

CALOGÊNESE *in vitro* EM EXPLANTES FLORAIS DE CUPUAÇU USANDO THIDIAZURON E ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO

Gleyce Kelly de Sousa Ramos¹, Simone de Miranda Rodrigues², Oriel Filgueira de Lemos³, Rafael Moyses Alves³

¹Estudante de Mestrado em Biotecnologia da Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, Pará, Brasil. Avenida Presidente Tancredo Neves, 2501 - Terra Firme, Belém - PA, Brasil, CEP 66077-830

²Pesquisador da Embrapa Amazônia Oriental, Belém - Pará, Brasil. Travessa Dr. Enéas Pinheiro s/n. CEP 66095-100 (simone.rodrigues@embrapa.br)

³Pesquisador da Embrapa Amazônia Oriental, Belém - Pará. Travessa Dr. Enéas Pinheiro s/n. CEP 66095-100

Recebido em: 02/10/2017 – Aprovado em: 21/11/2017 – Publicado em: 05/12/2017
DOI: 10.18677/EnciBio_2017B9

RESUMO

Para dar suporte ao melhoramento genético do cupuaçuzeiro, a micropropagação é importante pela necessidade de obtenção de plantas genética e morfológicamente iguais e uniformes. A calogênese é uma etapa inicial da regeneração de plantas via embriogênese somática, pois a partir de calos embriogênicos há desenvolvimento de embriões. Visando induzir a calogênese *in vitro* em estruturas florais de cupuaçuzeiro, cógulas, estaminoides e ovários foram cultivados em meio de indução de calos, meio de cultura DKW, suplementado com thidiazuron (TDZ) (0,0025; 0,005; 0,015; 0,02; ou 0,01 mg l⁻¹) e ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (1,0; 2,0; 4,0; 6,0; ou 8,0 mg l⁻¹), seguido o cultivo em meio de crescimento de calos, constituído de sais WPM, 2,00 mg l⁻¹ de 2,4-D e 0,05 mg l⁻¹ de BAP. O delineamento foi inteiramente casualizado em fatorial 3 X 6 (três tipos de explante e seis meios de cultura). Os explantes aos 28 dias de cultivo foram transferidos para um terceiro meio de cultura, constituído de sais e vitaminas DKW desprovido de reguladores de crescimento. A avaliação considerou o número de explantes calogênicos de cada tipo de explante nos meios de cultura em três estádios de desenvolvimento dos calos (pequeno, médio ou grande), conforme o diâmetro da massa calosa. Os dados foram analisados quanto ao percentual de calogênese e testes de comparação de média de Tukey. Todos os explantes, cógulas, estaminoides e ovários responderam à indução, ao crescimento e à multiplicação de calos. As cógulas e os estaminoides responderam em maior número na concentração de 0,0025 mg l⁻¹ de TDZ e 1 mg l⁻¹ de 2,4-D no meio inicial, sendo a mais indicada para a calogênese usando explante floral de cupuaçuzeiro nas condições desse estudo.

PALAVRAS-CHAVE: Cógulas; embriogênese somática; micropropagação.

CALLOGENESIS *in vitro* IN CUPUASSU FLORAL EXPLANTS USING THIDIAZURON AND 2,4-DICHLOROPHENOXYACETIC ACID

ABSTRACT

To assist the development of commercial plantations of cupuassu, micropropagation studies are fundamental for the need to obtain genetically and morphologically plants

similar and uniform. The callus formation is an important step in somatic embryogenesis process, to allow the formation of embryogenic callus necessary for the emergence of embryos. In order to induce callus *in vitro* in cupuassu floral explants, cogules, staminode and ovaries were cultured in DKW medium supplemented with different concentrations of thidiazuron (TDZ) (0.0025; 0.005; 0.015; 0.02; or 0.01 mg l⁻¹) and 2,4- dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) (1.0; 2.0; 4.0; 6.0; or 8.0 mg l⁻¹), and then were transferred to callus growth medium, containing WPM salts, 2,4-D 2.00 mg l⁻¹ and BAP 0.05 mg l⁻¹. The experimental draw was completely randomized in factorial 3 X 6 (three types of explant and six culture medium). The explants at 28 days of culture were transferred to the third culture medium consisted of salts and vitamins DKW without growth regulators. The evaluation considered the number of calogenic explants of each explant type in the culture medium at three stages of callus development (small, medium or large), according to the diameter of the callus mass. The data were analyzed for the percentage of calogenesis and Tukey mean comparison tests. All explants responded satisfactorily when the growth and multiplication of callus. The cogules and staminoids responded best in the concentration of TDZ 0.0025 mg l⁻¹ and 2,4-D 1 mg l⁻¹ in the initial medium, being the most indicated for the calogenesis using cupuassu floral explant in the conditions of this study.

KEYWORDS: Cogules. Staminodes. Tissue cultures.

INTRODUÇÃO

A cultura de tecidos vegetais é empregada estrategicamente quando possui potencial de aplicação no melhoramento vegetal. No caso do cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*), que é uma fruta de sabor ácido e aroma agradável, com potencial de expansão de mercado, existe o interesse na obtenção de um protocolo de multiplicação de tecidos *in vitro* para clonagem de plantas dessa espécie, devido a necessidade de produzir em grande escala, plantas elite consideradas superiores por associarem características de interesse agrícola, como resistência a doenças e alta produção de frutos (ALVES et al., 2014; BASTOS et al., 2016; SILVA et al., 2016).

Atualmente, o cultivo de materiais genéticos de cupuaçuzeiro sensíveis ao patógeno *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Singer, causador da vassoura-de-bruxa, resulta em baixa produtividade. Além disso, por ser uma planta alógama e apresentar grande variabilidade genética, há dificuldade para o estabelecimento de plantações homogêneas, dificultando a expansão da exploração comercial (SAGRI, 2012; SILVA et al., 2016).

O cultivo de materiais genéticos sensíveis ao patógeno *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Singer, causador da vassoura-de-bruxa, resulta em baixa produtividade. Além disso, por ser uma planta alógama e apresentar grande variabilidade genética, há dificuldade para plantações homogêneas, dificultando a expansão da exploração comercial (ALVES et al., 2013; MOURA et al., 2015).

A clonagem de cupuaçu utilizando enxertos não promove a uniformidade como o esperado, devido à desuniformidade dos porta-enxertos, formados por materiais genéticos não selecionados, o que provoca intensa variação intraclonal e mascara as respostas tanto em experimentos de avaliação genética como em ensaios fitotécnicos. Como alternativa, para produzir materiais com características fitossanitárias e agronômicas desejáveis, a técnica de cultura de tecidos permite a clonagem de plantas com características superiores em menor tempo.

Essa técnica tem sido empregada para dar suporte ao desenvolvimento e melhoramento de cultivares. A regeneração de plantas *in vitro* a partir de calos é um sistema bem utilizado para a micropropagação de plantas frutíferas. Para o cupuaçuzeiro, a embriogênese somática tem sido pouco utilizada, sendo a calogênese, a primeira etapa desse processo, cujos trabalhos na área carecem de avaliação de crescimento e comportamento dos calos (LEDO et al., 2002; PASQUAL et al., 2012; FERREIRA et al., 2013).

Nesse sentido, esse estudo objetivou a indução e a avaliação de calos em cupuaçuzeiro, etapa inicial para o estabelecimento de protocolo de multiplicação *in vitro* visando embriogênese somática para essa espécie, baseado no proposto por Li et al. (1998), usando estruturas florais cultivadas em diferentes concentrações de reguladores de crescimento.

MATERIAL E MÉTODOS

Botões florais, medindo aproximadamente 1,5 cm, foram retirados de plantas de cupuaçuzeiro da cultivar BRS Codajás, oriundos do Banco Ativo de Germoplasma de cupuaçuzeiro da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Amazônia Oriental - Belém-PA), e transportados ao Laboratório de Recursos Genéticos e Biotecnologia da mesma instituição. Inicialmente, os botões florais foram imersos em álcool comercial 98% por um minuto, incubados em Ca (ClO)₂ a 4%, acrescido de seis gotas de tween para um volume de 200 mL, por 15 minutos, sob constante agitação, e depois submetidos a cinco lavagens com água destilada autoclavada.

O delineamento experimental foi inteiramente atualizado em fatorial 3X6, constituído de três tipos de explantes e seis meios de cultura, com quatro repetições, cada uma representada por um frasco de 300 mL com 20 mL de meio de cultura com cinco cógulas, cinco estaminoides e um ovário por frasco de cada meio de cultura. Os seis meios de cultura estão representados na Tabela 1, e envolveram a combinação de seis concentrações de TDZ e seis concentrações de 2,4-D. Os explantes foram avaliados após 90 dias de cultivo no escuro quanto ao número de explantes com indução de calos, tamanho do calo (pequeno, médio e grande), sendo os dados submetidos à percentagem de explantes com calos, e análise de variância, teste de comparação de média, Tukey a 5% de probabilidade, e transformados em $\sqrt{(\text{número de calos} + 1)}$, quando necessários.

TABELA 1 - Combinações dos fitorreguladores de crescimento adicionados ao meio DKW.

Meios de Cultura	TDZ (mg l ⁻¹)	2,4-D (mg l ⁻¹)
T1	0,0025	1,00
T2	0,005	2,00
T3	0,015	6,00
T4	0,02	8,00
T5	0,02	4,00
T6	0,01	8,00

As estruturas florais (cógulas, estaminoides e ovários) foram excisadas e inoculadas no meio de estabelecimento e indução de calos, visando ao intumescimento dos explantes e início do processo de calogênese, constituído de sais e vitaminas DKW (DRIVER; KUNIYUKI, 1984), contendo 20 g l⁻¹ de glicose, 250 mg l⁻¹ de glutamina e 100 mg l⁻¹ de mio-inositol. A esse meio foram adicionadas

diferentes concentrações de TDZ (tidiazuron) e 2,4-D (2,4-diclorofenoxiacético), em seis diferentes combinações (Tabela 1).

Após 14 dias de cultivo, os explantes foram transferidos para meio de crescimento de calos, constituído de sais WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980) e vitaminas de Gamborg (GAMBORG et al., 1968), 2 mg l⁻¹ de 2,4-D; 0,05 mg l⁻¹ de BAP e 20 g l⁻¹ de glicose, no qual permaneceram por mais 14 dias. Por fim, os explantes com calos foram transferidos para meio de multiplicação de calos, constituído de sais e vitaminas DKW, 30 g l⁻¹ de sacarose e 1 mg l⁻¹ de glicose, visando ao aumento do volume dos mesmos. Nesse último meio, os explantes foram cultivados por 62 dias, sendo submetidos à renovação a cada 14 dias. Todos os meios de cultura tiveram pH aferido para 5,8 antes de serem autoclavados por 18 min a 120 °C e 1 atm, e foram solidificados com phytigel a 0,2%, sendo mantidos no escuro à temperatura de 25 ± 3 °C.

O surgimento, desenvolvimento e a multiplicação dos calos obtidos nos explantes florais foram avaliados conforme os diferentes estádios de desenvolvimento: C1 - calo pequeno e inicial, surgido apenas na base dos explantes, medindo até 1 cm; C2 - calo médio, variando de 1 cm < diâmetro do calo ≤ 3 cm, caracterizado pelo desenvolvimento de massa calosa recobrimdo tanto a base como outros pontos do explante; e C3 - calo grande, apresentando diâmetro maior que 3 cm e envolvendo todo o explante.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os explantes florais, cógulas, estaminoides e ovários de cupuaçuzeiro, resultaram em calogênese, sendo que os ovários iniciaram o processo calogênico a partir do 10º dia de cultivo, enquanto as cógulas e os estaminoides apresentaram calos após o 20º dia de cultivo, depois de serem transferidos para o meio de cultura de crescimento de calos, em que todos os explantes apresentaram pequenas massas calosas na região basal dos tecidos, caracterizado como o início da calogênese. Os estaminoides seguido pelas cógulas foram os explantes que apresentaram maior percentual de indução de calos com destaque para o meio de cultura T1 (0,0025 mg l⁻¹ de TDZ e 1,0 mg l⁻¹ de 2,4-D) (Tabela 2).

TABELA 2 - Resposta de explantes florais de cupuaçuzeiro quanto à percentagem de indução de calos em meios de cultura suplementado com TDZ X 2,4-D após 90 dias de cultivo *in vitro*.

Meios de Cultura	Cógulas (%)	Estaminoides (%)	Ovários (%)
T1	90	100	75
T2	75	50	65
T3	25	50	35
T4	40	50	20
T5	25	25	10
T6	25	50	10

As cógulas em meio de cultura com 0,02 mg l⁻¹ de TDZ e 4,0 mg l⁻¹ de 2,4-D (T5) apresentaram menor número de explantes com calos (1,14) após 90 dias (Tabela 3), enquanto em meio de cultura com 0,0025 mg l⁻¹ de TDZ e 1,0 mg l⁻¹ de 2,4-D (T1) houve o aparecimento de maior número de explantes com calos. Os

demais explantes, estaminoides e ovários, responderam à calogênese em maior número quando cultivados em meio T1 (0,0025 mg l⁻¹ de TDZ e 1,0 mg l⁻¹ de 2,4-D), porém essa diferença não foi significativa para os demais meios de cultura. Portanto, quanto à indução de calos, as cógulas e os estaminoides apresentaram respostas significativas aos ovários, sendo recomendados para a indução de calogênese em cupuaçuzeiro.

O meio de cultura com 0,0025 mg l⁻¹ de TDZ e 1,0 mg l⁻¹ de 2,4-D (T1) destacou-se dos demais, no qual a concentração de 2,4-D foi 400 vezes a concentração de TDZ, sendo semelhante ao meio de cultura T2, sugerindo que a concentração de TDZ deve ser igual ou inferior a 0,005 mg l⁻¹ e a de 2,4-D não superior a 2,0 mg l⁻¹, de modo que, os meios de cultura tiveram efeitos semelhantes para os três tipos de explante usados, sendo que os ovários, como explante, foram menos responsivos à calogênese que os demais (cógulas e estaminoides), enquanto os meios T1 e T2, independente do explante se destacaram na calogênese (Tabela 3).

TABELA 3 - Respostas de tipos de explantes de cupuaçuzeiro em diferentes meios de cultura (TDZ X 2,4-D) à indução de calogênese após 90 dias de cultivo *in vitro*.

Meios de Cultura	Cógulas	Estaminóides	Ovários	Médias para tratamento
T1	1,54	1,47	1,14	1,38 a
T2	1,43	1,36	1,07	1,28 ab
T3	1,16	1,23	1,07	1,16 bc
T4	1,25	1,13	1,07	1,15 bc
T5	1,14	1,07	1,03	1,08 c
T6	1,16	1,07	1,07	1,10 bc
Médias para explantes	1,28 a	1,22 a	1,07 b	
CV (%)				12,88

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Não foi aplicado o teste de comparação de médias por que o F da interação não foi significativo.

Considerando o aspecto dos calos obtidos a partir das cógulas, em meios de cultura com as menores concentrações dos fitorreguladores no meio de estabelecimento e indução de calos, usando 0,0025 mg l⁻¹ de TDZ e 1 mg l⁻¹ de 2,4-D (T1) ou 0,005 mg l⁻¹ de TDZ e 2 mg l⁻¹ de 2,4-D (T2), os calos apresentaram coloração bege claro, enquanto nos demais meios de cultura, os calos apresentaram coloração que variou de marrom escuro a preto.

As cógulas em meio de cultura com 0,02 mg l⁻¹ de TDZ e 4 mg l⁻¹ de 2,4-D apresentaram menor número de explantes com calos (1,14) após 90 dias (Tabela 2), enquanto em meio de cultura com 0,0025 mg l⁻¹ de TDZ e 1 mg l⁻¹ de 2,4-D houve o aparecimento de maior número de calos do tipo C3. Entretanto, esses resultados não foram significativos aos demais tratamentos. As cógulas resultaram na indução de calos de todos os tamanhos, pequenos (1,18), médios (1,38) e grandes (1,29), sem diferença significativa quanto ao número no final do experimento (Tabela 4).

TABELA 4 - Avaliação do processo de calogênese em cógulas de cupuaçuzeiro aos 90 dias.

Meios de Cultura							
Tipo de calos	T1	T2	T3	T4	T5	T6	Média para calos
C1	1,10 bA	1,29 aA	1,31 aA	1,18 aA	1,00 aA	1,21 aA	1,18 a
C2	1,86 aA	1,74 aAB	1,18 aBC	1,28 aABC	1,00 aC	1,18 aBC	1,38 a
C3	1,65 aA	1,25 aA	1,00 aA	1,28 aA	1,43 aA	1,10 aA	1,29 a
Médias dos Calos	1,54 a	1,43 ab	1,16 ab	1,25 ab	1,14 b	1,16 ab	
C.V (%)							25,02

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Médias dentro dos tratamentos (T) são classificadas com letras minúsculas, e médias entre os tratamentos são classificadas com letras maiúsculas. (C1: calo \leq 1 cm; C2: 1 cm < diâmetro calo \leq 3 cm; C3: calo > 3 cm).

Os meios de cultura usados para os estaminoides contendo 0,0025 mg l⁻¹ de TDZ e 1 mg l⁻¹ de 2,4-D (T1), 0,005 mg l⁻¹ de TDZ e 2 mg l⁻¹ de 2,4-D (T2), e 0,015 mg l⁻¹ de TDZ e 6 mg l⁻¹ de 2,4-D (T3) promoveram maiores indução de calos, 1,46, 1,36 e 1,23, respectivamente, diferindo-se dos demais meios de cultura, T4, T5 e T6 (Tabela 5). Com relação aos diferentes estádios de desenvolvimento de calos, os estaminoides resultaram no maior número de calos de tamanho médio (1 cm < diâmetro do calo \leq 3 cm), sendo obtidos em maiores números nos tratamentos T1 e T2. Ressalte-se que os explantes do tipo estaminoides, nos meios de cultura avaliados, resultaram em intensa indução dos calos do tipo médio (Tabela 5).

TABELA 5 - Avaliação de calogênese em estaminoides de cupuaçuzeiro aos 90 dias de cultivo em meio de multiplicação de calos.

Meios de Cultura							
Tipos de calos	T1	T2	T3	T4	T5	T6	Média para calos
C1	1,10	1,10	1,10	1,00	1,00	1,00	1,05 b
C2	1,72	1,87	1,39	1,29	1,10	1,20	1,43 a
C3	1,57	1,10	1,21	1,10	1,10	1,00	1,18 b
Médias dos Calos	1,46 a	1,36 ab	1,23 ab	1,13 b	1,07 b	1,07 b	
C.V (%)							19,92

O F de interação não foi significativo. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade para a comparação entre o resultado dos tratamentos (T) e para o resultado do tamanho dos calos. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. (C1: calo \leq 1 cm; C2: 1 cm < diâmetro calo \leq 3 cm; C3: calo > 3 cm).

A calogênese em ovário ocorreu em todos os tratamentos sem diferença significativa quanto ao número final de calos obtidos. Entretanto, quanto ao tamanho de calos, resultou em diferença significativa (Tabela 6). A dose de 0,0025 mg l⁻¹ de TDZ e 1 mg l⁻¹ de 2,4-D apresentou a maior média de número de calos grandes por

explante (1,14). Esses calos, inicialmente, formaram massa visualmente clara e aspecto friável, e com o tempo também foi observado o surgimento de raízes. Todos os explantes cultivados nessas condições ficaram cobertos por calos de coloração marrom escuro e aspecto enrijecido aos 90 dias, evidenciando oxidação moderada. Também foi possível observar que o aumento nas doses dos reguladores de crescimento acarretou redução no número de calos às concentrações de 0,0025 mg l⁻¹ de TDZ e 1,0 mg l⁻¹ de 2,4-D (T1) (Tabela 6). Os ovários cultivados em meio de cultura suplementado com 0,005 mg l⁻¹ de TDZ e 2,0 mg l⁻¹ de 2,4-D (T2), apresentaram calos com coloração branco-amarelado e aspecto esponjoso, sendo considerados calos com características indesejáveis, devido a consistência bastante enrijecida.

TABELA 6 - Avaliação de calogênese em ovários de cupuaçuzeiro aos 90 dias de cultivo em meio de multiplicação de calos.

Meios de Cultura							
Tipos de calos	T1	T2	T3	T4	T5	T6	Média para calos
C1	1,00	1,00	1,10	1,00	1,00	1,00	1,02 b
C2	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00 b
C3	1,41	1,21	1,10	1,21	1,10	1,21	1,21 a
Médias dos Calos	1,14 a	1,07 a	1,07 a	1,07 a	1,03 a	1,07 a	
C.V (%)							11,90

O F de interação não foi significativo. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade para a comparação entre o resultado dos tratamentos (T) e para o resultado do tamanho dos calos. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. (C1: calo ≤ 1 cm; C2: 1 cm < diâmetro calo ≤ 3 cm; C3: calo > 3 cm).

Com relação à qualidade dos calos obtidos, todos os explantes, cógulas, estaminoides e ovários, apresentaram calos de coloração amarelada quando cultivados em meio contendo 0,01 mg l⁻¹ de TDZ e 8 mg l⁻¹ de 2,4-D (T6), e sinais evidentes de oxidação, o que prejudicou o desenvolvimento da massa de calos, além de um menor número de explantes responderam à calogênese, sendo este meio de cultura desfavorável à indução de calos.

Quanto à indução de calos por explante, foram observados calos pequeno, médio e grande, a partir do tipo de explantes em cultivo. As respostas quanto ao tamanho dos calos e tipos de explantes foram independentes, pois em todos os tipos de explantes ocorreu a indução de calos pequenos, médios e grandes (Tabela 7). Os calos médios foram mais evidentes em cógulas e estaminóides, enquanto em ovário os calos que foram induzidos se destacaram pelo tamanho grande (1,29), mesmo sem diferença significativa para os demais explantes. O tipo de explante, cógula, foi o mais responsivo para a indução de calos seguido pelos estaminóides e ovário.

TABELA 7 - Indução de calos em diferentes tipos de explantes, classificados quanto ao tamanho, após 90 dias de cultivo *in vitro*.

	Tipos de Calos			Média para tipos de explantes
	Pequenos	Médios	Grandes	
Cógulas	1,18	1,38	1,29	1,28 a
Estaminóides	1,05	1,43	1,18	1,22 ab
Ovários	1,02	1,00	1,21	1,07 b
Média para tipos de calos	1,08 b	1,27 a	1,22 ab	
C.V (%)				16,21

Não foi aplicado o teste de comparação de médias por que o F de interação não foi significativo. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Todos os tecidos introduzidos, estaminóides, cógulas e ovários de cupuaçuzeiro resultaram em calogênese *in vitro*. Nas menores concentrações dos fitorreguladores, observou-se a ausência de escurecimento dos tecidos, quando comparado as maiores concentrações utilizadas, provavelmente em decorrência da oxidação dos tecidos provocada pelas altas concentrações dos fitorreguladores. Por outro lado, nas maiores concentrações dos fitorreguladores, os explantes induziram calos em maior tempo de cultivo, resultando em calos de menor tamanho e enrijecido.

Souza; Zaffari (2011) constataram que o aumento da concentração de CIN e 2,4-D inibiu a proliferação celular dos calos aos 90 dias de cultivo, ao estudarem a indução e multiplicação de calos em mentrasto (*Ageratum conyzoides* L. SIEBER). Esses estudos foram semelhantes aos apresentados nesse trabalho, onde o uso de concentrações reduzidas dos fitorreguladores favoreceu a calogênese dos tecidos, principalmente com relação à qualidade. Entretanto, Ferreira et al. (2013), cultivando explantes florais de cupuaçu em meio contendo 1 mg l⁻¹ de 2,4-D a e 0,25 mg l⁻¹ de cinetina, observaram que os ovários foram os explantes mais sensíveis para a formação de calos quando comparados com estaminóides, pétalas e lígulas.

Há pouco conhecimento sobre o desenvolvimento de calos, a nível molecular. Sabe-se que reguladores de crescimento das classes das auxinas e citocininas têm sido amplamente utilizados para gerarem calos, e que reguladores que promovem a indução de raízes adventícias também participam do processo de calogênese, sugerindo que a base molecular para formação de calos está relacionada com a rizogênese (IKEUCHI et al., 2013). Semelhante ao presente estudo, o aparecimento discreto de raízes também foi observado por Ledo et al. (2002), ao combinarem a auxina 2,4-D com a citocinina 6-furfurilaminopurina (KIN).

Ledo et al. (2002) e Ferreira et al. (2004), estudando a calogênese em explantes de cupuaçuzeiro, observaram sinais de oxidação nos explantes após sucessivos subcultivos. Esses estudos usaram altas concentrações de 2,4-D e citocininas, o que pode ter contribuído para o aumento da oxidação e da inibição do crescimento dos calos. Sabe-se que a oxidação é considerada uma barreira, por dificultar o estabelecimento de culturas *in vitro*, considerando que o escurecimento

de tecidos é desencadeado por diversos fatores, como a liberação de compostos fenólicos no meio.

Nesse trabalho, foram obtidos calos de grandes dimensões para os três tipos de explantes florais. Entretanto, maior número de estaminoides produziram calos de maior tamanho. Apesar da vantagem do crescimento celular dos calos, estes se tornaram endurecidos em pouco tempo, além de mais propícios à oxidação, não sendo indicados para processos de multiplicação celular. Os calos que apresentaram tamanho intermediário apresentaram-se células individualizadas, brilhosas e arredondadas, enquanto que os calos pequenos se caracterizaram por apresentarem coloração amarela clara ou branca e aspecto opaco. Desse modo, as cógulas se destacaram pela qualidade dos calos no processo de calogênese para o cupuaçuzeiro.

Em cacau, o protocolo para obtenção de embriões somáticos está bem estabelecido, com a conversão de calos em embriões e plântulas (LI et al., 1998; NOAH et al., 2013; FLOREZ et al., 2015). Mas, também existe a dificuldade para obter embriões somáticos em algumas espécies elites de cacau, como é de se esperar, visto geralmente protocolos de cultura de tecidos serem genótipos específicos. Uma pesquisa proteômica, realizada comparando-se embriões somáticos e zigóticos de cacau na mesma fase de desenvolvimento, identificou a presença de muitas proteínas relacionadas a estresse e a inibidores de endopeptidases (NOAH et al., 2013). Em cupuaçuzeiro existe grande estresse celular envolvido na tentativa de converter calos embriogênicos em embriões somáticos, dificultando assim o estabelecimento dessa etapa, e conseqüentemente, comprometendo o sucesso desse processo de regeneração celular para plantas da espécie.

CONCLUSÕES

Cógulas, estaminoides e ovários de *T. grandiflorum* respondem à calogênese em meios de cultura DKW e WPM combinados com TDZ e 2,4-D. Entretanto, as cógulas e os estaminóides se destacam por responderem em maior quantidade quando cultivadas em baixas concentrações desses reguladores de crescimento, podendo ser utilizadas em protocolos visando a regeneração de plantas via embriogênese somática.

REFERÊNCIAS

ALVES, R. M.; FILGUEIRAS, G. C.; HOMMA, A. K. O. Aspectos socioeconômicos do cupuaçuzeiro na Amazônia: do extrativismo a domesticação. In: SANTANA, A. C. (ed.). **Mercado, cadeias produtivas e desenvolvimento rural na Amazônia**. 1. ed. Belém, PA: UFRA, 2014. p.197-223. ISBN 9788572950879.

ALVES, R. M.; SILVA, C. R. S.; SILVA, M. S. C.; SILVA, D. C. S.; SEBBENN, A. M. Diversidade genética em coleções amazônicas de germoplasma de cupuaçuzeiro [*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum.]. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n. 3, p. 818-828, 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452013000300019>.

BASTOS, A. J. R.; TEIXEIRA, A. L.; FERNANDES, J. R. Q.; ALVES, R. M. **Caracterização física de frutos de acessos de cupuaçuzeiro procedentes de plantios comerciais do município de Tomé Açu, Pará (clones elites II)**. V

Simpósio de Estudo e Pesquisa em Ciências Ambientais na Amazônia, Belém (PA), p. 67-74, 2016. ISSN 2316-7637.

DRIVER, J. A.; KUNIYUKI, A. H. In vitro propagation of paradox walnut rootstock. **Hortscience**, 19 (4): 507-509, 1984. https://www.researchgate.net/publication/235909861_In_vitro_propagation_of_Paradox_Walnut_root_stock.

FERREIRA, M. G. R.; CÁRDENAS, F. E. N.; CARVALHO, C. H. S.; CARNEIRO, A. A.; DAMIÃO FILHO, C. F. Indução de calos embriogênicos em explantes de cupuaçuzeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 26: 372-374, 2004. <http://www.scielo.br/pdf/rbf/v27n3/27806.pdf>.

FERREIRA, M. G. R.; SANTOS, M. R. A.; ROCHA, R. B.; BRAGADO, A. C. R. Callus induction from floral explants of cupuaçu. **Revista Caatinga**, 26: 105–109, 2013. http://periodicos.ufersa.edu.br/revistas/index.php/sistema/article/view/2639/pdf_62.

FLOREZ, S. L.; ERWIN, R. L.; MAXIMOVA, S. N.; GUILTINAN, M. J.; CURTIS, W. R. Enhanced somatic embryogenesis in *Theobroma cacao* using the homologous BABY BOOM transcription factor. **BMC Plant Biology**, 15: 121, 2015. doi: 10.1186/s12870-015-0479-4.

GAMBORG, O. L., MILLER, R.; OJIMA, K. Nutrient requirement of suspension cultures in soybean root cells. **Experimental Cell Research**, 50: 151-158, 1968. [http://dx.doi.org/10.1016/0014-4827\(68\)90403-5](http://dx.doi.org/10.1016/0014-4827(68)90403-5).

IKEUCHI, M.; SUGIMOTO, K.; IWASE, A. Plant callus: mechanisms of induction and repression. **The Plant Cell**, 25: 3159-3173, 2013. doi: 10.1105/tpc.113.116053.

LEDO, A. S.; LAMEIRA, O. A.; BENBADIS, A. K. Explantes de cupuaçuzeiro submetidos a diferentes condições de cultura *in vitro*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 24: 604-607, 2002. ISSN 0100-2945. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452002000300005>.

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**, 34: 293-299, 1998. <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F02822737.pdf>.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **Proceedings of International Plant Propagators**, 30: 421-427, 1980. ISSN: 0538-9143.

MOURA, E. A.; CHAGAS, P. C.; MOURA, M. L. S.; SOUZA, O. M.; CHAGAS, E. A. Emergência e desenvolvimento inicial de plântulas de cupuaçu cultivadas sob diferentes substratos e condições de sombreamento. **Revista Agro@ambiente Online**, v. 9, n. 4, p. 405-413, 2015. doi: 10.18227/1982-8470ragro.v9i4.2597.

NOAH, A. M.; NIEMENAK, N.; SUNDERHAUS, S.; HAASE, C. OMOKOLO, D. N. et al. Comparative proteomic analysis of early somatic and zygotic embryogenesis in *Theobroma cacao* L. **Journal of Proteomics**, 78, 123-133, 2013. doi: 10.1016/j.jprot.2012.11.007.

PASQUAL, M.; CHAGAS, E. A.; SOARES, J. D. R.; RODRIGUES, F. A. **Tissue Culture Techniques for Native Amazonian Fruit Trees, Recent Advances in Plant in vitro Culture**. Dr. Annarita Leva (Ed.), InTech, ISBN 978-953-51-0787-3, Published: October 17, 2012. doi: 10.5772/52211.

SAGRI (Secretaria de agricultura do estado do Pará) – 2012. (<http://www.sagri.pa.gov.br/pagina/agricultura>) Acesso: 08/10/2016.

SILVA, B. Z.; ROSSI, A. A. B.; DARDENGO, J. F. E.; ARAUJO, V. A. A. C.; ROSSI, F. S. et al. Diversidade genética estimada com marcadores entre sequências simples repetidas em cultivos comerciais de Cupuaçuzeiro. **Ciência Rural**, v.46, n.1, 2016. <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20141634>.

SILVA, P. K. S.; PEREIRA, M. P.; MARINHO, L. C. C. Estudo da secagem da semente do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum). **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.18, n.4, p.455-460, 2016. ISSN: 1517-8595.

SOUZA, J. C.; ZAFFARI, G. R. Indução e multiplicação *in vitro* de massa celular indiferenciada de mentrasto (*Ageratum conyzoides* L. SIEBER). **Plant Cell Culture & Micropropagation**, 7: 9-16, 2011. ISSN 1808-9909.