

Anais



VI Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Amazônia Ocidental
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Anais da VI Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental

*Regina Caetano Quisen
Ronaldo Ribeiro de Moraes
Luis Antonio Kioshi Aoki Inoue
Gilvan Ferreira da Silva
Editores Técnicos*

*Embrapa Amazônia Ocidental
Manaus, AM
2010*

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Amazônia Ocidental

Rodovia AM-010, km 29, Estrada Manaus/Itacoatiara
Caixa Postal 319, 69010-970, Manaus, AM
Fone: (92) 3303-7800
Fax: (92) 3303-7820
www.cpa.embrapa.br

Comitê Local de Publicações

Presidente: *Celso Paulo de Azevedo*
Secretária: *Gleise Maria Teles de Oliveira*
Membros: *Aparecida das Graças Claret de Souza*
José Ricardo Pupo Gonçalves
Lucinda Carneiro Garcia
Luis Antonio Kioshi Inoue
Maria Augusta Abtibol Brito
Maria Perpétua Beleza Pereira
Paulo César Teixeira
Raimundo Nonato Vieira da Cunha
Ricardo Lopes
Ronaldo Ribeiro de Moraes

Revisão de texto: *Maria Perpétua Beleza Pereira*

Normalização bibliográfica: *Maria Augusta Abtibol Brito*

Diagramação e arte: *Gleise Maria Teles de Oliveira*

1ª edição

1ª gravação em CD-ROM (2010): 200

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**CIP-Brasil. Catalogação-na-publicação.
Embrapa Amazônia Ocidental.**

Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental (6. : 2010 :
Manaus).

Anais... / editores Regina Caetano Quisen, Ronaldo Ribeiro de Moraes, Luis
Antonio Kioshi Aoki Inoue e Gilvan Ferreira da Silva. – Manaus: Embrapa
Amazônia Ocidental, 2010.

1 CD-ROM; 4 ¼ pol.

ISBN 978-85-89111-10-2

1. Pesquisa. 2. Desenvolvimento. I. Quisen, Regina Caetano. II. Moraes,
Ronaldo Ribeiro de. III. Inoue, Luis Antonio Kioshi Aoki. IV. Silva, Gilvan Ferreira
da. V. Título.

CDD 501

Embriogênese Somática de Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*): Indução a Calogênese

Marcelle Larissa Correa
Nelcimar Reis Sousa
Aparecida das Graças Claret de Souza
Regina Caetano Quisen

Resumo

O processo de embriogênese somática da espécie *Theobroma grandiflorum* surgiu com o objetivo de auxiliar a produção de planta-elite em grande escala, podendo servir como base para programas de melhoramento, visando à produção de plantas resistentes a doenças, como a vassoura-de-bruxa, e à alta produção de frutos. Desse modo, esse trabalho teve como objetivo estudar o processo inicial da morfogênese por meio da calogênese em diferentes explantes de cupuaçuzeiro. Os tecidos foram inoculados in vitro em meio de cultura com sais, vitaminas, aminoácidos, açúcares, agentes antioxidantes, ágar e diferentes concentrações de auxinas e citocininas. As culturas foram mantidas em sala de crescimento, com temperatura, umidade e fotoperíodo controlados. Os resultados indicaram que a cultura de calos, nessa espécie, requer a presença de reguladores de crescimento, provavelmente por não apresentar níveis endógenos suficientes de hormônios, principalmente as auxinas. Os dados confirmaram a recalcitrância in vitro observada em muitas culturas perenes tropicais e reforçam a necessidade do aprofundamento na composição dos meios de cultura e a definição do comportamento morfogenético desses tecidos com vistas à embriogênese somática.

Termos para indexação: cultura in vitro, espécies lenhosas, recalcitrância.

Introdução

Os plantios e a produção de cupuaçu concentram-se na região Norte do País, sendo o Pará o principal estado produtor, seguido do Amazonas, de Rondônia e do Acre (CAVALCANTE, 2001). Esses plantios possuem alto grau de heterozigiosidade genética, sendo esse fato associado à falta de material genético melhorado, limitando consequentemente a expansão da cultura do cupuaçuzeiro na Amazônia. Outro fator que interfere no cultivo é a incidência do fungo *Crinipellis pernicioso*, agente causador da doença conhecida vulgarmente como “vassoura-de-bruxa”, que também promove a alta taxa de abortamento dos frutos e a queda dos frutos maduros, prejudicando assim seu valor comercial (RODRIGUES, 2000).

Desenvolvido em rede e envolvendo as Unidades da Embrapa com sede na região amazônica, o programa de melhoramento genético do cupuaçu da Embrapa Amazônia Ocidental está, no momento, concentrado na avaliação da variabilidade intraespecífica e seleção preliminar de genótipos superiores para serem avaliados na primeira rede de experimentos de competição de clones da região.

Nesse programa, também estão sendo desenvolvidos diversos estudos de propagação *in vitro*, que tem como objetivo possibilitar a inserção dessa técnica como ferramenta para o melhoramento, a conservação e propagação massal da espécie.

Diante disso, as biotécnicas vieram para trazer benefícios ao melhoramento genético das plantas, sendo um dos seus principais objetivos acelerar a geração de conhecimentos fundamentais sobre a

biologia e a genética da cultura, e, em consequência, o melhoramento pode ser mais científico e preciso, com redução do tempo para o desenvolvimento de cultivares de alto desempenho.

Alguns estudos de propagação de espécies *in vitro* no gênero *Theobroma* vem sendo desenvolvidos, concentrados principalmente no cacau, os quais relataram que o potencial e a competência do gênero à regeneração de plântulas a partir da embriogênese somática, direta e indireta, de diferentes tecidos é bastante proveitosa

Os primeiros estudos visando à obtenção de plantas de cacau por embriogênese somática foram conduzidos por Esan (1977) e Pence et al. (1979), os quais utilizaram embriões imaturos como fonte de tecidos para cultivo, mas apenas cerca de dez anos mais tarde foi possível obter plantas completas, com raiz bem desenvolvida, utilizando esse mesmo tipo de explante (NÓVAK et al., 1986).

Entretanto, apesar da existência de técnicas de clonagem atualmente disponíveis para a produção massiva de espécies correlatas, não tem sido possível obter os mesmos avanços no cupuaçuzeiro, onde raras são as contribuições, na literatura, à cultura referente a aplicações de técnicas biotecnológicas.

Alguns resultados iniciais foram obtidos por Janick e Whipkey (1988). Velho et al. (1990) obtiveram embriões somáticos de cupuaçu a partir de calos, mas não conseguiram converter em plântulas viáveis.

Esse comportamento é atribuído por Damião Filho (1995) à recalcitrância de certas espécies de plantas à obtenção de calos em quaisquer tipos de explante,

sendo que algumas gramíneas e muitas espécies lenhosas só produzem calos quando são empregadas doses altíssimas de auxinas no meio de cultura.

Assim, considerando esse panorama, é necessário incrementar pesquisas de embriogênese somática voltadas aos aspectos morfogenéticos de diferentes tecidos de plantas de cupuaçu submetidos a várias condições de cultura *in vitro*. Neste sentido, este trabalho tem como objetivo induzir a formação de calos embriogênicos em tecidos do cupuaçu (*T. grandiflorum*), em função do tipo de explante e meio de cultura.

Material e Métodos

No experimento 1, peças florais (pétalas, cógulas e estaminódios) foram isolados de botões florais imaturos e inoculadas sob condições *in vitro* em meio de indução a calogênese com sais e vitaminas de DKW (MC GRANAHAN et al., 1987), suplementado com ágar (0,7%), glicose (2%), água de coco (10%), aminoácidos, 2,4-D (4,0 mg⁻¹.L) e TDZ (0,005 mg⁻¹.L). Os tratamentos consistiram na ausência (tratamento 1) e na presença (tratamento 2) de carvão ativado (0,2%) no meio DKW. O pH foi ajustado para 5,8 e o meio autoclavado, para 121 °C por 15 minutos. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com seis repetições por tratamento, com cinco explantes cada.

No experimento 2, utilizou-se como explante o tecido nucelar de sementes imaturas e inoculados em meio de indução a calogênese, o MS/2 (MURASHIGE e SKOOG, 1962) suplementado com água de coco (10%), caseína (100 mg⁻¹.L), PVP (0,5 g⁻¹.L), sacarose (2,0 g⁻¹.L), glicose (2,0 g⁻¹.L), ágar (0,6 %), 2,4-D

(1,0 mg⁻¹.L). No tratamento 1, a cinetina foi adicionada 0,5 mg⁻¹.L, enquanto o 2ip a 0,5 mg⁻¹.L no tratamento 2. O pH foi ajustado para 5,8 e o meio autoclavado a 121 °C por 15 minutos. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com seis repetições por tratamento, com cinco explantes cada.

No experimento 3, utilizaram-se como explantes segmentos de epicótilos de plântulas obtidas de germinação *in vitro* que foram inoculados em meio de cultura com sais e vitaminas de MS suplementado com sacarose (3,0%), glicose (6,0%) e ágar (0,9%). Nesse meio basal foram constituídos quatro tratamentos: o T1 com TDZ (0,5 mg⁻¹.L); o T2 com TDZ (0,5 mg⁻¹.L) e ANA (0,1 mg⁻¹.L); o T3 com TDZ (0,5 mg⁻¹.L) e tiamina (150 mg⁻¹.L); e o T4, com TDZ (0,5 mg⁻¹.L), ANA (0,1 mg⁻¹.L) e tiamina (150 mg⁻¹.L). O pH foi ajustado a 5,8 e autoclavado a 121 °C por 15 minutos. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com dez repetições por tratamento, com um explante cada.

No experimento 4, foram utilizados como explantes segmentos de folhas de plântulas obtidas de germinação *in vitro* e inoculados em meio de indução de calogênese com sais e vitaminas de MS suplementado com sacarose (2,5%) e fitagel (0,2%). No meio basal foram aplicados sete tratamentos: T1 - 2,4-D (5 mg⁻¹.L); T2 - 2,4-D (7 mg⁻¹.L); T3 - 2,4-D (10 mg⁻¹.L); T4 - BAP (2,0 mg⁻¹.L) e AIA (0,5 mg⁻¹.L); T5 - BAP (4,0 mg⁻¹.L) e AIA (0,5 mg⁻¹.L); T6 - BAP (6,0 mg⁻¹.L) e AIA (0,5 mg⁻¹.L); e T7 - BAP (8,0 mg⁻¹.L e AIA (0,5 mg⁻¹.L). O pH foi ajustado a 6,0 e autoclavado a 121 °C por 15 minutos. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com seis repetições por tratamento, com quatro explantes cada.

As culturas foram mantidas no escuro, em sala de crescimento, com temperatura de $27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ até apresentarem formação de calos (30-100 dias). Ao final de cada fase, os experimentos foram avaliados pela contagem de calos aparentes, aspecto do calo formado, presença e ausência de contaminantes (fungos e bactérias).

Resultados e Discussão

Experimento 1

Os resultados obtidos (Tabela 1) demonstram que a produção de calos ocorreu para todos os explantes no tratamento 1 (sem carvão), sendo que no tratamento 2 (com carvão), somente a cógula apresentou essa formação. Esses calos apresentaram aspecto que variavam de compacto a semifriável e

coloração escurecida ou clara (branca ou amarela), seguida do escurecimento, e variando em diferentes seções no mesmo explante.

Arnaldos et al. (2001) atribuíram essas mudanças à formação de compostos pigmentados em resposta ao estresse surgido frente a um possível déficit de hormônios, nutrientes ou água, condições estas que provocam aumento em radicais livres. Resultados semelhantes a esse trabalho foram verificados por Valle (2003), em que a adição de 5 e 7,5 mg.L⁻¹ de 2,4-D associado a 0,5 mg.L⁻¹ de cinetina promoveu total necrose dos tecidos. Dessa forma, cuidados devem ser observados com relação à restrição de tempo entre a formação do calo e o início da degeneração das células que o formam, uma vez que esse período é de no máximo 10 dias (VALLE, 2003).

Tabela 1. Eficiência do meio DKW suplementado com 2,4-D e TDZ na indução de calos em segmentos florais de cupuaçuzeiro, aos 90 dias. Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, 2009.

Cógula	Tratamento 1 (sem carvão)	Tratamento 2 (com carvão)
Formação de calo (%)	16,7	6,7
Explante inerte (%)	6,7	10,0
Perda por oxidação (%)	10,0	53,3
Perda por contaminação (%)	33,3	30
Estaminódio	Tratamento 1 (sem carvão)	Tratamento 2 (com carvão)
Formação de calo (%)	6,7	0,0
Explante inerte (%)	26,7	16,7
Perda por oxidação (%)	33,3	83,3
Perda por contaminação (%)	6,7	33,3
Pétala	Tratamento 1 (sem carvão)	Tratamento 2 (com carvão)
Formação de calo (%)	20,0	0,0
Explante inerte (%)	40,0	83,3
Perda por oxidação (%)	3,3	16,7
Perda por contaminação (%)	36,7	0,0

A oxidação foi responsável pelas maiores perdas de explante, como para estaminódios, que alcançaram 83,3% e 33,3% nos tratamentos 1 e 2, respectivamente. No tratamento 2, essas perdas foram maiores para todos os explantes quando comparadas ao tratamento 1 (Tabela 1).

Um dos fatores frequentemente considerados como componente da recalcitrância *in vitro* é o elevado conteúdo fenólico e oxidativo nesses compostos. Efraim et al. (2005), comparando o teor de compostos fenólicos (flavan-3-ols e procianidinas), encontraram valores consideráveis destes em tecidos de cupuaçu e cacau. Do mesmo gênero do cacau, que apresenta naturalmente uma grande quantidade de polifenóis (GRIFFITHS, 1958); KIIM e KEENEY, 1983), o conteúdo desses compostos nos tecidos de cupuaçu pode ser um dos fatores que influenciaram na baixa frequência de formação de calos.

As pétalas foram responsáveis por 40% dos tecidos que não responderam aos estímulos à calogênese no tratamento 1, seguido pelo estaminódio (26,7%) e cógula (6,7%). No tratamento 2, esses valores foram de 83,3% (pétalas), 16,7% (estaminódios) e 10% (cógulas). O comportamento dos tecidos que não responderam à indução sugere que a cultura de calos dessa espécie requer a presença de 2,4-D exógeno, provavelmente por não apresentar níveis suficientes de auxina endógena.

Também se observou que adição de carvão ativado no tratamento 2, suplementado ao meio de cultura com o objetivo de minimizar os efeitos negativos da oxidação fenólica durante a cultura *in vitro*, interferiu na calogênese

nos três diferentes explantes testados. Esse fato é reforçado por Winkle et al. (2003), que fazem considerações de que o carvão ativado promove a adsorção também de elementos que promoveriam a calogênese, tais como os reguladores de crescimento, vitaminas, Fe-EDTA, íons Zn e Cu, e outros componentes do meio de cultura.

De acordo com Damião Filho (1995), certas espécies de plantas são recalcitrantes à obtenção de calos em quaisquer tipos de explante, sendo que algumas gramíneas e muitas espécies lenhosas só produzem calos quando são empregadas doses altíssimas de auxinas no meio de cultura. Rodrigues (2000), por sua vez, atribui esses resultados à concentração do 2,4-D, que tanto pode induzir como inibir a calogênese.

Além desses fatores, devem ser considerados nessa análise a concentração dos sais, bem como a temperatura, o fotoperíodo e os agentes geleificantes. Neste sentido, os resultados obtidos neste trabalho reforçam a necessidade do aprofundamento na composição dos meios de cultura visando à definição do comportamento morfogenético desses tecidos com vistas à embriogênese somática.

Experimento 2

Conforme demonstrado na Tabela 2, ambos os tratamentos influenciaram a formação de calos em segmentos de tecido nucelar, em que o tratamento com 2,4-D e cinetina (T1), apesar de apresentar 56% de calos formados, foi responsável por 36% de tecidos não responsivos. Os calos apresentavam coloração branca e de aspecto cristalino e compacto.

Tabela 2. Influência da associação de reguladores de crescimento na calogênese de tecido nucelar de cupuaçuzeiro, aos 100 dias. Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, 2009.

	Tratamento 1 (Meio com 2,4-D e KIN)	Tratamento 2 (Meio com 2,4-D e 2ip)
Perda por contaminação (%)	8,0 b	48,0 a
Perda por oxidação (%)	0,0 ns	0,0 ns
Explante inerte (%)	36,0 a	12,0 b
Explante com calo (%)	56,0 ns	40,0 ns

Médias seguidas por letras iguais na mesma linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Verificou-se diferença significativa entre os tratamentos quanto à contaminação, com 48% de perda de explantes por agentes contaminantes no tratamento, comparado a 8% do tratamento 1. Em ambos os tratamentos, não ocorreu perda por oxidação durante essa fase da calogênese.

Os tratamentos aplicados contribuíram para o desenvolvimento de calos nos 70 dias de cultura in vitro de segmentos nucleares de sementes imaturas. A combinação do 2,4-D com cinetina ou 2ip, nas concentrações testadas, foi bastante favorável à iniciação e progressão. Esse fato demonstra a necessidade de haver um balanço ideal entre os reguladores de crescimento para indução e manutenção dos calos, sendo variável conforme a espécie, a idade e o tipo do explante. Entre as auxinas existentes, o 2,4-D e o ANA são os mais frequentemente empregados na indução de calos e em culturas em suspensão (PESCADOR et al., 2000).

A formação de calos compactos indica a necessidade de outros testes com diferentes concentrações desses reguladores de crescimento, visto que, de acordo com Gaspar et al. (1996), altas concentrações dessa auxina podem

induzir a calogênese. Torres e Caldas (1990), por sua vez, alertam que concentrações elevadas de auxinas podem inibir, dependendo da espécie, a formação de calos friáveis.

Experimento 3

De acordo com a análise de variância, não houve diferença estatística entre os tratamentos utilizados, sendo que todos os meios testados foram eficientes na indução de calos em tecidos de segmento de epicótilo de cupuaçuzeiro com porcentagens que variaram entre 100% (tratamento 1) e 50% (tratamento 4), e valores intermediários de 70% (tratamento 2) e 50% (tratamento 3). Apesar de Lopes et al. (1997) terem observado que a tiamina promoveu o crescimento e incrementou a friabilidade de calos de *Pilocarpus pennatifolius*, no presente trabalho os calos formados apresentaram aspecto compacto e cristalino.

A aplicação de TDZ influenciou a formação de calos, sendo maior no tratamento sem adição de tiamina e/ou ANA. Essa interação, apesar de favorecer valores entre 70% e 50% de calos, considerando a recalitrância in vitro característica de espécies perenes,

quanto maior a porcentagem de calos obtidos, maior a possibilidade de converter essas massas calosas em calos embriogênicos e posterior formação de embriões somáticos e regeneração de plantas.

Aparentemente o uso de TDZ aumenta o potencial da formação de calos em segmentos de epicótilo, enquanto que a associação com a auxina ANA apresentou comportamento oposto. Segundo Kaneda et al. (1997), melhor performance do TDZ, aparentemente, pode estar relacionada a maior atividade citocinínica ou a forma de ação diferente de outras citocininas durante o processo de desdiferenciação e rediferenciação celular, como também ao fato de o TDZ induzir a acumulação de auxinas e citocininas endógenas no tecido (MURTHY et al., 1995).

Experimento 4

De acordo com os resultados obtidos (Figura 1), verificou-se que os segmentos foliares foram responsivos aos tratamentos aplicados, com maior formação de calos quando cultivados em meio com a combinação citocinina/auxina.

Flores et al. (2006), estudando a indução de calos em explantes de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.), verificaram que explantes de origem foliar foram os que proporcionaram os melhores resultados, semelhantes aos obtidos por Dhar e Joshi (2005), que, trabalhando com *Saussurea obvallata*, observaram significativa influenciado tipo primário de explantes (hipocótilo, raízes, cotilédones e folhas) sobre a taxa de formação de calos, tendo sido as folhas a melhor fonte com 100% de calogênese.

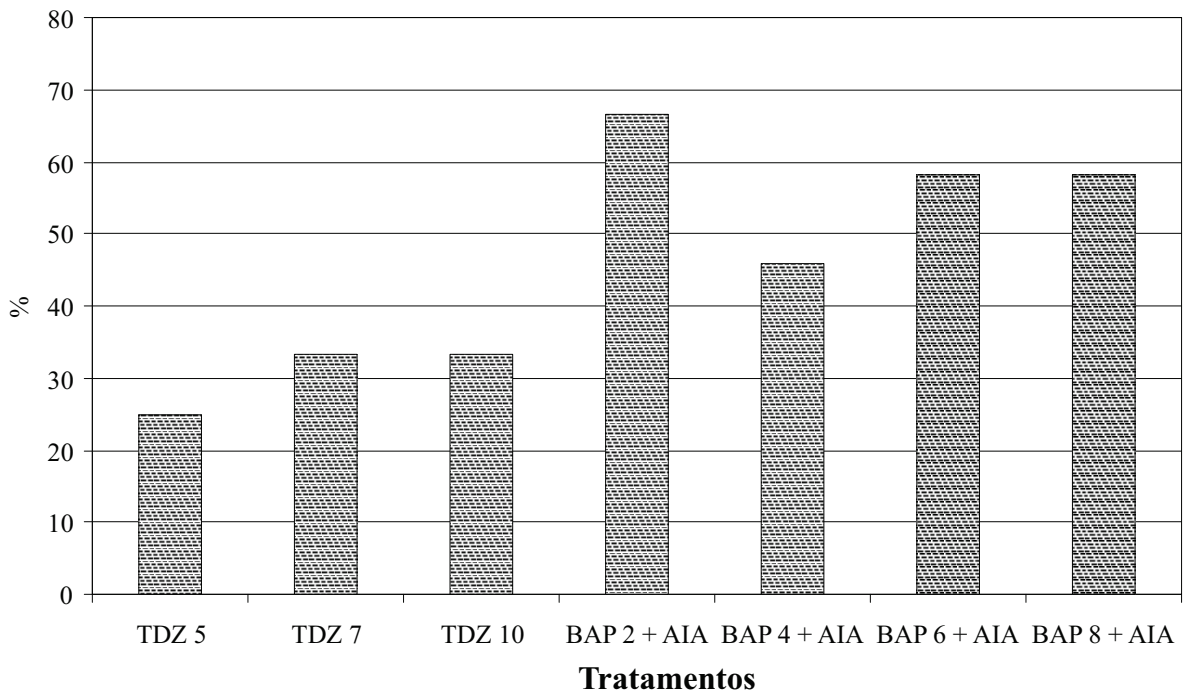


Figura 1. Porcentagem de explantes foliares de *T. grandiflorum* com calos formados em meio MS sob diferentes concentrações de reguladores de crescimento, aos 60 dias após inoculação. Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, 2009.

Segundo Rey et al. (1980), auxinas e citocininas são exigidas para o crescimento de calos. As primeiras propiciam um calo mais friável, enquanto as outras, calos mais firmes. Assim como observado nos resultados apresentados neste trabalho, a concentração dos reguladores de crescimento influencia o desenvolvimento da cultura de calos in vitro e, geralmente, concentrações semelhantes de auxinas e citocininas no meio promovem a formação de calos. Esses resultados confirmam o relato de Tisserat (1985), ao verificar que a produção de calos pode ser induzida apenas pela adição de auxina; entretanto, quando foi adicionada citocinina, a proliferação dos calos aumentou.

Conclusões

- Nenhum dos experimentos (1 a 4) avaliados apresentou proliferação de calos embriogênicos até o final da cultura, sendo que no primeiro experimento alguns calos com aspecto semifriável e coloração mais clara escureceram ao final da permanência no meio de indução.
- Para iniciar o processo de cultura de calos para o cupuaçuzeiro, é imprescindível a suplementação do meio nutritivo com reguladores de crescimento.
- Todos os tecidos testados demonstraram competência para a diferenciação celular, sendo necessário, contudo, novos experimentos com variações na composição do meio de cultura (sais, vitaminas, aminoácidos, carboidratos, entre outros compostos) visando à formação de calos embriogênicos, à maturação e à germinação de embriões somáticos e regeneração de plantas completas.

Agradecimentos

Ao CNPq, pela concessão de bolsa; e à Embrapa Amazônia Ocidental, pela logística cedida.

Referências

ARNALDOS, T.L.; MUÑOZ, R.; FERRER, M.A.; CALDERÓN, A.A. Changes in phenol content during strawberry (*Fragaria x ananassa*, cv. Chandler) callus culture. **Physiologia Plantarum**, v.13, p.315-322, 2001.

CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/Embrapa-CNPH, 1990. p.37-70.

CAVALCANTE, A. da S. L. **Respostas morfogenéticas in vitro de açaizeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) e de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* (Will. Ex Spreng Schum))**. 2001. 124 p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceara, Fortaleza.

DAMIÃO FILHO, C. F. **Cultura de tecidos de plantas: micropropagação**. Jaboticabal: FUNEP, 1995. 25 p.

DHAR, U.; JOSHI, M. Efficient plant regeneration protocol through callus for *Saussurea obvallata* (DC) Edgew. (Asteraceae): effect of explant type, age and plant growth regulators. **Plant Cell Report**, Berlin, v.24, p.195-200, 2005.

- EFRAIM, P. et al. Identificação de flavanols e procianidinas em sementes de cupuaçu e cacau. In: CONGRESSO IBEROAMERICANO DE INGENIERÍA DE ALIMENTOS, 5., 2005, Jalisco. **Hacia una visión integrada de Ika ingeniería de alimentos**. Campo Grande: Embrapa Agropecuária Oeste, 2005. 1 CD ROM.
- ESAN, E. B. Tissue culture studies on cacao (*Theobroma cacao* L.): a supplementation of current research. In: INTERNATIONAL COCOA RESEARCH CONFERENCE, 5., 1977, Idaban. **Resumes...** Idaban: [s.n.], 1977. p. 116-125.
- FIGUEIRA, A.; JANICK, J. Development of nucellar somatic embryos of *Theobroma cacao* L. **Acta Horticulturae**, v. 336, p. 231-236, 1993.
- FLORES, R.; NICOLOSO, F. T.; VASCONCELLOS, N. J. S. Indução de calos e aspectos morfogênicos de *Puffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. **Rev. Bras. Pl. Med. Botucatu**. 8(3):89-95p. 2006
- GASPAR, T.; KEVERS, C.; PENEL, C.; GREPPIN, H.; REID, D.M.; THORPE, T.A. Plant hormones and growth regulators in plant tissue culture. **In Vitro Cellular and Development Biology-Plant**, Wallingford, v. 32, p.272-289. 1996.
- GONDIM, T. M. S. **Aspectos de produção de cupuaçu**. Rio Branco, AC: Embrapa Acre, 2001. 43 p.
- GRIFFITHS, E. 1958. Sexual reproduction and variation in *Gloeotinia temulenta* (Prill. & Delacr.) Wilson & Gray. **Transactions of the British Mycological Society**, 41:461-482.
- JANICK, J.; WHIPKEY, A. Somatic embryogenesis in *Theobroma grandiflorum*. **HortScience**, Alexandria, n. 23, p.807, 1988.
- KANEDA, Y. et al. Combination of thidiazuron and basal media with low salt concentrations increases the frequency of shoot organogenesis in soybeans [*Glycine max* (L.) Merr.]. **Plant Cell Reports**, v.17, p.8-12, 1997.
- KIM, H.; KEENEY, P. G. 1983. Method of analysis for (-)-epicatechin in cocoa beans by high-performance liquid chromatography. **J. Food Sci**, 48:548-551.
- LOPES, S. de O. et al. Influência da tiamina no cultivo in vitro de *Pilocarpus pennatifolius*. **Caderno de Farmácia**, v. 13, n. 2, p. 167-168, 1997.
- McGRANAHAN, G. H.; DRIVER, J. A.; TULECKE, W. Tissue culture of juglans. In: BONGA, J. M.; DURZAN, D. J. (Ed.). **Cell and tissue culture in forestry: case histories: gymnosperms, angiosperms and palms**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1987. p. 261-271.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- MURTHY, B. N. S.; MURCH, S. J.; SAXENA, P. K. Thidiazuron- induced somatic embryogenesis in intact seedlings of peanut (*Arachis hypogaea*): endogenous growth regulator levels and significance of cotyledons. **Physiologia Plantarum**, v.94, p.268-276, 1995.

NÓVAK, F. J. DONINI, B.; OWUSU, G. **Somatic embryogenesis and in vitro plant development of cocoa (*Theobroma cacao*)**. In: Proc. Int. Symp. Nuclear techniques and in vitro culture for plant improvement. IAEA, Vienna, pp. 443-449, 1986.

PENCE, V. C.; HASEGAWA, P. M.; JANICK, J. Asexual embryogenesis in *Theobroma cacao* L. **Journal of the American Society of Horticulture Science**, Geneva, New York, v.104, n.2, p.145-148, 1979

PESCADOR, R. Biotecnologia da *Piper hispidinervium* – Pimenta longa. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 15, p. 18-23, 2000.

REY, H.; MROGINSKI, L. A.; FERNANDEZ, A. Inducción in vitro de callos y raíces de seis cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). **Pitón**, v. 39, n. 1, p. 161-170, 1980.

RODRIGUES, E. F. **Desenvolvimento do eixo embrionário in vitro e calogênese de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) e estabelecimento do ápice caulinar de bacuri (*Platonia insignis*)**. 2000 70 p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

TISSERAT, B. Embryogenesis, organogenesis, and plant regeneration. In: DIXON R. A. (Ed.). *Plant cell culture: a practical approach*. Oxford: IRL, 1985. p. 79-105.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília, DF: ABCTP/ EMBRAPA-CNPQ, 1990. 433 p.

VAN WINKLE, S.; JOHNSON, S.; PULLMAN, G. S. The impact of gelrite and activated carbon on the elemental composition of plant tissue culture media. **Plant Cell Report**, New York, v. 21, p. 1175-1182, 2003.

VELHO C. C.; WHIPKEY, A.; JANICK J. **Cupuassu: a new beverage crop in Brazil**. In: Janick J. and Simon JE (eds) *Advances in New Crops*, pp 372-375, 1990. Timber Press, Portland, USA.