



17^o Seminário de Iniciação Científica e 1^o Seminário de Pós-graduação da Embrapa Amazônia Oriental. 21 a 23 de agosto de 2013, Belém-PA

OBTENÇÃO DE CALOS EM ESTAMINOIDES DE CUPUAÇUZEIRO CULTIVADOS *IN VITRO*

Gleyce Kelly de Sousa Ramos¹, Simone de Miranda Rodrigues², Oriel Filgueira de Lemos², Rafael Moyses Alves²

Bolsista da Fapespa, Estudante do curso de Agronomia da Universidade Federal Rural da Amazônia. E-mail: gleyceramos17@yahoo.com.br.

² Pesquisador da Embrapa Amazônia Oriental. E-mail: simone.rodrigues@embrapa.br

² Pesquisador da Embrapa Amazônia Oriental. E-mail: oriel.lemos@embrapa.br

² Pesquisador da Embrapa Amazônia Oriental. E-mail: rafael-moyses.alves@embrapa.br

Resumo: Este trabalho teve por objetivo induzir calos *in vitro* em estaminoides de cupuaçuzeiro retirados de botões florais e cultivados em meio de cultura DKW e WPM. Os explantes foram inoculados no meio de cultura DKW para crescimento primário de calos. Os tratamentos diferiram na concentração dos reguladores de crescimento usados, os quais foram TDZ e 2,4-D, T1: 0,0025 mg.L⁻¹ de TDZ e 1 mg.L⁻¹ de 2,4-D; T2: 0,005 mg.L⁻¹ de TDZ e 2 mg.L⁻¹ de 2,4-D; T3: 0,01 mg.L⁻¹ de TDZ e 4 mg.L⁻¹ de 2,4-D; T4: 0,015 mg.L⁻¹ de TDZ e 6 mg.L⁻¹ de 2,4-D; T5: 0,02 mg.L⁻¹ de TDZ e 8 mg.L⁻¹ de 2,4-D; T6: 0,02 mg.L⁻¹ de TDZ e 4 mg.L⁻¹ de 2,4-D e T7: 0,01 mg.L⁻¹ de TDZ e 8 mg.L⁻¹ de 2,4-D. Após 14 dias, foram transferidos para meio de cultura WPM e avaliados ao final de 150 dias. Os melhores resultados foram obtidos nos tratamentos T1, T2 e T6, devido a qualidade dos calos.

Palavras-chave: cultura de tecidos, reguladores de crescimento, *Theobroma grandiflorum*.

Introdução

A utilização de material não selecionado em plantios é considerada uma das causas da baixa produtividade dos pomares de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex. Spreng.) Schum.) na região Amazônica, juntamente com uma porcentagem de plantios suscetíveis ao patógeno *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Singer, causador da vassoura-de-bruxa (CRUZ E ALVES, 2002). A grande variabilidade genética compromete não só a produtividade, como também dificulta a uniformidade das parcelas em trabalhos experimentais.

O desenvolvimento de plântulas constituídas por genótipos superiores e homogêneos seria fundamental para viabilizar uma solução para esse problema. Nesse sentido, a cultura de tecidos é uma



alternativa, pois permite obter material uniforme e selecionado (CID, 2010).

Devido o interesse em estabelecer um protocolo de clonagem de materiais superiores para o cupuaçu, partiu-se de experimentações realizadas com cacauzeiro, por apresentarem familiaridade botânica, adaptando-se um protocolo de embriogênese somática usado na cultura do cacau à cupuaçuzeiro. Objetivou-se induzir calos *in vitro* em estaminoides de cupuaçuzeiro, visto que a calogênese é considerado como o primeiro passo para regeneração de plantas *in vitro*.

Material e Métodos

Estaminoides foram extraídos de botões florais da cultivar BRS Codajás, genótipo 186 de cupuaçuzeiro, pertencente ao banco ativo de germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental. O experimento foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia e Recursos Genéticos da mesma instituição. Em câmara de fluxo laminar, efetuou-se assepsia dos botões florais imergindo-os em álcool comercial (92,8%) durante 1 min, seguido de solução de $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ a 4% acrescido de seis gotas de tween por 15 min, sob constante agitação, seguindo 5 lavagens com água destilada autoclavada.

Para o cultivo dos estaminoides, foram utilizados em sequência três meios de cultura descritos no protocolo de embriogênese somática sugerido por Li et al (1998): meio para o crescimento primário de calos (CPC) por 14 dias, para o crescimento secundário de calos (CSC) por 14 dias e meio para o desenvolvimento de embrião (DE), neste meio de cultura os explantes foram subcultivados a cada 14 dias até completar 150 dias. Os explantes foram removidos dos botões florais e inoculados em meio de cultura DKW (DRIVER E KUNIYUKI, 1984) para crescimento primário de calos (CPC), suplementado com vitamina DKW, glicose 20 g.L^{-1} , glutamina 250 mg.L^{-1} e mio-inositol 100 mg.L^{-1} . A este mesmo meio foram adicionados diferentes combinações dos fitorreguladores TDZ (tidiazuron) e 2,4-D (2,4-diclorofenoxiacético). T1: $0,0025 \text{ mg.L}^{-1}$ de TDZ e 1 mg.L^{-1} de 2,4-D; T2: $0,005 \text{ mg.L}^{-1}$ de TDZ e 2 mg.L^{-1} de 2,4-D; T3: $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$ de TDZ e 4 mg.L^{-1} de 2,4-D; T4: $0,015 \text{ mg.L}^{-1}$ de TDZ e 6 mg.L^{-1} de 2,4-D; T5: $0,02 \text{ mg.L}^{-1}$ de TDZ e 8 mg.L^{-1} de 2,4-D; T6: $0,02 \text{ mg.L}^{-1}$ de TDZ e 4 mg.L^{-1} de 2,4-D e T7: $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$ de TDZ e 8 mg.L^{-1} de 2,4-D.

Os explantes foram transferidos para meio de crescimento secundário de calos (CSC), constituído de sais de WPM (LLOYD & MCCOWN, 1980), suplementado com vitaminas de Gamborg, 2 mg.L^{-1} de 2,4-D, $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP e 20 g.L^{-1} de glicose. Em seguida, os calos foram cultivados em meio de desenvolvimento de embriões (DE), composto de sais e vitaminas DKW,



suplementado com 30 g.L⁻¹ de sacarose; 1 g.L⁻¹ de glicose. O pH foi sempre ajustado para 5,8 e foi usado phytigel a 0,2% como agente gelificante.

Os tratamentos diferiram na concentração de fitorreguladores usados no meio para CPC, foram usados cinco explante por frascos com quatro repetições, representada por um frasco com 20 ml de meio de cultura. As análises foram realizadas com base na porcentagem de formação de calos em três distintos estádios de desenvolvimento: calo pequeno, estágio de desenvolvimento em que a massa calosa encontrou-se restrita a alguns pontos do explante, geralmente na base dos estaminoides onde é iniciada a formação de calos (C₁-calo pequeno); calo médio, estágio em que a massa calosa recobria toda a base e outros pontos do explante (C₂- calo médio); e calos grandes ou abundantes, fase em que os explantes encontraram-se totalmente coberto por massa calosa (C₃- calo grande).

Resultados e Discussão

Ocorreu a formação de calos nos três diferentes estádios de desenvolvimento (Tabela 1). As maiores taxas de formação de calos ocorreram nos tratamentos T1 e T2. O maior percentual (50%) de formação de calos *in vitro* ocorreu no tratamento T1, considerados abundantes (C₃), enquanto 45% dos explantes do tratamento T2 responderam com calos de tamanho mediano (C₂). No tratamento T4, foi observado 20% de calos grandes (C₃). A taxa de formação de calos no T5 foi igual tanto para a formação de calos médios quanto para formação de calos grandes, representado por 10%. Os tratamentos T6 e T7 responderam com apenas 10% de calos grandes e médios, respectivamente.

Tabela 1 – Percentual de formação de calos para estaminoides de cupuaçu cultivados *in vitro*. T1 (0,0025 mg.L⁻¹ de TDZ + 1 mg.L⁻¹ de 2,4-D); T2 (0,005 mg.L⁻¹ de TDZ + 2 mg.L⁻¹ de 2,4-D) T3 (0,01 mg.L⁻¹ de TDZ + 4 mg.L⁻¹ de 2,4-D); T4 (0,015 mg.L⁻¹ de TDZ + 6 mg.L⁻¹ de 2,4-D); T5 (0,02 mg.L⁻¹ de TDZ + 8 mg.L⁻¹ de 2,4-D); T6 (0,02 mg.L⁻¹ de TDZ + 4 mg.L⁻¹ de 2,4-D) e T7 (0,01 mg.L⁻¹ de TDZ + 8 mg.L⁻¹ de 2,4-D).

Formação de calos (%)

Tratamentos

C₁
C₂
C₃

T1
5
20
50

T2



5
45
15

T3
0
0
0

T4
5
10
20

T5
0
10
10

T6
0
0
10

T7
0
10
0

Os melhores resultados, com relação a qualidade dos calos obtidos provenientes dos estaminoides, foram encontrados para os tratamentos T1, T2 e T6. Os estaminoides submetidos à condição T1 exibiram massa calosa clara na região da base da estrutura. Entretanto, a região basal apresentaram calos com coloração escura, provavelmente decorrente da oxidação dos tecidos. Os explantes submetidos aos tratamentos T2 e T6 exibiram características semelhantes a calos friáveis, apresentando massa calosa redonda, aspecto brilhoso e coloração clara. Entretanto, tornaram-se volumosos, apresentando coloração branca e mais consistente, com a continuidade dos subcultivos (150 dias). Depois de transferidos para o meio CSC a massa calosa começou a se expandir que antes era restrita a base do explante pode ser devido à adição de regulador de crescimento. O meio DE é um substrato para indução e maturação de embriões, este é sem regulador de crescimento, entretanto não foi observada a emergência de embriões somáticos em nenhum dos tratamentos realizados.

Conclusões



17^o Seminário de Iniciação Científica e 1^o Seminário de Pós-graduação da Embrapa Amazônia Oriental. 21 a 23 de agosto de 2013, Belém-PA

É possível a indução de calos em estaminoides de cupuaçuzeiro com características semelhantes a calos friáveis ao adicionar o dobro da concentração dos reguladores de crescimento, TDZ e 2,4-D proposto por Li et al. (1998).

Agradecimentos

À Embrapa pelo financiamento da pesquisa e a FAPESPA pela Bolsa de Iniciação Científica.

Referências Bibliográficas

- CID, L.P.B; **Cultivo *in vitro* de Plantas**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2010.
- CRUZ, E.D; ALVES, R.M.; Cultivares de cupuaçuzeiro tolerantes à vassoura-de-bruxa. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 4p. **Recomendações Técnicas**, 2002.
- DRIVER, J.A.; KUNIYUKI, A. H. In vitro propagation of *Paradox walnut* rootstock. **HortScience** 19:507-509; 1984.
- LI, Z.; TRAORE, A.; MAXIMOVA, S.; GUILTINAN, M. Somatic embryogenesis and plant regeneration from floral explants of cacao (*Theobroma cacao* L.) using tidiuron. **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. **Proceedings of International Plant Propagators**, Ashville, v.30, p. 421-427, 1980.