



CALOGÊNESE *IN VITRO* EM ESTAMINÓIDES DE CUPUAÇU

Simone de Miranda Rorigues¹, Gleyce Kelly de Sousa Ramos², Oriel Figueira de Lemos³, Ilmarina Campos de Menezes⁴, Rafael Moyses Alves⁵

¹ Pesquisador da Embrapa Amazônia Oriental, Laboratório de Biotecnologia e Recursos Genéticos, simone@cpatu.embrapa.br

² Bolsista da Fapespa Embrapa Amazônia Oriental, Laboratório de Biotecnologia e Recursos Genéticos, gleyceramos17@yahoo.com.br

³ Pesquisador da Embrapa Amazônia Oriental, Laboratório de Biotecnologia e Recursos Genéticos, oriel@cpatu.embrapa.br

⁴ Analista da Embrapa Amazônia Oriental, Laboratório de Biotecnologia e Recursos Genéticos, ilmarina@cpatu.embrapa.br

⁵ Pesquisador da Embrapa Amazônia Oriental, Laboratório de Biotecnologia e Recursos Genéticos, rafael@cpatu.embrapa.br

Resumo: Existe dificuldade para obtenção de plantios homogêneos de cupuaçuzeiro, o que dificulta sua expansão. Portanto, a obtenção de um protocolo de clonagem e multiplicação para essa espécie torna-se interesse não apenas para os programas de melhoramento da espécie, mas também para uso em plantios comerciais. Nesse sentido, esse trabalho objetivou o estudo de estaminóides *in vitro* de cupuaçu, considerando-se variações no tempo de cultivo nos meios de obtenção de calos. Os explantes cultivados durante 28 dias em meio DKW e 14 dias em meio WPM apresentaram os melhores resultados para a obtenção de calos de cupuaçu.

Palavras-chave: calogênese, cultura de tecidos, *Theobroma grandiflorum*

Introdução

Cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex. Spreng.) Schum.), nativo da Amazônia, necessita expandir sua produção, devido aceitação mercadológica e demanda por novos produtos. Entretanto, a dificuldade para homogeneização de plantas no campo compromete o aumento da produção. Ademais, existe um número limitado de cultivares resistentes ao patógeno *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Singer, causador da vassoura-de-bruxa, que é responsável por acarretar os maiores impactos econômicos na produção, por comprometer o rendimento dos plantios (Alves, 2003).



A obtenção de materiais resistentes e homogêneos é um desafio para a expansão da cultura. Nesse sentido, estudos de micropropagação de cupuaçuzeiros tornam-se estratégicos devido à possibilidade de multiplicação em larga escala de materiais resistentes a doença. Com esse objetivo, os estudos foram concentrados no processo de calogênese de cupuaçuzeiro, visto essa ser a primeira etapa envolvida no estabelecimento de um protocolo de micropropagação para essa espécie. Por ser filogeneticamente próxima ao cacauzeiro, o qual dispõe de protocolos para embriogênese somática, selecionamos um protocolo de micropropagação sugerido por Li e colaboradores (1998), para avaliar o comportamento *in vitro* de estaminóides de cupuaçu.

Material e Métodos

Botões florais do clone Codajás, coletados do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental, foram usados para o estabelecimento dos experimentos. Em capela de fluxo laminar, os botões florais foram submetidos à assepsia utilizando álcool comercial (92,8%) por 1 min, seguido a imersão em solução de hipoclorito de cálcio a 4% contendo 6 gotas de tween, por 15 min, antes de serem lavados por cinco vezes com água destilada autoclavada. Os estaminóides foram retirados dos botões florais, sendo introduzidos 5 explantes por frasco, considerando 4 repetições por tratamento. Considerando o protocolo de Li et al. (1998), constituído basicamente de 3 meios de cultura [PCG-crescimento primário de calos (1º. meio); SCG- crescimento secundário de calos (2º. meio); ED-desenvolvimento de embrião (3º. meio)], os tratamentos foram estabelecidos de acordo o tempo de cultivo no primeiro e segundo meios.

Os explantes foram inoculados no meio PCG, contendo sais e vitaminas DKW (Driver e Kuniyuki, 1984); suplementado com 2,0 mg.l⁻¹ de 2,4-D; 5x10⁻³ mg.l⁻¹ de TDZ; acrescido de 20 g.l⁻¹ de glicose; pH ajustado para 5,8, e solidificado com 2,0 g.l⁻¹ de phytigel. Em seguida, os explantes foram transferidos para o meio SCG, contendo sais WPM (Lloyd e McCown, 1980) e vitaminas de Gamborg; 2,0 mg.l⁻¹ de 2,4-D; 0,05 mg.l⁻¹ de BAP; 20 g.l⁻¹ de glicose; pH de 5,8, e solidificado com 2,2 g l⁻¹ de phytigel. Em seguida, os tecidos vegetais foram transferidos para meio ED contendo sais e



vitaminas DKW, suplementado com 30 g.l^{-1} de sacarose; 1 mg.l^{-1} de glicose e 2 g.l^{-1} de phytigel. A avaliação final dos resultados foi feita após 2 meses de cultivo.

Foram realizados 8 tratamentos: T1, T2 e T3, que tiveram os explantes cultivados durante 14 dias no meio PCG, discriminando-se entre si pelo tempo de cultivo no 2º meio (SCG), que foram de 14, 21 e 28 dias, respectivamente. Os tratamentos T4 e T5, que tiveram os explantes cultivados durante 21 dias no meio PCG, e diferiram entre si pelo tempo de cultivo no 2º meio (SCG), que foi de 21 e 28 dias, respectivamente. Enquanto os tratamentos T6, T7 e T8, que tiveram os explantes cultivados durante 28 dias no meio PCG, diferiram entre si pelo tempo de cultivo no 2º meio (SCG), que foi de 14, 21 e 28 dias, respectivamente. Após o cultivo dos explantes nos dois meios de cultura, estes foram transferidos para o 3º meio (ED), constituído de sais e vitaminas DKW, suplementado com 30 g.l^{-1} de sacarose; 1 mg.l^{-1} de glicose; 2 g.l^{-1} de phytigel. Todos os tratamentos foram mantidos no escuro, à temperatura de $25 \pm 3^\circ\text{C}$ e subcultivadas a cada 14 dias no meio ED.

Resultados e Discussão

Após 20 dias de cultivos, observou-se o escurecimento de 80% dos estaminóides introduzidos, sendo que 15% dos submetidos no tratamento T6 apresentaram calos de tamanho pequeno. Aos 40 dias de avaliação foi visualizado o surgimento de calos no tratamento T1, onde 10% dos explantes apresentaram calos de tamanho pequenos, enquanto os tratamentos T6, T7 e T8 apresentaram 50%, 10% e 20% de calos pequenos, respectivamente, com coloração branca, mas de aspecto mole. Ao final de 60 dias, 50% dos explantes do tratamento T1 apresentaram calos de tamanho médio, e entre estes, 5% apresentaram raízes de aproximadamente 1 cm na região do calejamento. Os tratamentos T6, T7 e T8 apresentaram 65%, 15% e 20% de calos de tamanho pequeno, respectivamente, sendo que T8 também apresentou 15% de calos com tamanho médio. Apesar do tratamento T6 resultar na obtenção de calos pequenos, este foi considerado o melhor tratamento devido à porcentagem de estaminóides que responderam, e da qualidade dos calos obtidos, apresentando consistência mole e coloração clara. Os demais tratamentos, T2, T3, T4 e T5, não resultaram em resposta aparente dos estaminóides, apresentando intensa oxidação ao final de 60 dias de cultivo.



Como acontece em protocolos de embriogênese somática de cacau, o cultivo de estaminóides responde de modo satisfatório ao processo de calogênese, sob condições de cultivo semelhante às apresentadas nesse trabalho. Ademais, os meios usados no experimento atual mostraram-se eficientes para o processo de calogênese em cupuaçu, entretanto, o tempo necessário para a obtenção de calos em cupuaçu é maior que o necessário para obtenção de calos em cacau cultivados *in vitro* (Li et al., 1998).

Conclusão

É possível obter calos de cupuaçu de tamanho médio a partir do cultivo *in vitro* de estaminóides, sendo que o cultivo por 28 dias em meio PCG e 14 dias em meio SCG apresentaram as melhores respostas quanto à calogênese *in vitro*.

Agradecimento

À Embrapa pelo apoio financeiro ao projeto GENEACU (0208020010000) e a FAPESPA pela concessão da Bolsa de Iniciação Científica.

Referências Bibliográficas

- ALVES, R.M. **Caracterização genética de populações de cupuaçuzeiro *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex. Spreng.) Schum., por marcadores microssatélites e descritores botânico-agronômicos.** Piracicaba, 2003. 146 f. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.
- DRIVER, J.A.; KUNIYUKI, A.H. In vitro propagation of paradox walnut rootstock. **HortScience**, Alexandria, v. 19, n. 4, p. 507-509, 1984.
- LI, Z.; TRAORE, A.; MAXIMOVA, S.; GUILTINAN, M. Somatic embryogenesis and plant regeneration from floral explants of cacao (*Theobroma cacao* L.) using tidiazuron. **In Vitro Cell Developmental Biology**, New York, v. 34, p. 293-299, 1998.
- 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.