

EXPLANTES DE CUPUAÇUZEIRO SUBMETIDOS A DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTURA *IN VITRO*¹

ANA DA SILVA LEDO²; OSMAR ALVES LAMEIRA³; ABDELLATIF KEMALLEDDINE BENBADIS⁴

RESUMO- Este trabalho objetivou avaliar as respostas morfo genéticas de diferentes explantes de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* Schum.) submetidos a várias condições de cultura *in vitro*. A utilização de 2,4-D nas concentrações de 4,52; 6,78 e 9,05 μM promoveu a formação de calos friáveis em eixos embrionários e o TDZ nas concentrações de 2,0 e 3,0 μM induziu uma alta frequência de calos friáveis e menor oxidação em segmentos de folhas jovens. O 2,4-D combinado com KIN, promoveu a iniciação de calos friáveis e o ANA combinado com KIN, a rizogênese em segmentos cotiledonares. Na presença de 2,26 μM de 2,4-D e 13,94 μM de KIN, houve a formação de calos friáveis em segmentos caulinares. A adição de água de coco, 2iP e ANA estimulou o rápido crescimento e a progressão de culturas de calo em eixo embrionário, segmentos caulinares e segmentos de folhas jovens clorofiladas.

Termos para indexação- *Theobroma grandiflorum*, calos, reguladores de crescimento

CUPUASSU EXPLANTS UNDER DIVERSE CONDITIONS OF *IN VITRO* CULTURE

ABSTRACT- This study aimed to evaluate morphogenetic responses of different cupuassu explants (*Theobroma grandiflorum* Schum.) under diverse conditions of *in vitro* culture. 2,4-D (4,52; 6,78 and 9,05 μM) promoted the formation of friable calluses in embryonic axes and TDZ (2,0 and 3,0 μM) induced a high frequency of friable calluses and smaller oxidation in segments of young leaves. 2,4-D combined with KIN promoted the initiation of friable calluses while NAA combined with KIN promoted the rhizogenesis in cotyledon segments. In the presence of 2,26 μM 2,4-D and 13,94 μM KIN it was noticed the growth of friable calluses in stem segments. The addition of coconut water, 2iP and NAA stimulated the fast growth of calluses in embryonic axis, stem segments, and chlorophyllous young leaf segments.

Index Terms: *Theobroma grandiflorum*, calli, growth regulators

O cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* Schum.) é encontrado, espontaneamente, nas matas de terra firme e várzea alta, na parte sul e leste do Pará, abrangendo as áreas do médio Tapajós, rios Xingu e Guamá, alcançando a pré-Amazônia maranhense (Cavalcante, 1991). Atualmente, está disseminado por toda a bacia Amazônica e Norte do Maranhão, sendo cultivado na Bahia, Espírito Santo, São Paulo e em outras regiões do País. O maior potencial de exploração da cultura é a produção de polpa para a fabricação de sorvetes, doces, geléias, néctar, licores, compotas, bolos, biscoitos, iogurtes e sucos. Das sementes, pode-se obter o chocolate e também extrair uma gordura semelhante à manteiga de cacau, de alta digestibilidade (Venturieri, 1993).

Plantios desuniformes associados à falta de material genético melhorado têm sido apontados como os principais fatores que limitam a expansão da cultura do cupuaçuzeiro na Amazônia. Instituições de pesquisas na região, nos últimos anos, têm implementado 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 (*Crinipellis pernicioso*), principal enfermidade da cultura. Neste contexto, a cultura de tecidos, em especial a micropropagação, torna-se uma técnica auxiliar muito valiosa, para clonagem, a curto prazo, de genótipos superiores e para acelerar diversas etapas de programas de melhoramento.

Informações sobre a micropropagação do cupuaçuzeiro são escassas. Os estudos de no gênero *Theobroma* têm sido direcionados para a espécie *Theobroma cacao* L., considerada, até há pouco tempo, como a única espécie do gênero cultivada comercialmente.

Alguns trabalhos têm mostrado a capacidade de diferentes explantes de cupuaçuzeiro em formar calos, bem como a diferenciação de estruturas embriogênicas. Em trabalhos conduzidos por Janick & Whipkey (1988), a embriogênese somática indireta foi induzida em embriões imaturos de *Theobroma grandiflorum* em meio MS semi-sólido com 1 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 10 % de água de coco, entretanto não foi observada a regeneração de plântulas. Avaliando o efeito de auxinas, Ferreira et al. (2001) 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.

O objetivo do presente trabalho foi o de estudar as respostas morfo genéticas de diferentes explantes de cupuaçuzeiro submetidos a várias condições de cultura *in vitro*.

Foram utilizados explantes obtidos a partir de plântulas assépticas, com 50 dias de idade, obtidas *in vitro* (segmento caulinar e de folhas jovens clorofiladas) e de embriões zigóticos maduros (eixo embrionário e cotilédones) oriundos de plantas adultas, com 8 anos de idade, da coleção de cupuaçuzeiro da Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA.

Na primeira etapa, os explantes foram inoculados em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) com 0,6 % de ágar, 3 % de sacarose e suplementado com diferentes reguladores de crescimento. Os meios de cultura tiveram o pH ajustado para 5,8 e, em seguida, submetidos à esterilização em autoclave a 120°C durante 15 minutos.

Para os eixos embrionários, testaram-se os seguintes reguladores de crescimento adicionados isoladamente ao meio de cultura: ácido naftalenoacético-ANA (10,74; 21,48; 32,22 e 42,96 μM), ácido 2,4-diclorofenoxiacético-2,4-D (2,26; 4,52; 6,78 e 9,05 μM) e tidiazuron-TDZ (1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 μM). O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com 12 tratamentos e quatro repetições. Para os segmentos de folhas jovens: TDZ (0; 1,0; 2,0 e 3,0 μM) combinado com 2,4-D (0; 9,05; 18,10 e 27,15 μM), sendo o delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4 x 4 (quatro concentrações de 2,4-D combinadas com quatro de TDZ) e três repetições. Para segmentos cotiledonares: 6-furfurilaminopurina- KIN (11,61; 13,94; 16,26 e 18,59 μM) combinado com ANA (5,37 μM) ou 2,4-D (2,26 μM); e ANA (10,74; 21,48; 32,22 e 42,96 μM) combinado com TDZ (3,0 e 4,0 μM), no delineamento inteiramente casualizado, com 16 tratamentos e três repetições. Para segmentos caulinares: KIN (11,61; 13,94; 16,26 e 18,59 μM) combinado com ANA (5,37 μM) ou 2,4-D (2,26 μM), no delineamento inteiramente casualizado, com oito tratamentos e três repetições.

Na segunda etapa, foi avaliado o efeito da água de coco em culturas de calos friáveis, iniciadas a partir de eixos embrionários, segmentos foliares e caulinares. As culturas de calos friáveis foram repicadas para meio MS com 0,7 % de ágar, 2 % de glicose e pH ajustado em 5,8. Foram testados os seguintes tratamentos: meio MS;

1 (Trabalho 018/2002). Recebido: 25/02/2002. Aceito para publicação: 06/09/2002.

2 Eng. Agr. D.Sc. Embrapa Acre, caixa postal 321 CEP 69.908-970, Rio Branco-AC, E-mail: analedo@cpafac.embrapa.br

3 Eng. Agr. D.Sc. Embrapa Amazônia Oriental caixa postal 48, CEP 66017-970, Belém-PA

4 Eng. Agr. PhD ³Universidade Federal do Ceará, Campus do PICI, Departamento de Fitotecnia, CEP 60020-181, Fortaleza-CE.

meio MS + água de coco (AC); meio MS + AC + 2,69 μM de ANA + 12,30 μM de isopenteniladenina-2iP; meio MS + AC + 5,37 μM de ANA + 12,30 μM de 2iP; meio MS + AC + 8,06 μM de ANA + 12,30 μM de 2iP e meio MS + AC + 10,74 μM de ANA + 12,30 μM de 2iP. A água de coco foi adicionada aos meios na concentração de 100 mL⁻¹. O experimento foi conduzido utilizando o delineamento inteiramente casualizado, com seis tratamentos e quatro repetições.

Em todos os experimentos a unidade experimental foi constituída de dez frascos, contendo um explante cada e avaliaram-se a o número de explantes com respostas morfogênicas e as percentagens de explantes com calo friável, não friável e embriogênico.

Nos primeiros 15 dias as culturas foram mantidas em sala de crescimento, com temperatura variando de 26 \pm 2°C, umidade relativa do ar média em torno de 70%, sob fotoperíodo de 16 horas de luz branca fria indireta (6 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de irradiância)/oito horas de escuro. Em seguida, o fotoperíodo foi ajustado para 16 horas de luz branca fria direta (52 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de irradiância)/oito horas no escuro.

As variáveis foram submetidas à análise de variância pelo teste F e as médias foram comparadas pelo teste de Scott & Knott (Scott & Knott, 1974) em nível de 1 % de probabilidade.

Em meio MS suplementado com ANA, foi verificada, aos 20 dias de cultura, a formação de calo branco-translúcido de aspecto esponjoso e não friável sobre a superfície dos segmentos (Figura 1A). Explantes cultivados em meio com TDZ apresentaram o mesmo padrão de resposta morfogênica. Entretanto, na presença de 2,4-D, após a formação de calo não friável, foi observada a iniciação e o crescimento de calo friável em toda a superfície dos explantes aos 25 dias de cultura.

As maiores frequências de calos friáveis foram verificadas aos 30 dias, em meio suplementado com 4,52; 6,78 e 9,05 μM de 2,4-D (Figura 2). Entretanto, observou-se o rápido escurecimento das culturas (Figura 1B). A iniciação e o crescimento de calos em meio com menor concentração de 2,4-D (2,26 μM) foram mais lentos. Ferreira et al. (2001) também observaram maior indução de calos em segmentos de eixos embrionários cultivados em meio MS líquido com maiores concentrações de 2,4-D (4 e 8 mg.L⁻¹).

O escurecimento de explantes tem sido relatado como uma dificuldade no estabelecimento de culturas *in vitro* em algumas espécies lenhosas, como consequência de oxidações, provavelmente em decorrência da liberação de compostos fenólicos pelos tecidos em resposta aos ferimentos, altas concentrações de reguladores de crescimento no meio de cultura e pela oxidação de polifenóis e quininas (Pious & Ravindra, 1997). Blake (1983) relata que o meio líquido pode diluir substâncias responsáveis pela oxidação dos explantes. Entretanto, Ferreira et al. (2001) observaram o escurecimento de culturas de calos de *T. grandiflorum* em meio líquido na ausência de reguladores de crescimento.

Pré-tratamentos dos explantes com ácido cítrico e ácido ascórbico e a adição de substâncias adsorventes ao meio de cultura, como carvão ativado e polivinilpirrolidona, deverão ser considerados em futuros ensaios.

Foram observadas a formação de calo branco-translúcido de aspecto esponjoso e não friável, aos 15 dias de cultura, com crescimento muito lento, na borda e nas nervuras centrais e secundárias dos segmentos de folhas e ausência de calos friáveis na maioria dos tratamentos testados (Figura 1C). Na presença isolada de 1,0; 2,0 e 3,0 μM de TDZ, após a formação de calo não friável, foram verificados a iniciação e o rápido crescimento de calo friável de coloração clara em toda a superfície abaxial e adaxial dos explantes (Figura 1D). As concentrações de 2 e 3 μM de TDZ induziram as maiores frequências de explantes com calos friáveis (Figura 3).

Provavelmente, a formação de calos friáveis em explantes foliares de cupuaçu possa ser dependente da presença de citocininas. Segundo Lu (1993), o TDZ estimula a divisão celular e, conseqüentemente, o crescimento de calos dependentes de citocininas em algumas espécies. Algumas evidências indicam que o TDZ possa ter atividade auxínica ou estar envolvido no metabolismo de auxinas, conforme relatado por Lu

(1993).

Quando o TDZ foi combinado com o 2,4-D não foi observada a iniciação e progressão de calos friáveis, provavelmente devida a rápida oxidação das culturas. Esta hipótese é reforçada pelo fato de que nos explantes inoculados em meio com 1,0; 2,0 e 3,0 μM de TDZ, a percentagem de oxidação foi de 6,7; 3,33 e 3,33 %, respectivamente (dados não mostrados). Em contrapartida, quando o TDZ foi combinado com o 2,4-D a percentagem de oxidação variou de 14,81 a 90,0 % (dados não mostrados). Altos índices de oxidação e baixa eficiência na formação de calos foram observados em discos foliares de *T. grandiflorum* em meio suplementado com 4,52 μM (Rodrigues, 2000).

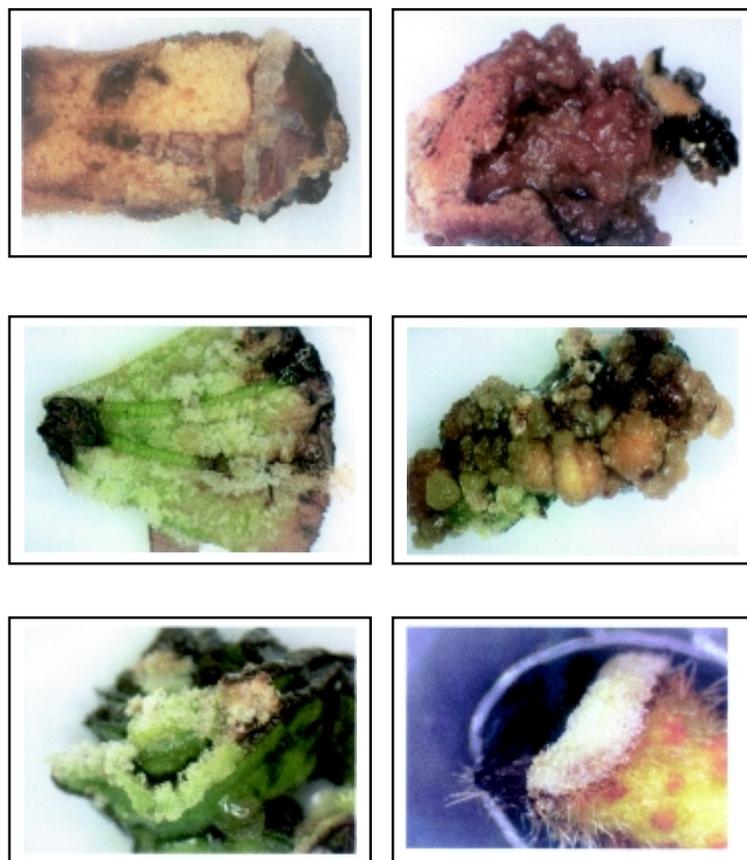
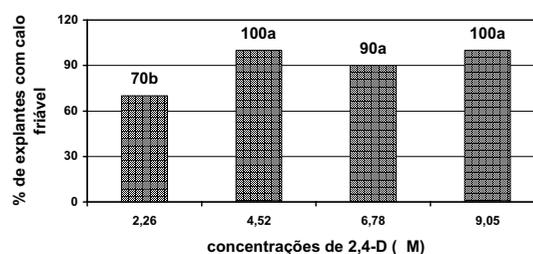
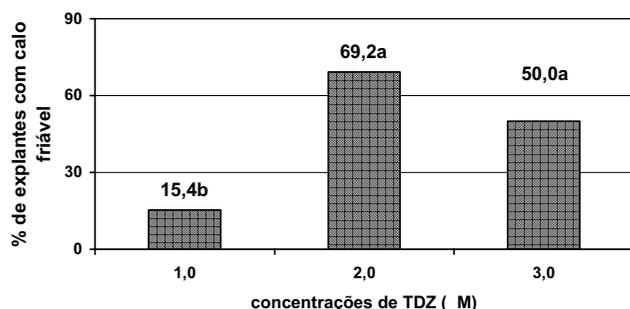


FIGURA 1 - Calogênese em explantes de *T. grandiflorum* (19X). A- iniciação de calo não friável em eixo embrionário em meio com ANA; B- formação e oxidação de calo friável em eixo embrionário em meio com 2,4-D; C- formação de calo não friável em explante foliar em meio com TDZ; D- formação de calo friável em explante foliar em meio com TDZ; E- formação de calo não friável em segmento cotiledonar em meio com ANA X TDZ; F- formação de calo não friável em segmento caulinar em meio com ANA X KIN.



Médias seguidas pela mesma letra não diferem, entre si, a 1% de probabilidade pelo teste de Scott & Knott (1974) CV= 19,64 %

FIGURA 2 - Percentagem de eixos embrionários de *T. grandiflorum* com calo friável em meio MS sob diferentes concentrações de 2,4-D aos 30 dias de cultura. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2001.



Médias seguidas pela mesma letra não diferem, entre si, a 1% de probabilidade pelo teste de Scott & Knott (1974) CV= 19,64 %

FIGURA 3 - Percentagem de explantes foliares de *T. grandiflorum* com calo friável sob diferentes concentrações de TDZ aos 45 dias de cultura. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2001.

Conforme relatado por Mok et al. (1987), o TDZ é resistente às oxidases, estável e biologicamente ativo em concentrações menores que as citocininas tipo adenina. Resultados semelhantes foram obtidos por Flores (1999), que observou menor oxidação de calos em explantes foliares de *Fragaria x ananassa* Duch. em meio suplementado com TDZ.

A combinação de ANA e KIN, nas concentrações testadas, foi bastante favorável a indução da rizogênese em segmentos cotiledonares. Pence et al. (1979) observaram o crescimento organizado de raízes em cotilédones de *T. cacao*, em meio MS suplementado com 20 mg.L⁻¹ de ANA.

Nos tratamentos constituídos da combinação de ANA com TDZ, as respostas limitaram-se à formação de calo de aspecto esponjoso e não friável (Figura 1E). Entretanto, quando o 2,4-D foi combinado com KIN, após a iniciação de calo não friável, houve a formação e o rápido crescimento de calo friável em toda a superfície dos segmentos cotiledonares e, em menor frequência, a iniciação de raízes. Ndoumou et al. (1997), trabalhando com cotilédones de *T. cacao*, observaram o rápido crescimento de calos em meio ½ MS suplementado com 2,4-D e KIN.

Os calos friáveis apresentaram um rápido escurecimento, apesar de manterem uma alta taxa de crescimento até o 150º dia de cultura. A oxidação e o crescimento excessivo de calos oriundos de cotilédones de *T. cacao*, têm sido reportados como os principais problemas no estabelecimento da embriogênese somática (Berthouly & Eskes, 1995).

Não foram detectadas diferenças significativas entre as concentrações de KIN combinadas com 2,26 µM de 2,4-D quanto à percentagem de explantes com calos friáveis (P > 0,05).

A combinação de ANA ou 2,4-D com KIN, nas concentrações testadas, promoveu a indução de calos com coloração branco-translúcida de aspecto esponjoso e não friável (Figura 1F). O tratamento constituído de 2,26 µM de 2,4-D e 13,94 µM de KIN foi o único a induzir a formação de calos friáveis entretanto, com crescimento muito lento e rápido escurecimento.

Resultados semelhantes foram obtidos por Hall & Collin (1974), que observaram apenas a formação de calos sem regeneração de plântulas em segmentos de ramos ortotrópicos de *T. cacao*. Rodrigues (2000) não verificou a formação de calos em segmentos nodais de *T. grandiflorum* em meio suplementado com diferentes concentrações de 2,4-D. Segundo Dufour et al. (1985), o desenvolvimento desorganizado de calos em segmentos caulinares de *T. cacao*, cultivados em meios para a proliferação de brotos, pode ser devido a fatores endógenos ou ao equilíbrio gasoso inadequado.

Aos 10 dias de cultura, verificou-se o rápido crescimento dos calos com aspecto friável e de coloração verde-clara. Não foi observado o crescimento dos calos friáveis em meio MS na ausência de água de coco e de reguladores de crescimento, ocorrendo um rápido escurecimento das culturas. Nos eixos embrionários, na presença de água de coco, houve a progressão dos calos, sendo potencializada em meio suplementado com ANA e 2iP, não sendo detectadas diferenças

significativas entre as concentrações de ANA (Tabela 1). Resultados semelhantes foram obtidos por Pence et al. (1979), que observaram o aumento do crescimento de calos de *T. cacao* L. em meio MS suplementado com 10 % de água de coco. Entretanto, Ferreira et al. (2001) observaram o escurecimento de calos em resposta à combinação de água de coco e 2,4-D.

O efeito estimulatório da água de coco pode ser explicado pelo fato de este aditivo ser rico em glicose e frutose, sais minerais, mioinositol, citocininas, bem como nucleotídeos e outros compostos orgânicos (Ferreira et al., 1998). Alguns trabalhos têm demonstrado a capacidade de indução de embriogênese somática a partir de diversos explantes de *T. grandiflorum* e *T. cacao* em meio de cultura suplementado com água de coco (Janick & Whipkey, 1988; Li et al., 1998 e Marbach & Teixeira, 1999). A ausência de indução de calos embriogênicos observada nas culturas 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.

TABELA 1 - Respostas morfogênicas de culturas de calos friáveis iniciados a partir de eixos embrionários (EE), segmentos de folhas jovens (SFJ) e segmentos caulinares (SC) de *T. grandiflorum*, cultivados em meio MS suplementado com água de coco (AC); 2iP e diferentes concentrações de ANA, aos 30 dias de cultura. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, 2001.

Tratamentos	EE	SFJ	SC
	% de explantes com calo friável		
MS	0	0	0
MS + AC	26,5	0	0
MS + AC + 2,69 M ANA + 12,30 M 2iP	50,0	37,5	0
MS + AC + 5,37 M ANA + 12,30 M 2iP	62,0	33,3	0
MS + AC + 8,06 M ANA + 12,30 M 2iP	44,4	12,5	0
MS + AC + 10,74 M ANA + 12,30 M 2iP	43,0	0	37,5

CONCLUSÕES

O 2,4-D promove a formação de calos friáveis em eixos embrionários e o TDZ induz alta frequência de calos friáveis e menor oxidação em segmentos de folhas jovens.

A combinação de 2,4-D e KIN no meio de cultura promove a formação de calos friáveis e de ANA, e KIN induz a rizogênese em segmentos cotiledonares.

A combinação de 2,4-D e KIN promove a formação de calos friáveis em segmentos caulinares.

A adição de água de coco, 2iP e ANA no meio secundário estimula o rápido crescimento de calos friáveis em culturas de eixo embrionário de segmento caulinar e de segmentos de folhas jovens.

REFERÊNCIAS

- BERTHOULY, M.; ESKES, A. Les biotechnologies appliquées au cacaoyer. In: TEISSON, C. (Ed.). **Biotechnologies végétales: intégration chez les plantes tropicales 1**. Montpellier: CNED-Institut de RENNES, 1995. chapitre 4, p.69-83.
- BLAKE, J. Tissue culture propagation of coconut, date and oil palm. In: DOODS, J.H. (Ed.). **Tissue culture of trees**. London: Croom Helm, 1983. p.23-50.
- CAVALCANTE, P.B. **Frutas comestíveis da Amazônia**. Belém: MPEG, 1991. 230p.
- DUFOUR, M.; DUBLIN, P. Quelques données sur la multiplication végétative *in vitro* des cacaoyers cultivés (*Theobroma cacao*). **Café Cacao Thé**, Paris, France, v.29, n.4, p.235-244, oct./déc. 1985.
- FERREIRA, A.T.; CALDAS, L.S.; PEREIRA, E.A. Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/ EMBRAPA-CNPQ,

1998. v.1, p.21-24.
- FERREIRA, M. das G.R.; CÁRDENAS, F.E.N.; CARVALHO, C.H.S.de; 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, dez. 2001.
- FLORES, R. **Calogênese e morfogênese a partir de discos foliares de morangueiro** (*Fragaria x ananassa* Duch.) cv. Vila Nova. 1999. 73f. Dissertação (Mestrado em Ciências)-Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 1999. 73p.
- HALL, T.R.; COLLIN, H.A. Initiation and growth of tissue cultures of *Theobroma cacao*. **Annals of Botany**, London, v.39, n.5, p.555-570, Nov., 1974.
- JANICK, J.; WHIPKEY, A. Somatic embryogenesis in *Theobroma grandiflorum*. **HortScience**, Alexandria, Virginia, v.23, p.807, 1988.
- LI, Z.J.; TRAORE, A.; MAXIMOVA, S.; GUILTINAN, M.S. Somatic embryogenesis and plant regeneration from floral explants of cacao (*Theobroma cacao* L.) using thidiazuron. **In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant**, Oxon, United Kingdom, v.34, n.4, p.293-299, Oct./Dec. 1998.
- LU, C. The use of thidiazuron in tissue cultures. **In Vitro, Cellular and Developmental Biology Plant**, Oxon, United Kingdom, v.29, n.2, p.92-96, Apr.-Jun.1993.
- MARBACH, P.A.S.; TEIXEIRA, J.B. Regeneração de plantas de cacau (*Theobroma cacao* L.) via embriogênese somática. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v.11, p.168-169, jun.1999.
- Suplemento.
- MOK, M.C. et al. Biological and biochemical effects of cytokinin-active phenylurea derivatives in tissue culture systems. **HortScience**, Alexandria, Virginia, v.22, n.6, p.1194-1197, 1987.
- 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, Mar. 1962.
- NDOUMOU, D.O.; NDZOMO, G.T.; NIEMENAK, N. Phenol content, acidic peroxidase and IAA-oxidase during somatic embryogenesis in *Theobroma cacao* L. **Biologia Plantarum**, Prague, v.39, n.3, p.337-347, Jun.-Jul. 1997.
- PENCE, V.C.; HASEGAWA, P.M.; JANICK, J. Asexual embryogenesis in *Theobroma cacao* L. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Geneva, New York, v.104, n.2, p.145-148, 1979.
- SCOTT, A.J.; KNOTT, M. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Raleigh, v.30, n.3, p.507-512, Sept. 1974.
- RODRIGUES, E.F. **Desenvolvimento do eixo embrionário in vitro e calogênese de cupuaçu** (*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum.) e estabelecimento do ápice caulinar de bacuri (*Platonia insignis* Martius). 2000, 70f. Tese (Doutorado em Agronomia)-Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2000.
- VENTURIERI, G.A. **Cupuaçu: a espécie, sua cultura, usos e processamento**. Belém: Clube do Cupu, 1993. 108p.