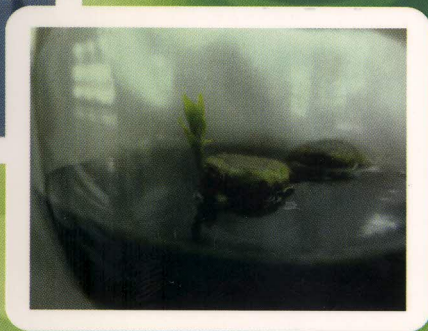


Cultura de tecidos em espécies frutíferas

Moacir Pasqual
Edvan Alves Chagas
(organizadores)



PONTIKIS, C. A.; MELAS, P. Micropropagation of *Ficus carica* L. *HortScience*, Alexandria, v. 21, n. 1, p. 153-154, fev. 1986.

STANGE, B. C.; ROWLAND, R. E.; RAPLEY, B. I.; PODD, J. V. ELF magnetic fields increase amino acid uptake into *Vicia faba* L. roots and alter ion movement across the plasma membrane. *Bioelectromagnetics*, New York, v. 23, n. 5, p. 347-354, jul. 2002.

YAKUSHIJI, H.; MASE, N.; SATO, Y. Adventitious bud formation and plantlet regeneration from leaves of fig (*Ficus carica* L.). *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, v. 78, n. 6, p. 874-879, 2003.

Frutíferas nativas da amazônia

Edvan Alves Chagas¹³

Patrícia Silva Flores¹⁴

Pollyana Cardoso Chagas¹⁵

Marcio Akira Couceiro¹⁵

Moacir Pasqual¹⁶

Rafael Pio¹⁶

Maria da Conceição da Rocha Araújo¹⁷

Marcela Liege da Silva¹⁷

1 Introdução

A Floresta Amazônica é a maior floresta tropical do mundo, com uma área original de 4,1 milhões de km², que abriga grande parte da biodiversidade mundial (Auler et al., 2004). A região é um dos mais importantes centros de diversidade de espécies frutíferas perenes comestíveis do planeta. Dentre as espécies amazônicas com maior importância na fruticultura, destacam-se o guaraná (*Paullinia cupana* var. *typica*), cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*), açaí (*Euterpe oleracea*), bacuri (*Platonia insignis*), pajurá (*Couepia bracteosa*), camu-camu (*Myrciaria du-*

13 Eng. Agr., D.Sc., Pesquisador da Embrapa Roraima. Rod. BR 174, km 08, C.P. 133, Distrito industrial, CEP 69301-970, Boa Vista-RR. E-mail: edvan.chagas@embrapa.br. Bolsista Produtividade em Pesquisa do CNPq

14 Eng. Agr., D.Sc., Pesquisadora da Embrapa Acre. Rod. BR 364, km 14, CEP 69900-056, Rio Branco-AC. E-mail: patricias.flores@embrapa.br

15 Eng. Agr., D.Sc., Professor da Universidade Federal de Roraima (CCA/UFRR), BR 174, Km 12, Monte Cristo, CEP 69300-000, Boa Vista-RR. E-mail: pollyana.chagas@ufrr.br, biofabrica@ufrr.br

16 Eng. Agr., D.Sc., Professor da Universidade Federal de Lavras (DAG/UFLA). C.P. 3037, CEP 37200-000, Lavras-MG. E-mail: mpasqual@dag.ufla.br. Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq

17 Doutoranda do Curso de Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Bionorte (UFAM/UFRR/Embrapa Roraima). BR 174, Km 12, Monte Cristo, CEP 69300-000, Boa Vista-RR. E-mail: marcelaliege@yahoo.com.br; nilmacoly@hotmail.com

bia), araçá-boi (*Eugenia stipitata*), abiu (*Pouteria caimito*), sapotã (*Quararibea cordata*), entre outras (Donadio, 1995).

As frutas da Amazônia têm despertado grande interesse nos últimos anos, tanto em âmbito nacional como internacional, em função dos seus sabores exóticos e agradáveis e das variadas formas de utilização de sua polpa pela agroindústria (Fernandes et al., 2003). A floresta amazônica possui grande número de espécies frutíferas não domesticadas e uma minoria sendo explorada através de colheita no local de ocorrência natural (Mitra, 2010). Segundo o Anuário Brasileiro da Fruticultura (2008), no país são exploradas 500 variedades de espécies produtoras de frutas comestíveis nativas e exóticas, sendo que destas, 220 ainda encontram-se na forma não domesticada. Por isso, é imprescindível o conhecimento destas espécies, bem como suas necessidades de cultivo para exploração em escala comercial, de maneira racional e sustentável.

Entre as espécies atualmente exploradas existe também uma lacuna no conhecimento e adoção de tecnologias que permitam a produção eficiente dessas frutíferas. A subutilização destas espécies é evidenciada pelos baixos níveis de produtividade dos pomares, o que tem limitado a expansão da fruticultura baseada em espécies nativas amazônicas. Essas tecnologias envolvem entre outros aspectos, o manejo de culturas e a produção de mudas que permitam a multiplicação e distribuição das mesmas aos produtores. Assim, a determinação de técnicas adequadas de propagação das mudas é o primeiro passo para domesticação de espécies nativas ou sua introdução ao cultivo comercial (Chagas et al., 2012).

A propagação sexuada de plantas nativas para uso na fruticultura não é vantajosa por resultar em populações com grande variação no período de maturação dos frutos. Além disso, algumas espécies apresentam sementes com dormência, o que compromete a germinação e a formação de mudas em escala comercial, ou ainda a recalcitrância das sementes, inviabilizando seu armazenamento por períodos prolongados.

O método de propagação de espécies frutíferas mais utilizado é a enxertia. A propagação vegetativa permite a clonagem de plantas selecionadas diretamente na natureza ou provenientes

de hibridações dirigidas, mantendo seus caracteres desejáveis e tem sido muito estudada na Amazônia em espécies nativas (Chagas et al., 2012). A propagação vegetativa resulta em mudas de alta qualidade e em pomares mais uniformes e precoces, com maior produtividade e melhor qualidade de frutos (Pereira et al., 2006). Além destas vantagens, a enxertia também é vantajosa por permitir maior controle do porte das plantas facilitando o manejo e a colheita, e a formação de mudas com resistência a patógenos de solos e tolerantes à seca.

2 Técnicas da cultura de tecidos em frutíferas nativas

Há várias décadas inúmeros trabalhos têm sido desenvolvidos com o objetivo de estabelecer protocolos de micropropagação de espécies frutíferas para a multiplicação clonal de indivíduos superiores, tendo em vista as inúmeras vantagens que a propagação *in vitro* oferece.

Além da aplicação da cultura de tecidos para a propagação de plantas de alto valor agrônomico ou portadoras de genes raros e que correm risco de extinção, a técnica também é utilizada para limpeza clonal de plantas, através da cultura de meristemas. No melhoramento genético de plantas, a cultura de tecidos pode ser empregada para reduzir o tempo para o desenvolvimento de novas cultivares e na ampliação da variabilidade genética. Dentre as técnicas de cultura de tecidos mais empregadas no melhoramento de plantas, pode-se citar: seleção *in vitro* de indivíduos resistentes/tolerantes a diversos fatores de estresse a partir da variabilidade genética pré-existente ou induzida pela variação somaclonal ou pelo uso de mutagênicos, haploidização, hibridação somática, e resgate de embriões zigóticos obtidos do cruzamento entre diferentes espécies ou gêneros de plantas (Pasqual, 2001). A cultura de tecidos também se destaca como técnica auxiliar na introgressão de genes de interesse agrônomico por meio da engenharia genética.

Uma aplicação da cultura de tecidos que é muito importante, em especial para plantas nativas, é o armazenamento e conservação de germoplasma. Porém, em diversas outras espécies, as técnicas de cultura de tecidos vêm sendo também am-

plamente utilizadas para o estudo do metabolismo, fisiologia, desenvolvimento e reprodução de plantas com propriedades de interesse comerciais desejáveis (Borém, 2009), a exemplo das nutracêuticas e fármacos.

Estudos sobre a aplicação de técnicas de cultura de tecidos em espécies frutíferas nativas da Amazônia, ainda são incipientes. Com exceção de algumas poucas espécies nativas em que estudos de cultura de tecidos se encontram em estágio avançado, como é o caso de *Theobroma cacao* e *T. grandiflorum*, para a maioria das espécies têm sido desenvolvidos com o objetivo de aprimorar metodologias de estabelecimento inicial das culturas *in vitro* (Tabela 1).

Espécie	Objetivo do estudo	Autoria
Açaizeiro (<i>Euterpe oleracea</i>)	Cultura de embriões	Ledo et al. (2001)
Cacau (<i>Theobroma cacao</i>)	Embriogênese somática	Duhem & Le Mercier (1989), Söndahl et al. (1993)
	Multiplicação de brotações	Janick & Whipkey (1985)
	Estabelecimento <i>in vitro</i>	Kononowicz & Janick (1984)
Camu-camu (<i>Myrciaria dubia</i>)	Estabelecimento <i>in vitro</i>	Gutiérrez-Rosati et al. (2006)
Cupuaçu (<i>Theobroma grandiflorum</i>)	Calogênese	Ferreira et al. (2001), Venturieri & Venturieri (2004)
	Embriogênese somática	Ferreira et al. (2002), Ferreira et al. (2006)
	Estabelecimento da cultura	Ledo et al. (2002), Ferreira et al. (2009a)
Ingazeiro (<i>Inga vera</i>)	Organogênese direta	Stein et al. (2007)
Murmuru	Cultivo de embriões	Pereira et al. (2006)
Pupunheira (<i>Bactris gasipaes</i>)	Estabelecimento <i>in vitro</i> e calogênese	Santos et al. (2010)

Tabela 1. Trabalhos desenvolvidos com cultura de tecidos em espécies frutíferas amazônicas.

2.1 Estabelecimento *in vitro* e micropropagação

Dentre as aplicações da cultura de tecidos vegetais, a micropropagação é a técnica de maior impacto e de resultados mais concretos. A técnica permite obter plantas com excelente qualidade fitossanitária, sob elevada taxa de multiplicação, em curto espaço de tempo. A micropropagação engloba diferentes etapas que vão desde o estabelecimento da cultura asséptica *in vitro* até seu enraizamento, culminando com a aclimatização da planta (Bastos et al., 2007; Grattapaglia & Machado, 1998).

Conforme mencionado anteriormente, a maioria dos estudos com cultura de tecidos de espécies de plantas nativas da Amazônia tem sido desenvolvida com o objetivo de aprimorar metodologias de estabelecimento inicial das culturas. A etapa de desinfestação tem papel fundamental, pois um dos maiores problemas na utilização da cultura de tecidos está na contaminação dos explantes. Esse problema é mais grave no cultivo de espécies lenhosas, as quais estão inseridas todas as espécies amazônicas com potencial de uso na fruticultura. O problema é maior quando os explantes são retirados diretamente do campo. Explantes obtidos de plantas mantidas em casa de vegetação também tem mostrado elevado nível de contaminação, porém seu controle é mais fácil. Algumas medidas são indispensáveis que começam antes mesmo da coleta do material do campo, passando por toda etapa de laboratório até a aclimatização e desenvolvimento da planta em casa de vegetação. Portanto, as condições fitossanitárias da planta matriz são importantes para determinar a facilidade em se esterilizar o explante durante o isolamento (Pasqual, 2001).

Ramos et al. (2013) visando a domesticação da espécie *Aniba canelilla* (casca-preciosa) testaram o tipo de explante (ápices caulinares e segmentos nodais) e diferentes concentrações de sais do meio MS no estabelecimento *in vitro*. Verificou-se que o segmento nodal foi menos sensível aos tratamentos de desinfestação realizados e proporcionaram maior sucesso na des-

contaminação, na sobrevivência e no estabelecimento *in vitro* de casca-preciosa. Porém, uma etapa primordial para o sucesso do experimento foi o tratamento preventivo realizado pelos autores. Antes da retirada dos explantes, iniciou-se o tratamento das mudas com aplicações de antibiótico ampicilina (1.000 mg L^{-1}), três vezes por semana, durante quatro semanas. Na segunda semana, acrescentou-se às pulverizações o fungicida Benomyl [Metil-1-(butilcarbamoil)- 2-benzimidazol carbamato], na concentração de 12 g L^{-1} . Ao final do tratamento preventivo e um dia anterior à coleta, algodões saturados com álcool 70% foram friccionados nos ápices caulinares e nos segmentos nodais das mudas, visando a quebrar a tensão superficial ocasionada pela cera natural das folhas e diminuir a contaminação *in vitro* (Pasqual, 2001). No dia seguinte, os explantes foram retirados e acondicionados em frascos com água destilada. No laboratório, foram lavados por 30 minutos com sabão líquido e água corrente, e imersos em solução de Benomyl (6 g L^{-1}), por 24h. Posteriormente, em câmara de fluxo laminar, os explantes foram desinfestados com álcool a 70%, acrescido de Tween-20 (1 gota em 100 mL) por 90 segundos e imersos em hipoclorito de sódio (1% de cloro ativo) por 15 min, sendo, por último, lavados três vezes com água destilada e autoclavada. Este procedimento é fundamental para o estabelecimento *in vitro* das frutíferas nativas da Amazônia uma vez que grande parte do material vegetal encontra-se em campo.

Para minimizar os problemas de contaminação e viabilizar o processo de estabelecimento *in vitro*, diversas substâncias têm sido testadas, sendo os compostos à base de cloro e etanol os mais utilizados no processo de desinfestação (Silva et al., 2005), e, em alguns casos, a adição de antibióticos ao meio de cultura (Ferreira et al., 2009a). Estudos comprovam o sucesso na utilização desses princípios ativos na desinfestação de explantes de frutíferas nativas quando se deseja estabelecer tecidos vegetais *in vitro* para posteriores estudos de multiplicação. As concentrações das soluções desinfestantes, assim como as combinações dos seus princípios ativos e os tempos de exposição, podem variar consideravelmente.

Na descontaminação de explantes florais de cupuaçu recomenda-se manter os explantes por 20 minutos em solução de hipoclorito de sódio 0,25% (Ferreira et al., 2009a). Os autores ainda observaram que a adição de antibiótico cefatoxima ao meio de cultura também foi indispensável no controle da contaminação em explantes florais de cupuaçu.

Para Bacurizeiro (*Platonia insignis*), o melhor resultado na desinfestação de explantes radiculares foi obtido utilizando-se solução de hipoclorito de sódio na concentração de 1,75% durante 30 minutos, acrescido de pré-tratamento em solução antifúngica composta de uma mistura de carboxin (0,067% p/v) e thiram (0,067% p/v); carbendazim (0,17% p/v); e clorotalonil (0,17% p/v) e tiofanato-metílico (0,067% p/v) (Ferreira et al., 2009b).

Na desinfestação de ápices de pupunha o tratamento mais efetivo foi a imersão dos explantes na solução de hipoclorito de sódio à 1,25% por 20 minutos (Santos et al., 2010). De acordo com os autores, 90% dos explantes não apresentaram contaminação durante o cultivo *in vitro*. Teixeira (2001) obteve melhores resultados para a desinfestação de explantes de brotações, folhas e gemas de pupunha, com a imersão em álcool etílico na concentração de 50% por 1 minuto, seguido de imersão em solução de hipoclorito de sódio a 0,5% por 5 minutos.

De acordo com Sato et al. (2001) e Erig & Schuch (2003), durante o estabelecimento *in vitro* de plantas nativas, a oxidação dos explantes é um problema frequentemente observado. Este é um dos principais entraves também ao estabelecimento *in vitro* do camu-camu (*Myrciaria dubia*). Na Figura 1 é possível visualizar o sucesso obtido no estabelecimento *in vitro* de camu-camu, realizado pela equipe de Fruticultura e Cultura de Tecidos da Embrapa Roraima e Universidade Federal de Roraima (UFRR).



Figura 1. Estabelecimento *in vitro* de camu-camu realizado na Biofábrica (UFRR) pela equipe de Fruticultura e Cultura de Tecidos da Embrapa Roraima e UFRR. Boa Vista-RR, 2011.

Visando avaliar o efeito do regime de luz submetido à planta matriz e do tipo de ramo utilizado no estabelecimento *in vitro* de araçá (*Psidium* spp.), Souza et al. (2006) verificaram que explantes de segmentos nodais provenientes de ramos herbáceos apresentaram menores taxas de contaminação e quando as plantas matrizes foram mantidas no escuro, foram obtidas as maiores percentagens de sobrevivência. Provavelmente, estes resultados podem ser decorrentes do menor tempo de exposição dos ramos mais jovens às fontes de contaminação microbiana no ambiente de coleta dos explantes.

Outra maneira de controlar a oxidação dos explantes durante o estabelecimento das culturas *in vitro* é a redução na concentração de alguns componentes do meio de cultura. Teixeira (2001) observou que a redução em 50% da concentração

original dos macronutrientes NH_4NO_3 e KNO_3 , sacarose e ágar do meio Murashige & Skoog (1962) (MS) foi eficiente para o controle da oxidação fenólica e proliferação de brotações em explantes de pupunha.

Durante a fase de multiplicação de brotações *in vitro*, a composição do meio de cultura vai variar com a espécie utilizada, ou mesmo conforme o tipo de tecido ou órgão utilizado como explante. O meio de cultura MS é o mais utilizado na micropropagação de espécies vegetais. No entanto, para espécies lenhosas, as quais incluem as frutíferas nativas da Amazônia, o meio WPM (LLoyd & McCown, 1981) tem sido utilizado com sucesso.

Com relação aos reguladores de crescimento utilizados para indução de brotações, verifica-se que de maneira geral, as plantas nativas respondem melhor em meio de cultura suplementado com baixas doses de auxinas e/ou citocininas. Para muricizeiro, Nogueira (2007) obteve excelentes resultados utilizando diferentes doses de BAP na micropropagação da espécie. Porém, concentrações elevadas de BAP (acima de $4,0 \text{ mg L}^{-1}$) não foram eficientes na indução de brotos axilares em segmentos nodais. Já para ingazeira, Stein et al. (2007) constataram que o BAP reduziu o número de brotações e o número de folhas dos explantes.

2.2 Embriogênese somática

Na embriogênese somática, células ou tecidos somáticos se desenvolvem até a formação de uma planta completa, através de uma série de estágios semelhantes ao desenvolvimento de embriões zigóticos.

A maioria dos sistemas de embriogênese somática ocorre pela via indireta, na qual, calos embriogênicos são induzidos e mantidos ao longo da multiplicação. A grande vantagem deste método é que grandes quantidades de embriões somáticos podem ser formados com um mínimo de manipulação e espaço físico de laboratório.

Este processo de regeneração de plantas foi obtido com sucesso em cacau (Duhem & Le Mercier, 1989; Söndahl et al., 1993) e cupuaçu (Ferreira et al., 2002; Ferreira et al., 2006).

Na embriogênese somática indireta, a formação de calos pró-embriogênicos é o passo inicial para a obtenção dos embriões somáticos e geralmente é obtida com a cultura de explantes juvenis ou embrionários em meio suplementado com auxina, com destaque para 2,4-D e TDZ (Akram & Aftab, 2008).

Santos et al. (2010) observaram ser possível a indução de calos em ápices caulinares de pupunha. A maior porcentagem de indução de calos foi de 60%, obtida com a combinação de 10,0 mg L⁻¹ de 2,4-D e 3,0 mg L⁻¹ de BAP.

Alguns trabalhos têm mostrado a capacidade de diferentes explantes de cupuaçuzeiro em formar calos. Ferreira et al. (2006), realizando estudos de indução de calos embriogênicos em explantes de cupuaçu, concluíram que a região do hipocótilo foi a parte mais responsiva do eixo embrionário, formando calos com aspecto branco e brilhante. O meio MS acrescido de 2,4-D promoveu a formação de calos grandes. Resultados semelhantes foram encontrados por Ferreira et al. (2001), no estudo sobre o efeito da concentração de auxina e do meio líquido sobre o desenvolvimento de calos de cupuaçu. Os autores observaram que a combinação de ANA e 2,4-D induziu a rizogênese e a formação de calos em segmentos de hipocótilo, e a água de coco, em meio sem reguladores de crescimento, favoreceu a rizogênese e a calogênese.

Ledo et al. (2002) avaliaram as respostas morfogênicas de diferentes explantes de cupuaçuzeiro submetidas a várias condições de cultura *in vitro* e afirmam que a ausência de indução de calos embriogênicos observado na cultura pode estar relacionada com diversos fatores, como tipo e o estágio de desenvolvimento dos explantes, meio de cultura e tipo e concentração de reguladores de crescimento.

Venturieri & Venturieri (2004) realizaram um trabalho de indução à calogênese do híbrido *Theobroma grandiflorum* × *T. obovatum*, o qual possui resistência à doença vassoura-de-

bruxa (*Crinipellis perniciosa*). Dentre os explantes utilizados, os cotilédones foram os tecidos que mais produziram calos em meio de cultura.

Para o açazeiro, Ledo et al. (2001) relataram a possibilidade de conversão *in vitro* de embriões zigóticos isolados de sementes maduras em plantas completas e normais sendo necessária a presença de ANA e BAP no meio de cultura. A concentração de 0,79 mg L⁻¹ de ANA, combinada com 0,26; 0,37 ou 0,53 mg L⁻¹ de BAP promoveram o melhor crescimento da parte aérea das plantas. Os autores ainda constataram que foi necessária a presença de ANA e BAP no meio de cultura para a conversão de embriões zigóticos e para o crescimento inicial de plantas cultivadas *in vitro*. Os mesmos autores em estudos sobre a embriogênese somática direta utilizando embriões zigóticos de açaí, obtiveram resultados satisfatórios, com a redução pela metade da quantidade de nutrientes do meio MS na ausência de fitorreguladores.

2.3 Cultivo de embriões zigóticos *in vitro*

Plantas cultivadas *in vitro* requerem uma fonte de energia exógena para a realização da fotossíntese. A sacarose tem sido a fonte de carbono mais utilizada, estando presente em meios de cultura para frutíferas nativas em concentrações que variam de 20 a 40 g L⁻¹ (Ferreira et al., 2002). Pereira et al. (2006) verificaram que embriões imaturos de murmuru apresentaram maior taxa de germinação em meio suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose. Para os embriões obtidos de frutos maduros, 15 g L⁻¹ de sacarose no meio foram suficientes para que se alcançassem os melhores índices de germinação. Estes resultados confirmam a hipótese de que dependendo da espécie e do estágio de desenvolvimento dos embriões, a presença de carboidratos no meio de cultura pode ser em concentrações mínimas ou até dispensável em razão de embriões de muitas espécies utilizarem a energia necessária para a germinação *in vitro* a partir das próprias reservas do embrião (García et al., 2002).

Embriões mais jovens normalmente necessitam de concentrações mais elevadas de carboidratos no meio de cultura para sustentar sua germinação (Chagas et al., 2003a e 2003b). Ferreira et al. (2002) obtiveram melhores resultados com a utilização de 3% de sacarose no desenvolvimento de eixos embrionários de cupuaçu, em concordância com Duhem & Le Mercier (1989), Janick & Whipkey (1985), Kononowicz & Janick (1984) e Söndhal et al. (1993) em trabalhos realizados com *Theobroma cacao*.

2.4 Germinação *in vitro* de grãos de pólen

Uma das técnicas utilizadas na obtenção de novas variedades é a hibridação controlada no campo e posterior avaliação das progênes. Para obter-se sucesso nos cruzamentos é importante detectar-se antes de ir para o campo a viabilidade dos grãos de pólen (Chagas et al., 2010). Para aplicação de técnicas de polinização artificial, o conhecimento do tempo de viabilidade do pólen e a receptividade do estigma é de fundamental importância para se obter sucesso na fecundação da flor (Ramos et al., 2008). Porém, a germinação do grão de pólen depende de vários fatores, como pressão osmótica, concentração e tipo de açúcar, consistência, temperatura, umidade, presença de enzimas e fitormônios no meio (Antonio, 2004; Chagas et al., 2010). Em frutíferas nativas, principalmente naquelas espécies cujo processo de domesticação está mais avançado, observam-se alguns poucos estudos nesta linha de investigação.

Oliveira et al. (2001), estudando a viabilidade de pólen *in vivo* e *in vitro* pelo método de coloração em genótipos de açaizeiro, observaram o sucesso na germinação *in vitro* de pólen de diferentes cultivares. Os autores verificaram que grãos de pólen *in vivo* de açaizeiro, retirados de botões florais e flores recém-abertas, apresentam viabilidade alta, sendo maior no segundo estágio de avaliação. Com relação ao tempo de armazenamento a -10°C, grãos de pólen *in vitro* apresentaram redução na viabilidade com o aumento do tempo de armazenamento. Também verificaram que a viabilidade dos grãos

de pólen variou conforme o genótipo e o estágio avaliados. Com este estudo, os autores ainda recomendam que o pólen dos genótipos avaliados pode ser utilizado em polinizações controladas sem prejuízos na fecundação, inclusive, podendo permanecer armazenado por até doze meses de conservação nas condições testadas no referido trabalho.

Em seus estudos para obter altos índices de pólen de *Theobroma grandiflorum* verificou-se que pólenes de uma única flor não são uniformes (Antonio, 2004). Por isso, recomenda-se usar todas as anteras de uma flor para preparar uma amostra. Não é necessário contar mais do que 300 grãos de pólen por amostra. O estágio em que deve ser coletado o botão para fins de polinização artificial, ou testes de germinação é quando todas as sépalas estiverem desprendidas, pétalas com a extensão distendida, estilete-estigma exposto e cerca de duas horas após o início da antese (estádio E). O pólen coletado deve ser usado, preferencialmente, até duas horas depois de coletado, onde verificou-se maior viabilidade. O autor ainda recomenda que o ótimo meio para a germinação do pólen de cupuaçuzeiro deve ser constituído de 5% de lactose 0,01% de ácido bórico (H_3BO_3) e 1% de ágar, com pH 6,1. O pólen de cupuaçuzeiro coletado de botões no estágio E pode permanecer viável até 72 horas depois de coletado da planta e conservado no botão em condições de ambiente, porém, no final desse período, sua viabilidade é muito baixa, cerca de 5%.

3 Possibilidades de utilização da cultura de tecidos em frutíferas nativas da Amazônia

Existe uma infinidade de aplicações da cultura de tecidos em frutíferas nativas da Amazônia, no entanto, pouco se tem utilizado essa importante tecnologia.

As técnicas de cultura de tecidos podem ser utilizadas para fins de conservação *in vitro*, multiplicação, intercâmbio e conservação de recursos genéticos. Estas técnicas possuem particular importância para espécies que apresentam sementes recalcitrantes ou com baixo potencial germinativo, para espécies

de propagação exclusivamente vegetativa e para espécies ameaçadas de extinção (Andrade, 2002; Engelmann & Engels, 2002).

O cultivo de anteras ou ovários são ferramentas importantes no melhoramento genético de plantas. A obtenção de plantas a partir de tecidos haplóides, seguida da duplicação do número cromossômico através do tratamento com colchicina, possibilita a obtenção de linhagens homozigotas em curto espaço de tempo, dispensando as várias gerações de autofecundação necessárias no melhoramento convencional.

A produção de sementes sintéticas a partir de embriões somáticos oferece várias vantagens para a propagação de espécies frutíferas nativas, dentre as quais salienta-se que a produção pode ocorrer ao longo do ano, sem o risco de perdas ocasionadas por adversidades climáticas, degradação dos biomas, ataques de pragas e doenças e anos de baixa produção. Além disso, a tecnologia de sementes sintéticas permite com mais segurança a manutenção da identidade clonal do material mantido em laboratório e a semeadura pode ser realizada diretamente no campo, dispensando a necessidade de estruturas para a aclimatização, sementeiras e viveiros.

A fusão de protoplastos de células somáticas vegetais também apresenta um grande potencial para a combinação de genomas de espécies sexualmente incompatíveis. Através da fusão de protoplastos e posterior regeneração de plantas são obtidos híbridos somáticos de espécies ou gêneros distintos que são poliplóides artificiais. Na fruticultura estes poliplóides podem ser utilizados como porta-enxertos.

4 Considerações finais

Embora haja eminente importância das frutíferas nativas da Amazônia, verifica-se que ainda existem poucos estudos com aplicações de técnicas de cultura de tecidos na domesticação e melhoramento destas espécies. Os trabalhos têm se concentrado praticamente no desenvolvimento de protocolos para o estabelecimento de plantas *in vitro*, e alguns poucos trabalhos com embriogênese somática, resgate de embriões imaturos e

estudos de protocolos de germinação de grãos de pólen como suporte aos programas de melhoramento genético.

Não obstante a realidade e eficácia das técnicas da cultura de tecidos, é importante ressaltar que algumas dificuldades básicas devem ser superadas para implementação satisfatória em frutíferas lenhosas, como é o caso das nativas da Amazônia. A desinfestação e a oxidação fenólica representam um dos mais sérios problemas, durante a fase de estabelecimento da cultura *in vitro* de explantes de espécies lenhosas.

Tipos adequados de explantes retirados em épocas apropriadas podem contribuir por apresentar menor teor endógeno de fenóis nos tecidos e, com isto, menor oxidação. Da mesma forma, menores danos físicos e químicos no momento da excisão e desinfestação podem contribuir para minimizar o problema de oxidação. Além disso, a adição de compostos antioxidantes como cisteína, ácido ascórbico e adsorventes como carvão ativado e PVP pode ser decisiva na prevenção à oxidação, a qual é mais acentuada nas fases iniciais de cultivo (Santos et al., 2001). Associado a isto, com o cultivo em baixas intensidades luminosas, bem como a substituição freqüente do meio de cultura, as chances de se obter sucesso no estabelecimento e cultivo de explantes de espécies lenhosas são bastante elevadas.

Outro aspecto importante a ser ressaltado diz respeito ao reduzido número de espécies frutíferas nativas da Amazônia que tem sido alvo de estudo e aplicação das técnicas de cultura de tecidos. Estas espécies resumem-se praticamente àquelas cujos programas de melhoramento estão em estágio mais avançado. Desse modo, verifica-se que ainda existe vasto campo de estudo a ser explorado e uma deficiência significativa de técnicas e informações que permitirão o avanço na domesticação e melhoramento dessas espécies.

5 Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro e as bolsas concedidas pela Universidade Federal de Roraima, Embrapa Roraima, CAPES, CNPq e FEMARH.

6 Referências

- AKRAM, M.; AFTAB, F. High frequency multiple shoot formation from nodal explants of teak (*Tectona grandis* L.) induced by thidiazuron. **Propagation of Ornamental Plants**, Sofia, v. 8, n. 2, p. 72-75, 2008.
- ANDRADE, S. R. M. **Princípios da cultura de tecidos vegetais**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2002. 14 p.
- ANTONIO, I. C. *In vitro* germination of cupuassu [*Theobroma grandiflorum* (Willdenow ex Sprengel) Schumann] pollen grain. **Científica**, Jaboticabal, v.32, n.2, p.101-106, dez. 2004.
- Anuário Brasileiro de Fruticultura. Panorama. Editora Gazeta, 2008. 136p.
- AULER A. S.; WANG X.; EDWARDS, R. L.; CHENG, H.; CRISTALLI, O. S.; SMART, P. L.; RICHARDS, D. A. Palaeoenvironments in semi-arid northeastern Brazil inferred from high precision mass spectrometric speleothem and travertine ages and the dynamics of South American rainforests. **Speleogenesis and Evolution of Karst Aquifers**, Ucrânia, v.2, n.2, p. 1-4, 2004.
- BASTOS, L. P.; MOREIRA, M. J. S.; COSTA, M. A. P. C.; ROCHA, M. C.; HANSEN, D. S.; SILVA, S. A.; DANTAS, A. C. V. L.; SOUSA, C. S. Cultivo *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa*). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.5, supl.2, p. 1122-1124, jul. 2007.
- BORÉM, A. Biotecnologia Aplicada ao Melhoramento de Espécies Silvestres. In: BORÉM, A.; LOPES, M. T. G.; CLEMENT, C. R. **Domesticação e Melhoramento de Espécies Amazônicas**. Ed. UFV. Viçosa: UFV, 2009. 117-163p.
- CHAGAS, E. A.; PASQUAL, M.; DUTRA, L. F.; SILVA, A. B.; CAZETTA, J. O.; SANTOS, F. C.; CARDOSO, P. Desempenho de diferentes estádios embrionários no cultivo *in vitro* de embriões de 'Pêra Rio' x 'Poncã'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 3, p. 523-525, dec. 2003a.
- CHAGAS, E. A.; PASQUAL, M.; RAMOS, J. D.; CARDOSO, P.; CAZETTA, J. O.; FIGUEIREDO, M. A. Development of globular embryos from the hybridization between 'Pêra Rio' sweet orange and 'Poncã' mandarin. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 3, p. 483-488, dec. 2003b.
- CHAGAS, E. A.; PIO, R.; CHAGAS, P. C.; PASQUAL, M.; NETO, J. E. B. Composição do meio de cultura e condições ambientais para a germinação de porta-enxertos de pereira. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 2, p. 261-266, feb. 2010.
- CHAGAS, E. A.; BACELAR-LIMA, C. G.; CARVALHO, A. S.; RIBEIRO, M. I. G.; SAKAZAKI, R. T.; NEVES, L. C. Propagação do camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) Mcvaugh). **Revista Agro@mbiente**, Boa Vista, v. 6, n. 1, p. 67-73, jan./abr. 2012.
- DONADIO, L. C. Native fruits of Brasil. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 1, n. 370, p. 109-112, sept. 1995.
- DUHEM, K.; MERCIER, N. Données nouvelles sur l' induction et le développement d' embryons somatiques chez *Theobroma cacao* L. **Café Cacao Thé**, Paris, v. 33, n. 1, p. 9-14, 1989.
- ENGELMANN, F.; ENGELS, J. M. M. Technologies and Strategies for *ex situ* conservation. In: ENGELS, J. M. M. et al. (Eds.). **Managing Plant Genetic Diversity**. Oxford: IPGRI, 2002. 89-103p.
- ERIG, C. A.; SCHUCH, M. W. Estabelecimento *in vitro* de plantas de marmeleiro (*Cydonia oblonga* Mill.) cultivares MC, Adans e Portugal. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 8, n. 2, p.107-115, 2003.
- FERNANDES, A. R. F.; CARVALHO, J. G.; MELO, P. C. Efeito do fósforo e do zinco sobre o crescimento de mudas do cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* Schum). **Cerne**, Lavras, v. 9, n. 2, p. 221-230, dez. 2003.
- FERREIRA, M. G. R.; CÁRDENAS, F. E. N.; CARVALHO, C. H. S.; CARNEIRO, A. A.; FILHO, C. F. D. Indução de calos embriogênicos em explantes de cupuaçuzeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 26, n. 2, p. 372-374, aug. 2004.

- FERREIRA, M. G. R.; CÁRDENAS, F. E. N.; CARVALHO, C. H. S.; 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, dec. 2001.
- FERREIRA, M. G. R.; CÁRDENAS, F. H. N.; CARVALHO, C. H. S. C.; CARNEIRO, A. A.; DANTAS FILHO, C. F. Resposta de eixos embrionários de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum.) à concentração de sais, doses de sacarose e renovação do meio de cultivo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 1, p. 246-248, abr. 2002.
- FERREIRA, M. G. R.; SANTOS, M. R. A.; BRAGADO, A. C. R. Propagação *in vitro* de cupuaçuzeiro: desinfestação de explantes florais. **Saber Científico**, Porto Velho, v. 2, n. 2, p. 37-44, jul./dez. 2009a.
- FERREIRA, M. G. R.; SANTOS, M. R. A.; SANTOS, E. R.; ROCHA, J. F.; CORREIA, A. O. Desinfestação de explantes radiculares de bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.). **Saber Científico**, Porto Velho, v. 2, n. 2, p. 56-62, jul./dez. 2009b.
- GARCÍA, J. L.; TRONCOSO, J.; SARMIENTO, R.; TRONCOSO, A. Influence of carbon source and concentration on the *in vitro* development of olive zygotic embryos and explants raised from them. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 69, n. 1, p. 95-100, april. 2002.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Embrapa-SPI: Embrapa-CNPq, v. 1, p. 99-169, 1998.
- GUTIÉRREZ-ROSATI, A.; ROJAS, E. I.; MICKY, M.; RODRIGUEZ, M. Avances en la introducción de genotipos de camu camu (*Myrciaria dubia* H.B.K. Mc Vaugh). **Folia Amazônica**, Lima, p.57-60, 2006.
- JANICK, J.; WHIPKEY, A. Axillary proliferation of shoots from cotyledonary nodal tissue of cacao. **Revista Theobroma**, Ilhéus, v. 15, n. 3, p. 125-131, jul./sept. 1985.
- KONONOWICZ, A. K.; JANICK, J. *In vitro* development of zygotic embryos of *Theobroma cacao*. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, Alexandria, v. 109, n. 2, p. 266-269, 1984.
- LEDO, A. S.; LAMEIRA, O. A.; BENBADIS, A. K. Explantes de cupuaçuzeiro submetidos a diferentes condições de cultura *in vitro*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 3, p. 604-607, dez. 2002.
- LEDO, A. S.; LAMEIRA, O. A.; BENBADIS, A. K.; MENEZES, I. C.; LEDO, C. A. S.; OLIVEIRA, M. S. P. Cultura *in vitro* de embriões zigóticos de açazeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 3, p. 468-472, dez. 2001.
- LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **Proceedings International Plant Propagator's Society**, Ashville, v. 30, p.421-327, 1981.
- MITRA S. K. Important Myrtaceae fruit crops. **Acta Horticulturae**, Leuven, v.1, n. 849, p. 33-38, jan. 2010.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 15, n. 3, p. 473-497, jul. 1962.
- NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, R.; OLIVEIRA, L. M.; SOARES, G. A.; SOARES, F. P.; CASTRO, A. H. F.; PAIVA, P. D. O. Indução de calos em explantes foliares de murici-pequeno. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 366-370, mar./abr. 2007.
- OLIVEIRA, M. S. P.; MAUÉS, M. M.; KALUME, M. A. A. Viabilidade de pólen *in vivo* e *in vitro* em genótipos de açazeiro. **Acta Botânica Brasileira**, São Paulo, v. 15, n. 1, p. 27-33, jan./abr. 2001.

PASQUAL, M. **Introdução à cultura de tecidos: fundamentos básicos**. Lavras: UFLA/FAEPE. 2001, 97p.

PEREIRA, J. E. S.; MACIEL, T. M. S.; COSTA, F. H. S.; PEREIRA, M. A. A. Germinação *in vitro* de embriões zigóticos de murmuru (*Astrocaryum ulei*). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 2, p. 251-256, mar./abr. 2006.

RAMOS, J. D.; PASQUAL, M.; PIO, L. A. S.; CHAGAS, E. A.; PIO, R. Stigma receptivity and *in vitro* citrus pollen grains germination protocol and adjustment. **Interciência**, Caracas, v.33, p.51-55, 2008.

SANTOS, M. R. A.; FERREIRA, M. G. R.; CORREIRA, A. O. C.; ROCHA, J. F. *In vitro* establishment and callogenesis in shoot tips of peach palm. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 23, n. 1, p. 40-44, jan./mar. 2010.

SANTOS, R. B.; PAIVA, R.; PAIVA, P. D. O.; SANTANA, J. R. F. **Problemas no cultivo *in vitro*: cultura de tecidos**. Paiva e Paiva, Lavras: UFLA, v.9, p.73-79, 2001.

SATO, A. Y.; DIAS, H. C. T.; ANDRADE, L. A.; SOUZA, V. C. Micropropagação de *Celtis* sp: controle da contaminação e oxidação. **Cerne**, Lavras, v.7, n. 2, p. 117-123, dez. 2001.

SILVA, A. L. L.; FRANCO, E. T. H.; BISOGNIN, D. A.; DORNELLES, E. B.; WALTER, J. M. Efeitos do nitrato de amônia na multiplicação e regeneração de gemas laterais de *Dyckia maritima* Baker - Bromeliaceae. **Revista Brasileira de Agrocência**, Pelotas, v. 11, n. 3, p. 369-371, jul./set. 2005.

SÖNDAHL, M. R.; LIU, S.; BELLATO, C.; BRAGIN, A. Cacao somatic embryogenesis. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n. 336, v.1, p.245-248, abril. 1993.

SOUZA, J. A.; SCHUCH, M. W.; SILVA, L. C. Efeito do tipo de ramo e do regime de luz fornecido à planta matriz no estabelecimento *in vitro* de araçazeiro cv. "Irapuã". **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 6, p. 1920-1922, nov./dez. 2006.

STEIN, V. C.; PAIVA, R.; NOGUEIRA, G. F.; SOARES, F. P.; MARTINOTTO, C. Organogênese direta em explantes de ingazeiro (*Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn.). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.5, supl.2, p. 723-725, jul. 2007.

TEIXEIRA, J. B. **Limitações ao processo de cultivo *in vitro* de espécies lenhosas**. Brasília: Embrapa-Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001.

VENTURIERI, G. A.; VENTURIERI, G. C. Calogênese do híbrido *Theobroma grandiflorum* x *T. obovatum* (Sterculiaceae). **Acta Amazônica**, Manaus, v. 34, n. 4, p. 507-511, oct./dec. 2004.