

8-009

Resposta de tecidos de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum.) à concentração de auxina e meio líquido (8)

Maria das Graças Rodrigues FERREIRA¹, Carlos Henrique Siqueira de CARVALHO², Andréa Almeida CARNEIRO³ e Carlos Ferreira DAMIÃO FILHO⁴

¹ CENA/USP, Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Av. Centenário, 303, Cx Postal 96. CEP - 13400-970, Piracicaba-SP. E-mail: mgrf23@hotmail.com

^{2,3} EMBRAPA MILHO E SORGO, Núcleo de Biologia Aplicada, Cx Postal 151. CEP - 35701-970, Sete Lagoas-MG.

⁴ UNESP, Jaboticabal, Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária, Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n. CEP - 14884-900, Jaboticabal-SP.

INTRODUÇÃO

O cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*) é uma árvore frutífera, pertencente à família das Sterculiaceas, que encontra-se disseminada por toda a bacia Amazônica, sendo esporadicamente encontrada em outros países como a Colômbia, Venezuela, Equador e Costa Rica (Venturieri et al., 1985). O maior valor da espécie está na polpa, que se encontra aderida às sementes, é de cor branca-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., 1984; Venturieri et al., 1985). Face ao enorme potencial deste fruto nos mercados interno e externo, surge a necessidade de incrementar as pesquisas básicas com esta valiosa espécie do gênero *Theobroma*. Certas espécies de plantas são recalcitrantes à obtenção de calos em quaisquer tipos de explantes, sendo que algumas gramíneas e muitas espécies lenhosas só produzem calos quando são empregadas doses altíssimas de auxinas no meio de cultura (Damião Filho, 1995). Singha (1982) observou aumento da disponibilidade e absorção de nutrientes pelos explantes, quando estes foram colocados em meios líquido e semi-sólido. Os meios líquidos também permitem melhor diluição de exsudatos oriundos do explante, evitando, desta forma, o acúmulo de compostos tóxicos. Este trabalho teve como objetivo estudar o efeito da concentração de auxina e do meio líquido sobre o desenvolvimento de calos de cupuaçu.

METODOLOGIA

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Biologia Celular do Núcleo de Biologia Aplicada, pertencente à Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG. Foram utilizados como fonte de explantes, eixos embrionários e cotilédones, obtidos de sementes de frutos imaturos de cupuaçu. As sementes foram imersas em solução de 20% de hipoclorito de sódio (alvejante comercial), durante 10 minutos, seguindo-se três lavagens com água bidestilada. Em condições assépticas, os cotilédones foram segmentados e os eixos embrionários das sementes foram divididos em: região da plúmula, radícula e hipocótilo. A seguir, esses explantes foram esterilizados com solução Ao (anti oxidante) por 1 hora e, posteriormente, imersos numa solução de 9 ml LS (sais e vitaminas MS - Murashige e Skoog, 1962) + 1 ml de Ao por dez minutos. Os explantes foram cultivados em placas de Petri descartáveis e as culturas mantidas em sala de crescimento, com temperatura variando de 24 a 28° C em condições de escuro. Para cada condição foram feitas 10 repetições empregando-se os seguintes meios: **Meio 1:** (50%) sais MS (2,15 g/L) sacarose (60 g/L), água de coco (100 ml/L), 2,4-D (1; 2; 4; 8 mg/L), cinetina (0,5 mg/L), gelrite (2,5 mg/L) e pH 5,3 antes da autoclavagem;

Meio 2: sais N6 (4 g/L), acrescidos de vitaminas N6 (1000 x) (1 ml/L), sacarose (20 g/L), caseína hidrolizada (100 mg/L), 2,4-D (0; 2; 4 mg/L), ANA (0; 3; 5 mg/L), água de coco (50 ml/L), phytigel (2,5 g/L) e pH 5,8; **Meio 3:** igual ao meio anterior suplementado apenas com ANA (3 mg/L); **Meio 4:** (100%) sais MS (4,30 g/L), acrescidos de vitaminas LS (1 ml/L), sacarose (60 g/L), inositol (100 mg/L), ANA (1 mM), phytigel (3,0 g/L), pH 5,8.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após 6 semanas, calos foram observados em segmentos de eixos embrionários no meio 1, em todas as concentrações de 2,4-D testadas, com ênfase para a região do hipocótilo. Explantes cultivados nas concentrações menores de 2,4-D (1 e 2 mg/L) apresentaram calos com aspecto branco e brilhante, enquanto aqueles cultivados nas maiores concentrações (4 e 8 mg/L) apresentaram um aumento distinto de tamanho, boa formação de calos brancos, com partes amareladas, aspecto gelatinoso, que secaram após alguns subcultivos. Janick (1986) afirmou que altas concentrações de 2,4-D mais água de coco estimulam a produção de calo e anulam a indução de embrião. Para segmentos cotiledonares, nas concentrações menores de 2,4-D, os explantes ficaram cobertos por calos grandes, brancos e brilhantes, que ficavam amarelados, enquanto que nas concentrações mais altas (4 e 8 mg/L) houve apenas a formação de massa calosa branca, seguida de escurecimento. Após 8 semanas, verificou-se o escurecimento e morte dos calos em todas as concentrações empregadas, o que poderia ser atribuído à combinação de 2,4-D com água de coco. Estes resultados concordam com os de Kononowicz et al. (1984), empregando embriões zigóticos imaturos de cacau, que observaram escurecimento e morte dos calos, em resposta à combinação de água de coco e 2,4-D acima de 2 mg/L. Após 6 semanas no meio 2, notou-se a presença de raiz em segmentos de hipocótilo, no meio sem regulador de crescimento, e calos em segmentos radiculares. Estes efeitos podem ser devidos à presença de água de coco no meio de cultura. Legrand et al. (1984) concluíram que a água de coco favoreceu a rizogênese e calogênese em hipocótilo de plântulas de cacau, com emprego de meio básico, sem regulador de crescimento. Calos brancos friáveis foram observados em todos os outros meios empregados, sendo estes mais pronunciados também na região do hipocótilo. Os meios que continham apenas ANA (3; 5 mg/L) apresentaram o maior número de raízes acompanhados de massa calosa enquanto os meios que continham ANA e 2,4-D (3; 2 mg/L) apresentaram calos brancos e raízes. Com cotilédones também houve indução de calos, que escureceram e secaram, não sendo evidenciado nenhum calo embriogênico nestes meios. Os calos foram subcultivados a cada 15 dias nestes meios e, após um mês, foram transferidos para meio líquido, sem regulador de crescimento, a fim de estimular o aparecimento de estruturas embriogênicas. Ranch (1993) afirmou que a maturação em meio líquido facilitaria a pronta conversão de maior número de embriões somáticos. As culturas foram dispostas em frascos Erlenmeyer, os quais foram mantidos sob agitação contínua em agitador a 120 r/min, intercalando luz e escuro. Após 3 dias nestas condições, observou-se aumento de tamanho dos explantes, bem como escurecimento dos mesmos. Após 15 dias nestas condições, as culturas foram transferidas para um meio sólido, no caso o meio 3, empregando-se 3 mg/L de ANA, com o objetivo de estimular o aparecimento de estruturas embriogênicas. Apesar do escurecimento dos explantes, 3 semanas após observou-se o aparecimento de calos amarelos, com aspecto friável. Estes resultados também foram obtidos por Figueira e Janick (1993), empregando tecido nucelar de cacau como explante. As culturas foram mantidas nesse meio durante 5 semanas sendo, em seguida, transferidas para um meio de regeneração, o meio 4. As culturas foram subcultivadas a cada 7 dias neste meio e, após um mês, observou-se que os calos permaneceram indiferenciados.

CONCLUSÕES

1. a região do hipocótilo do eixo embrionário de cupuaçu apresentou maior calosidade;

2. as maiores concentrações de 2,4-D (4 e 8 mg/L) promoveram bom desenvolvimento de segmentos de eixos embrionários, acompanhados de calos brancos;
3. ANA promoveu o aparecimento de raízes e formação de massa calosa;
4. a combinação de ANA e 2,4-D (3; 2 mg/L) promoveu o aparecimento de raízes e calos brancos em segmentos de hipocótilo;
5. a água de coco favoreceu a rizogênese e calogênese em meio sem reguladores;
6. o meio líquido favoreceu o aparecimento de calos friáveis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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).
- DAMIÃO FILHO, C. F. **Cultura de tecidos de plantas: micropropagação**. Jaboticabal: FUNEP, 1995. 25 p.
- FIGUEIRA, A.; JANICK, J. Development of nucellar somatic embryos of *Theobroma cacao*. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n. 336, p. 231-38,1993.
- JANICK, J. Embryogenics: the technology of obtaining useful products from the culture of asexual embryos. In: CROCOMO, O. J. (Ed.). **Biotechnology of plants and microorganisms**. Ohio: State University Press, 1986. p. 97-117.
- 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.
- 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.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A . Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p. 473-497, 1962.
- RANCH, P. J. The potential for synthetic soybean seed. In: REDENBAUGH, K. (Ed.). **Synseeds: applications of synthetic seeds to crop improvement**. Florida: CRC PRESS, 1993. p. 329--51.
- SINGHA, S. Influence of agar concentration on *in vitro* shoot proliferation of *Malus* sp. "Almey" and *Pyrus communis* "Seckel". **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 107, n. 4, p. 657-660, 1982.
- VENTURIERI, G. A.; ALVES, M. L. B.; NOGUEIRA, M. Q. O Cultivo do cupuaçuzeiro. **Informativo SBF**, Itajaí, v. 4, n.1. 1985.