



OBTENÇÃO DE CALOS EM CÓGULAS DE *Theobroma grandiflorum*

Simone de Miranda Rorigues¹, Gleyce Kelly de Sousa Ramos², Oriel Figueira de Lemos³, Rafael Moyses Alves⁴, Ilmarina Campos de Menezes⁵

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

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

Resumo: A obtenção de materiais homogêneos de cupuaçu é um desafio para o aumento da expansão da cultura no campo. Assim, torna-se interessante o estabelecimento de um protocolo de clonagem de materiais superiores dessa espécie, visando o aumento da produtividade. Portanto, esse trabalho teve como objetivo o estudo *in vitro* de cógulas de cupuaçu considerando diferentes tempos de cultivo dos explantes nos meios de cultura. Consideramos o cultivo de 14 dias em meio PCG, seguido de 14 dias em meio SCG como a melhor condição de cultivo para a calogênese *in vitro* a partir de cógulas de cupuaçu.

Palavras-chave: calogênese, cupuaçu, explante floral

Introdução

A espécie *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex. Spreng.) Schum., pertencente a família do cacau, é originária da Amazônia brasileira, tornando-se conhecida devido sua polpa cremosa de sabor exótico. O valor relativamente alto do mercado da polpa da fruta, torna o cupuaçu cada vez mais atraente, com a demanda ultrapassando o estoque em algumas regiões sul americanas (Calzavara et al., 1984).

Dentre os entraves para a expansão da cultura, a doença vassoura-de-bruxa é responsável pelos maiores impactos econômico na produção, além da heterogeneidade das plantas no campo, dificultando a realização de experimentos e análises de dados, e o



processo de produção como colheita e processamento da polpa (Cruz e Alves, 2002). Portanto, materiais resistentes ao fungo *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Singer e homogêneos é a atual demanda para a expansão da espécie. Nesse sentido a cultura de tecidos pode ser utilizada estrategicamente para atingir tais objetivos. Logo, esse trabalho teve como objetivo estudar o processo de calogênese *in vitro* a partir de cógulas de cupuaçu cultivadas em meio de cultura proposto por Li e colaboradores (1998).

Material e Métodos

Botões florais no estágio de pré-antese do clone Codajás, coletados do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental no período de 8h às 10h, foram armazenadas em água destiladas, para serem usados no estabelecimento dos experimentos. Os botões florais foram desinfestados em capela de fluxo laminar usando álcool comercial (92,8%) por 1 minuto, e posteriormente imersos em solução de hipoclorito de cálcio $[Ca(ClO)_2]$ a 4% e 6 gotas de tween, por 15 minutos, antes de serem lavados por 5x com água destilada estéril. As cógulas foram isoladas e introduzidas em número de 5 por frasco, considerando 4 repetições por tratamento.

Considerando o protocolo sugerido para cacau por Li e colaboradores (1998), foram usados 3 meios de cultura sequenciais: [PCG (1º. Meio – crescimento primário de calos); SCG (2º. Meio – crescimento secundário de calos); ED (3º. Meio – desenvolvimento de embriões)], e os tratamentos foram estabelecidos de acordo o tempo de cultivo no primeiro e segundo meios de cultivo. O meio PCG foi constituído de sais e vitaminas DKW (Driver e Kuniyuki, 1984); suplementado com $2,0 \text{ mg.l}^{-1}$ de 2,4-D; $5 \times 10^{-3} \text{ mg.l}^{-1}$ de TDZ; acrescido de 20 g.l^{-1} de glicose; e pH ajustado para 5,8, semi solidificado com $2,0 \text{ g.l}^{-1}$ de phytigel, antes da autoclavagem por 20 min. O meio SCG, conteve sais WPM (Lloyd e McCown, 1980) e vitaminas de Gamborg; $2,0 \text{ mg.l}^{-1}$ de 2,4-D; $0,05 \text{ mg.l}^{-1}$ de BAP; 20 g.l^{-1} de glicose; pH ajustado para 5,8, e semi-solidificado com $2,2 \text{ g.l}^{-1}$ de phytigel; enquanto o meio ED conteve sais e vitaminas DKW, suplementado com 30 g.l^{-1} de sacarose; 1 mg.l^{-1} de glicose; 2 g.l^{-1} de phytigel.

Foram realizados 8 tratamentos: T1, T2 e T3, tiveram as cógulas cultivadas durante 14 dias em meio PCG, seguida do subcultivo no 2º meio (SCG), sendo de 14, 21 e 28 dias, respectivamente. As cógulas dos tratamentos T4 e T5 foram cultivadas



durante 21 dias no meio PCG, antes de serem cultivadas no 2º meio (SCG) por 21 e 28, respectivamente. Enquanto os tratamentos T6, T7 e T8, que tiveram os explantes cultivados durante 28 dias no meio PCG, foram transferidos para o cultivo no 2º meio (SCG), sendo de 14, 21 e 28 dias, respectivamente. As cógulas foram cultivadas todo o tempo no escuro em temperatura de $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$, e subcultivadas a cada 14 dias no 3º meio (ED). Os dados foram obtidos após 70 dias de cultivo no escuro.

Resultados e Discussão

As cógulas introduzidas em meio de cultura escureceram após 15 dias de cultivos, devido ao processo natural de oxidação. Na maioria dos tratamentos, observou-se intensa oxidação dos tecidos vegetais aos 70 dias de avaliação. Conseqüentemente, não foi observado respostas morfogênicas *in vitro* nos tratamentos T3, T4 e T8. Entretanto, as cógulas submetidas ao T1 começaram a apresentar os primeiros sinais de calejamento com 20 dias de cultivo (Tabela 1).

Tabela 1 Resposta *in vitro* de cógulas de cupuaçu, em percentagem de calejamento. T1 (14 dias em PCG, 14 dias em SCG), T2 (14 dias em PCG, 21 dias em SCG), T3 (14 dias em PCG, 28 dias em SCG), T4 (21 dias em PCG, 21 dias em SCG), T5 (21 dias em PCG, 28 dias em SCG), T6 (28 dias em PCG, 14 dias em SCG), T7 (28 dias em PCG, 21 dias em SCG), T8 (28 dias em PCG, 28 dias em SCG).

Tratamentos	Sem resposta	Calos pequeno	Calos médio	Calo grande
T1	40	5	20	35
T2	80	20	0	0
T3	100	0	0	0
T4	100	0	0	0
T5	95	0	5	0
T6	80	20	0	0
T7	80	20	0	0
T8	100	0	0	0

Os tratamentos T6 e T7 apresentaram calos brancos pequenos, característico do calejamento inicial observado nas respostas dos explantes; enquanto que 5% dos calos pequenos evoluíram para calos de tamanho grandes no T5 aos 70 dias de cultivo, sendo de coloração branca e apresentando maior resistência. Os melhores resultados foram obtidos no tratamento T1, onde obteve-se explantes com calos em distintas fases de desenvolvimentos, apresentando coloração escura, com células arredondadas e



brilhosas. Ainda, 5% desses explantes desenvolveram raízes que foram consideradas curtas e grossas. O protocolo apresentado por Li et al. (1998) também tem resultado no desenvolvimento de uma pequena porcentagem de raízes em estaminóides de cacau. Entretanto, após a eliminação destas, juntamente com o subcultivo dos explantes em meio ED, ocorre a formação de embriões somáticos de cacau.

Conclusão

Cóculas de cupuaçu cultivadas 14 dias em meio DKW seguido de 14 dias em meio WPM responderam de modo semelhante a resultados apresentados para cacau.

Agradecimento

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

Referências Bibliográficas

- CALZAVARA, B.B.G.; MULLER, C.H.; KAHWAGE, O.N.C. Fruticultura tropical: o cupuaçuzeiro - cultivo, beneficiamento e utilização do fruto. Belém: EMBRAPA, CPATU, 101p. **Série Documentos**, 32, 1984.
- 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**, 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.