

# INDUÇÃO DE CALOS EM ESPÉCIES AMAZÔNICAS DO GÊNERO *THEOBROMA*<sup>1</sup>

## Callus induction in amazonian species of the *Theobroma* genus

Marivana Borges Silva<sup>2</sup>, Alessandra de Rezende Ramos<sup>3</sup>,

Giorgini Augusto Venturieri<sup>4</sup>

### RESUMO

Vários trabalhos vem sendo desenvolvidos sobre o cultivo *in vitro* de cacau (*T. cacao*), mas são raros para a maioria das outras espécies do gênero, como o cupuaçu (*T. grandiflorum*), cuja a área plantada vem aumentando expressivamente, e outras que poderiam servir de fonte de genes para as espécies economicamente já reconhecidas. Protocolos para obtenção de embriões somáticos *in vitro* para as espécies *T. cacao*, *T. grandiflorum*, *T. speciosum* e o híbrido *T. grandiflorum* x *T. obovatum* foram avaliados a partir de duas fontes de explantes, estaminódios e pétalas (formadas por lígulas e cógulas) cultivados em meio de crescimento primário de calo, consistindo de sais DKW, suplementado com 20 g l<sup>-1</sup> de sacarose, 250 mg l<sup>-1</sup> de glutamina, 200 mg l<sup>-1</sup> de mio-inositol, 0,2 mg l<sup>-1</sup> de tiamina-HCl, 0,1 mg l<sup>-1</sup> de ácido nicotínico, 0,2 mg l<sup>-1</sup> de glicina, 2 mg l<sup>-1</sup> de 2,4-D, 2,2 g l<sup>-1</sup> de Gelrite® e pH 5,8. A este meio foram adicionadas diferentes concentrações de tidiazuron (0, 5 e 10 µg l<sup>-1</sup>). As culturas foram mantidas no escuro por 14 dias, à temperatura de 25 ± 2 °C, e então transferidas para meio de crescimento secundário de calo, constituído de sais WPM, vitaminas de Gamborg, 20 g l<sup>-1</sup> de sacarose, 2 mg l<sup>-1</sup> de 2,4 D, 0,3 mg l<sup>-1</sup> de cinetina, 50 ml l<sup>-1</sup> de água de côco, 2,2 g l<sup>-1</sup> de Gelrite® e pH 5,8. A formação de calos ocorreu em todas as espécies. Embriões somáticos foram obtidos somente para *T. cacao*. A calogênese mostrou-se influenciada pelo genótipo e foi maior nos estaminódios.

**Termos para Indexação:** Embriogênese, explantes, TDZ.

### ABSTRACT

Many works have been done on cocoa (*Theobroma cacao*) *in vitro* culture, with few studies being published for other species of the same genus, as cupuassu (*T. grandiflorum*), whose planted area is increasing expressively, and others that could be used as a source of genes for those with recognized economical importance. Protocols to obtain *in vitro* somatic embryos from *T. cacao*, *T. grandiflorum*, *T. speciosum* and the hybrid *T. grandiflorum* x *T. obovatum* from two sources of explants, staminodes and petals (formed by ligules and cogules) were evaluated, using a primary callus growth medium made of DKW salts, supplemented with 20 g l<sup>-1</sup> of sucrose, 250 mg l<sup>-1</sup> of glutamine, 200 mg l<sup>-1</sup> of myo-inositol, 0.2 mg l<sup>-1</sup> of thiamine-HCl; 0.1 mg l<sup>-1</sup> of nicotinic acid; 0.2 mg l<sup>-1</sup> of glycine; 2 mg l<sup>-1</sup> of 2,4-D; 2.2 g l<sup>-1</sup> of Gelrite® and the pH adjusted to 5.8. To this media was added different concentrations of thidiazuron (0; 5 and 10 µg l<sup>-1</sup>). Cultures were maintained at dark for 14 days, at a temperature of 25 ± 2 °C, and so transferred for the secondary callus growth, made with WPM salts, Gamborg vitamins, 20 g l<sup>-1</sup> of sucrose, 2 mg l<sup>-1</sup> of 2,4 D; 0.3 mg l<sup>-1</sup> of cinetin, 50 ml l<sup>-1</sup> of coconut milk, 2.2 g l<sup>-1</sup> of Gelrite® and the pH adjusted to 5.8. Callus formation occurred in all species. Somatic embryos were obtained only for *T. cacao*. Callus formation was influenced by genotype and was higher on staminodes.

**Index terms:** Embryogenesis, explants, TDZ.

(Recebido para publicação em 14 de janeiro de 2004 e aprovado em 13 de junho de 2005)

### INTRODUÇÃO

O gênero *Theobroma* abriga 22 espécies, todas pertencentes à América Tropical (CUATRECASAS, 1964), porém, oito dessas são encontradas na Amazônia Brasileira, tendo como representante mais ilustre o cacau (*T. cacao* L.). Uma outra espécie do gênero, o cupuaçu (*T. grandiflorum* (Willd.) Schum.), também começa a se destacar no mercado de frutas exóticas (VENTURIERI, 1993). *T. speciosum* Willd. e entre as espécies do gênero, é a que possui o teor

de gordura mais parecido com cacau (SILVA et al., 2004), ou seja, um sucedâneo potencial.

Os plantios comerciais de cacau possuem alto grau de heterozigosidade genética, em que somente poucas árvores possuem elevado rendimento. Surge, portanto, a necessidade de serem propagados, assexuadamente, os melhores genótipos, pois as sementes zigóticas não conservam com eficiência grande parte da produtividade do material materno (FIGUEIRA & JANICK, 1995; LI et al., 1998).

<sup>1</sup> Estudos financiados pelo Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico (CNPq)/ Programa do Trópico Úmido (PTU) (proc. nº 63.00.13/95-0).

<sup>2</sup> Professora Dr., Universidade Federal do Pará – Campus de Bragança – Laboratório de Biologia Molecular – Rua Leandro Ribeiro, s/n – 68.600-000 – Bragança, PA – marivana@ufpa.br

<sup>3</sup> Bióloga, Dr., Bolsista do CNPq na Universidade Federal do Pará/Ufpa – CCB/Genética – 66.075-900 – Belém, PA – rezende@ufpa.br

<sup>4</sup> Professor Dr. Universidade Federal de Santa Catarina – Centro de Ciências Biológicas – 88.040-900 – Florianópolis, SC – giorgini@ccb.ufsc.br

A capacidade de propagação *in vitro* da maioria das espécies amazônicas de *Theobroma* não foi ainda avaliada, mas apresenta grande potencial tendo em vista os vários trabalhos desenvolvidos com o cultivo *in vitro* de *T. cacao* (LI et al., 1998; MAXIMOVA et al., 2002; TAN & FURTEK, 2003).

Para o cacauero, a embriogênese somática foi inicialmente observada a partir de embriões zigóticos imaturos (ESAN, 1977) posteriormente repetida por outros grupos (DUHEM et al., 1989; PENCE et al., 1979; WANG & JANICK, 1984). Embriões oriundos de zigotos, entretanto, possuem limitado valor para a propagação, por serem derivados de um genótipo ainda não testado. Além do mais, a germinação e conversão desses embriões somáticos foi problemática (WANG & JANICK, 1984). Assim, somente embriões somáticos derivados de tecido esporofítico (como nucelo, folha ou tecidos florais) têm valor para a conservação do germoplasma ou propagação clonal (FIGUEIRA & JANICK, 1995).

Esforços foram feitos na obtenção de embriões somáticos de cacau a partir de tecidos nucleares (FIGUEIRA & JANICK, 1993) e de tecidos florais por Alemanno et al. (1996), Lopez-Baez et al. (1993) e Söndahl et al. (1989). Porém, apesar do progresso obtido, a eficiência relatada por esses autores na obtenção de embriões somáticos e na conversão em plantas é baixa. Melhores taxas de conversão são obtidas por meio da troca frequente do meio ou da lavagem dos embriões somáticos (WANG & JANICK, 1984); do uso de meio suplementado com zeatina e carvão ativado, junto com a remoção dos cotilédones (DUHEM et al., 1989); da microenxertia de embriões somáticos imaturos sobre plântulas germinadas *in vitro* (AGUILAR et al., 1992); da utilização de maltose como fonte de carbono junto com carvão ativado (LOPEZ-BAEZ et al., 1993); e enriquecimento de CO<sub>2</sub> (FIGUEIRA & JANICK, 1994).

Li et al. (1998) desenvolveram um procedimento para estimular a embriogênese somática e a regeneração de plantas a partir de tecidos florais (estaminódios) de cacau, pela utilização de três etapas no cultivo (indução de calos, desenvolvimento de embriões e regeneração de plantas) em combinação com o uso de TDZ (Tidiazuron) e 2,4-D. Os autores observaram que todos os genótipos testados (19), foram responsivos às condições de cultura a taxas que variaram de 1 a 100 % de eficiência. Para o genótipo Sca6-1, observou-se uma média de 45 embriões por estaminódio. Mais de 270 plantas, derivadas de embriões somáticos de seis desses genótipos, foram estabelecidas com sucesso na casa-de-vegetação, abrindo caminho para

a propagação desta espécie a partir de embriões somáticos.

Presumindo que a metodologia aplicada por Li et al. (1998) pudesse ser também eficiente para outras espécies do gênero *Theobroma*, foi delineado o presente trabalho em que foram testadas diferentes concentrações de TDZ para obtenção de calos embriogênicos em três espécies de *Theobroma* e um de seus híbridos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### a) Material vegetal

Das espécies *T. grandiflorum* (Willd.) Schum, *T. speciosum* Willd. e o híbrido *T. grandiflorum* (Willd.) Schum x *T. obovatum* Klotzsch, foram utilizados explantes oriundos das matrizes cultivadas na Coleção de Germoplasma de Espécies Afins ao Cacau “George Addison O’Neill”, pertencente à Embrapa Amazônia Oriental, Belém – PA. Para *T. cacao*, foram utilizadas matrizes cultivadas no “Cacau do Casemiro”, localizado no campus da Universidade Federal do Pará, Belém – PA. Para cada espécie, três genótipos foram selecionados ao acaso e utilizados como fornecedores de explantes.

### b) Indução de calos embriogênicos

Como fonte de tecidos para a obtenção de calos embriogênicos foram utilizados tecidos florais imaturos, especificamente os estaminódios e as pétalas, formadas por duas regiões distintas, cógulas e lígulas.

Botões florais, próximos à antese, foram coletados pela manhã, lavados em água corrente e desinfetados, por 20 min, em solução de hipoclorito de sódio a 2% (p/v), seguidos por três lavagens em água destilada estéril.

As flores foram dissecadas dentro de uma câmara de fluxo laminar e os explantes (pétalas e estaminódios) colocadas em meio de crescimento primário de calo [CPC], adaptado de Li et al. (1998), consistindo de sais DKW (MCGRANAHAN et al., 1987), suplementado com 20 g l<sup>-1</sup> de sacarose; 250 mg l<sup>-1</sup> de glutamina; 200 mg l<sup>-1</sup> de mio-inositol; 0,2 mg l<sup>-1</sup> de tiamina-HCl; 0,1 mg l<sup>-1</sup> de ácido nicotínico; 0,2 mg l<sup>-1</sup> de glicina e 2 mg l<sup>-1</sup> de 2,4-D. A este meio foram adicionadas, antes da autoclavagem, diferentes concentrações de tidiazuron (0; 5 e 10 µg l<sup>-1</sup>). Cada concentração de tidiazuron foi considerada um tratamento (tratamento 1, 2 e 3, respectivamente), sendo que, para cada tratamento, foram utilizados 4 frascos (repetições), contendo 5 explantes (estaminódios, lígulas ou cógulas) cada um. O delineamento foi inteiramente casualizado. O meio foi solidificado com Gelrite® (2 g l<sup>-1</sup>), seu pH ajustado para 5,8, antes da autoclavagem e separado em alíquotas

de 20 mL distribuídas em frascos com um volume de 240 mL (tipo “baby food”). As culturas foram mantidas no escuro por 14 dias, à temperatura de  $25 \pm 2$  °C, e então transferidas para meio de crescimento secundário de calo [CSG], adaptado de Li et al. (1998), constituído de sais WPM (LLOYD & MCCOWN, 1981), vitaminas de Gamborg; 20 g l<sup>-1</sup> de sacarose (açúcar de uso culinário Cristal - União); 2 mg l<sup>-1</sup> de 2,4 D; 0,3 mg l<sup>-1</sup> de cinetina; 50 mL l<sup>-1</sup> de água de coco; solidificado com 2,2 g l<sup>-1</sup> de Gelrite® (SIGMA G-1910, marca registrada da Monsanto Company - USA) e pH ajustado para 5,8, antes da autoclavagem. As culturas foram mantidas por 14 dias no escuro, à temperatura de  $25 \pm 2$  °C.

### c) Desenvolvimento de embriões

Após a quarta semana, os calos obtidos foram transferidos para o meio de desenvolvimento de embrião [DE], adaptado de Li et al. (1998), constituído de sais DKW, suplementado com 31 g l<sup>-1</sup> de sacarose (açúcar de uso culinário); 100 mg l<sup>-1</sup> de mio-inositol; 0,2 mg l<sup>-1</sup> de tiamina-HCl; 0,1 mg l<sup>-1</sup> de ácido nicotínico; 0,2 mg l<sup>-1</sup> de glicina; solidificado com 2 g l<sup>-1</sup> de Gelrite®; e pH ajustado para 5,8, antes da autoclavagem. O meio foi vertido em frascos do tipo “baby food”, com 20 mL de meio por frasco. As culturas permaneceram no escuro, à temperatura de  $25 \pm 2$  °C, sendo transferidas para meio DE fresco a cada 14 dias.

### d) Análise estatística

A avaliação do experimento foi feita mediante observação do número médio de explantes cultivados que emitiram calos, para cada tratamento, nos diferentes genótipos de cada espécie. Os dados foram analisados pelo teste F e as médias comparadas pelo teste de Tukey (SOKAL & ROHLF, 1981) ao nível de 5% de probabilidade.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de variância (Tabela 1) evidenciou que houve diferenças significativas entre espécies, sendo o *T. cacao* a que mais calos gerou, seguido de *T. grandiflorum* x *obovatum*, *T. speciosum* e *T. grandiflorum* (Figura 1). Entre tecidos, os estaminódios foram os que mais formaram calos, friáveis e abundantes (Figura 2a e b) seguido de lígulas e cógulas que não diferiram estatisticamente entre si (Figura 3). Lígulas e cógulas apresentaram calos menores que nos estaminódios e restritos às regiões mais próximas da sua base. Houve interação entre os fatores tipo de tecido e espécie. Essa interação embora não tenha sido evidenciada em *T. cacao* ( $p = 0,057$ ), foi evidente *T. grandiflorum* x *obovatum* ( $p = 0,004$ ); *T. grandiflorum* ( $p = 0,017$ ) e *T. speciosum* ( $p = 0,038$ ) (Figura 4).

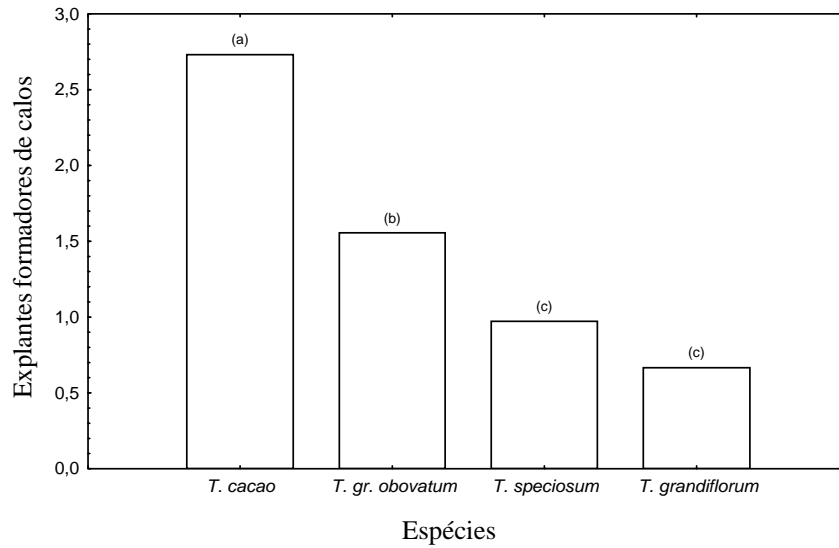
A aplicação de TDZ não influenciou na formação de calos e não apresentou interação com os efeitos de espécie e tecidos (Tabela 1).

Considerando-se somente os estaminódios, por ser o tecido que mais formou calos, nota-se que a resposta dos genótipos, dentro de cada espécie foi similar para *T. cacao* e *T. speciosum*, mas em *T. grandiflorum* e no híbrido *T. grandiflorum* x *obovatum* houve genótipos que produziram mais calos que outros, indicando influência do genótipo (Tabela 2). Para *T. grandiflorum*, estaminódios e lígulas produziram mais calos quando foi usado TDZ a 10 µg l<sup>-1</sup>, indicador de que uma elevação desta concentração melhores resultados poderão ser obtidos. Para *T. speciosum*, existe uma tendência similar, mas de menos consistência, devido a forte variação no comportamento dos genótipos. Quanto às cógulas, os resultados foram desprezíveis.

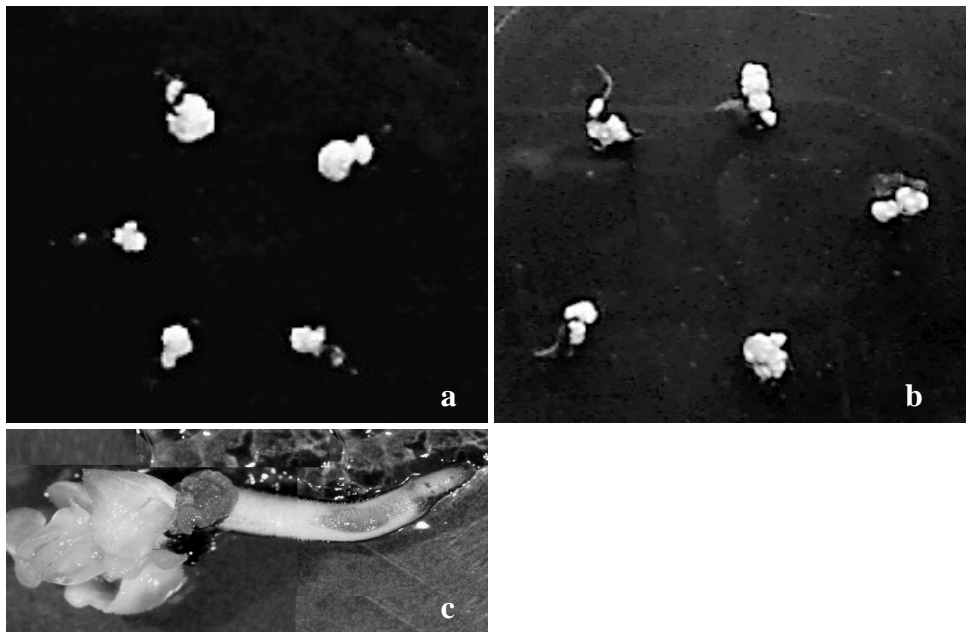
**TABELA 1** – Quadro a análise de variância para os fatores estudados.

Causa da Variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	p
Espécie	3	91.36	45.54	<0.001 ***
Tecido	2	157.02	78.27	<0.001 ***
Dosagem de TDZ	2	3.38	1.69	0.187
Espécie x Tecido	6	15.16	7.56	<0.001 ***
Espécie x Dosagem de TDZ	6	0.25	0.13	0.993
Tecido x Dosagem de TDZ	4	3.70	1.85	0.120
Resíduo	324	2.01		

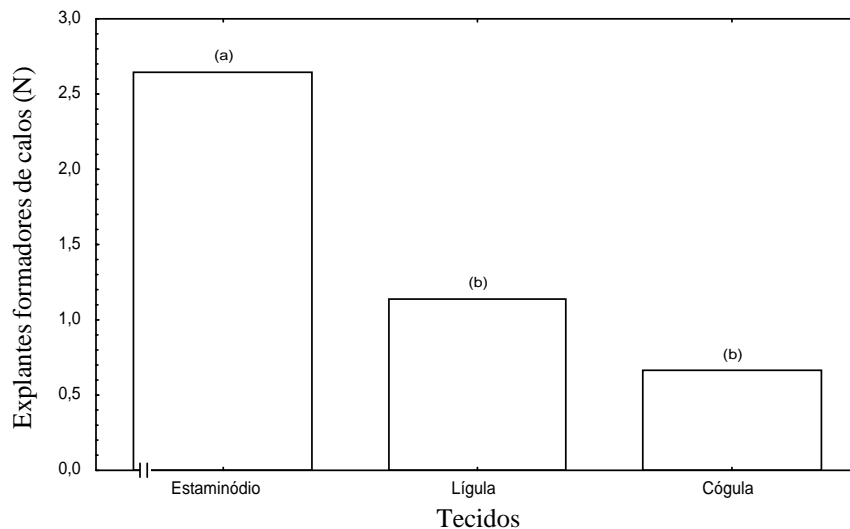
Obs.: \*\*\* diferença altissimamente significativa.



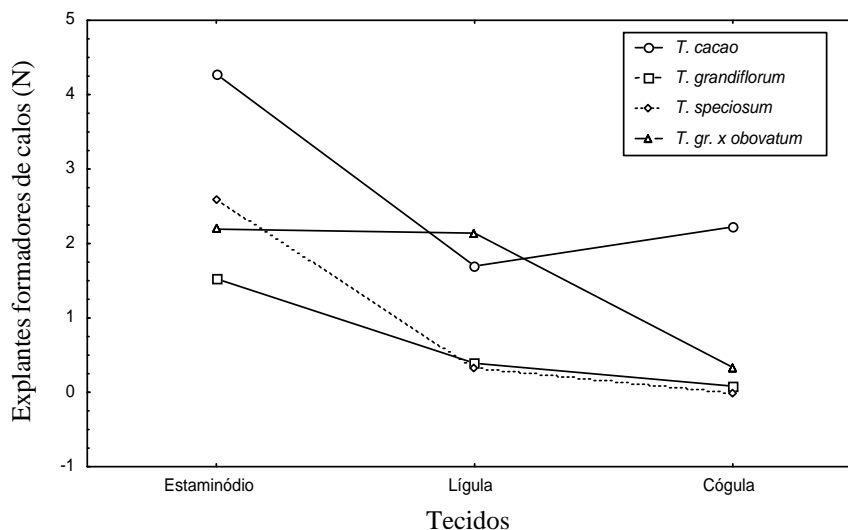
**FIGURA 1** – Explantes formadores de calos por espécie estudada. Tratamentos seguidos de mesma letra não diferiram significativamente entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).



**FIGURA 2** – a) Estaminódios de *Theobroma cacao* e b) *T. grandiflorum* evidenciando a formação de calos; c) Embrião somático de *T. cacao*.



**FIGURA 3** – Explantes formadores de calos por tipo de tecido usado. Tratamentos seguidos de mesma letra não diferiram significativamente entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).



**FIGURA 4** – Interação entre tipo de tecido usado e espécie na indução de explantes formadores de calos.

Para o híbrido de *T. grandiflorum* x *obovatum*, aparentemente o uso de TDZ diminui o potencial da formação de calos em estaminódios e lígulas (Tabela 2).

No presente trabalho, não se obteve a conversão de células somáticas em embriões nas espécies testadas, exceto em *T. cacao* (Figura 2b e c), No qual obteve-se a

formação de apenas três embriões.

O pré-requisito para o sucesso da propagação clonal de plantas via embriões somáticos é principalmente a escolha do genótipo, que difere dentro da espécie na produção de embriões somáticos (MAXIMOVA et al., 2002; TAN & FURTEK, 2003).

**TABELA 2** – Número de explantes formadores de calos em diferentes tecidos de *Theobroma*. Letras minúsculas comparam genótipos dentro de tecidos para cada espécie. As letras maiúsculas comparam os tecidos por espécie. As letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. A concentração de TDZ aplicada/genótipo encontra-se entre colchetes. UFPA, Belém, PA, 2000.

Espécie	Tecido	Média por genótipo	Tecido	Média por genótipo	Tecido	Média por genótipo
<i>T. cacao</i>	Estaminódio		Cógula		Lígula	
Genótipo 1-[0µg l <sup>-1</sup> ]	3,75	4,33 (a)	3,5	2,33 (a)	0	0,33 (b)
Genótipo 1-[5µg l <sup>-1</sup> ]	4,75		1,75		0,25	
Genótipo 1-[10µg l <sup>-1</sup> ]	4,5		1,75		0,75	
Genótipo 2-[0µg l <sup>-1</sup> ]	5	4,16 (a)	0,5	1,83 (a)	0,5	2,06 (a)
Genótipo 2-[5µg l <sup>-1</sup> ]	5		2,5		3,25	
Genótipo 2-[10µg l <sup>-1</sup> ]	2,5		2,5		2,75	
Genótipo 3-[0µg l <sup>-1</sup> ]	5	4,5 (a)	3,75	2,5 (a)	1,75	2,58 (a)
Genótipo 3-[5µg l <sup>-1</sup> ]	3,5		1,75		3,5	
Genótipo 3-[10µg l <sup>-1</sup> ]	5		2		2,5	
<b>Média</b>	<b>4,3 (A)</b>		<b>2,2 (B)</b>		<b>1,7 (B)</b>	
<i>T. grandiflorum</i>	Estaminódio		Cógula		Lígula	
Genótipo 1-[0µg l <sup>-1</sup> ]	0,25	0,25 (a)	0	0,08 (a)	0	0,00 (a)
Genótipo 1-[5µg l <sup>-1</sup> ]	0,25		0,25		0	
Genótipo 1-[10µg l <sup>-1</sup> ]	0,25		0		0	
Genótipo 2-[0µg l <sup>-1</sup> ]	2,25	2,67 (a)	0	0,16 (a)	1	0,75 (a)
Genótipo 2-[5µg l <sup>-1</sup> ]	2,25		0,25		1	
Genótipo 2-[10µg l <sup>-1</sup> ]	3,5		0,25		0,25	
Genótipo 3-[0µg l <sup>-1</sup> ]	1	1,66 (b)	0	0,00 (a)	0	0,42 (a)
Genótipo 3-[5µg l <sup>-1</sup> ]	2,25		0		1,25	
Genótipo 3-[10µg l <sup>-1</sup> ]	1,75		0		0	
<b>Média</b>	<b>1,5 (A)</b>		<b>0,1 (B)</b>		<b>0,4 (B)</b>	
<i>T. speciosum</i>	Estaminódio		Cógula		Lígula	
Genótipo 1-[0µg l <sup>-1</sup> ]	3	3,00 (a)	0	0,00 (a)	0	0,58 (a)
Genótipo 1-[5µg l <sup>-1</sup> ]	3,25		0		1,25	
Genótipo 1-[10µg l <sup>-1</sup> ]	2,75		0		0,5	
Genótipo 2-[0µg l <sup>-1</sup> ]	3,75	3,41 (a)	0	0,00 (a)	0	0,33 (a)
Genótipo 2-[5µg l <sup>-1</sup> ]	2,25		0		0,25	
Genótipo 2-[10µg l <sup>-1</sup> ]	4,25		0		0,75	
Genótipo 3-[0µg l <sup>-1</sup> ]	0	1,33 (a)	0	0,00 (a)	0	0,08 (a)
Genótipo 3-[5µg l <sup>-1</sup> ]	2,5		0		0,25	
Genótipo 3-[10µg l <sup>-1</sup> ]	1,5		0		0	
<b>Média</b>	<b>2,6 (A)</b>		<b>0 (B)</b>		<b>0,3 (B)</b>	
Híbrido	Estaminódio		Cógula		Lígula	
Genótipo 1-[0µg l <sup>-1</sup> ]	4,25	2,67 (a)	0,5	0,33 (a)	3,5	3,00 (a)
Genótipo 1-[5µg l <sup>-1</sup> ]	1,75		0		3,25	
Genótipo 1-[10µg l <sup>-1</sup> ]	2		0,5		2,25	
Genótipo 2-[0µg l <sup>-1</sup> ]	3	3,08 (a)	0	0,58 (a)	0	1,66 (a)
Genótipo 2-[5µg l <sup>-1</sup> ]	3,5		1,5		1,75	
Genótipo 2-[10µg l <sup>-1</sup> ]	2,75		0,25		1,75	
Genótipo 3-[0µg l <sup>-1</sup> ]	1	0,83 (b)	0	0,08 (a)	1	2,25 (a)
Genótipo 3-[5µg l <sup>-1</sup> ]	0,75		0,25		3	
Genótipo 3-[10µg l <sup>-1</sup> ]	0,75		0		2,75	
<b>Média</b>	<b>2,2 (A)</b>		<b>0,3 (B)</b>		<b>2,1 (A)</b>	

A eficiência na obtenção de embrião somático em *T. cacao* e sua conversão em planta, na maioria dos trabalhos, é relatada como baixa (ALEMANNO et al., 1996; LOPEZ-BAEZ et al., 1993; SONDAHL et al., 1989). Entretanto, Li et al. (1998) relataram um procedimento bem-sucedido, que estimulou a iniciação de calos embriogênicos a partir de estaminódios e subsequente obtenção e conversão de embriões somáticos em plantas viáveis, as quais apresentaram crescimento ortotrópico, semelhante a plantas derivadas de semente. Esses autores relacionam o sucesso de seus procedimentos primeiramente ao uso do meio DKW (DRIVER & KUNYUKI, 1984), que foi desenvolvido para a propagação *in vitro* de espécies perenes lenhosas, o qual contém maior concentração de cálcio, sulfato e magnésio do que o meio MS, usado previamente na obtenção de embriões somáticos por outros autores (FIGUEIRA & JANICK, 1993; LOPEZ-BAEZ et al., 1993; PENCE, 1979). Segundo esses autores, o uso do TDZ e da glicose, respectivamente como fontes de citocinina e carbono, são essenciais para a iniciação de calos embriogênicos e subsequente produção de embriões somáticos de cacau.

Dos calos obtidos no presente experimento não foram formados embriões somáticos, exceto para *T. cacao* em que ocorreu a formação de três embriões somáticos. Entre os autores que optaram pelo uso da sacarose como fonte de carbono em cultivos *in vitro* de cacau (ALEMANNO et al., 1996; FIGUEIRA & JANICK, 1993; LOPEZ-BAEZ et al., 1993; PENCE et al., 1979) os resultados não foram tão efetivos como os conseguidos por Li et al. (1998) que utilizou glicose. De fato, esses autores comentam, em seu artigo, uma reação de hipersensibilidade desenvolvida por tecidos de *T. cacao* cultivados em meios nutritivos contendo outros açúcares que não a glicose. Precedentes na literatura indicam que a fonte de carboidrato pode influenciar o grau e o tipo de diferenciação e, desta forma, a eficiência na regeneração de plantas (NAVARRO-ALVAREZ et al., 1994; SWEDLUND & LOCY, 1993). Outro fator que pode ter interferido na obtenção de embriões é o chamado “efeito de frasco”, ou seja, o tamanho do frasco de cultura podendo interferir na resposta morfogenética dos explantes cultivados *in vitro*, provavelmente devido a diferenças na concentração de oxigênio, CO<sub>2</sub>, etileno e outras substâncias voláteis presentes no ar contido no seu interior. Diferenças na forma dos frascos também podem influenciar o crescimento das culturas por modificação na taxa de difusão gasosa. Há muitos exemplos na literatura de diferentes tipos de frascos tendo

diferentes efeitos na morfogênese das culturas *in vitro* (MACKAY & KITTO, 1988; MCCLELLAND & SMITH, 1990). Li et al. (1998) cultivaram os explantes em placas de Petri de 100 x 15 mm, com 20 explantes por placa. No presente trabalho utilizou-se frascos do tipo “baby food”, cultivando-se cinco explantes por frasco. A diferença no volume e na quantidade de explante provavelmente alterou a concentração de CO<sub>2</sub> presente no frasco de cultura, interferindo, assim, na obtenção de embriões somáticos a partir das células do calo. Altos níveis de CO<sub>2</sub>, no cultivo *in vitro* de *T. cacao*, foram relacionados a uma maior eficiência no alongamento de ramos e desenvolvimento de folhas e na germinação de embriões somáticos cotiledonares derivados de embriões zigóticos (FIGUEIRA et al., 1991) e embriões somáticos derivados de tecido nucelar (FIGUEIRA & JANICK, 1993).

A frequência diferencial da calogênese ocorrida em estaminódios e pétalas levanta outra questão. Uma maior obtenção de calos em estaminódios, tanto em número como em área, quando comparado com as pétalas, sugere que estaminódios podem ser preferidos como fonte de explante na obtenção de um eficiente sistema de propagação via embriogênese somática. Porém, conclusões a esse respeito podem ser prematuras, pelo fato de que a capacidade de formação de calos é um fator marcadamente dependente do genótipo e a sua embriogenia não foi ainda obtida.

### CONCLUSÕES

- a) Todas as espécies formam calos, mas embriões somáticos só foram obtidos para *T. cacao*, e em baixa frequência.
- b) A calogênese é influenciada pelo genótipo e é maior nos estaminódios do que nas lígulas e cógulas (pétalas).
- c) Não houve efeito do TDZ, nas dosagens aplicadas, na formação de calos.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUILAR, M. E.; VILLA-LOBOS, V. M.; VASQUEZ, N. Production of cocoa plants (*Theobroma cacao* L.) via micrografting of somatic embryos. **In Vitro Cell Developmental Biology**, New York, v. 28, p. 15-19, 1992.
- ALEMANNO, L.; BERTHOULY, M.; MICHAUX-FERRIÈRE, N. Somatic embryogenesis of cocoa from floral parts. **Plantations, Recherche, Developpement**, Paris, v. 3, n. 4, p. 225-237, 1996.

- CUATRECASAS, J. Cacao and its allies: a taxonomic revision of the genus *Theobroma*. **Contribution from the United States National Herbarium**, Washington, v. 35, p. 379-614, 1964.
- DRIVER, J. A.; KUNIYUKI, A. H. In vitro propagation of paradox walnut rootstock. **HortScience**, Alexandria, v. 19, n. 4, p. 507-509, 1984.
- DUHEM, K.; LEMERCIER, N.; BOXUS, P. Donnees nouvelles sur l'induction et le developpement d'embryons somatiques chez *Theobroma cacao*. **Café Cacao Thé**, Paris, v. 33, p. 9-14, 1989.
- 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**, The Hague, v. 336, p. 231-236, 1993.
- FIGUEIRA, A.; JANICK, J. Optimizing carbon dioxide and light levels during in vitro culture of *Theobroma cacao*. **Journal of the American Society of Horticulture Science**, Alexandria, v. 119, n. 4, p. 865-871, 1994.
- FIGUEIRA, A.; JANICK, J. **Somatic embryogenesis in woody plants**. The Netherlands: Kluwer Academic, 1995. cap. 16, p. 291-310.
- FIGUEIRA, A.; WHIPKEY, A.; JANICK, J. Increased CO<sub>2</sub> and light promote in vitro shoot growth and development of *Theobroma cacao* L. **Journal of the American Society of Horticulture Science**, Alexandria, v. 116, p. 585-589, 1991.
- 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. B.; McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel (*Kalmia latifolia*) by use of shoot-tip culture. In: INTERNATIONAL PLANT PROPAGATORS SOCIETY, 1981, Seattle. **Proceedings...** Seattle: [s.n.], 1981. p. 421-437.
- LOPEZ-BAEZ, O.; BOLLON, H.; ESKES, A. B.; PÉTIARD, V. Embryogenèse somatique de cacaoyer *Theobroma cacao* L. à partir de pièces florales. **Sciences de la vie**, Paris, n. 316, p. 579-584, 1993.
- MACKAY, W. A.; KITTO, S. L. Factors affecting in vitro shoot proliferation of French tarragon. **Journal of the American Society of Horticulture Science**, Alexandria, v. 113, p. 282-287, 1988.
- MAXIMOVA, S. N.; ALEMANN, L.; YOUNG, A.; FERRIERE, N.; TRAORE, A.; GUILTINAN, M. Efficiency, genotypic variability, and cellular origin of primary and secondary somatic embryogenesis of *Theobroma cacao* L. **In Vitro Cell Developmental Biology**, New York, v. 38, p. 252-259, 2002.
- McCLELLAND, M. T.; SMITH, M. A. L. Vessel type, closure and explant orientation influence *in vitro* performance of five woody species. **HortScience**, Alexandria, v. 25, p. 797-800, 1990.
- McGRANAHAN, G. H.; DRIVER, J. A.; TULECKE, W. Tissue culture of juglans. In: BONGA, J. M.; DURZAN, D. J. (Eds.). **Cell and tissue culture in forestry: case histories: gymnosperms, angiosperms and palms**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1987. p. 261-271.
- NAVARRO-ALVAREZ, W.; BAENZIGER, P. S.; ESKRIDGE, K. M.; SHELTON, D. R.; GUSTAFSON, V. D.; HUGO, M. Effect of sugars in wheat anther culture media. **Plant Breeding**, Berlin, v. 112, p. 53-62, 1994.
- PENCE, V. C.; HASEGAWA, P. M.; JANICK, J. Asexual embryogenesis in *Theobroma cacao* L. **Journal of the American Society of Horticulture Science**, Alexandria, n. 104, p. 45-148, 1979.
- SILVA, C. R.; VENTURIERI, G. A.; FIGUEIRA, A. Description of Amazonian *Theobroma* L. collections, species identification and characterization of interspecific hybrids. **Acta Botanica Brasilica**, [S.l.], v. 18, n. 2, p. 333-341, 2004.
- SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. **The principles and practice of statistics in biological research**. 2. ed. San Francisco: State University of New York at Stony Brook, 1981. 776 p.



SÖNDHAL, M. R.; SEREDUK, T. B.; CHEN, Z.; BELLATO, C. M. **Somatic embryogenesis and plant regeneration of cacao**. Republic of South Africa: [s.n.], 1989. Patent 88/3078, 25 Jan. 1989.

SWEDLUND, B.; LOCY, R. D. Sorbitol as the primary carbon source for the growth of embryogenic callus of maize. **Plant Physiology**, Washington, v. 103, p. 1339-1346, 1993.

TAN, C. L.; FURTEK, D. B. Development of an in vitro regeneration system for *Theobroma cacao* from mature tissues. **Plant Science**, Calcutta, v. 164, p. 407-412, 2003.

VENTURIERI, G. A. **Cupuaçu**: a espécie, sua cultura, usos e processamento. Belém: Clube do Cupu, 1993. 108 p.

WANG, Y. C.; JANICK, J. Inducing precocious germination in asexual embryos of *Theobroma cacao* L. **HortiScience**, Alexandria, v. 19, p. 839-841, 1984.