

DETERMINAÇÃO DO NÍVEL DE PLOIDIA EM CUPUAZEIRO SEM SEMENTES¹

Vicente Haroldo de Figueiredo MORAES²
Larissa Alexandra Cardoso MORAES³

RESUMO: O objetivo deste trabalho é determinar o nível de ploidia do cupuazeiro aspérmico. A contagem dos cromossomos foi realizada em células do meristema subapical das extremidades dos ramos, porque esse tecido possui células grandes, que permitem melhor espalhamento dos cromossomos e facilitam a contagem. O cupuazeiro sem sementes é um triploide natural, com 30 cromossomos. O número de cloroplastos e o tamanho das células-guarda, bem como a espessura das folhas, está de acordo com o estado triploide do cupuazeiro de frutos sem sementes. Essa triploidia natural sugere que novos triploides aspérmicos podem ser obtidos de cruzamentos entre diploides e tetraploides induzidos por colchicina, cujas vantagens presumíveis são discutidas.

TERMOS PARA INDEXAÇÃO: *Theobroma grandiflorum*, Cromossomos, Aspermia, Meristema Subapical.

DETERMINATION OF THE PLOIDY LEVEL IN A SEEDLESS 'CUPUAÇU'

ABSTRACT: The objective of this work was to determine the ploidy level of the seedless "cupuaçu". The chromosomes were counted in cells of tips sub apical meristem of branches, because the cells of this tissue are larger allowing a better spreading and an easier chromosome count. The seedless "cupuaçu" is a natural triploid, with 30 chromosomes. The number of chloroplasts and the size of stomata guard cells as well as the leaf thickness are in agreement with the triploid state of the seedless cupuaçu. This natural triploid suggests that new seedless triploids can be obtained from crosses between diploids and colchicines-induced tetraploids whose presumable advantages are discussed.

INDEX TERMS: *Theobroma grandiflorum*, Chromosomes, Aspermy, Sub Apical Meristem

¹ Aprovado para publicação em 25.08.06

² Engenheiro Agrônomo, B.S., Pesquisador da Embrapa Amazônia Ocidental. E-mail: vicente@cpaa.embrapa.br

³ Engenheira Agrônoma, M. Sc., Pesquisadora da Embrapa Amazônia Ocidental. E-mail: larissa@cpaa.embrapa.br

1 INTRODUÇÃO

O cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*) de frutos sem sementes foi obtido pela propagação por enxertia de uma matriz encontrada no município de Cametá (PA) (CALZAVARA; MULLER; KAWAGE, 1984). Apesar das expectativas que esse achado provocou, a produção muito baixa de frutos foi certamente a causa principal da não expansão do seu cultivo.

Vários exemplos de espécies sem sementes cultivadas, com núcleos triploides, como é o caso bem conhecido da bananeira (OCHSE et al., 1961) e de outras espécies (EIGSTI; DUSTIN, 1947) sugeriam que o cupuaçuzeiro aspérmico fosse também um triploide, o que possibilitaria a obtenção de novos triploides sem sementes, pelos cruzamentos entre diplóides e tetraploides induzidos por colchicina, conforme o método descrito para a obtenção de melancia triploide, sem sementes (EIGSTI ; DUSTIN, 1947).

Este trabalho tem, portanto, o objetivo de determinar o nível de ploidia do clone de cupuaçuzeiro aspérmico.

2 MATERIALE MÉTODOS

2.1 CONTAGEM DE CROMOSSOMOS

O material para contagem dos cromossomos foi colhido de plantas adultas de frutos com sementes e do clone sem sementes originado da matriz de Cametá (CALZAVARA; MULLER; KAWAGE, 1984), do Campo Experimental da Embrapa Amazônia Ocidental, localizado no município de Manaus, (AM).

Em testes iniciais, feitos com primórdios foliares, não foi possível obter um bom espalhamento dos cromossomos, necessário à contagem, por causa do pequeno tamanho das células e a contagem também foi prejudicada porque a visibilidade ficou reduzida pela grande quantidade de pêlos.

Um melhor espalhamento foi obtido com células do meristema subapical, maiores que as dos primórdios foliares. A coleta foi feita quando as brotações estavam iniciando o alongamento, fase em que ocorrem as mitoses do meristema subapical. Foram excluídos com lâmina de barbear, no laboratório, as folhas novas em expansão, o meristema apical, com os primórdios foliares, e a epiderme do meristema subapical.

Um segmento de caule com cerca de 5 mm, logo abaixo do meristema apical, contendo o meristema subapical, foi colocado em frasco com 10 mL de solução saturada de para-diclorobenzeno, para promover a contração dos cromossomos metafásicos (MAJUMDER, 1964), adicionando-se uma gota de óleo de rícino a essa solução, para facilitar o espalhamento dos cromossomos (SWAMINATHAN; NATARAJAN, 1957). O frasco com o tecido e a solução foi mantido durante quatro horas na geladeira (5°C a 12°C).

Antes de fixar em solução 3:1 (v:v) de etanol absoluto com ácido acético glacial, o material foi lavado em água destilada por 15 minutos. O material permaneceu no fixador, em frasco tampado,

em temperatura ambiente, durante cerca de 12 horas.

Após a fixação, o material foi lavado três vezes, por imersão durante 15 minutos em etanol 70% e tratado por três horas em mistura de celulase 0,5% e pectinase 0,5%, para dissolver a parede celular (NARAYAN, 1976). Em seguida, foi lavado três vezes em água destilada, por 15 minutos e deixado por 20 a 24 horas em carmin hidroclórico alcoólico (SNOW, 1963). O excesso de corante foi lavado em etanol 70%, sendo, posteriormente, realizado o esfregaço em ácido acético 45%. As contagens dos cromossomos foram feitas com ocular 18x e objetiva 40x.

Foram também preparadas cinco lâminas de pontas de radícula, de sementes em início de germinação, adotando-se método idêntico ao descrito para o meristema subapical.

2.2 DADOS ANATÔMICOS

Foram colhidas em dias ensolarados (entre 13:00 h e 14:00 h) as folhas do último lançamento foliar maduro de cupuaçuzeiros comuns, com sementes, e as de uma planta de frutos sem sementes. Os terços médios das folhas foram fixados em FAA (5% de formalina, 5% de ácido acético glacial e 90% de etanol em solução aquosa a 70%), por 24 horas, a temperatura ambiente, sendo, posteriormente, lavados em água de torneira e transferidos para etanol 70%.

A epiderme inferior do material fixado, guardada em etanol 70%, foi seccionada com

lâmina de barbear e as secções foram montadas em lâmina com lugol (1,0 g de iodeto de potássio e 0,2 g de iodo metálico, em 100 mL de solução aquosa). Os cloroplastos, identificados pela reação do amido com iodo, foram contados com ocular 18x e objetiva 40x, em 30 células-guarda de cupuaçuzeiros com sementes e 30 do clone aspérmico, com cálculo da média e do desvio padrão.

Secções da epiderme inferior das mesmas amostras utilizadas na contagem dos cloroplastos foram coradas com azul de toluidina 0,05% aquosa, durante 3 a 5 minutos. O excesso do corante foi removido com água destilada e feita a montagem das lâminas com glicerina. As medições do comprimento de 30 células-guarda por amostra foram feitas com ocular micrométrica 12,5x e objetiva 100x, de imersão, das quais foram calculadas a média e o desvio padrão..

Das mesmas amostras foram também feitos cortes transversais do mesófilo, a mão livre, em áreas das folhas sem nervuras salientes. Os cortes foram corados em safranina, com remoção do excesso do corante por imersão rápida em água destilada, seguida de montagem em glicerina. Com ocular micrométrica 12,5x e objetiva 40x, foram feitas 30 medições do comprimento do palissádico e da espessura do mesófilo, das quais foram calculadas a média e o desvio padrão.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 CONTAGEM DE CROMOSSOMOS

No cupuaçuzeiro de frutos com sementes foram encontrados 20 cromossomos no meristema subapical, com quatro pares de cromossomos pequenos (Figura 1 A). Na ponta das radículas, também, foram encontradas células com 20 cromossomos, porém acompanhadas, freqüentemente, por células nas quais foram contados entre 35 e 38 cromossomos. Devido à dificuldade de visualização não foi possível fazer a contagem exata, mas admitiu-se que

sejam células tetraplóides, cuja presença tem sido registrada em raízes de várias espécies (MATHYSSE; TORREY, 1969). No meristema subapical do cupuaçuzeiro aspérmico foram encontrados 30 cromossomos, com seis pares de cromossomos pequenos, que em algumas lâminas não ficaram bem corados pelo carmin (Figura 1 B). O cupuaçuzeiro aspérmico é, portanto, um triplóide natural, que de acordo com Wet (1980) e Hermsen (1982), pode surgir por fecundação de gameta não reduzido, geralmente o gameta feminino.

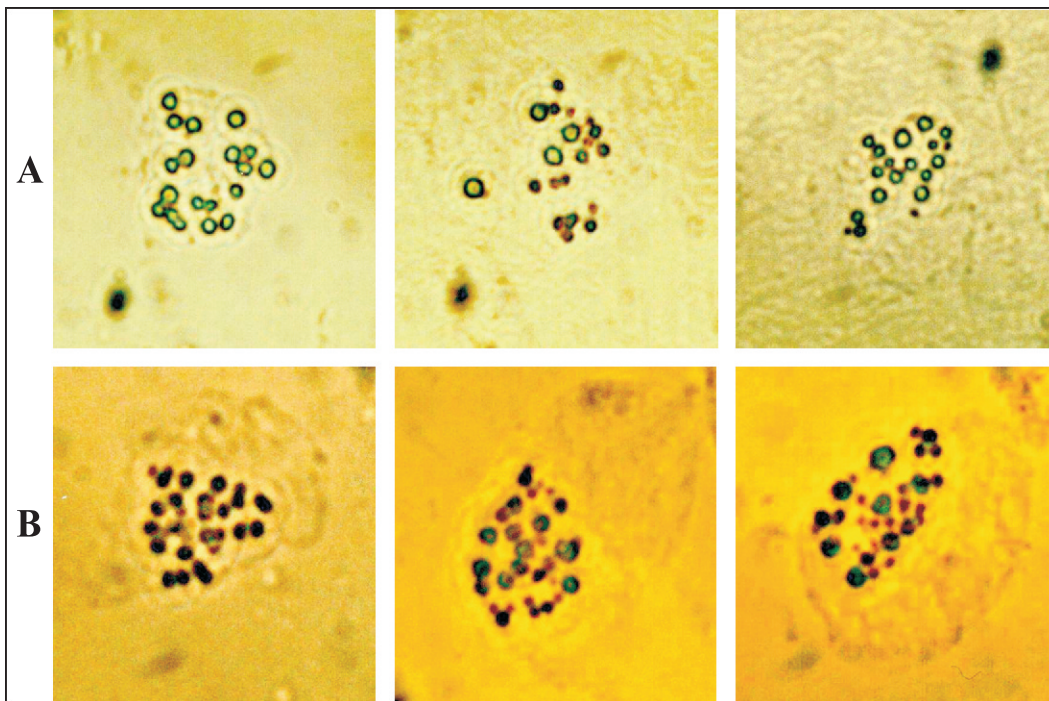


Figura 1- A) Núcleos de células de cupuaçuzeiro com sementes. B) Núcleos de células de cupuaçuzeiro sem sementes. Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, AM, 2001.

3.2 DADOS ANATÔMICOS

A Tabela 1 contém a média e o desvio padrão das contagens do número de cloroplastos das células guarda dos estômatos e do comprimento dessas células, da

espessura do mesófilo e do comprimento do palissádico. Verifica-se que essas características anatômicas apresentam valores maiores nas folhas do cupuaçuzeiro sem sementes.

Tabela 1- Média e desvio padrão de caracteres anatômicos de folhas de cupuaçuzeiro com sementes e de cupuaçuzeiro aspérmico.

Caracteres anatômicos	Com sementes	Aspérmico
Número de cloroplastos por célula guarda (μ)	4,0 \pm 0,16	5,9 \pm 0,23
Comprimento das células guarda dos estômatos (μ)	11,73 \pm 0,05	14,34 \pm 0,07
Espessura do mesófilo (μ)	156,9 \pm 8,8	209,1 \pm 9,1
Comprimento do palissádico (μ)	52,9 \pm 6,7	73,9 \pm 6,7

O número de cloroplastos das células guarda é maior em plantas da mesma espécie com nível de ploidia mais alto, como no algodão (CHANDARI; BARROW, 1975) e na beterraba (DUDDLEY, 1958).

O tamanho maior dos estômatos e a maior espessura do mesófilo da variedade aspérmica, determinada principalmente pelo maior comprimento do palissádico, são também características típicas dos poliplóides (WARDLAW, 1952; SINNOT, 1960).

O número de cloroplastos das células-guarda e o tamanho dos estômatos poderão ser utilizados na identificação preliminar de plantas triplóides, e, provavelmente, também de tetraplóides, mas a abundância de pêlos da epiderme abaxial dificulta a visibilidade dos estômatos. Neste, caso, é preferível medir a espessura do mesófilo, quando o número de plantas a examinar for grande. Essas características apresentam a vantagem de

poderem ser determinadas em tecido vegetativo, sem a necessidade de aguardar a brotação das gemas para a contagem de cromossomos.

A constatação da existência de um triplóide natural sem sementes sugere que podem ser obtidos novos triplóides aspérmicos, pelos cruzamentos entre diplóides e tetraplóides induzidos pelo tratamento com colchicina (EIGSTI; DUSTIN, 1947; RIZZONI; PALLITTI, 1973).

De acordo com Zeven (1980), devem ser atendidas as seguintes condições para a estabilidade e o sucesso agrônomico dos poliplóides:

a) número pequeno de cromossomos (poliplóides com mais de 60 cromossomos, tendem a excluir cromossomos durante a divisão celular);

b) os cromossomos não devem ser muito grandes;

c) a espécie deve ser alógama, pois a heterozigose é mais favorável à viabilidade dos poliplóides;

d) se o produto comercial for constituído de parte vegetativa, há maior probabilidade de sucesso, porque os poliplóides são geralmente estéreis.

Os resultados do presente trabalho mostram que as duas primeiras condições são atendidas pelo cupuaçuzeiro, sendo também a terceira, pois o cupuaçuzeiro é espécie predominantemente alógama (VENTURIERI; RIBEIRO FILHO, 1996).

A quarta condição evidentemente não é atendida. Uma possibilidade é a de que a baixa produção de frutos do cupuaçuzeiro sem sementes seja devido à auto-incompatibilidade do único clone disponível, e que o plantio de vários triplóides que vierem a ser obtidos de diferentes genótipos resulte em produção econômica de maior número de frutos.

Outra possibilidade é que, se o pólen de todos os triplóides for estéril, sem crescimento de tubo polínico, como na melancia triplóide (KIHARA, 1951), deve-se plantar os triplóides em mistura com diplóides, como doadores de pólen, em proporção ainda a ser determinada. No caso da melancia a recomendação de Kihara (1951) é de plantar 20% de diplóides.

Apesar da argumentação de Dewey (1980), de que o desempenho dos poliplóides na agricultura não correspondeu às previsões

anunciadas, a tentativa de obtenção de novos triplóides de cupuaçuzeiro é justificada pelas vantagens presumíveis dos frutos sem sementes. Além do maior rendimento de polpa por fruto, o custo do despulpamento torna-se mais baixo e deve ocorrer menor alteração na estrutura da polpa. O produto do despulpamento mecânico dos frutos com sementes tem menor aceitação no preparo de doces (CALZAVARA; MULLER; KAWAGE, 1984). É também provável que os frutos sem sementes sofram menos danos da broca dos frutos (*Chronotrachelus humeripictus*), pois esta se alimenta das sementes (RIBEIRO, 1992).

4 CONCLUSÃO

A variedade de cupuaçuzeiro de frutos sem sementes é um triplóide natural, cujas células somáticas contêm 30 cromossomos.

O tamanho dos estômatos, o número de cloroplastos por célula-guarda e a espessura do mesófilo permitem distinguir plantas triplóides de diplóides.

REFERÊNCIAS

- CALZAVARA, B.B.G.; MÜLLER, C.H.; KAWAGE, O.N.C. *Fruticultura tropical: o cupuaçuzeiro: cultivo, beneficiamento e utilização do fruto*. Belém: EMBRAPA-CPATU, 1984. 101p. (Documentos, 32).
- CHANDHARI, N. K.; BARROW, J. R. Identification of cotton haploids by stomatal chloroplasts-count technique. *Crop Science*, Madison, v.15, n.6, p.760-763, 1975.

- DEWEY, D.R. Some applications and misapplications of induced polyploidy to plant breeding. In: LEWIS, W.L. (Ed.). *Poliploidy: biological relevance*. New York: Plenum Press, 1980. p.445-471
- DUDDLEY, J.W. Number of chloroplasts in the guard cells of inbred lines of tetraploid sugar beets. *Agronomy Journal*, Madison, v.50, n.1, p.169-170, 1958.
- EIGSTI, O.J.; DUSTIN, P. *Colchicine in agriculture, medicine, biology and chemistry*. Ames: Iowa College Press, 1947. 470 p.
- HERMSEN, J.G.T. Origin and breeding of polyploids. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF THE SECTION MUTATION AND POLYPLOIDY OF THE EUROPEAN ASSOCIATION FOR RESEARCH ON PLANT BREEDING, 1981, Wageningen. *Proceedings...* Wageningen: Centre for Agriculture Publishing and Documentation, 1982. p.85-95.
- KIHARA, H. Triploid watermelons. *Proceedings of the American Society of Horticultural Science*, Baltimore, v.58, n.5, p.217-230, 1951.
- MAJUMDER, S.K. Chromosome studies of some species of *Hevea*. *Journal of the Rubber Research Institute of Malaysia*, Kuala Lumpur, v.18, n.5, p.269-275, 1964.
- MATHYSSE, A.G.; TORREY, J.G. Factors limiting the stimulation of polyploid mitosis in intact pea roots and excised root segments. *Botanical Gazette*, Chicago, v.130, n.1, p.62-64, 1969.
- NARAYAN, R.K.J. A technique for cytological preparations following enzymatic digestion of pollen mother cell walls. *Stain Technology*, Baltimore, v.50, n.6, p.387-390, 1976.
- OCHSE, J.J.; SOULE, J.; DIJKMAN, M.J.; WEHLBORG, C. *Tropical and subtropical agriculture*. New York: Macmillan, 1961. v.1.
- RIBEIRO, G.O. *A cultura do cupuaçuzeiro em Rondônia*. Porto Velho: EMBRAPA-Rondônia, 1992. 32 p. (Documentos, 27).
- RIZZONI, M.; PALITTI, F. Regulatory mechanisms of cell division. I. Colchicine induced endoreplication. *Experimental Cell Research*, San Diego, v.7, n.3, p.450-458, 1973.
- SINNOT, E.W. *Plant morphogenesis*. New York: McGraw Hill, 1960. 550 p.
- SNOW, R. Alcoholic hydrochloric acid-carmin as a stain for chromosome in squash preparations. *Stain Technology*, Baltimore, v.38, n.1, p.9-13, 1963.
- SWAMINATHAN, M.S.; NATARAJAN, A.T. Chromosome spreading induced by vegetable oils. *Stain Technology*, Baltimore, v.32, n.1, p.43-45, 1957.
- VENTURIERI, G.A.; RIBEIRO FILHO, A.A. A polinização manual do cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*). *Acta Amazônica*, Manaus, v.25, n.34, p.181-192, 1996.

WARDLAW, A.G. *Phylogeny and morphogenesis*. London: McMillan, 1952. 536p.

WET, J.M.J. Origin of polyploids. In: LEWIS, W.L. (Ed.). *Polyploidy: biological relevance*. New York: Plenum Press, 1980. p. 3-16.

ZEVEN, J.M.J. Polyploidy and domestication : The origin and survival of polyploids in cytotypes mixtures. In: LEWIS, W.L. (Ed.). *Polyploidy: biological relevance*. New York: Plenum Press, 1980. p.385-407.