

# CULTURA *IN VITRO* DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE CUPUAÇUZEIRO (*Theobroma grandiflorum* Schum.)<sup>1</sup>

Ana da Silva LEDO<sup>2</sup>

Osmar Alves LAMEIRA<sup>3</sup>

Abdellatif Kemaleddine BENBADIS<sup>4</sup>

Sebastião MEDEIROS FILHO<sup>5</sup>

Ilmarina Campos de MENEZES<sup>6</sup>

**RESUMO:** Este trabalho teve como objetivo estabelecer o protocolo para a obtenção de plântulas a partir da cultura *in vitro* de embriões zigóticos de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* Schum.). Os embriões zigóticos foram excisados, sob condições assépticas, de sementes obtidas de frutos maduros, e inoculados em dois substratos: ágar e vermiculita, na ausência e presença de meio de cultura MS e ½ MS. O substrato ágar a 0,6% promoveu maior percentagem de conversão de embriões em plântulas (100%) quando comparado com a vermiculita (83,33%). As plântulas em ágar, na ausência de meio de cultura, apresentaram maior comprimento da parte aérea (13,56 cm), sendo que a adição de meio MS não proporcionou aumento no crescimento da parte aérea em ambos os substratos.

**TERMOS PARA INDEXAÇÃO:** Cultura de Embriões, *Theobroma grandiflorum*, Meio de Cultura, Substrato.

## *IN VITRO* CULTURE OF CUPUASSU ZYGOTIC EMBRYOS (*Theobroma grandiflorum* Schum.)

**ABSTRACT:** This work had as objective to establish protocol for the obtaining of seedlings starting from the *in vitro* culture of cupuassu zygotic embryos (*Theobroma grandiflorum* Schum.). The zygotic embryos were excised under aseptic conditions, starting from seeds of mature fruits, and cultivated in two substrates: agar and vermiculite, in the absence and presence of MS e ½ MS media. The substrate agar at 0,6% promoted larger percentage of conversion of embryos in seedlings (100%) when compared with the vermiculite (83,33%). The seedlings in agar, in the absence of medium of culture, presented larger shoot length (13,56 cm), and the addition of MS medium didn't provide an increase in the shoot growth in both substrates.

**INDEX TERMS:** Culture of Embryos, *Theobroma grandiflorum*, Culture Medium, Substrate.

<sup>1</sup> Aprovado para publicação em 4.11.2003

Parte da tese de Doutorado apresentada pelo primeiro autor ao curso de pós-graduação em Fitotecnia da Universidade Federal do Ceará-UFC, financiada com recursos da Embrapa Amazônia Oriental.

<sup>2</sup> Engenheira Agrônoma, D.Sc., Pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros CP 44, CEP49025-040, Aracaju, SE. E-mail: analedo@cpatc.embrapa.br.

<sup>3</sup> Engenheiro Agrônomo, D.Sc., Pesquisador da Embrapa Amazônia Oriental, CP 48, CEP 66017-970, Belém, PA.

<sup>4</sup> Engenheiro Agrônomo, PhD, Professor Visitante do Departamento de Fitotecnia da UFC, Av. Mister Hull, s/n, CEP 60020-181, Campus do Pici, Fortaleza, CE.

<sup>5</sup> Engenheiro Agrônomo, D.Sc., Professor do Departamento de Fitotecnia da UFC, Fortaleza, CE.

<sup>6</sup> Engenheira Agrônoma, M.Sc., Técnica de Nível Superior da Embrapa Amazônia Oriental.

## 1 INTRODUÇÃO

O cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* 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 outras regiões do país. 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; GUIMARÃES; NUNES, 1992). Para atender esta demanda, instituições de pesquisa 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 pernicioso*), 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, em 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, a produção de plântulas assépticas, elucidar alguns problemas como nutrição do embrião no óvulo, entre outras aplicações (COLLINS; GROSSER, 1984; HU; FERREIRA, 1998).

A terminologia cultura de embriões, segundo Rappaport citado por Hu e Ferreira (1998), tem sido empregada para descrever os processos de crescimento e desenvolvimento do embrião zigótico *in vitro*, independentemente da idade, tamanho e estágio de desenvolvimento em que o embrião foi excisado. A importância da cultura de embriões se deu devido à descoberta de que poderiam ser cultivados separadamente do tecido maternal e de reserva, quando condições assépticas e nutricionais eram fornecidas (ANDREOLI, 1985). No cultivo asséptico, os embriões transpõem facilmente a fase de desinfestação por estarem protegidos dentro do fruto e 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 objetivos do presente trabalho foram avaliar o efeito de diferentes substratos e da adição de meio de cultura na conversão *in vitro* de embriões zigóticos e estabelecer um protocolo de obtenção de plântulas *in vitro* de cupuaçuzeiro.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

As atividades foram conduzidas no Laboratório de Recursos Genéticos e Biotecnologia da Embrapa Amazônia Oriental, Belém (PA). 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. Após a lavagem das sementes com água autoclavada e destilada, procedeu-se à 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 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 ½ MS e MS, suplementados com 1,5 e 3,0 % de sacarose, respectivamente. 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 ½ MS; 0,6 % de ágar + meio MS; vermiculita + água destilada; vermiculita + meio ½ MS e vermiculita + meio MS, totalizando seis tratamentos.

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 °C ± 2, umidade relativa do ar média em torno de 70 % e fotoperíodo de 16 horas de luz branca fria (52 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> de irradiância) oito horas de escuro.

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 3 (dois substratos e três meios de cultura), com cinco repetições. Cada unidade experimental foi constituída de 10 frascos, contendo um embrião cada.

Aos 45 dias da inoculação, as variáveis analisadas foram: a percentagem de conversão de embriões zigóticos em plântulas, os pesos da massa fresca da parte aérea (g), do sistema radicular (g) e dos cotilédones (g) e o comprimento da parte aérea das plântulas (cm). Como plântulas anormais, foram consideradas as que apresentavam o crescimento da parte aérea e do sistema radicular atrofiado.

### 3 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 com rápido crescimento, e, posteriormente, o desenvolvimento de raízes secundárias (Figura 1A). A partir da terceira semana ocorreu a emergência do epicótilo e dos nós cotiledonares, e a formação do gancho epicotilar (Figura 1B). 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 verificadas a partir da quarta semana após a inoculação (Figura 1C). Aos 45 dias após

a inoculação, as plântulas apresentavam o primeiro par de folhas com limbo bem desenvolvido e com coloração esverdeada. Em todos os embriões inoculados não houve a formação de plântulas anormais. As fases descritas anteriormente concordam com as observadas por Venturieri (1993), entretanto, devido à ausência do tegumento e as condições ambientais controladas, o desenvolvimento das plântulas *in vitro* foi mais rápido. Resultados semelhantes foram obtidos por Castro et al. (2001) que observaram maior velocidade de germinação e de crescimento e desenvolvimento de embriões de murici (*Byrsonima intermedia* A. Juss) desprovidos de tegumento.

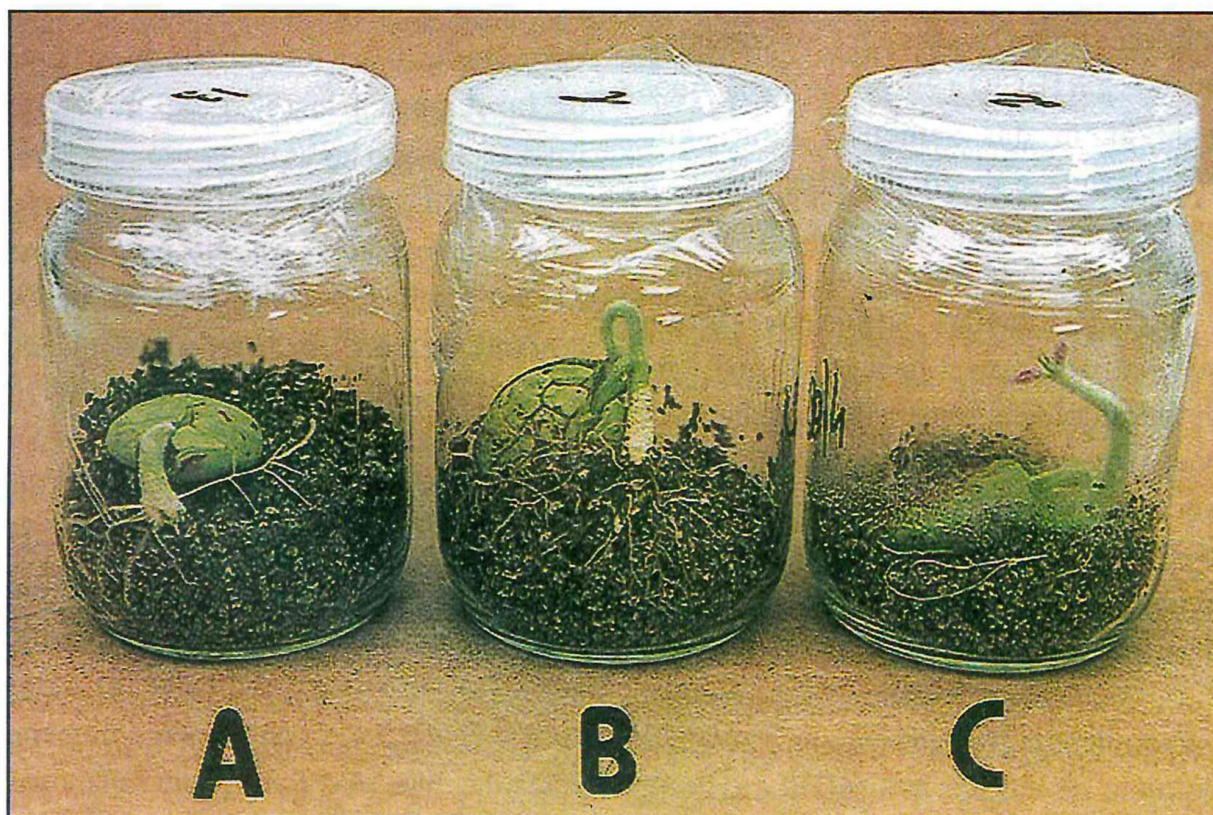


FIGURA 1 - Desenvolvimento *in vitro* de embriões zigóticos de *Theobroma grandiflorum*. A- lançamento da radícula e desenvolvimento de raízes secundárias; B- emergência do epicótilo e nós cotiledonares e formação do gancho epicotilar; C- alongação do gancho epicotilar e emissão do primeiro par de folhas. Embrapa Amazônia Oriental, Belém (PA) 2000

De acordo com as análises de variâncias (Tabela 1), houve efeito significativo da interação substrato x meio de cultura para o peso da massa fresca da parte aérea. Não foram detectadas interações significativas para a percentagem de conversão de embriões zigóticos em plântulas, pesos da massa fresca do sistema radicular e dos cotilédones e comprimento da parte aérea. Houve efeito significativo do substrato para a percentagem de conversão de embriões zigóticos, peso da massa fresca dos cotilédones e comprimento da parte aérea e do meio de cultura para o peso da massa fresca dos cotilédones e comprimento da parte aérea. Não foram detectados efeitos significativos dos fatores estudados sobre o peso da massa fresca do sistema radicular.

O substrato ágar a 0,6 % promoveu maior percentagem de conversão de

embriões zigóticos em plântulas (100 %), quando comparado com a vermiculita (83,33 %), conforme a Tabela 2. Estes resultados discordam dos obtidos por Lessa (1998) e Lopes (2000) que obtiveram maiores percentagens de germinação em sementes de mogno (*Swietenia macrophylla*) e de macieira (*Malus domestica*), respectivamente, em vermiculita quando comparado com o ágar. A incidência de 10 % de contaminação, quando os embriões foram inoculados em vermiculita, contribuiu para a menor emergência das plântulas.

As plântulas em vermiculita e na ausência de meio de cultura apresentaram maior acúmulo de massa fresca na parte aérea (1,9 g) e a adição de meio de cultura em ágar não influenciou significativamente o peso da massa fresca da parte aérea.

TABELA 1 - Resumo das análises de variâncias para médias da percentagem de conversão de embriões zigóticos em plântulas (%CEZ), dos pesos da massa fresca da parte aérea (PMFPA), do sistema radicular (PMFSR) e dos cotilédones (PMFCO) e do comprimento da parte aérea (CPA) de plântulas de *Theobroma grandiflorum*, em função do tipo de substrato (SUB) e do meio de cultura (MC). Embrapa Amazônia Oriental, Belém (PA) Brasil, 2000.

Fontes de Variação	G.L.	Quadrados Médios				
		CEZ (%)	PMFPA (g)	PMFSR (g)	PMFCO (g)	CPA(cm)
SUB	1	2083,33**	0,0790ns	0,2253ns	9,3856**	52,4041**
MC	2	333,33ns	0,7189**	0,0883ns	2,5527**	33,3241**
SUB X MC	2	333,33ns	0,9963**	0,1959ns	0,3090ns	16,5115ns
Resíduo	24	291,67	0,1360	0,1016	0,3449	5,0819
CV (%)		18,63	28,04	25,47	9,81	18,42

\*\* - significativo ao nível de 1 % pelo teste F.

ns - não significativo ao nível de 5 % pelo teste F.

Os embriões zigóticos inoculados em ágar originaram plântulas mais vigorosas, que apresentaram, em média, 13,56 cm de comprimento da parte aérea, sendo que a adição de meio de cultura não proporcionou um aumento no crescimento em ambos os substratos (Tabela 2). A pressão osmótica é um fator a ser considerado, uma vez que elevadas pressões osmóticas reduzem o crescimento e afetam o metabolismo celular (NICKELL; MARETZKI, 1969<sup>7</sup> citados por CALDAS; HARIDASAN; FERREIRA, 1998). Provavelmente, os sais presentes no meio de cultura promoveram um aumento do potencial osmótico, conseqüentemente diminuindo o potencial hídrico, o que pode ter influenciado o crescimento e desenvolvimento das plântulas.

Os embriões mantidos em ágar e na ausência de meio de cultura apresentaram maior peso de massa fresca dos cotilédones (6,62g). Considerando que os cotilédones têm a função de armazenar substâncias de reservas até a plântula tornar-se autotrófica, a presença de meio de cultura torna-se dispensável para o crescimento inicial de plântulas cultivadas *in vitro*. Conforme relatado por Hu e 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, podendo germinar e crescer num meio inorgânico, e os reguladores de crescimento tornam-se dispensáveis. Entretanto, Llano-Agudelo, Gonzales-Rosas e Salazar-Garcia (1995) e Ledo et al. (2001) obtiveram a conversão *in vitro* de plântulas de *Persea americana* Mill cv. Americana e de *Euterpe oleracea* Mart., respectivamente, a partir de embriões zigóticos maduros cultivados em meio MS suplementado com reguladores de crescimento.

Apesar da vermiculita umedecida com solução nutritiva favorecer a formação de raízes pelo maior grau de aeração (CALDAS; HARIDASAN; FERREIRA, 1998), não foram verificadas diferenças significativas entre os substratos e entre a ausência ou presença de meio de cultura sobre o peso da massa fresca do sistema radicular das plântulas de cupuaçuzeiro. Este resultado discorda dos obtidos por Soares et al. (2001) que, estudando a cultura de embriões de jenipapo (*Genipa americana* L.), observaram maior desenvolvimento do sistema radicular de plântulas em meio de cultura WPM. Provavelmente, os requerimentos nutricionais no cultura *in vitro* de embriões zigóticos dependam da espécie e do estágio fisiológico dos embriões.

<sup>7</sup> NICKELL, L.G.; MARETZKI, A Nutritional and metabolic studies with sugarcane cell suspensions. In: SYMPOSIUM ON CONTINUOUS OF MICROORGANISMS, 4., 1969. *Proceedings...* p. 373-382.

Tabela 2 – Médias da porcentagem de conversão de embriões zigóticos (%CEZ) em plântulas aos 10 dias de cultura, dos pesos da massa fresca da parte aérea (PMFPA), do sistema radicular (PMFSR) e 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 %	100,0	100,0	100,0	100,00a
Vermiculita	90,0	90,0	70,0	83,33b
Média	95,0A	95,0A	85,0A	
	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	1,61	1,26	1,08	
	PMFSR (g)			Média
	Ausência de MS	½ MS	MS	
Ágar 0,6 %	1,14	1,25	1,10	1,33a
Vermiculita	1,58	1,13	1,30	1,17a
Média	1,36A	1,19A	1,20A	
	PMFCO (g)			Média
	Ausência de MS	½ MS	MS	
Ágar 0,6 %	7,00	6,15	6,71	6,62a
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	13,56a
Vermiculita	14,25	9,70	8,80	10,92b
Média	14,14A	12,08AB	10,50B	

Nota: 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.

#### 4 CONCLUSÃO

- a) é possível a conversão *in vitro* de embriões zigóticos, isolados de sementes em completo estágio de maturação fisiológica, em plântulas completas e normais;
- b) o substrato ágar é adequado para a cultura de embriões de cupuaçuzeiro;
- c) 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

- ANDREOLI, C. Cultura de embriões. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS, 1., 1985, Brasília, DF. *Anais...* Brasília, DF: EMBRAPA-CENARGEN, 1985. p.25-28.
- 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, DF: EMBRAPA-SPI/ EMBRAPA-CNPq, 1998. v.1, p.87-132.
- CASTRO, A.H.F.; ALVARENGA, A.A. de; PAIVA, R.; GOMES, G.A.C.; SANTOS, C.G. dos. Cultivo *in vitro* de embriões de murici (*Byrsonima intermedia* A. Juss). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 8., 2001, Ilhéus. *Anais...* São Carlos: SBFV/UESC; Ilhéus: CEPLAC-CEPEC, 2001. Seção 8-027. 1-CD-ROOM.
- 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.
- 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, DF: EMBRAPA-SPI/ EMBRAPA-CNPq, 1998. v.1, p.371-393.
- LEDO, A. da S.; LAMEIRA, O.A.; BENBADIS, K.A.; MENEZES, I.C. de.; LEDO, C.A. da; OLIVEIRA, M.S.P.de. Cultura *in vitro* de embriões maduros de açazeiro. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v.23, n.3, p.468-472, dez. 2001.
- LESSA, A.O. *Utilização de microenxertia para obtenção de plantas de Malus domestica Borkh livres do vírus da mancha clorótica das plantas de macieira*. 1998. 56p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 1998.)
- LLANO-AGUDELO, B.E.; GONZALEZ-ROSAS, H.; SALAZAR-GARCIA S. *In vitro* culture of mature avocado embryos. *Fruits*, Paris, v.50, n.1, p.59-64, jan./fev. 1995.
- LOPES, S.C. *Micropropagação do mogno (Swietenia macrophylla King)*. 2000. 54p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Pelotas, 2000.
- 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.
- SOARES, M.C.L.; BATISTA, M. dos J.F.; VIEIRA, I.M.S.; SERRA, A.G.P.; MOTA, M.G. da C. Produção *in vitro* de plântulas de jenipapo (*Genipa americana* L.). In: ENCONTRO LATINO-AMERICANO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL, 4., 2001, Goiânia. *Programa e Resumos...* Goiânia: REDBIO, 2001. 205p. p.87.
- 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).
- VENTURIERI, G.A. *Cupuaçu: a espécie, sua cultura, usos e processamento*. Belém: Clube do Cupu, 1993. 108p.