

ISOLAMENTO DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS E CRESCIMENTO DE PLÂNTULAS DE CLONES DE CAJUEIRO-ANÃO PRECOCE *IN VITRO*

Diva Correia¹, Geórgia Cravalho Anselmo², Cinthya Fontenele Vieira¹, José Dionis Matos Araújo¹, Celli Rodrigues Muniz¹

¹Embrapa Agroindústria Tropical, R. Dra. Sara Mesquita 2270, 60511-110, Fortaleza-CE, dcorreia@cnpat.embrapa.br. ²Universidade Estadual do Ceará, Av. Parajana, 1700 – Campus Itaperi, CEP 60740-020, Fortaleza, CE.

Introdução

A utilização dos clones de cajueiro-anão precoce teve início no Brasil dando grande impulso aos sistemas de cultivo (BARROS; CRISÓSTOMO; CAVALCANTE, 1994).

Nos anos 80 foram lançados os primeiros clones comerciais, sendo um deles o clone CCP76 (BARROS et al., 1993), que é utilizado em escala comercial, tanto para o plantio sequeiro como para o plantio irrigado, enfatizando a importância de genótipos superiores na produção da qualidade de castanhas. Na década de 90 foi lançado o clone BRS 226 ou Planalto, utilizado em escala comercial em cultivo de sequeiro (PAIVA et al., 2002).

A propagação vegetativa via enxertia tem sido a alternativa de clonagem do cajueiro e estudos de propagação *in vitro* são reduzidos (BOGGETTI; JÁSIK; MANTELL, 2001; CARDOZA; SOUZA, 2002). Entretanto, é necessário avanço de conhecimento dessa espécie. Dessa forma, há necessidade do desenvolvimento de metodologias que permitem a realização de estudos *in vitro* visando aspectos nutricionais, bioquímicos e moleculares. Adicionalmente, o cultivo *in vitro* de plantas permite que o material genético seja transportado em espaço reduzido e livre de contaminantes. O objetivo desse trabalho foi desenvolver uma metodologia para o isolamento de embriões zigóticos e crescimento de plântulas *in vitro* de cajueiro anão precoce.

Material e métodos

O estudo foi conduzido no laboratório de cultura de tecidos de plantas da Embrapa Agroindústria Tropical, em Fortaleza, Ceará. Foram utilizados frutos de dois clones de cajueiro-anão precoce, o BRS 226 e o CCP 76. Dos frutos, retirou-se o epicarpo e o mesocarpo. As amêndoas com a película (Figura 1) foram desinfestadas em uma solução de hipoclorito de sódio a 2% (v/v) acrescido de 3 gotas de Tween 20® para cada 100 mL da solução desinfestante, ficando sob agitação durante 30 minutos.

Em câmara de fluxo laminar, as amêndoas foram inseridas em uma solução desinfestante contendo 2 mL de PPM® (Plant Preservative Mixture) em 500mL de água

destilada e esterilizada sob agitação por 30 minutos. Logo após, foram realizadas quatro lavagens sucessivas em água destilada e esterilizada.

Com o auxílio de uma pinça e bisturi nº 11, os embriões foram resgatados e isolados em meio de cultura JADS (CORREIA et al., 1995) modificado, fazendo uso de 50% do volume da solução de ferro (Figura 1). O meio foi suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, benzilaminopurina (BAP 0,01 mg L⁻¹), ácido naftaleno acético (ANA 0,1 mg L⁻¹) e ácido giberélico (GA₃ 2 mg L⁻¹). Utilizou-se como agente solidificante o gelrite® (1,6 g L⁻¹). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 antes da adição do agente solidificante e, em seguida, foi distribuído 10 mL de meio em cada tubo de ensaio (capacidade 150 mm x 25 mm). Os tubos foram vedados com tampa de algodão. Desta forma, os tubos foram esterilizados em autoclave a 120 °C durante 10 minutos.

Em câmara de fluxo laminar, os embriões foram inoculados e mantidos durante 30 dias em sala de crescimento à temperatura de 27 ± 2°C, fotoperíodo de 12 horas/luz sob radiação fotossintética de 30 m⁻² s⁻¹. Durante este período, as culturas foram transferidas para meio novo a cada 7 dias. (Figura 1)

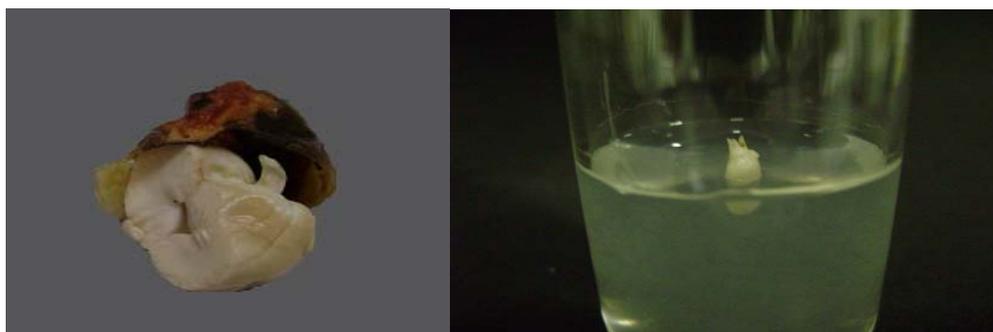


Figura 1. Amêndoa e embrião do clone CCP 76 *in vitro*.

Após este período, as culturas foram transferidas para frascos com capacidade de 250 mL contendo 30 mL de meio de cultura utilizado inicialmente. Nesta condição, as culturas permaneceram durante 150 dias, sendo transferidas para meio de cultura novo, a cada 30 dias.

As taxas de contaminação, de oxidação e de sobrevivência dos embriões foram avaliadas semanalmente durante 30 dias. Aos 180 dias, após a inoculação dos embriões, foram avaliados o número de plantas formadas e número médio de folhas desenvolvidas.

Resultados e Discussões

Na tabela 1 encontram-se os resultados do isolamento de embriões zigóticos dos clones CCP 76 e CCP 226. As contaminações foram observadas somente durante os primeiros 30 dias de cultivo. Os dados de contaminação indicam que o processo de desinfestação das amêndoas foi eficiente para o controle do crescimento de bactérias

(2,12% e 8,30%) e de fungos (0,70% e 2,43%) para os clones CCP 76 e BRS 226, respectivamente. Esses resultados sugerem que o uso da solução de hipoclorito de sódio seguida do uso de solução de PPM[®] é uma alternativa aos produtos comumente utilizados, como por exemplo, o cloreto de mercúrio (CARDOZA; SOUZA, 2002).

As taxas de oxidação apresentaram-se mais elevadas para ambos os clones sugerindo que as transferências sucessivas de meio a cada 7 dias durante os primeiros 30 dias não foram eficazes para o controle da liberação dos fenóis e outros exudados. A presença de oxidação nos embriões pode ter favorecido a redução do desenvolvimento dos mesmos, o que poderia explicar também as reduzidas taxas de sobrevivência (Tabela 1).

Tabela 1. Número, porcentagens de contaminação, de oxidação e de sobreviventes de embriões zigóticos e porcentagem de plântulas formadas e número médio de folhas desenvolvidas em plântulas de cajueiro anão precoce. Fortaleza (CE), 2010.

Clone	Embrião			Plântulas formadas		
	Nº isolados	Contaminados (%)	Oxidação (%)	Sobreviventes (%)	%	Média de nº de folhas
CCP 76	283	2,82	30,03	67,13	26,84	4,79 ± 0,46
BRS 226	205	10,73	28,78	60,48	33,87	2,24 ± 0,29

± erro padrão da média

O clone BR226 apresentou maior porcentagem de plantas formadas quando comparado à porcentagem obtida pelo clone CCP 76 como pode ser observado na tabela 1. Entretanto, as plântulas do clone CCP 76 apresentaram maior crescimento (Figura 2) e maior média de número de folhas quando comparado aos resultados alcançados pelo clone BRS 226 (Tabela 1). Tais resultados demonstram a variabilidade genética entre os clones.

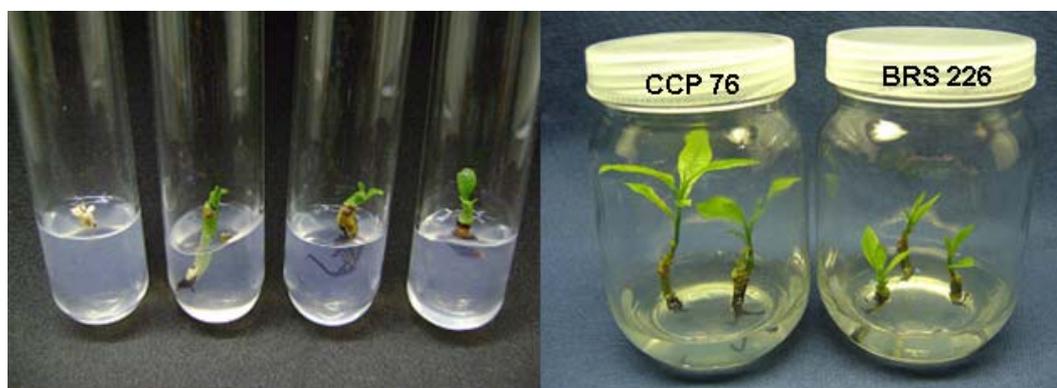


Figura 2. Crescimento de embriões do clone CCP 76 (esquerda) e plântulas desenvolvidas dos clones de cajueiro anão precoce CCP 76 e BRS 226 (direita).

Conclusão

A metodologia empregada no isolamento e desenvolvimento de embriões zigóticos de clones de cajueiro anão precoce CCP 76 e BRS 226 permitem a obtenção de plântulas *in vitro*.

Agradecimentos

À Funcap e a Embrapa pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

BARROS, L.M.; PIMENTEL, C.R.M.; CORREA, M.P.F.; MESQUITA, A.L.M. **Recomendações técnicas para a cultura do cajueiro anão precoce**. EMBRAPA/CNPAT: Fortaleza, 1993. 65p. (EMBRAPA-CNPAT. Circular Técnica, 1).

BARROS, L. de M; CRISÓSTOMO, J.R.; CAVALCANTE, J.J.V. Melhoramento populacional do cajueiro-anão precoce para características agrônômicas e industriais. In: **Congresso Brasileiro de Fruticultura**, nº13, v.1, Salvador: SBF, 1994, p. 293-294.

BOGGETI, B.; JÁSIK, J.; MANTELL, S.H. In vitro root formation in *Anacardium occidentale* microshoots. **Biologia Plantarum**, v. 44, n. 2, p. 175-179, 2001.

CARDOZA, V.; D'SOUZA, L. Induction, development and germination of somatic embryos from nucellar tissues of cashew (*Anacardium occidentale* L.). **Scientia Horticulturae**, v. 93, p. 367-372, 2002.

CORREIA, D.; GONÇALVES, A.N.; COUTO, H.Y.Z.; RIBEIRO, M.C. Efeito do meio de cultura líquido e sólido no crescimento e desenvolvimento de gemas de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* na multiplicação *in vitro*. **IPEF**, v. 48-49, p. 107-116, 1995.

PAIVA, J.R.; CARDOSO, J.E.; BARROS, L.M.; CRISÓSTOMO, J.R.; CAVALCANTI, J.J.V.; ALENCAR, E.S. **Clone de cajueiro-anão precoce BRS 226 ou Planalto**: nova alternativa para o plantio na Região Semi-Árida do Nordeste. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2002.