



Boletim de Pesquisa

ISSN 1517-2228

 Ministério
da Agricultura
e do Abastecimento

Número, 28

Dezembro, 2000

CULTURA *IN VITRO* DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE CUPUAÇUZEIRO

Embrapa

**CULTURA *IN VITRO* DE EMBRIÕES
ZIGÓTICOS DE CUPUAÇUZEIRO**

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL

Fernando Henrique Cardoso
Presidente

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO

Marcus Vinícius Pratini de Moraes
Ministro

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA

Conselho de Administração

Márcio Fortes de Almeida
Presidente

Alberto Duque Portugal
Vice-Presidente

Dietrich Gerhard Quast

José Honório Accarini

Sérgio Fausto

Urbano Campos Ribeiral

Membros

Diretoria-Executiva da Embrapa

Alberto Duque Portugal
Diretor-Presidente

Dante Daniel Giacomelli Scolari

Elza Ângela Battaglia Brito da Cunha

José Roberto Rodrigues Peres

Diretores

Embrapa Amazônia Oriental

Antonio Carlos Paula Neves da Rocha

Chefe Geral Interino

Jorge Alberto Gazel Yared

Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

Antonio Carlos Paula Neves da Rocha

Chefe Adjunto de Comunicação, Negócios e Apoio

Antonio Ronaldo Teixeira Jatene

Chefe Adjunto de Administração

CULTURA *IN VITRO* DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE CUPUAÇUZEIRO

Ana da Silva Ledo
Osmar Alves Lameira
Elisa Moura
Ilmarina Campos de Menezes



Exemplares desta publicação podem ser solicitados à:

Embrapa Amazônia Oriental

Trav. Dr. Enéas Pinheiro, s/n

Telefones: (91) 276-2307, 299-4544

Fax: (91) 276-9845

e-mail: cpatu@cpatu.embrapa.br

Caixa Postal, 48

66095-100 – Belém, PA

Tiragem: 300 exemplares

Comitê de Publicações

Leopoldo Brito Teixeira – Presidente

Antonio de Brito Silva

Expedito Ubirajara Peixoto Galvão

Joaquim Ivanir Gomes

José de Brito Lourenço Júnior

Maria do Socorro Padilha de Oliveira

Nazaré Magalhães – Secretária Executiva

Revisores Técnicos

Francisco José Câmara Figueirêdo – Embrapa Amazônia Oriental

Maria Rosa Costa – Embrapa Amazônia Oriental

Walnice Maria Oliveira do Nascimento – Embrapa Amazônia Oriental

Expediente

Coordenação Editorial: Leopoldo Brito Teixeira

Normalização: Isanira Coutinho Vaz Pereira

Revisão Gramatical: Maria de Nazaré Magalhães dos Santos

Composição: Euclides Pereira dos Santos Filho

LEDO, A. da S.; LAMEIRA, O.A.; MOURA, E.; MENEZES, I.C. de. **Cultura *in vitro* de embriões zigóticos de cupuacuzeiro**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2000. 15p. (Embrapa Amazônia Oriental. Boletim de Pesquisa, 28).

ISSN 1517-2228

1. Cupuaçu – micropropagação. 2. Cultura *in vitro*. 3. Teobroma grandiflorum.
I. EMBRAPA.

CDD: 634.65

Sumário

INTRODUÇÃO	6
MATERIAL E MÉTODOS	8
RESULTADOS E DISCUSSÃO	10
CONCLUSÕES	13
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	14

CULTURA *IN VITRO* DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE CUPUAÇUZEIRO

Ana da Silva Ledo¹
Osmar Alves Lameira²
Elisa Moura³
Ilmarina Campos de Menezes⁴

RESUMO: Este trabalho teve como objetivo estabelecer o protocolo para a obtenção de plântulas *in vitro*, a partir da conversão de embriões zigóticos de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum.). Os embriões zigóticos maduros foram excisados sob condições assépticas, a partir de sementes previamente despolpadas, obtidas de frutos maduros, e cultivados em dois substratos: ágar e vermiculita, na ausência e presença de meio de cultura MS e ½ MS. Após a quarta semana de inoculação, verificou-se o alongamento do eixo epicotilar e a formação do primeiro par de folhas. O substrato ágar a 0,6% promove maior percentagem de conversão de embriões (100%) quando comparado com a vermiculita (83,33%). As plântulas em ágar, na ausência de meio de cultura, apresentam maior crescimento da parte aérea (13,56cm), sendo que a adição de meio MS não proporciona aumento no comprimento da parte aérea em ambos os substratos. O melhor desempenho das plântulas cultivadas em ágar a 0,6% na ausência de meio de cultura fica bem evidenciado, entretanto a vermiculita também mostra-se como um substrato adequado, além de apresentar um baixo custo.

Termos para indexação: cultura de tecidos, micropropagação, *Theobroma grandiflorum*

¹Eng.-Agr., M.Sc., Pesquisadora da Embrapa Acre, Caixa Postal 392, CEP 69900-000, Rio Branco, AC.

²Eng.-Agr., Doutor, Pesquisador da Embrapa Amazônia Oriental, Caixa Postal 48, CEP 66017-970, Belém, PA.

³Bolsista PIBIC/CNPq da Embrapa Amazônia Oriental.

⁴Eng.-Agr., M.Sc., Técnica de Nível Superior da Embrapa Amazônia Oriental.

IN VITRO CULTURE OF CUPUASSU ZYGOTIC EMBRYOS

ABSTRACT: This work had as objective to establish protocol for the production of seedlings *in vitro* starting from the conversion of cupuassu zygotic embryos (*Theobroma grandiflorum* (Willd. former Spreng.) Schum.). The mature embryos zygotic was excised under aseptic conditions, starting from obtained seeds of mature fruits, and cultivated in two substrates: agar and vermiculite, in the absence and presence of MS e ½ MS medium. After the fourth week of inoculation, it was verified the growth of the epicotilar axis and the first pair's of leaves formation. The substrate agar at 0,6% promote larger percentage of conversion of embryos (100%) when compared with the vermiculite (83.33%). The seedlings in agar, in the absence of medium of culture, present larger growth of the aerial part (13.56 cm), and the addition of MS medium do not provide an increase in the length of the aerial part in both substrates. The best acting of the seedlings cultivated in agar at 0.6% in the absence of culture medium is well evidenced, however the vermiculite also show to be a substratum adapted besides presenting a low cost.

Index terms: tissue culture, micropropagation, *Theobroma grandiflorum*.

INTRODUÇÃO

O cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum.) é uma espécie frutífera da família Sterculiaceae, ocorrendo, espontaneamente, nas matas de terra firme e várzea alta, na parte sul e leste do Pará, abrangendo as áreas do médio Tapajós, rios Xingu e Guamá, alcançando a pré-Amazônia maranhense (Cavalcante, 1991; Venturieri, 1993). Atualmente o cupuaçu está disseminado por toda a bacia Amazônica e norte do Maranhão, sendo cultivado na Bahia, Espírito Santo, São Paulo e em outros estados brasileiros. O maior potencial de exploração da cultura é a produção de polpa para a fabricação de sorvetes, doces, geléias, néctar, licores, compotas, doces, bolos, biscoitos, iogurte e sucos. Das sementes pode-se obter o chocolate e também extrair uma gordura semelhante à manteiga de cacau, de alta digestibilidade (Venturieri, 1993).

Plantios desuniformes, associados à falta de material genético melhorado, têm sido apontados como os principais fatores que limitam a expansão da cultura do cupuaçuzeiro na Amazônia (Souza et al., 1992). Para atender esta demanda, instituições de pesquisas na região, nos últimos anos, têm implementado programas de melhoramento com ênfase à seleção de materiais com características de alta produção de frutos, rendimento de polpa e resistência à vassoura-de-bruxa (*Crinipellis perniciosa*), principal enfermidade da cultura.

A cultura de tecidos, em especial a micropropagação, quando integrada a um programa de melhoramento, torna-se uma técnica auxiliar muito valiosa, para clonagem, a curto prazo, de genótipos superiores e para acelerar programas de melhoramento genético. Dentre as técnicas de cultura de tecidos, a cultura de embriões, por tentar reproduzir *in vitro* o normal desenvolvimento de embriões, apresenta-se como uma ferramenta para o controle da embriogênese, o resgate de embriões interespecíficos quando apresentam alguma incompatibilidade, a produção de haplóides, a quebra de dormência e a produção de plântulas assépticas, além de elucidar alguns problemas como nutrição do embrião no óvulo, entre outras aplicações (Collins & Grosser, 1984; Hu & Ferreira, 1998).

A importância da cultura de embriões ocorreu devido à descoberta de que poderiam ser cultivados separadamente do tecido materno e de reserva, quando condições assépticas e nutricionais eram fornecidas. No cultivo asséptico, os embriões transpõem facilmente a fase de desinfestação por estarem protegidos dentro do fruto e da semente. Devido a este fator, ao alto poder regenerativo e à natureza juvenil, embriões têm sido usados como explantes para a propagação clonal e organogênese (Hu & Ferreira, 1998).

Os estudos sobre micropropagação do cupuaçuzeiro são incipientes, não se dispondo, até o momento, de protocolos para obtenção de plântulas *in vitro*.

As tentativas, via embriogênese somática, possibilitaram apenas a obtenção de calos embriogênicos sem a regeneração de plântulas normais (Velho et al., 1990).

Os objetivos do presente trabalho foram avaliar o desempenho de diferentes substratos, o efeito da presença de meio de cultura e estabelecer uma metodologia para a conversão *in vitro* de embriões zigóticos de cupuaçuzeiro em plântulas normais.

MATERIAL E MÉTODOS

As atividades foram realizadas no Laboratório de Recursos Genéticos e Biotecnologia da Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, conforme apresentado na Figura 1.

Os embriões zigóticos foram excisados de sementes, despulpadas manualmente com auxílio de tesoura, provenientes de frutos maduros de plantas da coleção de germoplasma de cupuaçuzeiro da Embrapa Amazônia Oriental. As sementes foram lavadas em água corrente e imersas em NaClO, a 2%, por 24 horas. Em seguida, após a lavagem das sementes com água autoclavada e destilada, procedeu-se a excisão dos embriões com a retirada do tegumento sob câmara de fluxo laminar.

Os embriões zigóticos foram submetidos ao procedimento de desinfestação em câmara de fluxo laminar, com a imersão em álcool etílico, a 70%, por um minuto e, em seguida, em solução de NaClO, a 2%, por 15 a 20 minutos sob agitação e, posteriormente, lavados cinco vezes em água destilada e autoclavada.

Foram testados como substratos o ágar e a vermiculita combinados com a ausência de meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) e com a presença de 30 ml de $\frac{1}{2}$ MS e MS, suplementado com 3% de sacarose. Após a desinfestação, os embriões zigóticos foram inoculados em frascos de vidro, com capacidade de 200 ml, contendo os seguintes tratamentos: 0,6% de ágar; 0,6 % de ágar + meio $\frac{1}{2}$ MS; 0,6% de ágar + meio MS; vermiculita + água destilada; vermiculita + meio $\frac{1}{2}$ MS e vermiculita + meio MS, perfazendo um total de seis tratamentos.

Coleta de frutos maduros



- Despoldamento manual das sementes com auxílio de tesoura;

Preparo e desinfestação das sementes



- Lavagem em água corrente;
- Imersão em NaOCl 2%/24horas;
- Lavagem em água esterilizada (3-5X).

Excisão e desinfestação de embriões



- Excisão dos embriões das sementes;
- Imersão em álcool 70%/ 1 min.;
- Imersão em NaOCl 2%/15 a 20 min.;
- Lavagem em água esterilizada (3-5 X).

Cultivo de Embriões



- Inoculação em ágar 0,6% ou vermiculita combinado com a ausência ou presença de meio de cultura MS e ½ MS.

Conversão de embriões em plântulas

- Condições de cultivo: temperatura $26 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade 70% e fotoperíodo de 16 horas de luz branca fria ($52 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de irradiância)/8 horas de escuro.

Figura 1. Fluxograma da metodologia adotada para conversão *in vitro* de embriões zigóticos em plântulas de cupuaçuzeiro.

O pH dos meios de cultura foi ajustado para 5,8 e a vermiculita foi previamente autoclavada por 30 minutos a 120°C. Todos os tratamentos foram submetidos à esterilização em autoclave a 120°C durante 15 minutos.

As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura variando de $26 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa do ar média em torno de 70% e fotoperíodo de 16 horas de luz branca fria ($52 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de irradiância/oito horas de escuro).

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2×3 (dois substratos e três meios de cultura), com cinco repetições. Cada unidade experimental foi constituída de dez frascos, contendo um embrião zigótico cada.

Aos 45 dias, por ocasião do encerramento do experimento, foram avaliadas a percentagem de conversão de embriões zigóticos em plântulas, percentagem de plântulas anormais, peso da matéria fresca da parte aérea (g), do sistema radicular (g) e dos cotilédones (g) e comprimento da parte aérea das plântulas (cm). Como plântulas anormais, foram consideradas plântulas que apresentavam o crescimento da parte aérea e do sistema radicular atrofiado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na primeira semana, após a inoculação, os cotilédones apresentavam-se intumescidos e com coloração esverdeada. Aos sete dias observou-se o lançamento da radícula e, em seguida, o seu rápido crescimento, com o posterior desenvolvimento de raízes secundárias. A partir da terceira semana ocorreu a emergência do epicótilo e dos nós cotiledonares, com a formação do gancho epicotilar. A alongação do gancho epicotilar e a formação do primeiro par de folhas, que se apresentavam cobertas com pêlos e com coloração roxo-avermelhada, foram verificados a partir da quarta semana após a inoculação.

Aos 45 dias, por ocasião do encerramento do experimento, as plântulas apresentavam o primeiro par de folhas com limbo bem desenvolvido e com coloração esverdeada. Em todos os tratamentos testados não foi verificada a formação de plântulas anormais. As fases descritas anteriormente concordam, em parte, com as observadas por Oliveira (1993) e Venturieri (1993) em condições *ex vitro*. Provavelmente, devido à ausência do tegumento, o desenvolvimento das plântulas *in vitro* foi mais rápido.

Houve efeito significativo da interação "substrato x meio de cultura" para o peso da matéria fresca da parte aérea e dos cotilédones. Não foi detectada interação significativa para a percentagem de conversão de embriões zigóticos em plântulas, peso da matéria fresca do sistema radicular e comprimento da parte aérea; entretanto houve efeito significativo do substrato para a percentagem de conversão de embriões zigóticos, e do substrato e meio de cultura para o peso da matéria fresca dos cotilédones e comprimento da parte aérea.

O meio ágar, a 0,6%, promoveu maior percentagem de conversão de embriões zigóticos (100 %), quando comparado com a vermiculita (83,33%), conforme apresentado na Tabela 1. Estes resultados discordam dos obtidos por Lopes (2000), que obteve maiores percentagens de germinação em sementes de mogno (*Swietenia macrophylla*) em vermiculita, quando comparado com meio MS + ágar. Provavelmente a incidência de 10% de contaminação, quando os explantes foram inoculados em vermiculita, contribuiu para a menor emergência das plântulas.

Quanto ao peso da matéria fresca da parte aérea, as plântulas em vermiculita, na ausência de solução nutritiva, apresentaram maior crescimento (1,90g). Com relação ao comprimento da parte aérea, os embriões zigóticos inoculados em meio ágar originaram plântulas mais vigorosas que apresentaram, em média, 13,56cm. Entretanto, a adição de meio MS não proporcionou o aumento no crescimento em ambos os substratos (Tabela 1). Provavelmente o excesso de sais no meio de cultura promoveu o aumento do potencial osmótico, conseqüentemente diminuindo o potencial hídrico, o que pode ter influenciado o processo de absorção de água pelas plântulas, comprometendo o seu crescimento.

TABELA 1. Médias da percentagem de conversão de embriões zigóticos (%CEZ) em plântulas aos dez dias de cultura, do peso da matéria fresca da parte aérea (PMFPA), do sistema radicular (PMFSR), dos cotilédones (PMFCO) e do comprimento da parte aérea (CPA) de plântulas de *Theobroma grandiflorum* aos 45 dias de cultura, em função do tipo de substrato e do meio de cultura. Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA, Brasil, 2000.

	% CEZ			Média
	Ausência de MS	½ MS	MS	
Ágar 0,6 %	100,00	100,00	100,00	100,00 ^a
Vermiculita	90,00	90,00	70,00	83,33b
Média	95,0	95,0	85,0	
	PMFPA (g)			Média
	Ausência de MS	½ MS	MS	
Ágar 0,6 %	1,31Ab	1,58Aa	1,20Aa	1,37
Vermiculita	1,90Aa	0,93Bb	0,96Ba	1,26
Média	1,61A	1,26AB	1,08B	
	PMFSR (g)			Média
	Ausência de MS	½ MS	MS	
Ágar 0,6 %	1,14	1,25	1,10	1,33
Vermiculita	1,58	1,13	1,30	1,17
Média	1,36	1,19	1,20	
	PMFCO (g)			Média
	Ausência de MS	½ MS	MS	
Ágar 0,6 %	7,00	6,15	6,71	6,62 ^a
Vermiculita	6,22	5,07	5,23	5,51b
Média	6,61A	5,61AB	5,97B	
	CPA (cm)			Média
	Ausência de MS	½ MS	MS	
Ágar 0,6 %	14,03	14,45	12,20	13,56 ^a
Vermiculita	14,25	9,70	8,80	10,92b
Média	14,14A	12,08AB	10,50B	

Médias seguidas por letras minúsculas, na coluna, e por letras maiúsculas, na linha, não diferem estatisticamente entre si, ao nível de 5 %, pelo teste de Tukey.

Considerando que os cotilédones, presentes na semente de cupuaçu, têm a função de armazenar substâncias de reservas até a plântula tornar-se autotrófica, a presença de solução nutritiva no meio externo torna-se dispensável para o crescimento inicial de plântulas cultivadas *in vitro*. Conforme relatado por Hu & Ferreira (1998), embriões excisados no estágio maduro ou próximos a este são quase autotróficos e, em geral, dependendo da espécie, não há necessidade de suplementação de fonte de energia e os reguladores de crescimento tornam-se dispensáveis.

Apesar da vermiculita umedecida com solução nutritiva favorecer a formação de raízes pelo maior grau de aeração (Caldas et al., 1998), não foram verificadas diferenças significativas entre os substratos estudados sobre o peso da matéria fresca do sistema radicular. Entretanto, observou-se que os cotilédones mantidos em ágar, na ausência de sais, apresentaram maior peso da matéria fresca.

O melhor desempenho das plântulas cultivadas em ágar 0,6% na ausência de solução nutritiva fica bem evidenciado, entretanto a vermiculita também mostrou ser um substrato adequado, além de apresentar um baixo custo.

CONCLUSÕES

A conversão *in vitro* de embriões zigóticos de cupuaçuzeiro, isolados de sementes em completo estágio de maturação fisiológica, origina plântulas completas e normais;

Os substratos ágar e vermiculita são adequados para a cultura de embriões de cupuaçuzeiro;

Não é necessária a presença de meio de cultura para a conversão de embriões zigóticos e para o crescimento inicial de plântulas cultivadas *in vitro*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CAVALCANTE, P.B. **Frutas comestíveis da Amazônia**. Belém: MPEG, 1991. 230p.
- COLLINS, G.B.; GROSSER, J.W. Culture of embryos. In: VASIL, I.K., ed. **Cell culture and somatic cell genetics of plants**. New York: Academic Press, 1984. v.1, p.241-257.
- CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A., ed. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/ Embrapa-CNPH, 1998. v.1, p.87-132.
- HU, C.Y.; FERREIRA, A.G. Cultura de embriões. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A., ed. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/ Embrapa-CNPH, 1998. v.1, p.371-393.
- LOPES, S.C. **Micropropagação do mogno (*Swietenia macrophylla* King)**. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, 2000. 54p. Dissertação Mestrado.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, n.3, p.473-497, 1962.
- OLIVEIRA, M.C.C.de. **Descrição morfológica do processo germinativo das sementes de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum.)**. Manaus: UFA, 1993. 44p. Monografia apresentada para a obtenção do grau de Engenharia Agrônômica.
- SOUZA, A.G.C.; GUIMARÃES, R.R.; NUNES, C.D.M. **Melhoramento genético do cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* (Willd ex Spreng) Schum)**. Manaus: Embrapa-CPAA, 1992.4p (Embrapa-CPAA. Pesquisa em andamento, 12).

- 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**: proceedings. Portland: Timber Press, 1990. p.372-375.
- VENTURIERI, G.A. **Cupuaçu**: a espécie, sua cultura, usos e processamento. Belém: Clube do Cupu, 1993. 108p.



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Ministério da Agricultura e do Abastecimento
Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Oriental
Trav. Dr. Enéas Pinheiro s/n, Caixa Postal 48
Cep 66017-970 - Belém - PA.
Fone: (91) 299-4544 - Fax (91) 276-9845
<http://www.embrapa.com.br>

Patrocínio:



MINISTÉRIO DA AGRICULTURA
E DO ABASTECIMENTO

