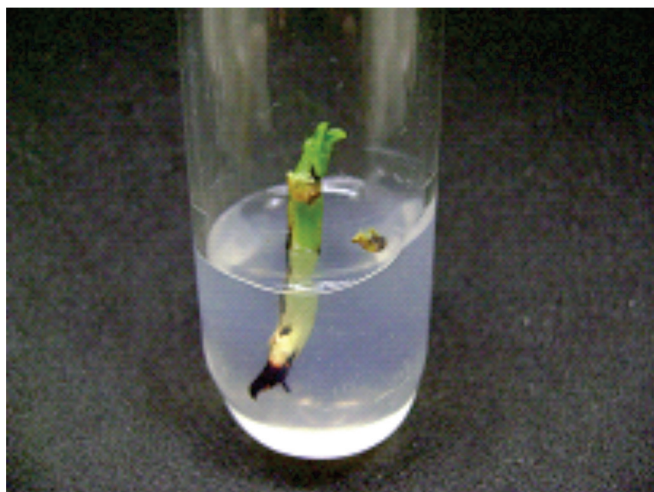


Foto: Diva Correia



## Metodologia do Isolamento de Embrião Zigótico de Cajueiro-Anão Precoce In Vitro

Diva Correia<sup>1</sup>  
Geórgia Carvalho Anselmo<sup>2</sup>  
Cinthya Fontenele Vieira<sup>3</sup>  
José Dionis Matos Araújo<sup>4</sup>  
Celli Rodrigues Muniz<sup>5</sup>

A cajucultura tem sido um segmento importante da agricultura para geração de emprego e renda para países como o Vietnã, Nigéria, Índia, Brasil e Indonésia. No Brasil, a área plantada de cajueiro está em torno de 762.660 ha; durante 2010, foram produzidas 102.002 t de castanha-de-caju, sendo o maior produtor o Ceará, seguido dos estados do Rio Grande do Norte e Piauí (IBGE-SIDRA, 2010).

A maioria dos plantios de cajueiro no Brasil é estabelecida utilizando mudas obtidas via germinação de sementes. Nos anos 80, foram lançados os primeiros clones comerciais, sendo um deles o clone CCP 76 (BARROS et al., 1993), que é utilizado em escala comercial tanto para o plantio de sequeiro como para o plantio irrigado. Na década de 90, foi lançado o clone BRS 226 ou Planalto, utilizado em escala comercial em cultivo de sequeiro (PAIVA et

al., 2002). A utilização dos clones de cajueiro-anão precoce teve início no Brasil dando grande impulso aos sistemas de cultivo (BARROS et al., 1994).

A propagação vegetativa, via enxertia, tem sido a alternativa de clonagem do cajueiro, e estudos de propagação in vitro são reduzidos (BOGGETTI et al., 2001; CARDOZA; SOUZA, 2002). É importante incrementar o conhecimento biológico dessa espécie por meio de estudos in vitro abordando aspectos nutricionais, bioquímicos e moleculares. Adicionalmente, o cultivo in vitro de plantas favorece que o material genético seja transportado em espaço reduzido e livre de contaminantes.

Considerando-se o exposto, é apresentada neste trabalho uma metodologia para o isolamento de embriões zigóticos e crescimento de plântulas in vitro de cajueiro-anão precoce.

<sup>1</sup>Bióloga, D.Sc. em Ciências Florestais, pesquisadora da Embrapa Agroindústria Tropical, Rua Dra. Sara Mesquita, 2270, Pici, CEP 60511-110, Fortaleza, CE, dcorreia@cnpat.embrapa.br

<sup>2</sup>Graduanda de Biologia, Universidade Estadual do Ceará, Av. Parajana, 1700 – Campus Itaperi, CEP 60740-020, Fortaleza, CE, georgiabiologa@hotmail.com

<sup>3</sup>Engenheira Agrônoma, Universidade Federal do Ceará, Avenida Mister Hull, s/n CEP 60.021-970 Fortaleza, CE

<sup>4</sup>Engenheiro Agrônomo, Bolsista Funcap/Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, jose.matos@crea.org

<sup>5</sup>Bióloga, M. Sc. em Tecnologia de Alimentos, Analista da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, celli@cnpat.embrapa.br

## Frutos utilizados

Para este trabalho, foram utilizados frutos de dois clones de cajueiro-anão precoce, o BRS 226 e o CCP 76, com pedúnculos completamente desenvolvidos, ou seja, com tamanho máximo, textura firme e com coloração característica do clone. O estudo foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Embrapa Agroindústria Tropical, em Fortaleza, Ceará.

## Assepsia dos frutos

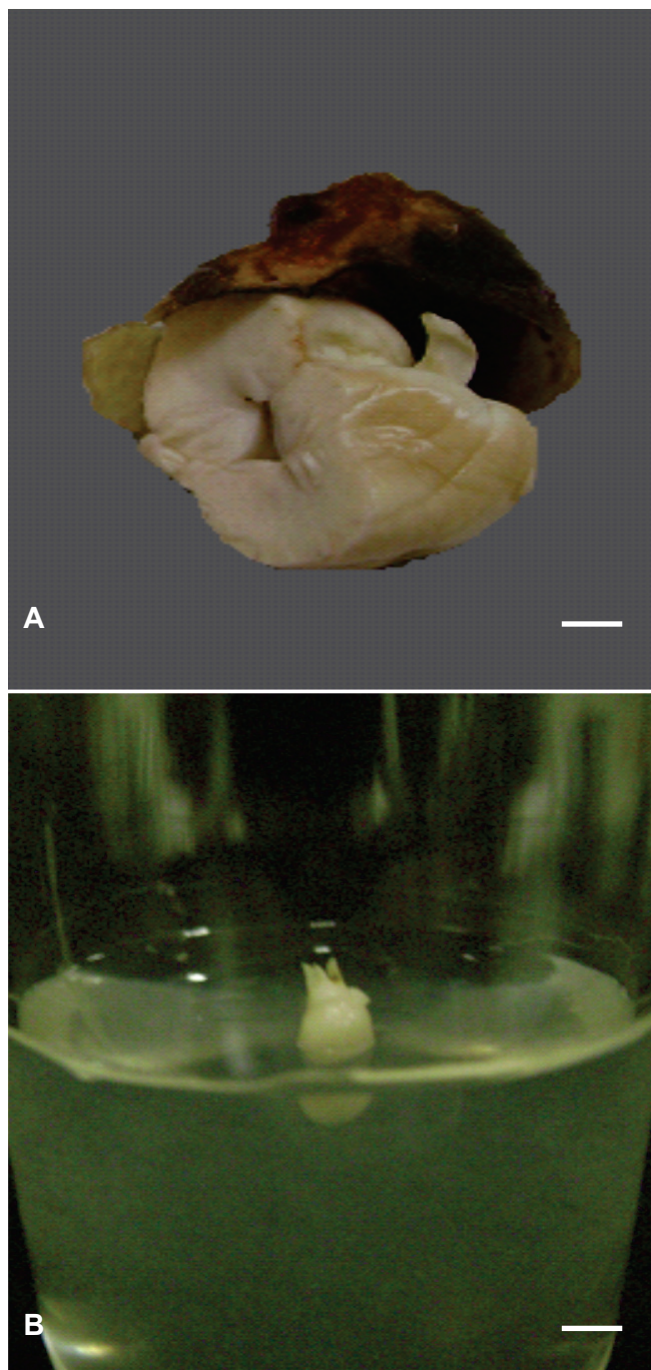
Os frutos são limpos superficialmente fazendo uso de água, sabão e uma escova macia. Com auxílio de uma faca, retiram-se o epicarpo e o mesocarpo. Em laboratório, as amêndoas com a película (Figura 1-A) são colocadas em frascos de capacidade de 250 mL contendo solução de hipoclorito de sódio comercial com 2% de cloro ativo acrescida de 3 gotas de Tween 20® para cada 100 mL da solução desinfestante, ficando sob agitação durante 30 minutos.

Posteriormente, em câmara de fluxo laminar, as amêndoas com as películas são mantidas em frascos com capacidade de 500 ml contendo solução desinfestante com 2 mL de PPM® (Plant Preservative Mixture) em 400 mL de água destilada e esterilizada, sob agitação, durante 30 minutos. Logo após, são realizadas quatro lavagens sucessivas em água destilada e esterilizada.

## Resgate e inoculação dos embriões zigóticos

Em capela de fluxo laminar, com o auxílio de uma pinça e cabo de bisturi com lâmina nº 11, as amêndoas são seccionadas ao meio, e os embriões zigóticos são resgatados e isolados em tubos de cultura (Figura 1-B) contendo meio de cultura JADS (Tabela 1) modificado utilizando apenas 50% do volume da solução de ferro indicada. O meio de cultura é suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, benzilaminopurina (BAP 0,01 mg L<sup>-1</sup>), ácido naftaleno acético (ANA 0,1 mg L<sup>-1</sup>) e ácido giberélico (GA3 2 mg L<sup>-1</sup>). O agente solidificante utilizado é o Gelrite®, Sigma (1,6 g L<sup>-1</sup>). O pH do meio de cultura é ajustado para 5,8 antes da esterilização e da adição do agente solidificante. Em seguida, é

distribuído 10 mL de meio em cada tubo de cultura (capacidade 150 mm x 25 mm). Os tubos são vedados com tampa de algodão. A esterilização do meio de cultura ocorre em autoclave à temperatura de 121 °C em pressão de 1,5 atm, durante 15 minutos.



Fotos: Diva Correia

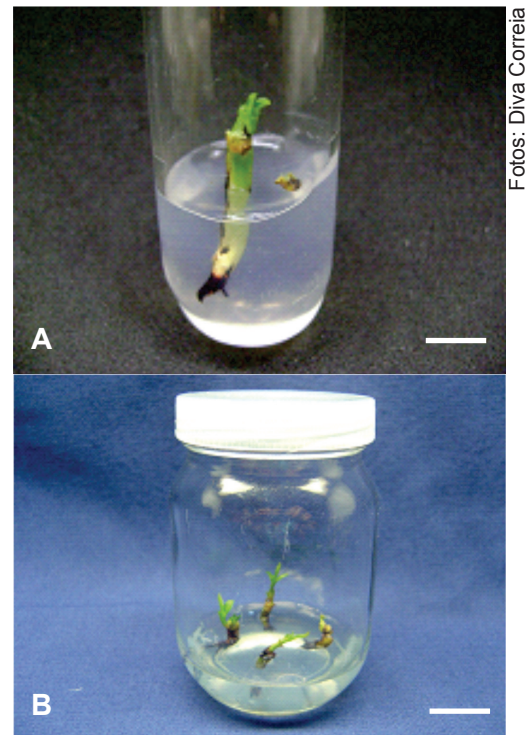
**Figura 1.** Amêndoa com a película (A) e embrião zigótico (B) do clone CCP 76 cajueiro-anão precoce (*Anacardium occidentale*) in vitro aos 7 dias de cultivo após inoculação. Barras = 0,5 cm.

**Tabela 1.** Composição do meio de cultura JADS (CORREIA et al., 1995).

Componente	Concentração	
	(mg L <sup>-1</sup> )	(mmol L <sup>-1</sup> )
<b>Macronutriente</b>		
Nitrato de amônio (NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> )	324,0	4
Nitrato de potássio (KNO <sub>3</sub> )	809,0	8
Nitrato de cálcio tetraidratado (CaNO <sub>3</sub> .4H <sub>2</sub> O)	1.181,0	5
Fosfato monobásico de potássio (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	408,0	3
Sulfato de magnésio heptaidratado (MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)	739,5	3
<b>Micronutriente</b>		
Ferro-EDTA		
(FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)	55,60	0,2
(Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O)	74,50	0,2
Sulfato de manganês monoidratado (MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O)	12,80	0,076
Sulfato de zinco heptaidratado (Zn SO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)	4,30	0,015
Sulfato de cobre pentaidratado (Cu SO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O)	1,25	0,005
Molibdato de sódio diidratado (Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O)	0,15	0,0006
Ácido bórico (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> )	3,10	0,05
<b>Composto orgânico</b>		
Tiamina.HCl (vitamina B <sub>1</sub> )		0,015
Piridoxina.HCl (vitamina B <sub>6</sub> )	0,5	0,0024
Ácido nicotínico (vitamina PP)	0,5	0,004
Pantotenato de cálcio (vitamina B <sub>5</sub> )	2,4	0,005
Cisteína	2,5	0,02
Arginina	7,0	0,04
Glutamina	146,0	1,0
Inositol	100,0	0,555
Sacarose	30000,00	11400,00

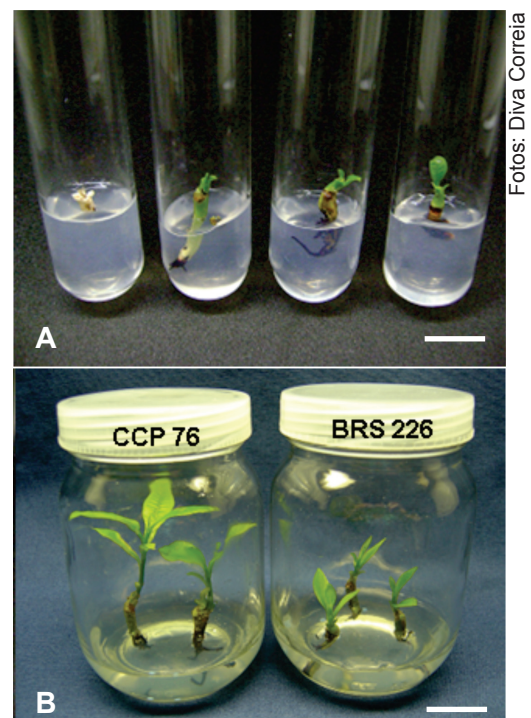
Os embriões devem ser mantidos durante 30 dias em sala de crescimento à temperatura de  $27 \pm 2$  °C, fotoperíodo de 12 horas/luz sob radiação ativa fotossintética de  $30 \mu\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Durante esse período, as culturas devem ser transferidas para um mesmo meio de cultura novo a cada 7 dias (Figura 2).

Após esse período, as culturas são transferidas novamente para frascos com capacidade de 250 mL contendo 30 mL de meio de cultura utilizado inicialmente. Nessa condição, as culturas permanecem durante 150 dias, sendo transferidas para meio de cultura novo, a cada 30 dias (Figura 3).



Fotos: Diva Correia

**Figura 2.** Embrião zigótico (A) do clone BRS 226 cajueiro-anão precoce (*Anacardium occidentale*) desenvolvido in vitro com 30 dias após a inoculação; embriões zigóticos transferidos para frascos de 250 mL (B). Barras = 1 cm.



Fotos: Diva Correia

**Figura 3.** Embriões zigóticos do clone CCP 76 com 7, 14, 21 e 28 dias de cultivo após a inoculação, da esquerda para a direita (A) e plântulas desenvolvidas dos clones de cajueiro-anão precoce CCP 76 e BRS 226 (B) aos 180 dias após a inoculação. Barras = 1 cm.

Os resultados obtidos do isolamento de embriões zigóticos dos clones CCP 76 e BRS 226 são mostrados na Tabela 2. Durante os primeiros 30 dias, foram observadas as taxas de contaminação. Os dados de contaminação indicam que o processo de desinfestação das amêndoas foi eficaz para o controle de bactérias (2,12% e 8,30%) e de fungos (0,70% e 2,43%) para os clones CCP 76 e BRS 226, respectivamente. Esses resultados sugerem que o uso da solução de hipoclorito de sódio seguido do uso de solução de PPM® é uma alternativa aos produtos comumente utilizados nos processos de desinfestação

superficial de materiais que antecedem ao cultivo in vitro, como, por exemplo, o cloreto de mercúrio (CARDOZA; SOUZA, 2002).

Verificou-se que as taxas de oxidação foram elevadas em ambos os clones, mostrando que, mesmo com as transferências realizadas a cada 7 dias, estas não foram eficazes durante os 30 primeiros dias para o controle da liberação dos fenóis e outros exsudados. A presença de oxidação nos embriões pode ter favorecido a redução do desenvolvimento deles e, conseqüentemente, as reduzidas taxas de sobrevivência (Tabela 2).

**Tabela 2.** Número, porcentagens de contaminação, de oxidação e de sobrevivência de embriões zigóticos, porcentagem de plântulas formadas e número médio de folhas desenvolvidas em plântulas de cajueiro-anão precoce. Fortaleza, CE, 2010.

Clone	Embrião				Plântula formada	
	Embrião zigótico isolado (n°)	Contaminado (%)	Oxidação (%)	Sobrevivência (%)	%	Folha (n°)
CCP 76	283	2,82	30,03	67,13	26,84	4,79 ± 0,46
BRS 226	205	10,73	28,78	60,48	33,87	2,24 ± 0,29

± Erro padrão da média.

O clone BRS 226 apresentou maior porcentagem de plantas formadas quando comparado à porcentagem obtida pelo clone CCP 76 (Tabela 2). Entretanto, as plântulas do clone CCP 76 apresentaram maior crescimento (Figura 3) e maior número médio de folhas quando comparadas aos resultados alcançados pelo clone BRS 226 (Tabela 2). Tais resultados demonstram a variabilidade genética entre os clones.

## Agradecimentos

Ao Banco do Nordeste (Fundece) e à Embrapa pelo financiamento; à Funcap pela concessão de bolsa.

## Referências

BARROS, L. de M.; PIMENTEL, C. R. M.; CORREA, M. P. F.; MESQUITA, A. L. M. **Recomendações técnicas para a cultura do cajueiro anão precoce**. Fortaleza : EMBRAPA/CNPAT, 1993. 65 p. (EMBRAPA-CNPAT. Circular Técnica, 1).

BARROS, L. de M.; CRISÓSTOMO, J. R.; CAVALCANTE, J. J. V. Melhoria populacional do cajueiro-anão precoce para características agrônomicas e industriais. In: CONGRESSO

BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, nº 13, Salvador, 1994.

**Resumos...** SBF, 1994, v. 1, p. 293-294.

BOGGETI, B.; JÁSIK, J.; MANTELL, S. H. *In vitro* root formation in *Anacardium occidentale* microshoots. **Biologia Plantarum**, Czech Republic, v. 44, n. 2, p. 175-179, 2001.

CARDOZA, V.; D'SOUZA, L. Induction, development and germination of somatic embryos from nucellar tissues of cashew (*Anacardium occidentale* L.). **Scientia Horticulturae**, Amsterdã, v. 93, n. 3/4, p. 367-372, 2002.

CORREIA, D.; GONÇALVES, A. N.; COUTO, H. Y. Z.; RIBEIRO, M. C. Efeito do meio de cultura líquido e sólido no crescimento e desenvolvimento de gemas de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* na multiplicação *in vitro*. **IPEF**, Piracicaba, v. 48-49, p. 107-116, 1995.

IBGE-SIDRA **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola, 2010**. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?c=1618&z=t&o=26&i=P>>. Acesso em: 12 out. 2011.

PAIVA, J. R.; CARDOSO, J. E.; BARROS, L. M.; CRISÓSTOMO, J. R.; CAVALCANTI, J. J. V.; ALENCAR, E. S. **Clone de cajueiro-anão precoce BRS 226 ou Planalto**: nova alternativa para o plantio na Região Semi-Árida do Nordeste. Fortaleza: Embrapa CNPAT, 2002. 4 p. (Embrapa CNPAT, Comunicado Técnico, 78).

**Comunicado Técnico, 179**

Ministério da  
Agricultura, Pecuária  
e Abastecimento



Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:  
**Embrapa Agroindústria Tropical**  
**Endereço:** Rua Dra. Sara Mesquita 2270, Pici,  
CEP 60511-110 Fortaleza, CE  
**Fone:** (0xx85) 3391-7100  
**Fax:** (0xx85) 3391-7109 / 3391-7141  
**E-mail:** vendas@cnpat.embrapa.br

1ª edição (2011): on-line

**Comitê de Publicações**

**Presidente:** Antonio Teixeira Cavalcanti Júnior  
**Secretário-Executivo:** Marcos Antonio Nakayama  
**Membros:** Diva Correia, Marlon Vagner Valentim Martins, Arthur Cláudio Rodrigues de Souza, Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho, Adriano Lincoln Albuquerque Mattos e Carlos Farley Herbster Moura.

**Expediente**

**Revisão de texto:** Marcos Antonio Nakayama  
**Editoração eletrônica:** Arião Nobre de Oliveira  
**Normalização bibliográfica:** Rita de Cassia Costa Cid