



INDUÇÃO DE CALOS EM CÓGULAS DE CUPUAÇUZEIRO SUBMETIDAS A DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO *IN VITRO*

Resumo: O cupuaçuzeiro alcançou expressão econômica na região Amazônica e no mercado internacional de frutas exóticas tropicais, e por ser uma espécie em processo de domesticação a heterogeneidade dos materiais cultivados em campo, compromete a produtividade. Torna-se necessário uso de técnicas da cultura de tecidos para obter materiais homogêneos cultivados. Esse trabalho objetivou obter calos *in vitro* a partir de cógulas de cupuaçuzeiro submetidas a diferentes condições de cultivo visando a regeneração de plantas via embriogênese somática. As concentrações de TDZ e 2,4-D para o crescimento primário de calos foram: T1 - 0,0025 mg.L⁻¹ de TDZ + 1 mg.L⁻¹ de 2,4-D; T2 - 0,005 mg.L de TDZ + 2 mg.L⁻¹ de 2,4-D; T3 - 0,01 mg.L de TDZ + 4 mg.L⁻¹ de 2,4-D; T4 - 0,015 mg.L de TDZ + 6 mg.L⁻¹ de 2,4-D; T5 - 0,02 mg.L de TDZ + 8 mg.L⁻¹ de 2,4-D; T6 - 0,02 mg.L de TDZ + 4 mg.L⁻¹ de 2,4-D e T7 - 0,01 mg.L de TDZ + 8 mg.L⁻¹ de 2,4-D. Após 14 dias, os calos foram subcultivados em meios de crescimento secundário, seguido de cultivo em meio de desenvolvimento de embrião. As combinações dos reguladores de crescimento TDZ e 2,4-D (0,02 mg.L de TDZ + 4 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 0,01 mg.L de TDZ + 8 mg.L⁻¹ de 2,4-D) promoveram a indução de calos friáveis em cógulas de cupuaçuzeiro, características importantes para a regeneração de plantas via embriogênese somática.

Palavras-chave: fruteira nativa, micropropagação, TDZ e 2,4-D

Introdução

O cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex. Spreng.) Schum.) tem despertado o interesse como objeto de pesquisas, pois esta espécie nativa da Amazônia alcançou expressão econômica não só na região, mas no mercado internacional de frutas exóticas tropicais. Entretanto, enfrenta condicionantes biológicos quanto ao cultivo na região, destacando-se o fungo *Moniliophthora perniciosa*, causador da doença vassoura-de-bruxa. A heterogeneidade dos materiais cultivados em campo é um entrave para expansão da cultura associado ao grande tempo para a formação das mudas via propagação vegetativa que alcança cerca de um ano (Alves, 2002). A utilização de programas de melhoramento com ênfase na seleção de materiais com características de alta produção de frutos, rendimento de polpa e resistência à vassoura de bruxa, principal enfermidade da cultura, são



estratégias para reverter esse quadro com suporte de um método eficiente e rápido de propagação. A micropropagação é uma técnica auxiliar valiosa, para clonagem, em curto prazo, de genótipos superiores e acelerar diversas etapas de programas de melhoramento. Com a finalidade de adaptar o protocolo de micropropagação do cacauzeiro (*T. cacao*) para o cupuaçuzeiro, em razão da familiaridade botânica entre eles, objetivou-se obter calos *in vitro* a partir de cógulas de cupuaçuzeiro submetidas a diferentes condições de cultivo visando a regeneração de plantas via embriogênese somática.

Material e Métodos

Foram coletados botões florais da cultivar BRS Codajás, genótipo 186 de cupuaçuzeiro no BAG da Embrapa Amazônia Oriental, para utilização das cógulas como explante. Assepsia dos botões florais foi realizada em câmara de fluxo laminar imergindo-os em álcool a 98% por 1 minuto, $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ a 4% com 6 gotas de tween por 15 minutos, e depois lavados 5 vezes com água destilada autoclavada. Para crescimento de calos primários (CCP), as cógulas foram removidas dos botões florais e inoculadas em meio de cultura DKW (McGranahan et al., 1987) suplementado com sais e vitamina DKW, glicose 20 g.l^{-1} , L-glutamina 250 mg.l^{-1} e mio-inositol 100 mg.l^{-1} , phytigel a 0,2%. O pH foi ajustado para 5,8. Os tratamentos foram definidos a partir das combinações dos fitorreguladores TDZ e 2,4-D adicionados antes da autoclavagem. Os tratamentos foram: T1 - 0,0025 mg.L^{-1} de TDZ + 1 mg.L^{-1} de 2,4-D; T2 - 0,005 mg.L de TDZ + 2 mg.L^{-1} de 2,4-D; T3 - 0,01 mg.L de TDZ + 4 mg.L^{-1} de 2,4-D; T4 - 0,015 mg.L de TDZ + 6 mg.L^{-1} de 2,4-D; T5 - 0,02 mg.L de TDZ + 8 mg.L^{-1} de 2,4-D; T6 - 0,02 mg.L de TDZ + 4 mg.L^{-1} de 2,4-D e T7 - 0,01 mg.L de TDZ + 8 mg.L^{-1} de 2,4-D.

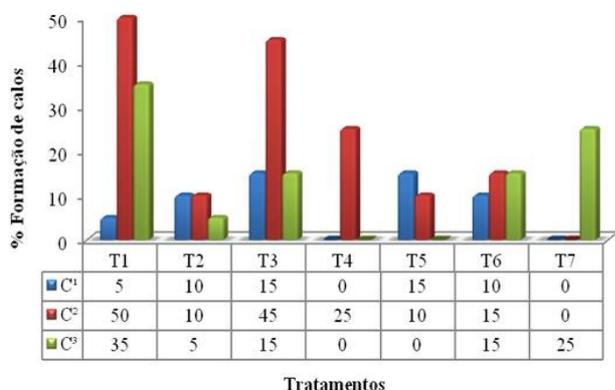
Os explantes permaneceram nesses meios por 14 dias, e posteriormente foram transferidos e mantidos por 14 dias no meio de crescimento secundário de calos (CSC), constituído de sais de WPM (Lloyd & McCown, 1980), vitaminas de Gamborg; 2,4-D 2 mg.L^{-1} , BAP a 0,05 mg.L^{-1} , e glicose 0,2%. O pH foi ajustado para 5,8 e acrescentou-se phytigel a 0,2% como agente gelificante. Em seguida, os calos foram subcultivados por 14 dias em meio de desenvolvimento de embriões (DE), composto de sais e vitaminas DKW, suplementado com sacarose a 3%; glicose 1%, phytigel a 0,2%, e pH ajustado para 5,8. Os tratamentos foram mantidos no escuro à temperatura de $25 \pm 3^\circ\text{C}$. O delineamento experimental foi um DIC constituído de quatro repetições, representada por um frasco com 20 ml de meio de cultura para cada fase de crescimento de calos, com cinco cógulas cada. A avaliação final foi realizada aos 150 dias para obtenção da porcentagem dos graus de desenvolvimento dos calos (C_1 - calo pequeno; C_2 - calo médio e C_3 - calo grande) e dos graus de oxidação.

Resultados e Discussão

Para algumas espécies, a oxidação é uma dificuldade no estabelecimento de culturas *in vitro* em decorrência da liberação de compostos fenólicos pelos tecidos em resposta aos ferimentos, e das altas concentrações de reguladores de crescimento no meio de cultura, entre outros fatores (Ledo, 2002). No trabalho atual, o cultivo *in vitro* de cógulas de cupuaçuzeiro apresentou 100% do material com grau moderado de oxidação em todos os explantes que não calejaram.

A Figura 1 apresenta o percentual do desenvolvimento de calos em diferentes estádios de desenvolvimento. Os tratamentos T3 e T5 apresentaram 15% de calos pequenos (C_1) com pouca massa calosa, e início de calejamento na base das cógulas. As maiores percentagens para obtenção de (C_2) foram obtidas nas cógulas submetidas aos tratamentos T1 e T3 com 50% e 45%, respectivamente, apresentando massa calosa na base das cógulas e em outros pontos do mesmo explante. O tratamento T1 apresentou a maior taxa de formação de (C_3) com 35% das cógulas totalmente cobertas por calos.

Figura 1. Percentual de graus de oxidação de cógulas de cupuaçuzeiro aos 150 dias de cultivo *in vitro*. C_1 - calo pequeno; C_2 - calo médio e C_3 - calo grande.



T1 - 0,0025 mg.L⁻¹ de TDZ + 1 mg.L⁻¹ de 2,4-D
 T2 - 0,005 mg.L de TDZ + 2 mg.L⁻¹ de 2,4-D
 T3 - 0,01 mg.L de TDZ + 4 mg.L⁻¹ de 2,4-D
 T4 - 0,015 mg.L de TDZ + 6 mg.L⁻¹ de 2,4-D
 T5 - 0,02 mg.L de TDZ + 8 mg.L⁻¹ de 2,4-D
 T6 - 0,02 mg.L de TDZ + 4 mg.L⁻¹ de 2,4-D
 T7 - 0,01 mg.L de TDZ + 8 mg.L⁻¹ de 2,4-D

Observamos que T1 formou calos com coloração clara na base e massa calosa visualmente mais arredondada. Entretanto, todos os explantes estavam cobertos por calos de coloração marrom escuro, evidenciando oxidação moderada e aspecto consistente. Os explantes submetidos ao T3 formaram calos de características variadas, coloração clara e brilhosa, alguns com pontuações brancas de aspecto esponjoso e outros com pontuações marrom escuro, provavelmente decorrente de oxidação. Os calos do T4 apresentaram características semelhantes a calos friáveis, porém com pontuações escuras. As cógulas do T5 formaram de calos com característica não friáveis. No T6 foram observados calos com características friáveis, coloração clara, brilhosa e massa mais arredondada. As cógulas no T7 apresentaram calos com aspecto friável. Os tratamentos T6 e T7, apesar de responderem em menor percentual de formação de calos em diferentes estágios de desenvolvimento, apresentaram os melhores



resultados quanto à qualidade dos calos obtidos, ou seja, calos com aparência desejável por exibirem semelhança a calos friáveis e massa calosa arredondada e brilhosa. Estes estudos visam à obtenção de embriões somáticos e posterior regeneração de plantas visando a clonagem da espécie.

Conclusão

Há indução de calos friáveis em cógulas de cupuaçuzeiro em meio de cultura com as combinações dos reguladores de crescimento TDZ e 2,4-D (0,02 mg.L de TDZ + 4 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 0,01 mg.L de TDZ + 8 mg.L⁻¹ de 2,4-D), primeiro passo para a regeneração de plantas via embriogênese somática.

Agradecimentos

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 microssatélites e descritores botânico-agronômicos.** Piracicaba, 2003. 146 f. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.
- LEDO, A. S.; LAMEIRA, O. A.; BENBADIS, A. K. **Explantos 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.
- 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, 1987, v.3, p. 261-271.