



## CALOGÊNESE *IN VITRO* EM CÓGULAS DE CUPUAÇUZEIRO (*Theobroma grandiflorum*)

Gleyce Kelly de Sousa Ramos<sup>1</sup>, Simone de Miranda Rodrigues<sup>2</sup>, Oriel Filgueira de Lemos<sup>3</sup>,  
Rafael Moysés Alves<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Bolsista Fapespa Embrapa Amazônia Oriental, Laboratório de Biotecnologia e Recursos Genéticos, [gleyceramos17@yahoo.com.br](mailto:gleyceramos17@yahoo.com.br)

<sup>2</sup>Pesquisadora da Embrapa Amazônia Oriental, Laboratório de Biotecnologia e Recursos Genéticos, [simone@cpatu.embrapa.br](mailto:simone@cpatu.embrapa.br)

<sup>3</sup>Pesquisador da Embrapa Amazônia Oriental, Laboratório de Biotecnologia e Recursos Genéticos, [oriel@cpatu.embrapa.br](mailto:oriel@cpatu.embrapa.br)

<sup>4</sup>Pesquisador da Embrapa Amazônia Oriental, Laboratório de Genética, [rafael@cpatu.embrapa.br](mailto:rafael@cpatu.embrapa.br)

**Resumo:** O trabalho teve por objetivo induzir calos *in vitro* a partir de explantes obtidos de botões florais de cupuaçuzeiro, cultivados em meio de cultura DKW. Os explantes foram inoculados em meio para crescimento de calos (CPC), transferidos para meio de crescimento secundário de calos (CSC), e após 14 dias foram transferidos para meio de desenvolvimento de embriões (DE). A avaliação ocorreu em função do tempo de permanência no primeiro meio de cultura e da concentração de fitorreguladores utilizados, totalizando 4 tratamentos, mantidos no escuro à temperatura de  $25 \pm 3^\circ\text{C}$ . O melhor resultado foi obtido quando cógulas foram cultivadas no primeiro meio de cultura usando 2,4-D  $4,0 \text{ mg. l}^{-1}$  e TDZ  $0,01 \text{ mg.l}^{-1}$ , e sacarose  $60 \text{ g.l}^{-1}$  e glicose  $2 \text{ g.l}^{-1}$  em meio de desenvolvimento, evidenciando eficiência no processo de indução de calogênese *in vitro* de cupuaçu.

**Palavras-chave:** calos *in vitro*, meio de cultura DKW, fruteira nativa, propagação vegetativa.

### Introdução

O mercado de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex. Spreng.) Schum.) durante 20 anos, ficou limitado às fronteiras amazônicas. No entanto, houve abertura do mercado de frutas exóticas a nível nacional e internacional, e com isso a necessidade de ampliar o cultivo (Alves, 2002). Porém, a falta de material genético melhorado associado a plantios desuniformes, e o fungo *Moniliophthora perniciosa*, causador da vassoura de bruxa, limitam a expansão da cultura. Nesse contexto torna-se importante a utilização da micropropagação, uma vez que permite produzir material uniforme e selecionado, e aumentar a produção. Estudos têm mostrado a capacidade de diferentes explantes de cupuaçuzeiro em formar calos, bem como a diferenciação de estruturas embriogênicas (Ledo, 2002).



Ainda não se dispõe de protocolos de micropropagação que permitam a clonagem e multiplicação de plântulas de cupuaçu. Como apresenta proximidade botânica com cacau (*T. cacao*), espera-se adaptar o protocolo de micropropagação estabelecido para cacau ao cupuaçu. Portanto, esse trabalho teve por objetivo induzir calos *in vitro* a partir de explantes florais de cupuaçuzeiro.

### Material e Métodos

Cógulas foram obtidas de botões florais da cultivar de cupuaçuzeiro, BRS Codajás (genótipo 186), do BAG da Embrapa Amazônia Oriental. Em câmara de fluxo laminar, os botões florais foram submetidos à assepsia com imersão em álcool comercial (92,8%) por 1 minuto, solução de  $\text{Ca}(\text{ClO})_2$  a 4% e 6 gotas de tween, por 15 min, e em seguida lavados por 5 vezes em água destilada autoclavada.

Os tratamentos foram montados considerando a concentração de fitorreguladores e tempo de permanência nos meios de cultura, sendo realizados quatro repetições com cinco cógulas para cada tratamento. As cógulas foram inoculadas em meio para crescimento primário de calos (CPC), contendo sais e vitaminas DKW (Driver e Kuniyuki, 1984); suplementado com 2,4-D  $4,0 \text{ mg.l}^{-1}$ , TDZ  $0,01 \text{ mg.l}^{-1}$ , acrescido de glicose  $20 \text{ g.l}^{-1}$ ; pH ajustado para 5,8, e usado phytigel a 0,2% como agente gelificante. Como mostrado na tabela 1, os explantes que permaneceram nessas condições por 14 dias foram definidos como T1 e T3, enquanto os explantes mantidos por 28 dias foram definido como T2 e T4. Em seguida todos os tratamentos foram transferidos para meio de crescimento secundário de calos (CSC), constituído de sais WPM (Lloyd & McCown, 1980), vitaminas de Gamborg; 2,4-D  $1,0 \text{ mg.l}^{-1}$ , BAP  $0,05 \text{ mg.l}^{-1}$ , glicose  $20 \text{ g.l}^{-1}$ , pH ajustado para 5,8, e semi solidificado com phytigel a 0,2%.

**Tabela 1.** Cultivo *in vitro* de cógulas de cupuaçuzeiro em diferentes tratamentos. CPC: meio de crescimento primário de calos; CSC: meio de crescimento secundário de calos; DEn: meio contendo sacarose 3 % e glicose 1%; EDd: meio contendo sacarose 6% e glicose 2%. Os explantes foram subcultivados a cada 14 dias em meio EDn ou EDd.

Tratamentos	CPC	CSC	DE
T1	14 dias	14 dias	DEn
T2	28 dias	14 dias	DEn
T3	14 dias	14 dias	DEd
T4	28 dias	14 dias	DEn

Após 14 dias, os calos foram transferidos para meios de desenvolvimento de embriões (DE) contendo sais e vitaminas DKW, açúcares, phytigel a 0,2%, e pH de 5,8 antes da autoclavagem. Os tratamentos também diferem na concentração dos açúcares. Os explantes do tratamento T1 e T2 foram cultivados em meio contendo sacarose  $30 \text{ g.l}^{-1}$  e glicose  $1 \text{ g.l}^{-1}$ ; enquanto nos tratamentos T3 e T4



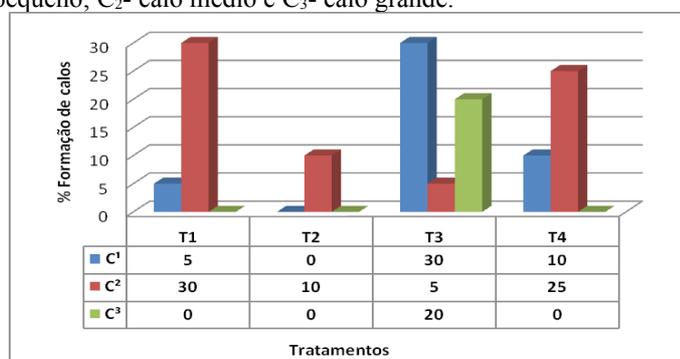
foram adicionados sacarose 60 g.l<sup>-1</sup> e glicose 2 g.l<sup>-1</sup>. Todos os tratamentos foram mantidos no escuro à temperatura de 25 ± 3°C e subcultivadas a cada 14 dias no meio ED.

Os resultados foram realizados considerando três estádios de desenvolvimento de calos: pequeno (massa calosa encontrada em alguns pontos do explante, geralmente na base da cógula onde se inicia a formação de calos); média (massa calosa recobrindo a base da mesma e outros pontos do explante); e calos grandes (explantes totalmente coberto pela massa calosa).

### Resultados e Discussão

Após 150 dias de cultivo, verificou-se a formação de calos em todos os tratamentos. A figura 1 apresenta o percentual do desenvolvimento de calos em diferentes estádios de desenvolvimento. O maior percentual de aparecimento de calos pequenos (C<sub>1</sub>) ocorreu no tratamento T3 com 30%, sendo todos com massa calosa redonda, brilhosa, coloração marrom clara de aspecto friável. Os maiores resultados para a formação de calos médio (C<sub>2</sub>) ocorreu nos tratamentos T1 e T4, em que 30% e 25% dos explantes calejaram, respectivamente. O surgimento dos calos no tratamento T1 ocorreu na base das cógulas, apresentando coloração marrom claro, formatos arredondados e brilho (semelhantes a calos friáveis); porém algumas cógulas foram recobertas com calos brancos, mais alongados e consistência endurecida. No tratamento T4 25% das cógulas apresentaram calos do tipo médio, apresentando coloração marrom escura na base, com pontuações brancas em alguns pontos e endurecidas, aparentemente não friáveis. A formação de calos grandes (C<sub>3</sub>) ocorreu apenas no tratamento T3, representado pela resposta de 20% das cógulas.

**Figura 1.** Percentagem do grau de formação de calos em cógulas de cupuaçuzeiro cultivados *in vitro* quando submetidos a diferentes tratamentos. C<sub>1</sub>- calo pequeno; C<sub>2</sub>- calo médio e C<sub>3</sub>- calo grande.



Desse modo, observou-se que a calogênese em T3, além de apresentar o maior percentual para formação de calos, apresentou também a maior porcentagem de calos com aspectos friáveis em explantes de cógula de cupuaçuzeiro. George (1993) afirmou que a renovação do meio conduz à



remoção de metabólitos tóxicos, fornecimento de nutrientes e hidratação, fatores que são prejudicados quando do crescimento do material vegetal em recipientes fechados. Também, a quantidade e o tipo de açúcar usado nos meios de cultura interferem na resposta morfogênica dos explantes. Esses estudos nortearão ensaios futuros, visado à obtenção de embriões somáticos e posterior regeneração de plantas para a propagação massal desta espécie.

### **Conclusão**

As combinações de 2,4-D 4,0 mg.l<sup>-1</sup> e TDZ 0,01 mg.l<sup>-1</sup> no meio para crescimento primário de calos, e sacarose 60 g.l<sup>-1</sup> e glicose 2 g.l<sup>-1</sup> no meio de desenvolvimento de embriões, promoveram as melhores respostas *in vitro*, com indução de calos de aspecto semelhantes a friáveis.

### **Agradecimento**

A Embrapa e a FAPESPA pela concessão de bolsa de iniciação científica.

### **Referências Bibliográficas**

- ALVES, R.M. **Caracterização genética de populações de cupuaçuzeiro *Theobroma grandiflorum* (Willd.ex.Spreng.) Schum., por marcadores microsatélites e descritores botânico-agronômicos.** Piracicaba, 2003. 146 f. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.
- DRIVER, J. A.; KUNIYUKI, A. H. In vitro propagation of Paradox walnut rootstock. **HortScience** 19:507-509; 1984.
- GEORGE, E. F. Plant tissue culture techniques. In: GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture.** Edington: Exegetics Limited, 1993, 574 p.
- LEDO, A. S.; LAMEIRA, O. A.; BENBADIS, A. K. Explantes de cupuaçuzeiro submetidos a diferentes condições de cultura *in vitro*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 24, n. 3, p. 604-607, Dezembro 2002.
- LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Combined Proceedings of International Plant Propagators' Society**, Seattle, v.30, p.421-427, 1980.