

Anais da IX Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Occidental



ISSN 1517-3135

Dezembro, 2012

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Amazônia Ocidental
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos 100

Anais da IX Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental

*Ronaldo Ribeiro Morais
Cheila de Lima Boijink
Kátia Emidio da Silva
Regina Caetano Quisen*

Embrapa Amazônia Ocidental
Manaus, AM
2012

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Amazônia Ocidental

Rodovia AM 010, Km 29, Estrada Manaus/Itacoatiara

Caixa Postal 319

Fone: (92) 3303-7800

Fax: (92) 3303-7820

www.cpaa.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: *Celso Paulo de Azevedo*

Secretária: *Gleise Maria Teles de Oliveira*

Membros: *Edsandra Campos Chagas, Jeferson Luis Vasconcelos de Macêdo, Jony Koji Dairiki, José Clério Rezende Pereira, Kátia Emídio da Silva, Lucinda Carneiro Garcia, Maria Augusta Abtibol Brito, Maria Perpétua Beleza Pereira, Rogério Perin, Ronaldo Ribeiro de Moraes e Sara de Almeida Rios.*

Revisor de texto: *Maria Perpétua Beleza Pereira*

Normalização bibliográfica: *Maria Augusta Abtibol Brito*

Diagramação: *Gleise Maria Teles de Oliveira*

Capa: *Lúcio Rogerio Bastos Cavalcanti*

1ª edição

1ª impressão (2012): 300

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

CIP-Brasil. Catalogação-na-publicação.

Embrapa Amazônia Ocidental.

Morais, Ronaldo Ribeiro et al.

Anais da IX Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental / (editado por) Regina Caetano Quisen et al.

- Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2012.

320 p. (Embrapa Amazônia Ocidental. Documentos; 100).

ISSN 1517-3135

1. Pesquisa. 2. Ciência. I. Título. II. Série.

CDD 501

Indução de Calogênese em Tecidos Imaturos de *Theobroma grandiflorum*

Graziela Silva dos Santos

Regina Quisen

Resumo

O entendimento do processo de embriogênese somática em *Theobroma grandiflorum* (cupuaçuzeiro), além de auxiliar a produção em larga escala de plantas-elites, pode servir como base para programas de melhoramento do cupuaçuzeiro visando à produção de plantas resistentes a doenças, como a vassoura-de-bruxa, e à alta produção de frutos. Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo induzir a formação de estruturas embriogênicas *in vitro* a partir de explantes imaturos de plantas selecionadas de *T. grandiflorum*. A utilização em meio DKW de 2,4-D a 0,44 μM associado à TDZ a 0,002 μM induziu maior formação de calo em explante do tipo cógula (60%) comparada a 0,001 de TDZ, enquanto essas concentrações apresentaram mesma eficiência para explante do tipo lígula (20%). As pétalas não foram responsivas aos tratamentos testados. Segmentos da camada residual do tecido nucelar em sementes imaturas demonstraram elevada capacidade morfogênica proporcionando a formação de embriões somáticos nas condições testadas.

Palavras-chave: cupuaçuzeiro, cultura de tecidos, embriogênese somática.

Introdução

As biotecnologias modernas baseadas na cultura de tecidos de plantas são ferramentas de grande contribuição na produção de mudas clonais de qualidade genética e fitossanitária, as quais são obtidas partindo-se de metodologias *in vitro* desenvolvidas especificamente para cada espécie.

Dentre as diversas técnicas de cultura de células e tecidos de plantas, a embriogênese somática tem se destacado como “teoricamente” a melhor opção para a propagação de espécies perenes. Esse processo consiste no desenvolvimento de embriões a partir de células somáticas diploides ou haploides sem a fusão de gametas (SCHULTHEIS et al., 1990), formando uma estrutura bipolar independente, desenvolvida a partir da: (1) indução e ativação de células totipotentes; (2) formação de células ou grupo de células embriogênicas; (3) diferenciação bipolar; e (4) desenvolvimento do embrião segundo os estádios embrionários característicos, maturação e germinação de maneira similar àquela que ocorre com o embrião zigótico (TISSERAT, 1985).

A aplicação dessa técnica na clonagem *in vitro* de fruteiras tropicais, tal como o cupuaçuzeiro (*T. grandiflorum*), é ainda bastante incipiente e sem resultados conclusivos, principalmente no que diz respeito à definição de protocolos para produção massal de mudas clonais. Dentre os poucos estudos existentes com o gênero *Theobroma*, alguns autores concluíram que a ativação de uma resposta morfogenética *in vitro* pode estar relacionada a diversos fatores, como tipo e estágio de desenvolvimento dos explantes, meio de cultura e tipo e concentração de reguladores de crescimento (FERREIRA et al., 2005; LEDO et al., 2002; RODRIGUES, 2000).

Considerando que esses aspectos são essenciais para explorar o potencial dessa cultura e, dessa maneira, desenvolver técnicas como uma ferramenta para melhoramento, conservação e propagação massal

da espécie, este trabalho teve como objetivo induzir a formação de estruturas embriogênicas *in vitro* a partir de tecidos imaturos de plantas selecionadas de *T. grandiflorum*, e assim contribuir para o entendimento do processo de embriogênese somática dessa espécie.

Material e Métodos

Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, Amazonas.

Explantos e assepsia: sementes recém-colhidas de matrizes

Sementes recém-colhidas de matrizes selecionadas de cupuaçuzeiro (*T. grandiflorum*) foram despulpadas manualmente, lavadas em água corrente e imersas em solução hipoclorito de sódio comercial a 50% (v/v) por 24 horas. Após enxágue em água estéril, as sementes foram levadas para ambiente asséptico de câmara de fluxo laminar, das quais foram retirados segmentos da camada residual do tecido nucelar e imersos em álcool 70%, por 60 segundos, seguido de solução hipoclorito de sódio comercial a 50% (v/v) por 15 minutos sob agitação. Os explantes foram lavados em água estéril e novamente reduzidos para a seleção de fragmentos do tecido nucelar e posterior inoculação em meio de cultura.

Também foram coletados botões florais imaturos de matrizes selecionadas de cupuaçuzeiro, os quais foram desinfestados com a imersão em álcool 70% + Tween 20 (3 gotas/100 mL) por 60 segundos e, em seguida, em solução de hipoclorito de sódio comercial a 50% (v/v) por 15 minutos sob agitação e lavados cinco vezes em água destilada e autoclavada. Após assepsia, os botões florais foram abertos isolando-se os estaminódios, as lígulas e cógulas, para posterior inoculação em meio de cultura.

Meios de cultura e avaliação

As peças florais foram inoculadas em placas de petri contendo 30 mL de meio de indução à calogênese (MIC) composto por sais e vitaminas de DKW (DRIVER; KUNIYUKI, 1984) suplementado com 2% de glicose, 250 mg L⁻¹ de glutamina, 200 mg L⁻¹ inositol e 0,6% ágar. Os tratamentos foram constituídos pela auxina 2,4-D (0,44 μM) combinada com a citocinina TDZ (0,001 μM e 0,002 μM). As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 26 °C ± 2 °C na ausência de luz por 30 dias e então transferidas para meio de mesma composição por três subculturas consecutivas.

Os segmentos (tecido nucelar) foram inoculados inicialmente em meio MIC, sendo mantidos em sala de crescimento com temperatura de 26 °C ± 2 °C na ausência de luz por 20 dias e depois transferidos para meio de mesma composição por quatro subculturas consecutivas. Para a diferenciação embriogênica (MEB), os calos formados foram transferidos para meio DKW suplementado com os reguladores 2,4-D (0,11 μM ou 0,44 μM) em combinação com as citocininas BAP (0,11 μM) ou TDZ (0,001 μM). Na fase de diferenciação (MD), as estruturas embriogênicas foram transferidas para meio de cultura DKW na ausência (meio básico) e na presença de complementação com KNO₃ (0,3 g L⁻¹) e 2,5 μM dos aminoácidos arginina, glicina, leucina, lisina e triptofano (meio modificado). As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 26 °C ± 2 °C na ausência de luz por 20 dias.

O desenho experimental adotado foi inteiramente casualizado com 5 a 8 repetições por tratamento, sendo considerada como unidade amostral a placa contendo de 5 a 15 explantes cada. Ao final de cada subcultura foram avaliadas a presença ou ausência de calos, tipologia de calos (friáveis ou compactos, nodulares, globulares ou embriogênicos) e a perda de explantes (contaminação e oxidação). Na fase de diferenciação foi avaliada a produção de biomassa por meio da pesagem das estruturas formadas em cada tratamento no momento da subcultura e após 20 dias de crescimento. Os dados foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey a 5% de significância para a comparação de médias dos tratamentos.

Resultados e Discussão

A inoculação de peças florais resultou em elevada perda de explantes, devido principalmente à contaminação bacteriana. A formação de calos foi visível a partir 38 dias de cultura nos explantes cógula e lígula, que foram responsivos aos tratamentos aplicados (Tabela 1). Esses calos apresentaram aspecto semifriável e de coloração branca para todos os explantes. Assim como no presente trabalho, Traore (2000) também observou que estaminoides de flores de cacau foram mais responsivos do que pétalas, produzindo acima de 99% de estruturas embriogênicas e aproximadamente 20 embriões responsivos por explante. Igualmente a Lu (1993) e Ledo et al. (2002), este trabalho demonstrou que a combinação dos reguladores do tipo auxina e citocinina foi essencial para a promoção da divisão celular e formação de calos friáveis em *T. grandiflorum*, sendo importantes os ajustes no meio de cultura, de acordo o tipo de explante e genótipo.

Tabela 1. Comportamento de explantes florais de cupuaçuzeiro após 90 dias em meio de indução à calogênese. Manaus, fevereiro de 2012.

Tratamento	Porcentagem de explantes								
	Pétala			Cógula			Lígula		
	Calo	Inerte	Perda	Calo	Inerte	Perda	Calo	Inerte	Perda
1	0	35	65	20	7,5	72,5	20	15	65
2	0	42	58	40	0,0	60,0	20	14	66

Os segmentos de tecido residual da camada nucelar formaram calos que ao longo das subculturas diferenciaram-se e, ao final de 100 dias, os aglomerados com calos nodulares e globulares formaram estruturas pré-embriogênicas e embriões em diferentes fases de desenvolvimento. A aplicação do teste de F demonstrou não haver diferença significativa entre os meios de cultura testados, que resultaram no aumento em 3,7 (meio modificado) e 3,3 vezes (meio básico) à biomassa inicial de estruturas embriogênicas, pré-embriões e embriões somáticos.

Apesar de não distinguirem estatisticamente, observou-se que o meio de cultura modificado contribuiu para maior vigor e qualidade das estruturas embriogênicas formadas. Esse comportamento também foi observado por Traore (2000), ao submeter explantes florais de *Theobroma cacao* ao meio DKW complementado com mesmos aminoácidos e nitrato de potássio, concluindo que esses nutrientes contribuíram não somente para o aumento da taxa de conversão de embriões, mas também na produção de brotações normais. Esse mesmo autor alerta, no entanto, que a produção de grande número de embriões não significa maior produção de plantas aptas para aclimatação.

Conclusões

Para as condições nas quais foi conduzido o presente trabalho pode-se concluir que:

- Os explantes cógula e lígula, obtidos de flores imaturas de *T. grandiflorum*, responderam ao meio de indução à calogênese DKW suplementado com 2,4-D e TDZ com a formação de calos com aspecto branco e friável.
- O tecido residual da camada nucelar de sementes imaturas de cupuaçuzeiro apresentou elevada capacidade embriogênica e com a formação de eixos embrionários de maior qualidade quando cultivados em meio DKW básico complementado com KNO_3 ($0,3 \text{ g L}^{-1}$) e $2,5 \mu\text{M}$ dos aminoácidos arginina, glicina, leucina, lisina e triptofano

Agradecimentos

À Embrapa Amazônia Ocidental, pela oportunidade de desenvolvimento deste trabalho.

À Fapeam, pela concessão de bolsa de Iniciação Científica.

Referências

DRIVER, J. A.; KUNIYUKI, A. H. In vitro propagation of paradox walnut rootstock. **HortScience**, v. 19, n. 4, p. 507-509, 1984.

FERREIRA, M. G. R.; CARVALHO, C. H. S.; CARNEIRO, A. A.; DAMIÃO FILHO, C. F. Indução de embriogênese somática em cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum.). **Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal**, v. 27, n. 3, p. 500-503, dez. 2005.

LEDO, A. S.; LAMEIRA, O. A.; BENBADIS, A. K. Explantes de cupuaçuzeiro submetidos a diferentes condições de cultura in vitro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, n. 3, p. 604-607, 2002.

LU, C. The use of thidiazuron in tissue cultures. **In Vitro, Cellular and Developmental Biology Plant**, v. 29, n. 2, p. 92-96, 1993.

RODRIGUES, E. F. **Desenvolvimento do eixo embrionário in vitro e calogênese de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) e estabelecimento do ápice caulinar de bacuri (*Platonia insignis*)**. 2000. 70 f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2000.

SCHULTHEIS, J. R.; CHÉE, R. P.; CANTLIFFE, D. J. Embriões somáticos e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília, DF: EMBRAPA-CNPH / ABCTP, 1990. 433 p.

TRAORE, A. **Somatic embryogenesis, embryo conversion, micropropagation and factors affecting genetic transformation of *Theobroma cacao* L.** 2000. Tese (Doutorado) - The Pennsylvania State University, University Park, 2000.

TISSERAT, B. Embryogenesis, organogenesis, and plant regeneration. In: DIXON, R. A. (Ed.). **Plant cell culture: a practical approach**. Oxford: IRL, 1985. p. 79-105.