



INDUÇÃO DE CALOS *IN VITRO* EM ESTAMINÓIDES DE CUPUAÇUZEIRO (*Theobroma grandiflorum*)

Resumo: Ampliação do mercado de frutas exóticas proporcionou a expansão do cultivo do cupuaçuzeiro, uma fruteira encontrada espontaneamente na Amazônia com excelente potencialidade de mercado para exploração da polpa, entretanto tem limitação para obtenção de materiais vegetais homogêneos. Nesse trabalho, objetivou-se obter calos *in vitro* em estaminóides de cupuaçu. Os explante foram cultivados em meio de crescimento e desenvolvimento de calos. Os tratamentos basearam-se nas diferentes concentrações dos fitorreguladores e fonte de carbono. Calos com melhores qualidades foram obtidos quando usou-se as concentração de TDZ $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$ e 2,4-D 4 mg.L^{-1} em meio para crescimento primário de calos e 6% (sacarose) e 2% glicose da concentração de açúcares em meio para desenvolvimento de embriões.

Palavras-chave: calos *in vitro*, explante floral, reguladores de crescimento

Introdução

A abertura do mercado nacional e internacional para frutas exóticas, principalmente advindas da floresta amazônica, proporcionou a oportunidade de expansão do cultivo e oferta dos produtos provenientes do cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex. Spreng.) Schum.), espécie arbórea com excelente potencialidade de mercado para exploração da polpa (Alves, 2002). Entretanto, a falta de material genético melhorado associado a variabilidade das cultivares e o fungo *Moniliophthora perniciosa*, causador da vassoura de bruxa, limitam a expansão da cultura. Como alternativa, técnicas de cultura de tecido tornam-se alternativa para clonagem e multiplicação de materiais resistentes e homogêneos de cupuaçuzeiro. Foi a partir de protocolos já estabelecidos para cacauzeiro (*T. cacao*), considerada até pouco tempo única espécie do gênero cultivada comercialmente, que baseamos os experimentos com o cupuaçuzeiro, visando obter calos *in vitro* em estaminóides de cupuaçu, para posteriormente desenvolver um protocolo de embriogênese somática para essa espécie. Portanto, o trabalho atual se concentrou no estudo da primeira etapa do estabelecimento de um protocolo de multiplicação *in vitro* para o cupuaçuzeiro, que consiste no processo de calogênese.



Material e Métodos

Explantos da cultivar BRS Codajás, genótipo 186 foram adquiridos do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental. Em câmara de fluxo laminar, os botões florais foram imersos em álcool 98% por 1 minuto, submetidos a solução de $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ a 4% e mais 6 gotas de tween por 15 minutos, seguido de cinco lavagens com água destilada autoclavada.

Para cultivo dos estaminóides, foram utilizados diferentes meios de cultura na seguinte ordem: PCG – crescimento primário de calos; SCG – crescimento secundário de calos e ED – desenvolvimento de explantes. Os tratamentos foram definidos de acordo com a concentração de fitorreguladores e tempo de permanência em meio de cultura em cada meio de cultura. O meio PCG conteve sais e vitaminas DKW (Driver e Kuniyuki, 1987); suplementado com glicose 20 g.l^{-1} , L-glutamina 250 mg.l^{-1} e mio-inositol 100 mg.l^{-1} , TDZ $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$ e 2,4-D 4 mg.L^{-1} pH ajustado para 5,8; semi solidificado com phytigel a 0,2% e autoclavado. Os explantes inoculados e mantidos em meio PCG por 14 dias foram definidos como T1 e T3, enquanto T2 e T4 ficaram durante 28 dias em meio de cultura PCG. Em seguida os tratamentos foram transferidos para meio de cultura 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 g.l^{-1} ; phytigel a 0,2 %; e pH ajustado para 5,8 antes da esterilização. Após 14 dias de cultivo em SCG, os explantes do tratamento T1 e T2 foram transferidos para meio ED contendo sais e vitaminas DKW, suplementado com sacarose 30 g.l^{-1} ; glicose 1 g.l^{-1} ; phytigel 0,2% como agente gelificante e pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem. Os tratamentos T3 e T4 diferem na concentração de açúcares, em que o meio ED conteve sacarose 60 g.l^{-1} e glicose 2 g.l^{-1} . Os tratamentos foram mantidos no escuro, à temperatura de $25 \pm 3^\circ\text{C}$, subcultivados a cada 14 dias no meio ED. O experimento constituiu de quatro repetições, representada por um frasco com 20 ml de meio de cultura por tratamento, com cinco explantes cada.

Resultados e Discussão



Os resultados foram avaliados após 150 dias de subcultivos, sendo visualizados três diferentes estádios de desenvolvimento (tabela 1). O estágio de desenvolvimento mais observado foi com calos pequenos, que exibem pouca massa calosa, geralmente na base dos explantes onde inicia a formação dos calos, sendo notado nos tratamentos T1, T3 e T4, com formação de 5%, 5% e 15%, respectivamente. Observou-se a formação de calos de tamanho médio apenas no tratamento T1, com massa de calos na base dos estaminóides e outros pontos do explante. O desenvolvimento de calos grande, caracterizado por intensa multiplicação de células cobrindo todo o explante, foi observado apenas no tratamento T3.

Tabela 1. Percentagem do grau de formação de calos em estaminóides de cupuaçuzeiro cultivados *in vitro* quando submetidos a diferentes tratamentos. T1 (14 dias em meio PCG, SCG e EDn), T2 (28 dias em PCG, 14 dia em SCG e EDn), T3 (14 dias em PCG, SCG e 28 dias em meio EDd), T4 (28 dias em PCG, 14 dias em SCG e 28 em EDd).

Tratamentos	Calos		
	Pequeno	Médio	Grande
T1	5	10	0
T2	0	0	0
T3	5	0	15
T4	15	0	0

EDn: açúcares na concentração de 3 % e glicose 1%; EDd: açúcares na concentração de 6% e glicose 2%

Com relação à qualidade dos calos, o tratamento T1 exibiu calos com características não friáveis.(esponjoso e branco). Enquanto o tratamento T3 apresentou calos abundantes, todos com células da massa calosa redonda, brilhosa e aspecto friável, sendo este considerado o melhor tratamento. Os estaminóides do T4 apresentaram calos com coloração clara na base, mas cobertos por massa calosa branca. Ferreira et al. (2001) também observaram maior indução de calos em segmentos de eixos embrionários de cupuaçu cultivados em meio MS líquido contendo concentrações elevadas de 2,4-D (4 e



8 mg.L⁻¹). Esses estudos nortearão experimentos futuros, visando a obtenção de embriões somáticos de cupuaçu.

Conclusão

Calos com melhores qualidades foram obtidos em meio para crescimento primário de calos por 14 dias nas concentrações de TDZ 0,01 mg.L⁻¹ e 2,4-D 4 mg.L⁻¹ e 28 dias em meio para desenvolvimento de embriões com 6% de sacarose e 2% de glicose.

Agradecimento

À Embrapa pelo financiamento do projeto e a FAPESPA pela 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.
- FERREIRA, M. das G.R.; CÁRDENAS, F.E.N.; CARVALHO, C.H.S.de; CARNEIRO, A.A.; DAMIÃO FILHO, C.F. Desenvolvimento de calos em explantes de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* Schum.) em função da concentração de auxinas e do meio líquido. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.23, n.3, p.473-476, dez. 2001.
- 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.
- McGRANAHAN, G.H.; DRIVER, J.A.; TULECKE, W. Tissue culture of Juglans. In: BONGA, J. M.; DURZAN, D. J. (eds.). **Cell and tissue culture in forestry: Case histories: Gymnosperms, Angiosperms and Palms.** Dordrecht: Martinus Nijhoff, v.3, p. 261-271, 1987.