



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

CALOGÊNESE *IN VITRO* 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

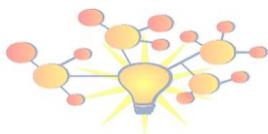
³Pesquisador/Dr. da Embrapa Amazônia Oriental

Resumo: Visando a obtenção de plantas resistentes à vassoura-de-bruxa (*Crinipellis pernicioso*) doença que causa superbrotamento e morte da planta, torna-se importante o desenvolvimento de técnicas de multiplicação para contemplar a procura crescente por genótipos de plantas resistentes. Em relação à ampla variabilidade genética do cupuaçuzeiro, apenas quatro clones elites, desenvolvidos pela Embrapa Amazônia Oriental, possuem resistência a essa doença, o que é insuficiente para contemplar toda a Região Norte e parte da Região Nordeste do país, devido os plantios serem altamente heterogêneos. Portanto, há uma necessidade de desenvolver tecnologias que possibilitem a multiplicação e o cultivo de cultivares que apresentem características favoráveis para os produtores, consumidores e indústrias alimentícias e cosméticas. Tentativas visando a embriogênese somática para essa espécie possibilitaram apenas a obtenção de calos embriogênicos. Este trabalho teve como objetivo desenvolver um protocolo de micropropagação para cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) K. Schum.) a partir de estaminóides e pétalas dessa espécie. Os tecidos vegetais foram coletados e desinfestados antes de serem inoculados em meio de cultura MS, mantidos no escuro por 14 dias, à temperatura de 25 ± 2 °C, antes de serem subcultivados. Os resultados foram obtidos no 6º mês de cultivo dos estaminóides, sendo observado o desenvolvimento de calos friáveis, enquanto as pétalas não responderam, sendo a oxidação dos explantes controlada com o uso de PVP.

Palavras-chave: estaminóides, cultivo *in vitro*, *Theobroma grandiflorum*

Introdução

O cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) K. Schum), é uma espécie frutífera da família Sterculiaceae, presente espontaneamente na mata de terra firme e várzea, no sul e leste do Pará, incluindo as áreas do médio Tapajós, rios Xingu e Guamá, abrangendo a pré-Amazônia maranhense. Atualmente o cupuaçu tem despertando enorme interesse devido o seu grande aproveitamento no mercado industrial, tanto na fabricação de cosméticos, sucos e biscoitos, como na



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

produção do cupulate, produto semelhante ao chocolate obtido do cacau. Os plantios dessa cultura apresentam-se desordenados, contendo também materiais susceptíveis à vassoura-de-bruxa, o que caracteriza como uma barreira para expansão da espécie, devido propiciar a disseminação da doença e comprometer as taxas de produção. Como alternativa, esforços são empregados no desenvolvimento de novas cultivares resistentes, via os programas clássicos de melhoramento genético. Atualmente, tenta-se associar técnicas biotecnológicas, como a cultura de tecidos, a esses programas, com o objetivo de acelerar algumas etapas do processo convencional de melhoramento. A obtenção de um protocolo de micropropagação para o cupuaçuzeiro será importante para aumentar a produção, em relação ao rendimento de polpa e principalmente produção de plantas resistentes, já que permitirá multiplicar plantas superiores em menor espaço e tempo. Assim, o objetivo desse trabalho foi desenvolver um protocolo de calogênese para o cupuaçuzeiro, visando o estabelecimento de uma metodologia para obtenção de embriões somáticos a partir de explantes dessa espécie em meio de cultura MS.

Material e Métodos

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Recursos Genéticos e Biotecnologia da Embrapa Amazônia Oriental, Belém-Pa. Estaminóides e pétalas, utilizados como fontes de explantes, obtidos dos botões florais maduros de cupuaçu do genótipo 215, proveniente do banco de germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental, coletados no período da manhã, foram lavados com sabão e água corrente antes de serem levados para câmara de fluxo laminar, onde foram desinfestados em álcool 70% por 1 minuto. Em seguida, foram incubados por 12 minutos em solução de hipoclorito de sódio a 1% com 2 gotas de tween-20 (20 gotas/100ml), seguidos de cinco lavagens em água destilada autoclavada. Com o auxílio de bisturi, os botões foram abertos para a excisão das pétalas e os estaminóides, os quais foram imersos em ácido cítrico (50M) até serem inoculados em meio MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com glutamina 250 mg.l^{-1} ; 2,4 D 2 mg.l^{-1} ; TDZ $0,005 \text{ mg.l}^{-1}$; sacarose 30 g.l^{-1} ; PVP $0,4 \text{ g.l}^{-1}$ (antioxidante); solidificado com 2 g.l^{-1} de fitagel e pH ajustado para 5,8, antes da autoclavagem. Foram montados 15 frascos com 15 estaminóides em cada e 15 frascos com 15 pétalas. Os explantes foram mantidos no escuro por 14 dias, à temperatura de $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, sendo subcultivados a cada 14 dias. As primeiras avaliações foram realizadas 5 semanas após a inoculação do do explante no meio MS, e quinzenalmente durante 28 semanas. Os experimentos foram avaliados de acordo com a porcentagem de frascos que resultaram em resposta *in vitro*, intensidade de oxidação e grau de desenvolvimento dos calos, de pelo menos um explante, já que tecidos de cupuaçu requerem



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

tempo prolongado para responder nessas condições.

Resultados e Discussão

Houve necessidade de um longo tempo de cultivo dos tecidos de cupuaçu até a observação das primeiras respostas de desenvolvimento *in vitro*, as quais foram observadas somente após o 6º mês de inoculação do explantes em meio de cultura MS. Apenas as repetições 1, 6 e 8 apresentaram desenvolvimento de calos de pelo menos um estaminóide dos 15 frascos inoculados, não sendo observado nenhuma resposta detectável das pétalas *in vitro*, sendo estas últimas posteriormente descartadas. Os calos originados dos tecidos dos estaminóides apresentaram coloração marrom-claro, com aspectos moles e brilhosos. Na repetição 1, 20% dos estaminóides inoculados responderam com desenvolvimento inicial, calos com tamanho variando entre 1-2 cm, na repetição 8 apenas 20% responderam com desenvolvimento médio, calos com tamanho variando entre 3-4cm, enquanto que a repetição 6 apresentou 40% do estaminóides com desenvolvimento abundante, calos com tamanho variando entre 4,5-6 cm. A oxidação se manteve ausente nos explantes e nos calos, devido ao uso do PVP.

Conclusões

Os estaminóides responderam satisfatoriamente quanto à obtenção de calos com aspecto embriogênicos.

O tempo prolongado para iniciar as primeiras respostas ainda é uma dificuldade para o desenvolvimento desse protocolo. Também, o cultivo de estaminóides com fitorreguladores deverão ser testados para reduzir o tempo de resposta *in vitro* e induzir a formação de embriões somáticos a partir desses tecidos de cupuaçu.

Referências Bibliográficas

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.

VELHO, C. C.; WHIPKEY, A.; JANICK, J. **Cupuassu: a new beverage for Brazil**. In INTERNATIONAL SYMPOSIUM NEW CROPS RESEARCH, DEVELOPMENTS ECONOMICS, 1., 1990, Portland. Advances in new crops: proceeding. Portland: Timber Press, 1990. p. 372-375.