



Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de pós-graduação em botânica

Leny Paula Lisbôa de Oliveira

**Embriogênese somática em genótipos de cacau
(*Theobroma cacao* L.)**

Orientador: Jonny Everson Scherwinski-Pereira
Coorientadora: Inaê Mariê de Araújo Silva Cardoso

**Brasília, DF
Setembro/2023**



Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de pós-graduação em botânica

**Embriogênese somática em genótipos de cacau
(*Theobroma cacao* L.)**

Dissertação apresentada ao Departamento de Botânica, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Botânica.

Aluna: Leny Paula Lisbôa de Oliveira

Orientador: Jonny Everson Scherwinski-Pereira

Coorientadora: Inaê Mariê de Araújo Silva Cardoso

**Brasília, DF
Setembro/2023**

Embriogênese somática em genótipos de cacau
(Theobroma cacao L.)

Leny Paula Lisbôa de Oliveira

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de mestre, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Botânica da Universidade de Brasília (PPGBOT/UnB).

Brasília, 29 de setembro de 2023.

Banca examinadora:

Dr. Jonny Everson Scherwinski-Pereira (Presidente)
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Departamento de Botânica, PPGBOT/UnB

Dra. Thais Roseli Corrêa (Membro externo)
Universidade Estadual do Maranhão, CCA/UEMA

Dr. Paulo Cesar Poeta Fermينو Jr. (Membro externo)
Universidade Federal de Santa Catarina, PPGEAN/UFSC

Dr. Sarah Christina Caldas Oliveira (Membro interno)
Universidade de Brasília, PPGBOT/UnB

Resumo

Introdução: O cacauieiro (*Theobroma cacao* L.), uma espécie lenhosa da família Malvaceae, é uma cultura de grande importância cultural e econômica no mundo, devido principalmente à produção de chocolate. No entanto, cerca de 38% do cacau cultivado é perdido anualmente por efeito de pragas e doenças, e a dificuldade de armazenamento devido à recalcitrância das sementes. Por apresentar um longo ciclo de vida, programas de melhoramento genético do cacauieiro são demorados, o que torna necessário o desenvolvimento de métodos de propagação mais eficientes para a multiplicação de genótipos de interesse, como a embriogênese somática.

Objetivo: O objetivo deste trabalho foi avaliar a adição de diferentes citocininas em um protocolo de embriogênese somática para diferentes genótipos de cacau, buscando sua otimização, além de descrever e caracterizar anatomicamente diferentes tipos de calos e embriões somáticos obtidos durante as diferentes etapas do processo. **Metodologia:** Este estudo foi realizado na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em Brasília-DF. Explantes formados por estaminoides foram coletados de flores de três plantas matrizes (752, 754 e 755) e cultivados em meios de cultura baseados na pesquisa de Li e colaboradores (1998), adicionado das citocininas cinetina e meta-Topolina nas concentrações de 0; 0,5 e 1,0 mg L⁻¹, seguindo um delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial triplo (3 genótipos × 2 citocininas × 3 concentrações). Os tratamentos foram formados por 5 repetições de 10 estaminoides cada.

Resultados: No processo de embriogênese somática houve a formação de calos após duas semanas, e o surgimento de embriões somáticos em dez semanas. O genótipo “754” no tratamento controle, destacou-se pela alta taxa de formação de embriões somáticos. Durante a fase de desenvolvimento de embriões somáticos, houve uma alta taxa de oxidação dos explantes, especialmente no tratamento controle, que foi o mais responsivo. Apenas 17,9% se desenvolveram em plantas completas, sendo 66% provindos do meio controle, sem diferença significativa entre os genótipos. A cultura *in vitro* resultou em uma elevada taxa de anormalidade.

Conclusões: O experimento revelou que os genótipos de cacau apresentam resposta genótipo-dependentes na embriogênese somática, sendo o genótipo 754 testado o mais eficaz. Verificou-se que a oxidação dos calos não afetou a formação de embriões e que a região basal do estaminóide foi a mais responsiva. A adição das citocininas nas concentrações testadas não aumentou significativamente a geração de embriões somáticos nos genótipos experimentados, o protocolo base de Li *et al.* (1998) teve o melhor desempenho. A cultura *in vitro* apresentou alta taxa de anormalidade. Todas as plantas em aclimatização apresentaram bom desenvolvimento na câmara de crescimento e na casa de vegetação. Calos classificados como “granulares” e “nodulares” foram diferenciados, e ambos foram considerados embriogênicos.

Palavras-chave: cultura de tecidos, calogênese, oxidação, meta-Topolina, cinetina.

Abstract

Introduction: The cocoa tree (*Theobroma cacao* L.), a woody species from the Malvaceae family, is a crop of great cultural and economic importance in the world, mainly due to the production of chocolate. However, around 38% of cocoa grown is lost annually due to pests and diseases, and difficulty in storage due to the recalcitrance of the seeds. Because it has a long life cycle, cocoa genetic improvement programs are time-consuming, which makes it necessary to develop more efficient propagation methods for the multiplication of genotypes of interest, such as somatic embryogenesis. **Objective:** The objective of this work was to evaluate the addition of different cytokinins in a somatic embryogenesis protocol for different cocoa genotypes, seeking its optimization, in addition to describing and anatomically characterizing different types of callus and somatic embryos obtained during the different stages of the process. **Methodology:** This study was carried out at Embrapa Genetic Resources and Biotechnology, in Brasília-DF. Explants formed by staminodes were collected from flowers of three parent plants (752, 754 and 755) and cultivated in culture media based on the research of Li and collaborators (1998), added with the cytokinins kinetin and meta-Topolin at concentrations of 0; 0.5 and 1.0 mg L⁻¹, following a completely randomized experimental design in a triple factorial scheme (3 genotypes × 2 cytokinins × 3 concentrations). The treatments consisted of 5 replications of 10 staminodes each. **Results:** In the process of somatic embryogenesis, callus formed after two weeks, and somatic embryos emerged within ten weeks. The “754” genotype in the control treatment stood out for its high rate of somatic embryo formation. During the development phase of somatic embryos, there was a high rate of oxidation of the explants, especially in the control treatment, which was the most responsive. Only 17.9% developed into complete plants, with 66% coming from the control medium, with no significant difference between the genotypes. In vitro culture resulted in a high abnormality rate. **Conclusions:** The experiment revealed that cocoa genotypes present a genotype-dependent response in somatic embryogenesis, with the genotype 754 tested being the most effective. It was found that callus oxidation did not affect embryo formation and that the basal region of the staminode was the most responsive. The addition of cytokinins at the concentrations tested did not significantly increase the generation of somatic embryos in the genotypes tested, the base protocol of Li *et al.* (1998) performed best. In vitro culture showed a high rate of abnormalities. All acclimatized plants showed good development in the growth chamber and in the greenhouse. Calli classified as “granular” and “nodular” were differentiated, and both were considered embryogenic.

Keywords: tissue culture, callogenesis, oxidation, meta-Topolin, kinetin.

Lista de figuras

Figura 1	27
<p>(A) Plantas matrizes de <i>Theobroma cacao</i> L., denominadas '752', '754' e '755', em fase de frutificação. (B) Botões florais de <i>Theobroma cacao</i> L. com diferentes tamanhos até o início de sua abertura. Foram utilizados os maiores botões (BG), ainda completamente fechados para embriogênese somática de seus estaminoides. (BP) Botões florais pequenos, não utilizados; (BG) Botões grandes utilizados como explantes; (BA) Botões abertos, não utilizados devido à maior exposição do estaminoide, tendo maior risco de contaminação.</p>	
Figura 2	28
<p>(A) Botão floral de <i>Theobroma cacao</i> L. mostrando as sépalas; (B) Botão floral sem as sépalas, mostrando as pétalas; (C) Estames visíveis (seta) após retirada das pétalas; (D) Estaminoides (seta) evidenciados após remoção dos estames; (E) Ovário e estilete isolados no centro do botão floral após remoção dos estaminoides; (F) Partes do botão floral lado a lado. (G) Estaminoide de botão floral de <i>Theobroma cacao</i> L. utilizado como explante no experimento de embriogênese somática.</p>	
Figura 3	34
<p>Embriogênese somática indireta em estaminoide de <i>Theobroma cacao</i> L. (A) Explante em meio de indução de calos (MIC) apresentando intumescimento dos tecidos e desenvolvimento de calos granulares (CG). (B) Explante em meio de multiplicação de calos (MMC) com formação de calos granulares (CG) e calos nodulares (CN). (C) Explante há duas semanas em meio de desenvolvimento de embriões (MDE) com embriões somáticos em fase globular (ESG); notar escurecimento do explante. (D) Explante há quatro semanas em meio de desenvolvimento de embriões (MDE), após a calogênese, apresentando embriões nas fases torpedo (EST), cordiforme (ESC) e globular (ESG) surgindo de calos com oxidação; notar assincronia do processo (presença de embriões somáticos também em estágio globular) e escurecimento evidente do explante.</p>	
Figura 4	36
<p>Estruturas calogênicas desenvolvidas em estaminoides de <i>Theobroma cacao</i> L. em meio de multiplicação de calos (MMC) após 4 semanas de cultivo. (A) Calos granulares. (B) Calos nodulares.</p>	
Figura 5	41
<p>Influência do meio de cultivo na quantidade de calos nodulares formados na região basal do explante (estaminoide), durante a fase de multiplicação de calos de cacau (<i>Theobroma cacao</i> L.). Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os meios de cultivo, pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. Barras representam o erro padrão.</p>	
Figura 6	42
<p>Embriões de <i>Theobroma cacao</i> L. oriundos de embriogênese somática. (A) Embriões somáticos se desenvolvendo em tecido escurecido (setas). (B) Aglomerado de embriões somáticos destacados do tecido calogênico, em diferentes estágios de desenvolvimento, e com colorações distintas. Embrião translúcido (ET); Embrião branco (EB).</p>	
Figura 7	43
<p>Influência do meio de cultivo de origem (meio de indução de calos e meio de multiplicação de calos) no percentual de formação de embriões somáticos, durante a embriogênese somática de <i>Theobroma cacao</i> L., a partir de estaminoides. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os meios de cultivo, pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. Barras representam o erro padrão.</p>	
Figura 8	43
<p>Influência do meio de cultivo de origem (meio de indução de calos e meio de multiplicação de calos) no número médio de embriões somáticos globulares, durante a embriogênese somática de <i>Theobroma cacao</i></p>	

L., a partir de estaminoides. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os meios de cultivo, pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. Barras representam o erro padrão.

Figura 9 45

Influência do meio de cultivo de origem (meio de indução de calos e meio de multiplicação de calos) no percentual de oxidação dos explantes durante o cultivo em meio de desenvolvimento de embriões somáticos de *Theobroma cacao* L. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os meios de cultivo em cada genótipo e letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os genótipos, dentro de cada meio de cultivo, pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. Barras representam o erro padrão.

Figura 10 46

Aspecto dos embriões após quatro semanas em meio de regeneração de plantas (MRP) apresentando características de anormalidade. (A) Planta de aspecto normal. (B) Planta com folha de coloração rosada. (C) Planta com folhas fusionadas. (D) Planta com folhas pequenas e com deficiência em clorofila. (E) Planta com folhas anormais e deficiência em clorofila. (F) Planta com má formação de raízes e folhas anormais pequenas junto a folhas normais. (G) Planta com folhas fusionadas e má formação de raiz. (H) Planta com folhas normais junto a folhas anormais grossas, enrugadas e com deficiência em clorofila. (I) Planta apresentando ausência do desenvolvimento da raiz e folhas com aspecto anormal, grossas, enrugadas e de coloração rosada. (J e K) Plantas apresentando embriogênese secundária; setas pretas indicando ES provinda de meristema apical; seta vermelha indicando ES foliar. (L) Embrião com seu desenvolvimento estagnado. (M) Desenvolvimento somente radicular. (N) Oxidação total do embrião após o início do desenvolvimento foliar. Barras: 1 cm.

Figura 11 47

Número de embriões somáticos de *Theobroma cacao* L. que se desenvolveram em plantas completas (com emissão de ambos os meristemas), desenvolvendo folhas verdes e raízes de pelo menos 3 cm, provindos de embriogênese somática indireta em diferentes meios de cultivo (controle e outros com adição de 0,5 mg L⁻¹ cinetina, 1 mg L⁻¹ cinetina, 0,5 mg L⁻¹ meta-Topolina e 1 mg L⁻¹ meta-Topolina).

Figura 12 49

Plantas de *Theobroma cacao* L., provindas de embriogênese somática indireta, em fase de aclimatização. (A e B) Planta sem anormalidades sendo transferida para substrato. (C) Plantas na terceira semana de desenvolvimento em câmara de crescimento tipo BOD, com a base do copo “tampa” removida para menor retenção de umidade para dar início às regas a cada dois dias. (D e E) Planta anormal, provinda de fusão de dois embriões sendo transferida para substrato. (F) Mudanças crescendo na casa de vegetação, as bases dos copos “tampas” foram removidas para diminuir a umidade disponível para as plantas e elas passaram a ser regadas a cada dois dias. Barras: 1 cm.

Figura 13 50

Caracterização morfoanatômica de estaminoides usados como explantes para indução da embriogênese somática em *Theobroma cacao* L. (cacaueiro). (A) Estaminoide; notar tricomas (seta). (B) Secção longitudinal do estaminoide evidenciando conspícuas vesículas de mucilagem. (B.1) Detalhe da base do estaminoide, rica em compostos fenólicos. (B.2) Detalhe dos feixes vasculares do estaminoide. (B.3) Detalhe do ápice do estaminoide, com tricoma visível e camadas de células com compostos fenólicos. (C, D) Secções transversais do estaminoide; observar tricomas e células da epiderme em maior magnificação em D. Barras: A, B = 500 µm; B.1-3 = 25 µm; C = 100 µm e D: 50 µm. Abreviações: est - estaminoide; cf - compostos fenólicos; ep - epiderme; fv - feixe vascular; muc - vesícula de mucilagem; pa - célula parenquimática; tr - tricoma.

Figura 14 52

Caracterização morfoanatômica de calos (filamentoso, granular e nodular) de *Theobroma cacao* L. (cacaueiro) oriundos de estaminoide após 14 dias de cultivo em meio de indução de calos. (A) Diferentes tipos de calos sobre um único estaminoide (calo filamentoso em detalhe lateral, calo nodular apontado

pela seta e granular). (B) Células vacuoladas alongadas e arredondadas características dos calos filamentosos e granulares, respectivamente. (B.1) Células vacuoladas alongadas (calos filamentosos). (B.2) Células vacuoladas arredondadas em meio a células citoplasmáticas ricas em compostos fenólicos (calos granulares). (B.3) Células com paredes celulares mais espessas e com abundância de compostos fenólicos (calo nodular). (C) Aglomerado de células com características embriogênicas em meio a células vacuoladas alongadas e arredondadas; notar compostos fenólicos esverdeados (seta). (C.1) Células com características embriogênicas em maior magnificação; observar célula pontilhada com núcleo central. Barras: A = 1 mm; B = 250 μm e B.1-3 = 25 μm ; C = 200 μm e C.1 = 25 μm . Abreviações: ce - célula embriogênica; cf - calo filamentoso; cg - calo granular; cn - calo nodular; cva - célula vacuolada alongada; cvr - célula vacuolada arredondada; f - composto fenólico; ze - zona embriogênica.

Figura 15 54

Caracterização morfoanatômica de calos (filamentoso, granular e nodular) de *Theobroma cacao* L. (cacaueiro) oriundos de estaminoide após 14 dias de cultivo em meio de indução de calos. (A) Diferentes tipos de calos sobre um único estaminoide (calo filamentoso, nodular e granular - detalhe lateral). (B) Diferentes tipos celulares. (B.1) Células embriogênicas observadas em calos nodulares. (B.2) Células com paredes celulares espessas. (B.3) Células vacuoladas arredondadas. (C) Multiplicação de células meristemáticas para fora do explante e de proembriões (pontilhado) para dentro do explante; seta indicando a epiderme do explante rica em compostos fenólicos. (D) Detalhe do proembrião referente à letra C. Barras: A = 1 mm; B = 250 μm , B.1, 3 = 25 μm , B.2 = 100 μm ; C = 50 μm ; D = 25 μm . Abreviações: ce - célula embriogênica; cf - calo filamentoso; cg - calo granular; cm - célula meristemática; cn - calo nodular; cv - célula vacuolada; f - compostos fenólicos; pe - proembrião.

Figura 16 56

Caracterização morfoanatômica de calos (granular e nodular) de *Theobroma cacao* L. (cacaueiro) oriundos de estaminoides após 15 dias de cultivo em meio de indução de calos. (A) Estaminoide com aglomerado de calos nodulares; observar calo granular abaixo dos calos nodulares. (B) Secção anatômica do explante apresentado na letra A; notar calos nodulares e multiplicação de células meristemáticas nas adjacências dos feixes vasculares. Setas indicando epiderme do estaminoide. (B.1) Calos nodulares com zonas embriogênicas. (B.2) Proembriões localizados internamente no estaminoide. (B.3) Proembriões localizados externamente ao estaminoide. (C) e (D) Zonas embriogênicas com sinais de fragmentação (setas). Barras: A = 1 mm; B = 250 μm , B.1, 2 = 25 μm e B.3 = 50 μm ; C = 200 μm ; D = 50 μm . Abreviações: ce - célula embriogênica; cg - calo granular; cm - células meristemáticas; cn - calo nodular; est - estaminoide; f - compostos fenólicos; fv - feixe vascular; me - massa embriogênica; pe - proembrião; mu - mucilagem, ze - zona embriogênica.

Figura 17 58

Caracterização morfoanatômica de calos (granular e nodular) de *Theobroma cacao* L. (cacaueiro) oriundos de estaminoides, após seis semanas de cultivo. (A) Calo granular sem sinais de escurecimento. (B) Secção anatômica do calo apresentado na letra A, rico em células vacuoladas. (C) Calos nodulares associados a calos granulares com escurecimento expressivo. (D) Secção anatômica do calo apresentado na letra C; observar células com paredes espessas (setas). (D.1) Célula com características embriogênicas; notar espessamento da parede celular. Barras: A, C = 1 mm; B = 200 μm ; D = 500 μm e D.1 = 25 μm . Abreviações: cg - calo granular; cn - calo nodular e cv - células vacuoladas.

Figura 18 60

Caracterização morfoanatômica de embriões somáticos de *Theobroma cacao* L. (cacaueiro) oriundos de estaminoide. (A) Estaminoide com as regiões basal e central cobertas por calos nodulares associados com calos granulares e com um agrupamento de embriões somáticos em diferentes estádios de desenvolvimento. (B) Secção anatômica do explante apresentado na letra A, com embriões somáticos globulares; notar proliferação de células meristemáticas subepidérmicas (seta), calo nodular e calo granular. (B.1) Embrião somático globular em maior magnificação; notar protoderme em formação (pontilhado). (B.2) Resquícios de proteína, corados com Xylidine Ponceau, observados em células centrais de embrião somático globular. (C) Embriões somáticos em estágio similar ao torpedo. Barras: A = 1 mm;

B = 100 μm , B.1= 50 μm e B.2 = 12,5 μm ; C = 100 μm . Abreviações: cg - calo granular; cm - células meristemáticas; cn - calo nodular; es - embriões somáticos; ep – epiderme, esc - embrião somático em estágio cordiforme; esg - embrião somático globular; est - embrião somático em estágio torpedo e pt – protoderme.

Figura 19 62

Caracterização morfoanatômica de embrião somático cotiledonar de *Theobroma cacao* L. (cacaueiro) oriundo de estaminoide. (A) Embrião cotiledonar. (B) Secção anatômica longitudinal do embrião apresentado na letra A. (B.1) Detalhe do meristema apical caulinar. (B.2) Detalhe do cordão procambial; notar elemento de vaso. (B.3) Detalhe do meristema apical radicular. (B.4) Camada fenólica na periferia do embrião somático. (B.5) Resquícios de proteína, corados com Xylidine Ponceau, observados em células de embrião somático cotiledonar. Barras: A = 500 μm ; B = 250 μm e B.1-5 = 25 μm . Abreviações: cf - compostos fenólicos; ep - epiderme; ev - elemento de vaso; mac - meristema apical caulinar; mpr - meristema apical radicular e pc - procâmbio.

Figura 20 63

Caracterização histoquímica dos tipos celulares envolvidos na calogênese de *Theobroma cacao* L. (cacaueiro) oriunda de estaminoide visando à embriogênese somática (A, D, G, J – secções coradas com Periodic Acid Schiff; B, E, H – secções coradas com Lugol e C, F, I, K – secções coradas com Xilidine Ponceau). (A, B) Grãos de amido (setas) identificados em células vacuoladas de calos granulares. (C) Resquícios de proteínas em células vacuoladas dos calos granulares. (D, E) Grãos de amido (setas) identificados em células de paredes celulares espessas (setas). (F) Reserva proteica em células de paredes celulares espessas (setas). (G, H) Grãos de amido (setas) identificados em proembriões. (I) Resquícios de proteínas em proembriões. (J) Grãos de amido (seta) visualizados em células vacuoladas adjacentes às células embriogênicas localizadas no interior de calo nodular. (K) Reserva proteica em vacúolos de células embriogênicas localizadas no interior de calo nodular. Barras = 25 μm . Abreviações: cf - compostos fenólicos; cn - calo nodular e pe - proembrião.

Lista de tabelas

Tabela 1	29
Componentes dos meios de indução de calos (MIC), de multiplicação de calos (MMC), de desenvolvimento de embriões somáticos (MDE) e de regeneração de plantas (MRP) de <i>Theobroma cacao</i> L. a partir de estaminoídes.	
Tabela 2	37
Taxa de formação (%) de calos granulares por tratamento e por região do explante (estaminoíde), durante a indução da embriogênese somática de cacau (<i>Theobroma cacao</i> L.).	
Tabela 3	37
Taxa de formação (%) de calos granulares por genótipo e por região do explante (estaminoíde), durante a indução da embriogênese somática de cacau (<i>Theobroma cacao</i> L.).	
Tabela 4	38
Taxa de formação (%) de calos nodulares por tratamento e por região do explante (estaminoíde), durante a indução da embriogênese somática de cacau (<i>Theobroma cacao</i> L.).	
Tabela 5	38
Taxa de formação (%) de calos nodulares por genótipo e por região do explante (estaminoíde), durante a indução da embriogênese somática de cacau (<i>Theobroma cacao</i> L.).	
Tabela 6	39
Taxa taxa de formação (%) de calos nodulares na região central do explante (estaminoíde), entre diferentes meios de cultivo e genótipos, durante a indução da embriogênese somática de cacau (<i>Theobroma cacao</i> L.).	
Tabela 7	40
Taxa de formação (%) de calos granulares por tratamento e por região do explante (estaminoíde), durante a fase de multiplicação de calos de cacau (<i>Theobroma cacao</i> L.).	
Tabela 8	40
Taxa de formação (%) de calos nodulares por tratamento e por região do explante (estaminoíde), durante a fase de multiplicação de calos de cacau (<i>Theobroma cacao</i> L.).	
Tabela 9	41
Taxa de formação (%) de calos granulares por genótipo e por região do explante (estaminoíde), durante a fase de multiplicação de calos de cacau (<i>Theobroma cacao</i> L.).	
Tabela 10	41
Taxa de formação (%) de calos nodulares por genótipo e por região do explante (estaminoíde), durante a fase de multiplicação de calos de cacau (<i>Theobroma cacao</i> L.).	

Tabela 11 47

Influência do meio de indução e multiplicação de calos, e de diferentes genótipos no número médio de raízes a partir de calos de ES em estaminoides de *Theobroma cacao* L.

Sumário

1. Introdução.....	14
2. Objetivos.....	17
2.1. Objetivo geral.....	17
2.2. Objetivos específicos.....	17
3. Hipótese.....	17
4. Revisão de literatura.....	18
4.1 Caracterização botânica do cacau.....	18
4.2 Importância socioeconômica.....	18
4.3 Propagação.....	19
4.4 Embriogênese somática.....	20
4.4.1 Fatores que interferem na embriogênese somática.....	22
4.4.2 Citocininas e auxinas.....	23
4.4.3 Etapas da embriogênese somática.....	24
4.5 Aclimatização de plantas.....	25
5. Materiais e métodos.....	27
5.1 Local de realização dos experimentos.....	27
5.2 Otimização da embriogênese somática de <i>Theobroma cacao</i> L.....	27
5.2.1 Coleta, desinfestação e preparação dos explantes.....	27
5.2.2 Indução de calos.....	28
5.2.3 Multiplicação de calos.....	30
5.2.4 Indução do desenvolvimento de embriões somáticos.....	31
5.2.5 Análise anatômica de calos e embriões.....	31
5.2.6 Regeneração de plantas a partir de embriões somáticos.....	32

5.2.7 Aclimatização das plantas.....	33
6. Resultados e discussão.....	34
6.1 Meio de indução de calos.....	35
6.1.1 Formação de calos por regiões do explante (base, centro, ápice) em MIC.....	37
6.2 Meio de multiplicação de calos.....	39
6.2.1 Formação de calos por regiões do explante (base, centro, ápice) em MMC.....	40
6.3 Meio de desenvolvimento de embriões.....	42
6.4 Regeneração de plantas.....	45
6.5 Aclimatização de plantas.....	48
6.6 Análises morfoanatômicas e histoquímicas.....	49
7. Conclusões.....	65
8. Referências bibliográficas.....	67

1. Introdução

O cacauero (*Theobroma cacao* L.) pertence à ordem Malvales, família Malvaceae, subfamília Sterculioideae e ao gênero *Theobroma*, junto a outras 21 espécies que formam esse gênero (The Plant List, 2013). Tem seu centro de origem e primeiro centro de domesticação na Amazônia, América do Sul, e presume-se ter sido domesticado há cerca de 5.300 anos (Motamayor et al., 2002; Zarillo et al., 2018; Díaz-Valderrama et al., 2020). A espécie foi de grande importância cultural e econômica para as civilizações do continente e, desde o século XVII, vem sendo cultivada como um produto agrícola e distribuído mundialmente (Wood e Lass, 2001). Ao longo da história, o cacau foi categorizado em dois principais grupos genéticos denominados "Criollo" (subespécie *cacao* de possível origem no centro da América) e "Forastero" (subespécie *sphaerocarpum* de possível origem na América do Sul), tendo como critérios características físicas e origens geográficas. Depois, foi identificado um terceiro grupo, chamado de "Trinitario", composto por híbridos entre os grupos "Criollo" e "Forastero" (Herrera-García et al., 2015).

O cacauero possui como principal derivado o chocolate, que representou no ano de 2022 um mercado global de aproximadamente US\$ 14,5 bilhões, e as expectativas são de atingir US\$ 19,1 bilhões até 2028 (GLOBAL Cocoa Market Outlook, 2023). Os maiores produtores e exportadores de sementes de cacau do mundo são Costa do Marfim, Gana e Indonésia, que juntos são responsáveis por quase dois terços da produção mundial. O Brasil está em sétimo lugar, tendo produzido 269.731 toneladas de sementes de cacau em 2020 (FAOSTAT, 2022).

As sementes de cacau são a parte do fruto mais valorizada pelo mercado mundial, pois são usadas na fabricação de chocolate, fármacos e cosméticos (Wood e Lass, 2001). Normalmente, há entre 30 e 40 sementes por fruto (Wood e Lass, 2001). A polpa (endocarpo) também é utilizada em menor escala na fabricação de geleia, vinho, licor, vinagre e sucos, devido ao seu sabor adocicado e ácido (Dias et al., 2007; Carneiro et al., 2008; Serviço Nacional de Aprendizagem Rural, 2018).

Para se obter 1 kg de cacau comercial é necessário entre 15 a 31 frutos (Serviço Nacional de Aprendizagem Rural, 2018). Anualmente, um cacauero pode produzir até 125 mil flores em almofadas florais no caule. No entanto, menos de 5% das flores são fertilizadas, e apenas 3 a cada 1.000 (0,3%) se transformam em frutos (Wood e Lass, 2001; Berbiye, 2014; N'Zi et al., 2017), logo, um cacauero pode produzir até 375 frutos ao ano, o que equivale a até 12 a 25 kg de cacau comercial por planta madura, bem estabelecida, sem doenças e dependendo do genótipo. A baixa taxa de polinização das flores do cacau se deve principalmente a cinco diferentes fatores: 1- estrutura da flor: os estaminoides (estames estéreis) ficam em uma posição que bloqueia os estames (férteis); 2- a flor não emite aroma nem néctar, o que diminui a atração de polinizadores; 3- as flores desabrocham de manhã e se não forem polinizadas, caem em 24h; 4- os grãos de pólen são pegajosos; e 5- somente pequenos insetos que conseguem se infiltrar na flor fazem a polinização, o que torna essa planta entomófila (dependente somente de insetos para sua polinização) (Nair, 2010; Santos et al., 2012; Berbiye, 2014).

T. cacao é predominantemente alógama, o que significa que a polinização cruzada ocorre em cerca de 95% dos casos, embora haja a possibilidade de ocorrer a autopolinização. Em decorrência disso, a maioria dos materiais genéticos são heterozigotos (Sandoval et al., 2020). A polinização das flores do cacauero é feita por pequenos insetos, principalmente mosquitos da

família Ceratopogonidae (Diptera). Já a disseminação natural do cacau depende de animais que abram o fruto, pois ele não abre nem cai naturalmente quando maduro (Wood e Lass, 2001).

Existem diversas pragas e doenças provocadas por fungos, oomicetos e insetos, que acometem o cacau, diminuindo sua vitalidade e, conseqüentemente, sua capacidade produtiva. Cerca de 38% do cacau cultivado no mundo é perdido anualmente devido a doenças, destacando-se as podridões causadas por espécies do gênero *Phytophthora* e a vassoura-de-bruxa causada pelo fungo *Moniliophthora perniciosa* (Marelli *et al.*, 2019).

As formas de controle de infestações por fungos e oomicetos são o controle químico, através de pulverização com fungicidas nas plantas, o controle cultural, cuja principal técnica é a remoção de partes das plantas que foram infectadas, e o controle genético, feito através do plantio de genótipos tolerantes/resistentes a essas pragas (Marelli *et al.*, 2019). Esta última impulsiona a pesquisa e o desenvolvimento de genótipos elite de cacau, que possibilitam a economia na compra de fungicidas, no tempo gasto de funcionários em inspeções e remoção de partes infectadas das plantas, além de prevenir a perda de parte da plantação infectada antes de serem aplicados os controles químico e cultural.

Estima-se que doenças e pragas são responsáveis pela perda de cerca de 30% da produção de cacau mundial, anualmente (Guiltinan *et al.*, 2008). Portanto, vê-se a necessidade do melhoramento genético dessa espécie para atender o mercado mundial com plantas mais resistentes. A Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC, Ilhéus, BA) tem recomendado genótipos melhorados (elite), mais tolerantes à doença vassoura-de-bruxa, desde o final da década de 1990, após o surto da doença vassoura-de-bruxa no sul da Bahia, para repor as culturas perdidas por fazendeiros locais. Dentre os genótipos recomendados pela CEPLAC, encontram-se as CEPEC2002 (2002), CCN51, PH16 (2003) e PS1319 (2004) (Laliberté e End, 2015). Porém, devido à espécie ser perene com longo ciclo de vida, os programas de melhoramento genético são demorados, tornando-se essencial o desenvolvimento de métodos de propagação mais eficientes que acelerem esse processo (Li *et al.*, 1998).

Os métodos mais utilizados de propagação do cacau são de forma sexuada, com uso das sementes (técnica utilizada principalmente no oeste africano), e de forma vegetativa, que pode ser feita por estaquia ou enxertia (técnica mais utilizada no Brasil desde a década de 1990) (Laliberté e End, 2015). Outro método alternativo, ainda não usado comercialmente no Brasil, é a produção *in vitro* por meio da embriogênese somática, que permite rápida propagação de clones geneticamente idênticos, morfológicamente semelhantes, e livres de doenças por meio de limpeza clonal (Wickramasuriya e Dunwell, 2018; Quainoo *et al.*, 2008).

A embriogênese somática (ES) é um método para gerar embriões de plantas assexuadamente. Esse método é baseado na totipotência celular onde, sob condições específicas de cultura de tecidos, uma célula somática (ou grupos de células) adquire competência embriogênica, podendo gerar embriões somáticos com ou sem uma fase intermediária de calos (ES indireta ou ES direta, respectivamente), e se rediferenciar em um embrião somático, a partir de estímulos de variados estresses e/ou reguladores de crescimento, onde então se desenvolve em uma planta geneticamente idêntica à planta doadora da qual a célula original é oriunda (Torres *et al.*, 1998; Konieczny *et al.*, 2012; Barrueto Cid, 2013; Fehér, 2015).

A cultura *in vitro* de ES de cacau começou a ser desenvolvida em 1986 (Novák *et al.*, 1986), entretanto, observou-se que a diferença de genótipos tem influência notável na eficiência da ES

nesta espécie, principalmente no processo de conversão de embriões somáticos maduros em plantas completas (Maximova *et al.*, 2002). Alguns anos mais tarde, estudos de Li e colaboradores desenvolveram um protocolo testando 19 genótipos (Li *et al.*, 1998). Em seu estudo foi testado o uso da auxina 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) no meio de cultura, definindo-se a melhor quantidade (de 9,0 µM) para o protocolo de ES em cacau (Li *et al.*, 1998). O uso de reguladores de crescimento vegetal ou fitohormônios, como auxinas e citocininas, em meio de cultura induz o potencial embriogênico na ativação e regulação da divisão e diferenciação celular (Geldner *et al.*, 2001; Fehér *et al.*, 2003).

A caracterização anatômica de estruturas formadas no processo de ES permite, dentre outras coisas, a distinção entre calos embriogênicos e não embriogênicos, além de possibilitar um melhor controle sobre o tempo adequado de subcultivo, e quais tecidos e/ou suas partes são mais responsivas à ES, o que pode tornar mais eficiente o desenvolvimento de protocolos de ES. Técnicas histológicas têm se mostrado úteis para o desenvolvimento de protocolos de ES e o entendimento da ES em diversas espécies vegetais (Schwendiman *et al.*, 1988; Michaux-Fèrriere e Carron, 1989; Chan *et al.*, 1998; Saénz *et al.*, 2006; Silva-Cardoso *et al.*, 2019; Sousa *et al.*, 2020; Almeida *et al.*, 2020; Campos *et al.*, 2020; Meira *et al.*, 2020; Sousa *et al.* 2022).

Neste contexto, o objetivo principal do trabalho foi testar o uso de duas diferentes citocininas em um protocolo de ES em genótipos de cacau, buscando sua otimização no que diz respeito a um desenvolvimento mais eficiente de embriões (em quantidade e qualidade), tendo como base o protocolo de Li e colaboradores (1998) (o qual já utiliza a auxina 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético)). Além disso, descrever e caracterizar anatomicamente tipos de calos e embriões somáticos obtidos nas diferentes etapas do processo.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Esta dissertação teve como objetivo a avaliação do uso de duas diferentes citocininas em diferentes concentrações para otimização de um protocolo de embriogênese somática (ES) em genótipos *Theobroma cacao* L., além de descrever e caracterizar diferentes tipos de calos e embriões somáticos oriundos da ES.

2.2 Objetivos específicos

- Induzir calos embriogênicos em genótipos de cacau sob influência de diferentes reguladores de crescimento;
- Avaliar o potencial embriogênico entre diferentes genótipos de cacau;
- Produzir e regenerar embriões somáticos de cacau;
- Descrever e caracterizar anatômica e histoquimicamente diferentes tipos de calos e embriões somáticos oriundos da ES;
- Aclimatizar plantas regeneradas.

3. Hipótese

Se protocolos de ES forem otimizados, essa técnica poderá ser usada para a clonagem de genótipos comerciais de cacau de maneira mais eficiente. Logo, este aprimoramento do protocolo para a ES irá aperfeiçoar a clonagem de variedades de cacau, se comparados aos protocolos existentes.

4. Revisão de literatura

4.1 Caracterização botânica do cacau

Theobroma cacao L. é uma árvore perene da ordem Malvales, família Malvaceae, subfamília Sterculioideae (The Plant List, 2013). Ela pode crescer até 15 metros de altura, possui folhas grandes, verde escuras, e pequenas flores brancas ou rosadas, agrupadas em inflorescências pendentes no tronco. Os frutos são grandes, verdes ou amarelos, e contêm sementes cobertas por endocarpo (polpa) espesso (Wood e Lass, 2001).

As folhas do cacauíeiro possuem forma oval a elíptica, são opostas, persistentes e coriáceas. Seus tamanhos podem variar de 20 a 40 cm de comprimento e de 10 a 20 cm de largura. As folhas são geralmente lisas e lustrosas na superfície superior, e pubescente a velutinosa superfície inferior (Wood e Lass, 2001).

O tronco de *Theobroma cacao* L. é geralmente robusto e pode medir até 30 cm de diâmetro. Ele apresenta uma casca grossa e rugosa de cor cinza escura a marrom escuro. Por ser uma planta cauliflora, apresenta floração e frutificação no caule. Suas flores são pequenas, com cerca de 1 a 2 cm de diâmetro, e possuem uma cor branca a rosa pálido. Elas são agrupadas em inflorescências pendentes no caule (almofadas florais) e podem conter de 5 a 20 flores, dependendo da variedade. As flores são hermafroditas e pentâmeras, apresentando pétalas, sépalas, estame, estaminoides inférteis e pistilo. O ovário é súpero e apresenta de 30 a 70 óvulos (Alvim, 1984; Wood e Lass, 2001).

A polinização é geralmente feita por insetos, como abelhas e besouros pequenos, que são guiados pelos estaminoides inférteis e de cor carmim escuro e as linhas guias das pétalas (Leão, 2010).

Um cacauíeiro adulto pode produzir mais de 50 mil flores por ano, das quais menos de 5% são polinizadas, e somente 0,5 a 2% resulta em frutos. A flor não polinizada nas primeiras 8 a 10 horas após a emergência cai e esse aborto ocorre normalmente nas 24 a 48 horas subsequentes (Alvim, 1984).

Os frutos de *Theobroma cacao* L. são grandes, podendo chegar a 30 cm de comprimento e 15 cm de largura. Eles são ovalados ou alongados e têm uma casca externa grossa e dura, geralmente de cor verde ou amarela, dependendo da variedade. A casca externa envolve uma polpa doce e suculenta que contém de 30 e 40 sementes por fruto cobertas por uma camada espessa de endocarpo (Wood e Lass, 2001; Schwan and Wheals, 2004).

As sementes de *Theobroma cacao* L. são pequenas, com cerca de 1 a 1,5 cm de comprimento, possuem uma forma oval ou arredondada, e cor marrom escuro. Sua superfície pode ser lisa ou ligeiramente rugosa. Além disso, as sementes também contêm compostos bioativos, como flavonóides e alcalóides, que são conhecidos por suas propriedades antioxidantes e estimulantes (Kalvatchev *et al.*, 1998; Wood e Lass, 2001).

4.2 Importância socioeconômica

O cacau é uma planta de grande importância socioeconômica em muitos países, especialmente na América Latina, na África e na Ásia. Seu cultivo é fonte de renda importante para muitos agricultores e suas famílias. Muitos pequenos agricultores dependem do cacau como sua

principal fonte de renda. A produção e o comércio de chocolate geram empregos e renda em todo o mundo (Voora *et al.*, 2019)

O cultivo de cacau também é importante para a conservação da biodiversidade em muitas regiões tropicais de onde é nativo, pois ajuda a preservar a diversidade de plantas e animais adaptados a estes lugares (Guiracocha *et al.*, 2001).

As sementes de cacau contêm compostos bioativos, como flavonóides e alcalóides, que são conhecidos por suas propriedades antioxidantes e estimulantes. Estas substâncias têm sido estudadas para o seu potencial na prevenção de doenças e na melhoria da saúde em geral (Kalvatchev *et al.*, 1998).

Informações recentes do FAOSTAT (2022) indicam que a produção mundial em 2020 foi cerca de 5,7 milhões de toneladas ao ano, utilizando-se cerca 12 milhões de hectares para plantio ao redor do mundo. Comparando-se esses dados com os primeiros dados referentes ao ano de 1961, percebe-se o aumento de cerca de 4,8 vezes na produção e 2,8 vezes na área de plantio. Esses dados mostram o desenvolvimento na eficiência da agricultura, além da introdução de variedades melhoradas, demonstrando um aumento de 1,7 vezes na produtividade mundial.

Juntos, os países Holanda, Alemanha e Estados Unidos importam cerca de 50% das sementes de cacau do mercado mundial. Já o Brasil, que produz cerca de 4,7% das sementes de cacau no mundo, participa somente com 0,03% da exportação e 1,41% da importação mundial de sementes de cacau, mostrando que a maior parte da produção nacional é utilizada para consumo local, ainda havendo a necessidade de importação para suprir as demandas do mercado interno (FAOSTAT, 2022).

Apesar do cacau ter tido sua origem na região amazônica, o foco do cultivo na Amazônia brasileira nos anos 1800 se voltou para a produção de borracha (*Hevea brasiliensis*), enquanto o cultivo de cacau ganhou destaque na Bahia. Entretanto, devido à epidemia da doença vassoura-de-bruxa que devastou as plantações brasileiras em 1989, as quais ainda não se recuperaram completamente, o crescimento do comércio de cacau no Brasil não cresceu tanto em comparação com outros países.

4.3 Propagação

O cacau pode ser propagado assexuado ou sexualmente. A propagação sexual do cacau é realizada por meio da polinização natural ou artificial das flores, que resulta na formação de vagens contendo sementes. Essas sementes são retiradas das vagens, lavadas e secas, e depois podem ser usadas para a produção de mudas de cacau (Serviço Nacional de Aprendizagem Rural, 2018; Sodré e Gomes, 2019; Posse *et al.*, 2020). A propagação sexual é uma forma importante de manter a diversidade genética da espécie. No entanto, oportuniza a perda de características selecionadas de interesse comercial, além de ser um processo mais demorado e menos preciso do que a propagação vegetativa (Torres *et al.* 1998; Barrueto Cid, 2013; Awotedu *et al.*, 2021; Ak *et al.*, 2021).

A propagação assexuado pode ocorrer por várias técnicas, como por exemplo, mergulhia, alporquia, enxertia, estaquia e propagação *in vitro* (Awotedu *et al.*, 2021). Os métodos mais utilizados de propagação do cacau são de forma sexuado (técnica utilizada principalmente no

oeste africano), e assexuada por estaquia e enxertia (técnica mais utilizada no Brasil desde a década de 1990) (Laliberté e End, 2015; Sodré e Gomes, 2019). A estaquia é um processo em que uma parte da planta, geralmente um ramo com gemas laterais, é retirada da planta matriz e cultivada para produzir uma nova planta, que são colocados em solo úmido até que produzam raízes e se tornem mudas independentes. Já a enxertia é um processo que envolve a união de duas partes de plantas diferentes, geralmente uma planta enxertada e uma planta porta-enxerto. Na enxertia de cacau, a parte superior da planta enxertada é unida à raiz da planta porta-enxerto. (Silva Neto, 2001; Leão, 2010; Sodré e Gomes, 2019; Awotedu *et al.*, 2021).

A propagação *in vitro*, também conhecida como cultura de tecidos ou micropropagação, é um método de propagação vegetativa que envolve o cultivo de tecidos vegetais em condições controladas de laboratório. Esse método é útil para a multiplicação rápida de plantas geneticamente uniformes, permitindo a produção de mudas saudáveis e resistentes a doenças (Maximova *et al.*, 2002; Teixeira *et al.* 2002; Quainoo & Dwomo, 2012; Sodré e Gomes, 2019; Awotedu *et al.*, 2021).

A propagação *in vitro* de cacau é feita pela técnica da embriogênese somática (ES), não foram encontradas pesquisas com a propagação *in vitro* de cacau por organogênese. A ES começa com a seleção de material no plantio, geralmente a partir de plantas-matrizes saudáveis e produtivas, em seguida, da seleção de explantes que serão promissores e responsivos à técnica. As técnicas de cultura de tecidos se baseiam na cultura de explantes, que são pequenos fragmentos de tecido de plantas selecionadas, como estaminoides e folhas, que são colocados em meio de cultura em placas de Petri, e mantidos em condições ideais de temperatura e iluminação (Pancaningtyas, 2013). Os tecidos vegetais desses explantes se diferenciam em calos, e se rediferenciam em embriões somáticos, graças ao uso controlado de reguladores de crescimento nos meios de cultura. Esses embriões, semelhantes aos embriões providos de sementes, podem ser regenerados em novas plantas, e aclimatizados para se obter clones da planta-matriz (Torres *et al.* 1998; Barrueto Cid, 2013).

4.4 Embriogênese somática

Embriogênese somática (ES) é um processo de regeneração de embriões a partir de células somáticas, ou seja, células que não são germinativas, em um meio de cultura *in vitro*. Esse processo envolve a manipulação de células vegetais para que desenvolvam uma massa celular organizada, que se assemelha a um embrião em formação (Krikorian e Berquam, 1969; Torres *et al.*, 1998)

Para que a ES ocorra, utiliza-se explantes, que podem ser folhas, caules, raízes, pólen ou outras partes da planta. Os explantes são colocados em um meio de cultura que contém nutrientes, açúcares e reguladores de crescimento. Os reguladores de crescimento mais utilizados são auxinas e citocininas, que estimulam o desenvolvimento das células e a formação de tecidos (Hand *et al.*, 2016).

Durante a ES, as células somáticas se dividem e se diferenciam para formar um embrião completo, que pode ser transferido para um meio de cultura diferente, e posteriormente, desenvolver-se em uma muda completa. Esse processo é especialmente útil para a propagação de espécies de plantas que são difíceis de cultivar por meios convencionais, além de permitir a regeneração de plantas geneticamente modificadas (Guan *et al.*, 2016).

Essa técnica também é amplamente utilizada na produção de mudas em larga escala para culturas de alto valor econômico, especialmente aquelas espécies perenes onde métodos de propagação convencionais são impossibilitados. Além disso, essa técnica também é importante para a conservação de espécies ameaçadas de extinção e na produção de plantas transgênicas para fins comerciais (Teixeira *et al.* 2002; Barrueto Cid, 2013).

O cultivo *in vitro* do cacau por meio da ES para obtenção de embriões têm sido estudado desde 1979 (Orchard *et al.*, 1979), 77 anos depois que Haberlandt, em 1902, declarou que era possível formar artificialmente embriões originários de células vegetativas (Krikorian e Berquam, 1969).

Li e colaboradores (1998) conseguiram induzir o rápido crescimento de calos e embriões somáticos de *Theobroma cacao* L., usando o meio para plantas lenhosas DKW (Driver & Kuniyuki 1984) para crescimento primário, e meio para cultura primária de calos PCG suplementado com Thidiazuron (TDZ). Porém o estudo mostrou a assincronia no surgimento e desenvolvimento de embriões somáticos. A variação na velocidade de diferenciação de embriões somáticos é uma característica recorrente nessa rota de micropropagação, e diversos estudos, incluindo os realizados com cacau (Pancaningtyas, 2015a; Bustami e Werbrouck, 2017), já documentaram essa assincronia. Superar o desafio do descompasso na embriogênese somática (ES) continua sendo uma questão de grande relevância (Zhang *et al.*, 2013). Pesquisas anteriores indicam que o ácido abscísico (ABA) desempenha um papel crucial na regulação da sincronia nos embriões (Gutmann *et al.*, 1996). No entanto, ainda há a necessidade de estudos mais aprofundados para uma compreensão completa e resolução deste problema.

Outros estudos investigaram a consistência dos meios de cultura e concluíram que o meio líquido é mais adequado para promover o desenvolvimento de embriões, enquanto o meio sólido permite a formação abundante de calos (Adu-Ampomah *et al.*, 1988). Outro aspecto relatado por diferentes autores é sobre a taxa de sucesso na produção de calos e embriões somáticos no cacau ser influenciada pelos diferentes genótipos (Pence *et al.* 1979; Adu-Ampomah *et al.*, 1988; Li *et al.*, 1998; Delporte *et al.*, 2014).

O regime de cultivo na luz ou no escuro não apresentou diferenças significativas de acordo com estudo de Pence e colaboradores (1979), porém maior parte dos trabalhos de ES em cacau tenham sido realizados no escuro (Adu-Ampomah *et al.*, 1988; Aguilar *et al.*, 1992; Li *et al.*, 1998).

Embora ainda haja muito a ser investigado sobre o cultivo *in vitro* do cacau para obtenção de embriões somáticos de boa qualidade, os estudos realizados fornecem informações importantes. Além disso, é importante considerar tanto a consistência do meio de cultura, quanto as diferenças genotípicas na capacidade de ES em cacau ao desenvolver técnicas de cultivo *in vitro* para essa espécie.

Uma das primeiras pesquisas em ES com cacau, em que se obteve alto índice de regeneração de plantas a partir de embriões somáticos foi a de Li e colaboradores (1998). Nessa pesquisa foi criado um protocolo de ES para cacau, onde 19 genótipos foram testados a partir de estaminoides como explantes. O meio de indução de calos utilizado (PCG) conteve o sais de DKW suplementado com 9 μ M 2,4-D, e várias concentrações de TDZ (0; 22,7; 45,5; 113,6; 227,3; e 454,5 nM). Cada tratamento continha 20 estaminoides por placa Petri, em três repetições. Após 14 dias os explantes foram transferidos para o meio SCG composto de sais basais do meio WPM (Wood Plant Medium de Lloyd e McCown, 1980), vitaminas de Gamborg (Gamborg, 1966) e suplementado com, 9 μ M de 2,4-D e 1,4 μ M de cinetina, e deixados por mais 14 dias. O

meio de desenvolvimento de embriões ED, onde que os calos foram transferidos, foi composto de sais basais de DKW, onde os explantes permaneceram em subculturas de 14 dias até o surgimento e transferência de embriões em estágio torpedo para o meio de regeneração PR, contendo 1/5 da força de dos sais de DKW. Os embriões maduros foram cultivados em fotoperíodo de 16h com subcultura a cada 14 dias e quando apresentaram folhas e raízes foram transferidos para recipientes com substrato em uma casa de vegetação.

O uso do TDZ na concentração de 22,7 nM, na pesquisa de Li e colaboradores (1998), mostrou o maior desenvolvimento de calos (até 10 vezes o peso fresco dos explantes mantidos em meio sem TDZ), a taxa de produção de embriões por explantes foi de 1% a 100%, totalizando de 1 a 46 embriões por estaminoide responsivo, e foi notada a embriogênese secundária, onde embriões primários foram capazes de produzir até 50 embriões em 1 mês em meio ED.

Pesquisas continuam o processo de otimização do protocolo de ES para cacau. Em uma pesquisa recente, Guillou e Verdier (2022) usaram embriões primários para produção de calos embriogênicos na ES. Os meios base de cultura utilizados foram DKW para a indução de calos, WPM para indução secundária de calos, em diferentes fases de indução, uma mistura de macronutrientes de MS e micronutrientes de DKW para multiplicação de calos e expressão de embriões, metade da força de macronutrientes e micronutrientes de MS para a maturação, macronutrientes de MS e micronutrientes de DKW para germinação dos embriões. Neste experimento foi obtido 80% de sucesso na indução de embriões por ES direta, 95% na produção de embriões por ES indireta, em torno de 1.500 embriões por grama de calo, e 20-40% na conversão de embrião em planta.

Em outro experimento de Pancaninytas (2021) de melhoramento de protocolo de ES para cacau, a produção de calos embriogênicos secundários foi feita a partir do meio basal modificado de Murashige and Skoog (1962) (MS) e Driver and Kuniyuki (1984) (DKW), e foram testadas diferentes concentrações do antioxidante ácido ascórbico (100 – 200 mg.L⁻¹) e da auxina 2,4,5-T (0,5 e 1 mg.L⁻¹) em 5 diferentes genótipos. Já para a regeneração de embriões foi utilizado meio de expressão (composição omitida pelo autor) com a adição dos ácidos orgânicos adenina (0,025 e 0,0125 mg.L⁻¹) e ácido ascórbico (50, 100 e 150 mg.L⁻¹). Esse experimento tentou vencer o obstáculo da oxidação dos explantes por componentes fenólicos liberados na cultura *in vitro*. Os resultados mostraram grande influência genotípica na ES secundária. Os tratamentos com melhor efeito foram as combinações de 100 mg.L⁻¹ de ácido ascórbico com 1 de 2,4,5-T mg.L⁻¹ na fase de calogênese secundária, e 0,0125 mg.L⁻¹ de adenina com 100 mg.L⁻¹ de ácido ascórbico na fase de regeneração de embriões.

Essas pesquisas diferem-se do experimento de Li e colaboradores (1998) no uso do meio MS ao invés do DKW. Li e colaboradores (1998) afirmam que meios baseados em MS frequentemente resultam em rápida senescência, crescimento reduzido, e até necrose, preferindo assim o uso do DKW, que foi desenvolvido para propagação *in vitro* de espécies perenes lenhosas, com maior concentração de elementos essenciais (cálcio, magnésio e enxofre) para a diferenciação celular na ES (Pedroso *et al.*, 1996).

4.4.1 Fatores que interferem na embriogênese somática

Existem vários fatores que podem interferir na embriogênese somática (ES) em plantas. Esses fatores incluem a genética da planta, a composição do meio de cultura utilizado, e a presença de reguladores de crescimento vegetal (Torres *et al.* 1998; Teixeira *et al.* 2002).

Em relação à genética, a capacidade de uma planta de formar embriões somáticos pode variar entre diferentes genótipos e espécies de plantas. No caso do cacau, muitas pesquisas com ES mostraram que o *T. cacao* é genótipo-dependente (Maximova *et al.*, 2002; Traore, 2006; Minyalka *et al.*, 2008; Quainoo e Dwomo, 2012; Ajijah *et al.*, 2014; Figueira e Janick, 2017). Por ela ser uma planta alógama (fecundação cruzada tanto entre flores de um mesmo indivíduo como de indivíduos distintos), há uma grande variabilidade genética, o que pode ser o principal fator de haver grandes variações entre os resultados nos estudos com diferentes genótipos, pois a variabilidade dentro das populações, em alógamas, é maior que entre populações. Por isso, é importante selecionar cuidadosamente as plantas-matrizes, para garantir que elas tenham uma boa capacidade de regeneração de tecidos de acordo com o protocolo utilizado (Delporte *et al.*, 2014).

O processo inicial de cultivo de plantas *in vitro* começa com a extração de tecidos de uma planta doadora, que são então colocados em meios de cultura contendo concentrações elevadas de reguladores de crescimento de plantas, ocorrendo assim uma transição brusca do metabolismo autotrófico para o heterotrófico, e tendem a desencadear o estresse oxidativo (Benson e Roubelakis-Angelakis, 1994). A oxidação desempenha papéis importantes em processos biológicos, como em processos de cicatrização e adaptação ao estresse ambiental. Porém, em culturas de tecidos vegetais, a oxidação pode ser prejudicial, causando estresse celular, escurecimento dos meios de cultura e até a morte celular, fatores que prejudicam a multiplicação tecidos vegetais (Pancaningtyas, 2015).

O meio de cultura utilizado é crucial para o sucesso da ES. A composição do meio de cultura pode afetar a taxa de proliferação celular e o desenvolvimento dos embriões somáticos. Também é importante manter as culturas em condições adequadas de temperatura e iluminação para garantir um crescimento celular saudável (Barrueto Cid, 2013; Hand, *et al.*, 2016).

Por fim, a presença de reguladores de crescimento vegetal, como as auxinas e citocininas, também pode afetar a ES. Esses reguladores do crescimento podem afetar a proliferação celular e a diferenciação em diferentes estágios do desenvolvimento dos embriões somáticos. Porém, é importante encontrar a combinação adequada de hormônios para cada espécie e genótipo de planta, já que as necessidades podem variar amplamente (Torres *et al.* 1998; Hand, *et al.*, 2016).

4.4.2 Citocininas e auxinas

Na cultura de tecidos, a morfogênese é controlada pelos reguladores de crescimento e hormônios vegetais, com destaque para o equilíbrio entre auxina e citocinina no meio de cultura, com o fim de induzir a formação de calos (Skoog e Miller, 1957 apud Handro e Floh, 1990).

Cada espécie e genótipo vegetal necessita de concentrações diferentes de auxinas e citocininas, o que traz a necessidade de pesquisas específicas para cada genótipo de interesse. À princípio é recomendável testar diversas combinações de auxina e citocinina no estágio inicial da cultura de tecidos (Handro e Floh, 1990). Em geral são utilizadas as citocininas sintéticas comumente utilizadas no cultivo *in vitro*, como a benziladenina (BA) e a cinetina (KIN), embora as exógenas mais específicas, de ocorrência natural nas plantas, possam ser mais efetivas em alguns casos, como no caso da zeatina (Z) e a 2-isopenteniladenina (2 ip). Já como auxinas, podem ser usados o ácido indolilacético (AIA), alfa-

naftalenoacético (ANA) e 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), sendo que a auxina que mostra a maior eficiência na indução de calos é o 2,4-D (Ammirato, 1983 apud Handro e Floh, 1990).

Pereira *et al.* (2007) estudaram o efeito da cinetina e ANA na indução *in vitro* de embriões somáticos de *Coffea arabica* L. cv. acaia cerrado, tendo resultados positivos na indução de embriões ao utilizar 8 mg L⁻¹ de cinetina e 8,0 mg L⁻¹ de ANA, em meio de MS (Murashige e Skoog, 1962).

Em uma pesquisa com o cacau feita por Silva *et al.* (2006), na fase de indução de calos foi utilizado 2 mg L⁻¹ de 2,4 D e 0,3 mg L⁻¹ de cinetina, em meio constituído de sais WPM, vitaminas de Gamborg, 20 g L⁻¹ de sacarose, 50 ml L⁻¹ de água de coco e 2,2 g L⁻¹ de Gelrite®. A calogênese foi influenciada pelo genótipo, e foi maior nos explantes de estaminoides. Dentre outras espécies de *Theobroma* estudadas, embriões somáticos foram obtidos somente para *Theobroma cacao* L.

A calogênese foi potencializada com a combinação de 2,4-D, cinetina e glutamina (2,5 µM, 2,5 µM e 0,68 µM, respectivamente) em meio de cultura de MS, na ES de *Myracrodruon urundeuva* (Silva *et al.*, 2020).

4.4.3 Etapas da embriogênese somática

A embriogênese somática (ES) é um processo complexo, que envolve a reprogramação de células somáticas para adquirir características embrionárias e se desenvolver em um embrião completo (Torres *et al.* 1998).

A primeira etapa da ES é a indução, que envolve a iniciação do processo de embriogênese em células somáticas por meio de estímulos externos, como o uso de reguladores de crescimento e nutrientes específicos no meio de cultura. Esses estímulos fazem as células se desdiferenciarem devido à sua totipotência (Barrueto Cid, 2013; Hand, *et al.*, 2016).

Em seguida, há a multiplicação celular, na qual as células embriogênicas começam a se dividir rapidamente e formar massas celulares conhecidas como calos embriogênicos. Esses calos são constituídos por células indiferenciadas que podem se diferenciar em qualquer tecido vegetal (Barrueto Cid, 2013; Hand, *et al.*, 2016).

A terceira etapa é a formação de proembriões, que ocorre quando os calos embriogênicos começam a se organizar em uma estrutura semelhante a um embrião, mas ainda não apresentam todos os tecidos embriogênicos. Nesse estágio, ocorrem alterações no padrão de divisão celular e início da diferenciação dos tecidos devido à mudança na composição do meio de cultura, geralmente adicionando reguladores de crescimento vegetal, que guiam a diferenciação celular (Skoog e Miller, 1957 apud Handro e Floh, 1990).

Posteriormente, há a etapa de maturação dos embriões somáticos, na qual ocorre o desenvolvimento completo dos tecidos meristemáticos, tornando-os embriões maduros, capazes de germinar e se desenvolver em plantas completas (Hand, *et al.*, 2016).

Por fim, a última etapa é a germinação, que envolve a regeneração de plântulas a partir dos embriões maduros em meio de cultura, em condições adequadas de luz e temperatura (Teixeira *et al.* 2002).

O desenvolvimento de embriões somáticos em plantas de cacau inicialmente foi observado em embriões zigóticos imaturos (Esan, 1977; Pence *et al.*, 1979). Porém, embora os embriões somáticos se desenvolvessem normalmente até a fase cotiledonar, não germinavam *in*

vitro. Posteriormente, foi desenvolvido um método para a germinação de embriões somáticos Novák *et al.* (1986).

Em trabalhos posteriores, foi possível obter embriões somáticos a partir de folhas, utilizando tecidos nucelares e tecidos florais como fonte de explantes. Diferentes protocolos foram desenvolvidos, incluindo o uso de substâncias como o 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), benzilaminopurina (BAP) e tidiazurón (TDZ) para induzir a embriogênese somática (Litz, 1986; Figueira e Janick, 1993; Söndahl *et al.*, 1993).

Plantas completas foram obtidas a partir de tecidos florais em 1993 por Lopez-Baez e colaboradores e em 1996 por Alemanno e colaboradores. As plantas derivadas de embriões somáticos apresentaram características semelhantes às das plantas derivadas de sementes.

Embora pesquisas tenham tentado o uso de diversos tipos de explantes, como estames, pétalas e base das peças florais, o protocolo mais eficiente em termos de resposta embriogênica, feito por Li e colaboradores (1998), utilizou estaminóides de botões florais fechados como explante inicial (Teixeira, 2002).

4.5 Aclimatização de plantas

Após a formação dos embriões somáticos e sua subsequente germinação, as plantas passam pela fase de aclimatização, uma fase de adaptação entre a cultura *in vitro* e o plantio em campo. A aclimatização é um processo gradual e crucial, pois as plantas passam de ambiente controlado (temperatura, umidade, iluminação, nutrientes, etc.) para um ambiente externo (com microrganismos, vento, maior dificuldade de obtenção de nutrientes, etc.) (Paiva e Paiva, 2001; Iliev *et al.*, 2010).

Inicialmente, as plantas são transplantadas para recipientes como copos descartáveis contendo substrato (como o comercial ou solo misturado com vermiculita na proporção de 2:1). Durante os primeiros dias, as plantas geralmente são mantidas em condições de umidade saturada e baixa iluminação. Em seguida, elas são transferidas para casa de vegetação, onde permanecem por alguns meses e então, podem ser transplantadas para o campo (Li *et al.*, 1998; Lameira *et al.*, 2000; Paiva e Paiva, 2001).

O processo de aclimatização envolve diversos cuidados, como o aumento gradual da incidência da luz solar direta nas plantas para evitar danos às folhas (Lameira *et al.*, 2000; Nolan e Rose, 2010). A regulação da temperatura também é importante, pois plantas cultivadas *in vitro* são mantidas em temperaturas amenas e, com a mudança de ambiente, podem sofrer com temperaturas mais elevadas (Lameira *et al.*, 2000; Paiva e Paiva, 2001; Cardoso *et al.*, 2018). Além disso, é fundamental manter um controle adequado da umidade, que deve ser mantida em níveis elevados para evitar a desidratação das mudas (Paiva e Paiva, 2001; Cardoso *et al.*, 2018). A manutenção de todos esses parâmetros até a adaptação da planta em campo é muito delicada, pois a planta deve se adaptar gradualmente à sua transferência de um lugar (*in vitro*) com todos os parâmetros ideais, para um lugar (*ex vitro*) sujeito a intempéries, microrganismos, etc.

Um estudo de Entuni e colaboradores (2018) de aclimatização por um ano, de plantas providas de embriões somáticos de cacau via estaminóides, mostraram fenótipos normais e

parâmetros de crescimento (como a idade de floração precoce e sustentação dos frutos em crescimento) similares às plantas propagadas pelo método tradicional feito por enxerto.

Testes de aclimatização de embriões de ES de cacau feitos por Manlé e colaboradores (2021), mostraram que o uso de areia como substrato na aclimatização é mais favorável para a sobrevivência do cacauzeiro nos primeiros anos de vida, devido à porosidade e fácil infiltração da água na areia, o que dificulta o acúmulo de água e o surgimento de fungos danosos para a planta.

5. Materiais e métodos

5.1 Local de realização dos experimentos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos e Genética Vegetal (LCT-II) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, localizado em Brasília-DF.

5.2 Otimização da calogênese na embriogênese somática de *Theobroma cacao* L.

5.2.1 Coleta, desinfestação e preparação dos explantes

Inicialmente, botões florais de *Theobroma cacao* L. foram coletados de três plantas matrizes da Embrapa, denominadas '752', '754' e '755' (Figura 1A). Os botões florais foram coletados no período da manhã, quando ainda estavam fechados, entre o final de novembro e início de dezembro de 2021. Eles foram selecionados de acordo com o tamanho, que variava entre 6 mm e 8 mm, dando-se preferência para os maiores que ainda se mantinham completamente fechados, conforme indicado por Teixeira *et al.* (2002) (Figura 1B).

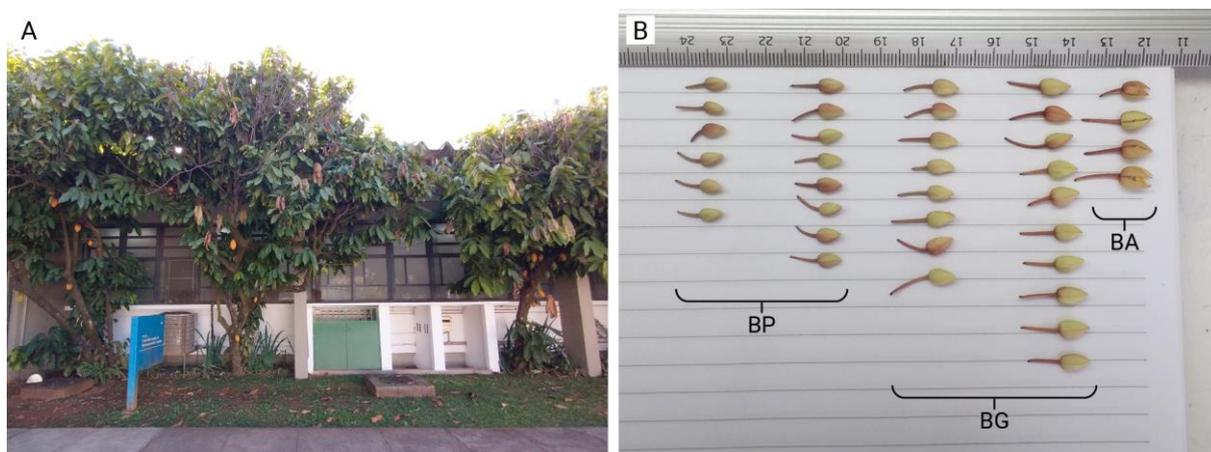


Figura 1. (A) Plantas matrizes de *Theobroma cacao* L., denominadas '752', '754' e '755', em fase de frutificação. (B) Botões florais de *Theobroma cacao* L. com diferentes tamanhos até o início de sua abertura. Foram utilizados os maiores botões (BG), ainda completamente fechados para embriogênese somática de seus estaminoides. (BP) Botões florais pequenos, não utilizados; (BG) Botões grandes utilizados como explantes; (BA) Botões abertos, não utilizados devido à maior exposição do estaminoide, tendo maior risco de contaminação.

Os botões florais foram desinfestados em câmara de fluxo laminar horizontal, em placas de *Petri* de vidro (15 mm × 100 mm) autoclavadas, por meio de imersão em solução de álcool 70% (v/v) por 3 minutos, seguido pela imersão em solução de hipoclorito de sódio (NaClO) na concentração de 0,5% de cloro ativo por 10 minutos. Posteriormente, foram feitas 3 lavagens em água destilada autoclavada por 5 minutos cada para remoção residual dos agentes esterilizantes, seguindo a metodologia de Teixeira *et al.* (2002).

Após a desinfestação, os botões florais foram colocados em discos autoclavados de papel filtro dentro de placas de *Petri* de vidro (15 mm × 100 mm) estéreis por cerca de 5 minutos para secagem. Em seguida, com auxílio de bisturis e pinças autoclavados, os estaminoides foram isolados do botão floral, mantendo-se parte do receptáculo, de acordo com especificações de Teixeira *et al.* (2002), obtendo-se, desta forma, os explantes para os experimentos iniciais de embriogênese somática (ES) (Figura 2).

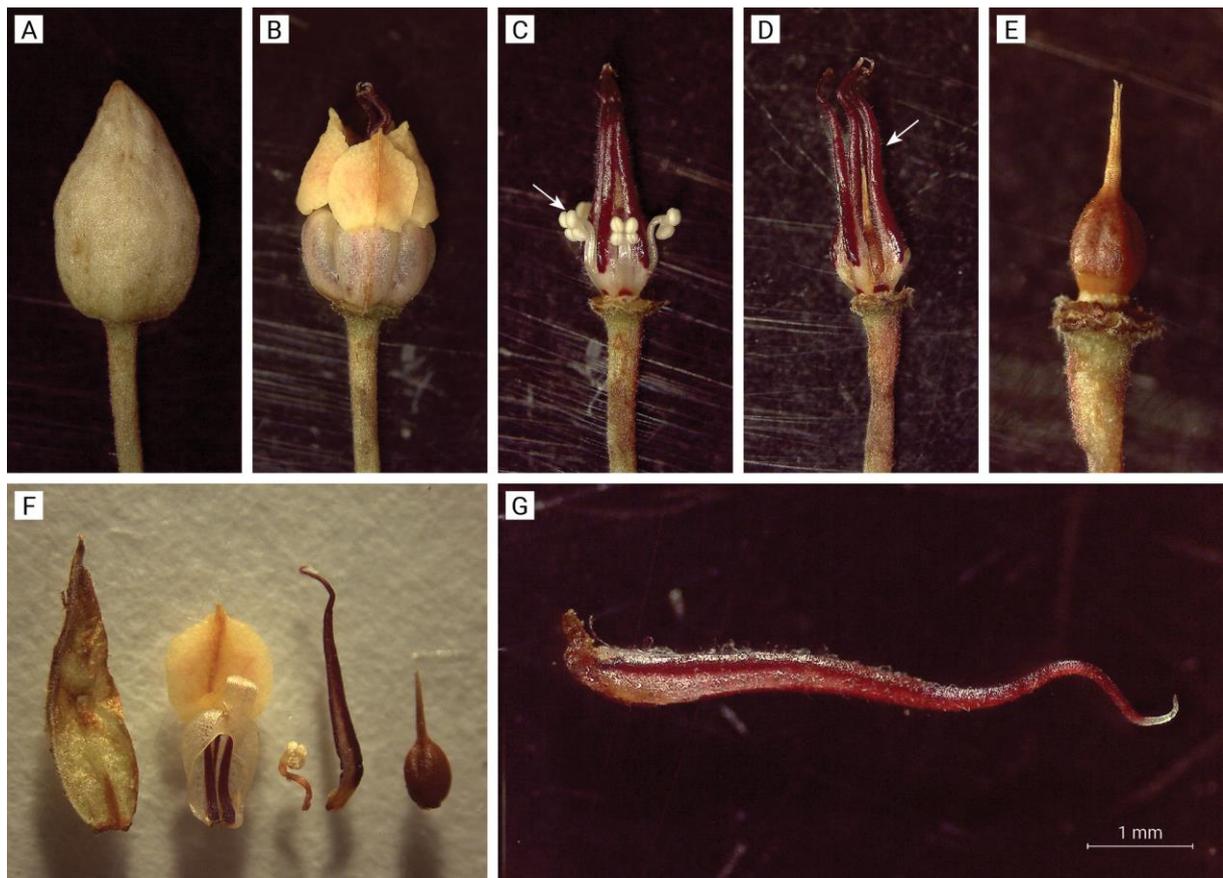


Figura 2. (A) Botão floral de *Theobroma cacao* L. mostrando as sépalas; (B) Botão floral sem as sépalas, mostrando as pétalas; (C) Estames visíveis (seta) após retirada das pétalas; (D). Estaminoides (seta) evidenciados após remoção dos estames; (E) Ovário e estilete isolados no centro do botão floral após remoção dos estaminoides; (F) Partes do botão floral lado a lado. (G) Estaminoide de botão floral de *Theobroma cacao* L. utilizado como explante no experimento de embriogênese somática.

5.2.2 Indução de calos

Para a indução de calos embriogênicos, os estaminoides oriundos dos três diferentes genótipos supramencionados foram inoculados em meio de indução de calos embriogênicos (MIC), composto pelos sais do meio de DKW (Driver e Kuniyuki, 1984), acrescido de $9,0 \mu\text{M}$ de 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D), $22,7 \text{ nM}$ de Tidiazurom (TDZ), $20,0 \text{ g L}^{-1}$ de glicose, $250,0 \text{ mg L}^{-1}$ de glutamina, $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de glicina e $2,0 \text{ g L}^{-1}$ de *Phytigel*, conforme protocolo desenvolvido por Li *et al.* (1998). A esse meio de cultura, foram adicionadas duas citocininas, cinetina (Cin) ou metatopolina (mT), nas concentrações de: 0; 0,5 e $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ (Tabela 1).

Tabela 1. Componentes dos meios de indução de calos (MIC)^[1], de multiplicação de calos (MMC)^[1], de desenvolvimento de embriões somáticos (MDE)^[2] e de regeneração de plantas (MRP)^[2] para protocolo de embriogênese somática de *Theobroma cacao* L. a partir de estaminoides.

Componente	MIC	MMC	MDE	MRP
Macronutrientes (mg L⁻¹)				
K ₂ SO ₄	1559	990	1559	311,8
NH ₄ NO ₃	1416	400	1416	283,2
Ca(NO ₃) ₂	1367	386	1367	273,4
MgSO ₄ anidro	361,49	180,7	361,49	72,3
KH ₂ PO ₄	265	170	265	53
CaCl ₂ anidro	112,5	72,5	112,5	22,5
Na ₂ EDTA	45,4	37,3	45,4	9,08
FeSO ₄ .7H ₂ O	33,8	27,8	33,8	6,76
KNO ₃	-	-	-	200
Micronutrientes (mg L⁻¹)				
MnSO ₄ .H ₂ O	33,5	22,3	33,5	6,7
H ₃ BO ₃	4,8	6,2	4,8	0,96
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,39	0,25	0,39	0,078
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,25	0,25	0,25	0,05
Zn(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	17	-	17	3,4
ZnSO ₄ .7H ₂ O		8,6		
Vitaminas (mg L⁻¹)				
Mio-inositol	200	100	100	100
Tiamina HCl	2	10	2	2
Ácido nicotínico	1	1	1	1
Piridoxina	-	1	-	-
Aminoácidos (mg L⁻¹)				
Glicina	2	-	2	2
Glutamina	250	-	-	-
Reguladores de crescimento (mg L⁻¹)				
2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D)	1,99	1,99	-	-
Tidiazuron (TDZ)	0,005	-	-	-
Cinetina	0; 0,5; 1,0	0; 0,5; 1,0	-	-
Meta-topolina (mT)	0; 0,5; 1,0	0; 0,5; 1,0	-	-
Gelificante (g L⁻¹)				
Phytigel®	2	2,2	2	1,7
Outros (g L⁻¹)				
Glicose	20	20	1	10
Sacarose	-	-	30	5

^[1] A composição dos meios de indução e multiplicação de calos (MIC e MMC, respectivamente) seguem o protocolo de Li *et al.* (1998), com adição de duas citocininas (cinetina e meta-topolina) em três concentrações (0; 0,5 e 1,0 mg L⁻¹).

^[2] A composição dos meios de desenvolvimento de embriões somáticos (MDE) e de regeneração (MRP) seguem o protocolo de Li *et al.* (1998).

O pH do meio foi ajustado para $5,8 \pm 0,1$ e o mesmo foi esterilizado por autoclavagem a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 20 minutos à $1,5\text{ atm}$ de pressão.

Durante todo o experimento, o processo de inoculação, transferência e subcultura dos explantes foi realizado em condições assépticas em câmara de fluxo laminar horizontal e os utensílios, tais como pinças e bisturis, foram previamente esterilizados por autoclavagem.

O cultivo dos explantes foi realizado em placas de *Petri* ($15 \times 90\text{ mm}$, de polietileno, estéreis por radiação ionizante, descartáveis), seladas com filme policloreto de polivinila (PVC) transparente, contendo aproximadamente 25 mL de meio de cultura por placa. Nesta etapa, as placas de *Petri* com os explantes inoculados foram envolvidas em papel alumínio e mantidas no escuro, em sala de crescimento com temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

O experimento foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado, em esquema fatorial triplo (3 genótipos \times 2 citocininas \times 3 concentrações), num total de 18 tratamentos. No total, cada tratamento foi formado por 5 repetições com 10 estaminoides cada.

Após duas semanas de cultivo em MIC, avaliaram-se as porcentagens de explantes escurecidos por oxidação e de formação de calos nas diferentes partes dos explantes (base, centro e ápice). Para melhor caracterizar os diferentes tipos de calos formados, eles foram classificados como sendo calos do tipo granulares e nodulares. O tipo granular foi caracterizado como formações calogênicas que apresentavam grânulos ou filamentos rígidos, fixos ao explante, de coloração branco translúcida a levemente amarelada translúcida de até 0,1 mm. Já os calos nodulares foram caracterizados com estruturas duras nodulares de cores branca translúcida a amarelada translúcida com superfície rugosa que chegava até 1,5 mm de diâmetro.

A porcentagem de explantes escurecidos por oxidação foi obtida por meio da razão entre a quantidade de explantes com mais de 50% de seu corpo escurecido por oxidação e o número total de explantes por placa, multiplicada por 100, o que também permitiu analisar o potencial responsivo de explantes nessa condição. A porcentagem de explantes com calos filamentosos e nodulares foi calculada da mesma forma supracitada. Ambos explantes, oxidados e não oxidados, foram utilizados nos experimentos seguintes.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, quando significativo, as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de significância, por meio do software estatístico R (R Development Core Team, 2012).

5.2.3 Multiplicação de calos

Após duas semanas em MIC, os explantes foram transferidos para placas de *Petri* ($15 \times 90\text{ mm}$), contendo cerca de 25 mL de meio de multiplicação de calos (MMC), baseado no meio de crescimento secundário de calos de Li *et al.* (1998), com modificações (Tabela 1). O meio MMC foi composto pelos sais do meio WPM (Wood Plant Medium) (Lloyd e McCown, 1980), suplementado com vitaminas de Gamborg (Gamborg, 1968), $9,0\text{ }\mu\text{M}$ de 2,4-D, $20,0\text{ g L}^{-1}$ de glicose e $2,2\text{ g L}^{-1}$ de *Phytigel*, além das concentrações de Cin e *mT* (0; 0,5 e $1,0\text{ mg L}^{-1}$) utilizadas na etapa de indução de calos. Nesta etapa, os calos foram mantidos no meio com o mesmo regulador da etapa anterior, mantendo-se, assim, as mesmas concentrações de citocininas em que estavam em MIC.

Assim como na etapa anterior, o pH do meio foi ajustado para $5,8 \pm 0,1$ antes da autoclavagem, que foi realizada por 20 minutos, à temperatura de $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $1,5\text{ atm}$ de pressão.

As placas de *Petri* com explantes inoculados foram envolvidas com papel alumínio e mantidas em condição de escuro, em sala de crescimento com temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Após quatro semanas de cultivo em MMC, as porcentagens de explantes escurecidos por oxidação e de explantes com formação de calos granulares e nodulares em diferentes partes dos estames (base, centro e ápice) de cada tratamento foram avaliadas. Ambos explantes, oxidados e não oxidados, foram utilizados nos experimentos seguintes.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, quando significativo, as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de significância, por meio do software estatístico R (R Development Core Team, 2012).

5.2.4 Indução do desenvolvimento de embriões somáticos

Para indução do desenvolvimento de embriões somáticos (diferenciação), os explantes foram transferidos para placas de *Petri* ($15 \times 90\text{ mm}$) contendo cerca de 25 mL de meio de desenvolvimento de embriões somáticos (MDE), desprovido de reguladores de crescimento ([Tabela 1](#)). O MDE foi composto pelos sais do meio de DKW (Driver e Kuniyuki, 1984), acrescido de $100,0\text{ mg L}^{-1}$ de mio-inositol, $2,0\text{ mg L}^{-1}$ de tiamina-HCL, $1,0\text{ mg L}^{-1}$ de ácido nicotínico, $2,0\text{ mg L}^{-1}$ de glicina, $30,0\text{ g L}^{-1}$ de sacarose, $1,0\text{ g L}^{-1}$ de glicose e $2,0\text{ g L}^{-1}$ de *Phytigel*, conforme protocolo desenvolvido por Li *et al.* (1998). O pH do meio foi ajustado para $5,8 \pm 0,1$ e o mesmo foi esterilizado por autoclavagem a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 20 minutos a $1,5\text{ atm}$ de pressão.

Após inoculação dos explantes, as placas de *Petri* foram envolvidas com papel alumínio e mantidas em condição de escuro em sala de crescimento com temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, por oito semanas, passando por subcultura a cada duas semanas.

A cada duas semanas foram avaliadas as porcentagens de explantes com embriões somáticos em diferentes estágios de desenvolvimento (globular e torpedo) em diferentes partes dos explantes (base, centro e ápice) e o potencial embriogênico dos calos escurecidos por oxidação e dos não oxidados de cada tratamento.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, quando significativo, as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de significância, por meio do software estatístico R (R Development Core Team, 2012).

5.2.5 Análise anatômica de calos e embriões

Para análise anatômica foram utilizados os seguintes explantes: estaminoides recém coletados de botões florais; calos após 27 dias de cultivo em meio de multiplicação de calos (MMC); e embriões somáticos em estágio inicial de desenvolvimento, entre 5 a 14 dias no meio de desenvolvimento de embriões (MDE).

Para fixação, os explantes foram colocados em microtubos com solução de Karnovsky modificada (Karnovsky, 1965), composta por paraformaldeído 4%, glutaraldeído 2,5% e tampão cacodilato de sódio $0,05\text{ M}$ (pH 7,2), por um período de 24 h (sob vácuo durante a primeira hora), seguida de três lavagens em solução de cacodilato de sódio ($0,05\text{ M}$, pH 7,2), por um período de 1 hora (sob vácuo) nas duas primeiras lavagens e 24 h na terceira (com a primeira hora sob vácuo).

A desidratação foi feita em séries alcoólicas crescentes (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 100%) por uma hora cada (sob vácuo), exceto a série de 70% que ficou por 24 h (com a primeira hora sob vácuo).

Os explantes passaram por pré-infiltração em etanol 100% e resina (1:1) por 24 h (sob vácuo durante a primeira hora), duas imersões em resina, sendo a primeira por 6 h e a segunda 24 h (ambas com a primeira hora sob vácuo).

A infiltração em historesina (Leica, Heidelberg, Alemanha) e a polimerização foram feitas segundo as especificações do fabricante.

Posteriormente, foram feitos cortes longitudinais e transversais (3-7 μm) em micrótomo rotativo manual (Leica®, RM212RT), distendidos e aderidos em lâminas microscópicas em placa aquecida à 40 °C. As secções obtidas foram coradas com Azul de Toluidina (0,5%) para caracterização estrutural e identificação de compostos fenólicos (O'Brien *et al.*, 1964). As secções obtidas a partir do material emblocado também foram submetidas aos seguintes testes histoquímicos: Xylidine Ponceau – XP utilizado para visualização de proteínas (Vidal, 1970); Periodic Acid Schiff – PAS (O'Brien e McCully, 1981) usado para identificar polissacarídeos neutros; Lugol (Johansen, 1940) para detecção de grãos de amido; Sudan IV (Pearse, 1972) para visualização de lipídeos totais; Vermelho de Rutênio para identificação de pectinas (Johansen, 1940); Dicromato de Potássio para visualização de compostos fenólicos não estruturais. (Gabe, 1968); Calcoflúor White para identificação de β , 1-4 glucanos, como celulose e hemicelulose (Hugher e McCully, 1975), além de Azul de Anilina para detecção de calose (β , 1-3 glucanos) (Currier, 1957; Eschrich e Currier, 1964), esses dois últimos corantes sob excitação com luz ultravioleta com auxílio de filtro UV de 340-380 nm. A obtenção e análise de imagens foram realizadas via microscópio Leica DM 750 e programa Leica Application Suite EZ.

5.2.6 Regeneração de plantas a partir de embriões somáticos

Após oito semanas em MDE, embriões somáticos maduros, apresentando hipocótilo e cotilédones, passaram para a etapa de regeneração de plantas.

Os embriões maduros foram inseridos verticalmente em tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo 10 mL de meio de regeneração de plantas (MRP). O MRP foi constituído de 1/5 dos sais do meio de DKW (Driver e Kuniyuki, 1984), acrescido de 100,0 mg L⁻¹ de mio-inositol, 2,0 mg L⁻¹ de tiamina-HCL, 1,0 mg L⁻¹ de ácido nicotínico, 2,0 mg L⁻¹ de glicina, 5,0 g L⁻¹ de sacarose, 10,0 g L⁻¹ de glicose, 0,2 g L⁻¹ de nitrato de potássio (KNO₃) e 1,7 g L⁻¹ de *Phytigel*, conforme protocolo desenvolvido por Li *et al.* (1998) (Tabela 1). O pH do meio foi ajustado para 5,8 \pm 0,1 e o mesmo foi esterilizado por autoclavagem a 121 °C durante 20 minutos a 1,5 atm de pressão.

Nas primeiras duas semanas de inoculação dos embriões somáticos em MRP, a concentração de mio-inositol foi de 200,0 mg L⁻¹, seguindo sua concentração original nas subculturas seguintes.

Os embriões somáticos foram mantidos em sala de crescimento à 25 °C \pm 2 °C e fotoperíodo de 16 h de luz com intensidade de 100 $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ até obter plantas com ao menos 2 folhas expandidas e raiz desenvolvidas, passando por subcultura a cada 4 semanas. Após esse período, foi analisada a porcentagem de embriões somáticos convertidos em plantas (emissão de ambos os meristemas), que desenvolveram folhas verdes e raízes de pelo menos 3 cm. Essa porcentagem foi

obtida por meio da razão entre a quantidade de embriões somáticos convertidos em plantas e o número total de embriões maduros que foram inoculados em meio MRP, multiplicada por 100.

5.2.7 Aclimatização das plantas

As plantas de cacau obtidas com altura superior ou igual a 5 cm e pelo menos três folhas foram submetidas ao processo de aclimatização. Para tal, as plantas foram inicialmente transplantadas em copos plásticos com capacidade de 200 mL contendo uma mistura de substrato Bioplant® e areia lavada (1:1, v/v), e foram cobertas com copos plásticos com capacidade de 300 mL para manter a umidade relativa do ar elevada.

As mudas foram acondicionadas em câmara de crescimento do tipo BOD (Percival, modelo I-30NL) a $25\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ e fotoperíodo de 12 horas com luminosidade de $25\ \mu\text{mol m}^2\ \text{s}^{-1}$. Após duas semanas cobertas com copos descartáveis para manter a umidade, tiveram a base do copo “tampa” removidos para diminuir a umidade disponível, e foram mantidas por mais duas semanas nesse sistema, sendo irrigadas a cada dois dias. Após as quatro semanas na câmara de crescimento as plantas foram transferidas para uma casa de vegetação da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

6. Resultados e discussão

O processo de ES desde a coleta até a obtenção dos primeiros embriões somáticos de cacau teve duração total de quatorze semanas para todos os tratamentos. Após a inoculação, os explantes apresentaram intumescimento ainda na primeira semana em MIC. Já com duas semanas em MIC, os explantes começaram a apresentar a formação de calos (Figura 3A), que foram se desenvolvendo e se multiplicando nas quatro semanas seguintes em MMC (Figura 3B). Com quatro semanas em MDE, os primeiros embriões somáticos em estágio globular apareceram (Figura 3C), e nas quatro semanas seguintes em MDE, eles se desenvolveram até a fase torpedo, enquanto novos embriões globulares surgiram (Figura 3D). No meio MDE, o desenvolvimento de calos se estabilizou e alguns apresentaram oxidação de seus tecidos.

Os explantes que apresentam alta taxa de calogênese para a ES de cacau são pétalas e estaminoides (Li *et al.*, 1998; Minyaka *et al.*, 2009, Boutchouang *et al.*, 2016), porém em um experimento de Teixeira *et al.* (2002) o estaminoide mostrou melhor resposta embriogênica, logo, nesse estudo os estaminoides foram os escolhidos. Os calos não foram separados dos explantes devido à forte fixação entre eles, o que inviabilizada sua separação sem que quebrasse o explante em pedaços ainda fixos aos calos. No entanto, diferentes pesquisas de ES em cacau também mantiveram os calos fixos aos explantes e obtiveram bons resultados (Li *et al.*, 1998; Ajijah *et al.*, 2016; Bustamine e Werbrouck, 2017; Kouassi *et al.*, 2017; Ramírez *et al.*, 2018).

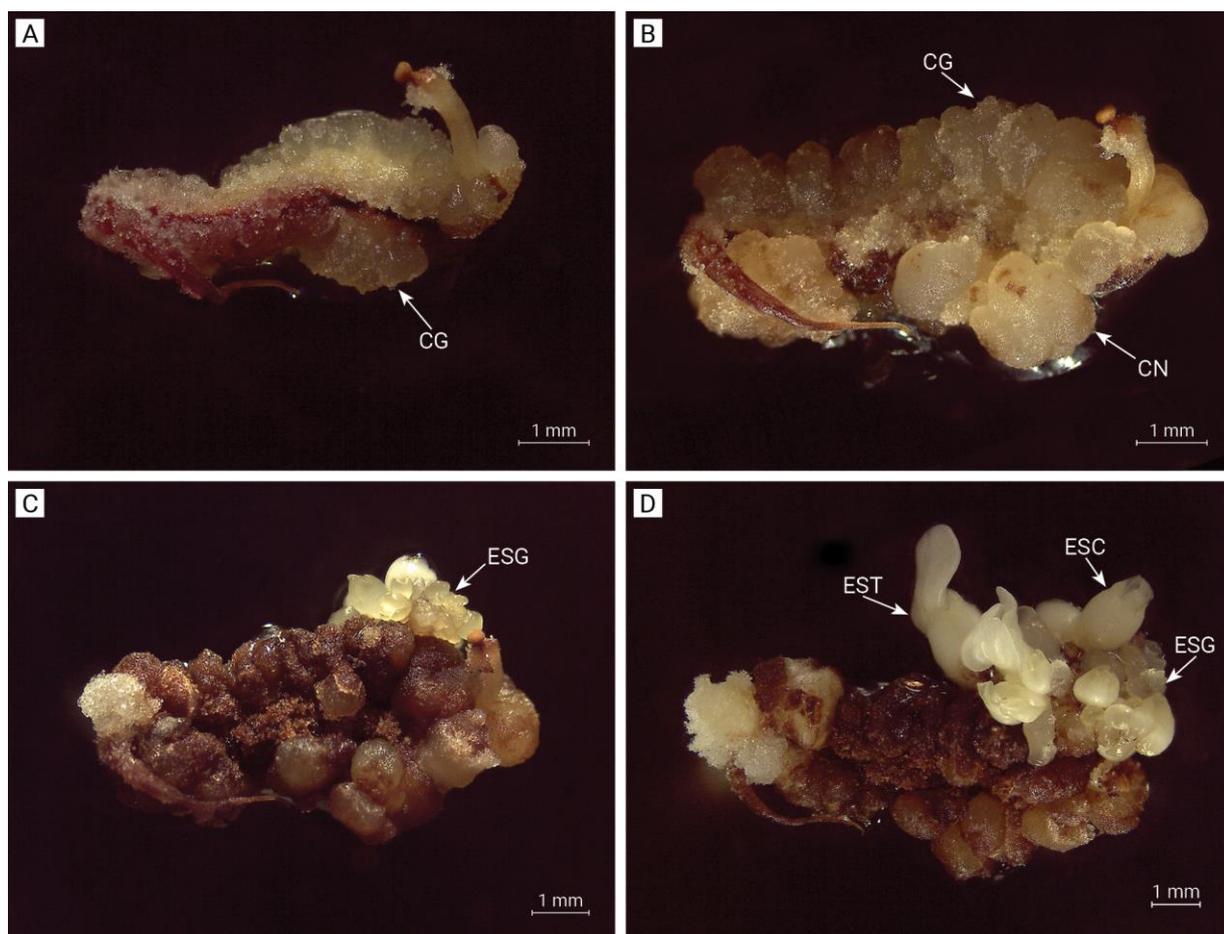


Figura 3. Embriogênese somática indireta em estaminoide de *Theobroma cacao* L. genótipo '752' no tratamento controle. (A) Explante em meio de indução de calos (MIC) apresentando intumescimento dos tecidos e desenvolvimento de calos granulares (CG). (B) Explante em meio de multiplicação de calos (MMC) com formação de calos granulares (CG).

e calos nodulares (CN). (C) Explante há duas semanas em meio de desenvolvimento de embriões (MDE) com embriões somáticos em fase globular (ESG); notar escurecimento do explante. (D) Explante há quatro semanas em meio de desenvolvimento de embriões (MDE), após a calogênese, apresentando embriões nas fases torpedo (EST), cordiforme (ESC) e globular (ESG) surgindo de calos com oxidação; notar assincronia do processo (presença de embriões somáticos também em estágio globular) e escurecimento evidente do explante.

Um dos elementos frequentemente associados à recalcitrância *in vitro* é a elevada concentração de compostos fenólicos e a subsequente oxidação dessas substâncias. O cacau, como a maioria das árvores tropicais, apresenta grandes quantidades de compostos polifenólicos (Griffiths, 1958; Kim & Keeney, 1983). Diferente dos resultados negativos quanto a oxidação em ES de cacau, mostrados por Pancaningtyas (2015b), embora tenha sido observada oxidação dos explantes (Figura 2 C e D; Figura 5 A), ela não afetou a produção de embriões somáticos, como também foi observado por Garcia *et al.* (2016) Guillou *et al.* (2018), inclusive, os tratamentos com maior taxa de formação de embriões também foram os com maior taxa de oxidação.

A assincronia na diferenciação de embriões somáticos é uma característica comum a essa rota de micropropagação, com diferentes relatos da sua ocorrência, inclusive, em cacau (Pancaningtyas, 2015a; Bustami e Werbrouck, 2017). O desafio do assincronismo na ES ainda é um desafio de grande importância (Zhang *et al.*, 2013). Estudos prévios evidenciaram que o ácido abscísico (ABA) desempenha um papel fundamental na regulação da sincronia em embriões, induzindo a desdiferenciação celular e inibindo sua proliferação, controlando assim a morfogênese (Gutmann *et al.* 1996). Porém, pesquisas ainda precisam ser feitas para que este problema seja melhor entendido e solucionado.

Foram observadas diferentes anormalidades nos embriões transferidos do meio MDE para o MRP, na etapa de regeneração de plantas, em todos os tratamentos. Dentre as observações, destacam-se anomalias como coloração rosada em folhas, fusão de folhas, deficiência de clorofila, folhas com aspecto anormal, pequenas, enrugadas, ausência no desenvolvimento ou má formação de raiz e ou engrossadas, somente o desenvolvimento raízes, embriogênese secundária, estagnação no desenvolvimento do embrião e oxidação total do embrião após o início do desenvolvimento foliar.

Algumas amostras de plantas (seis plantas normais, provenientes dos meios de cultura controle e com cinetina a 0,5 mg L⁻¹, três com anormalidade de fusão de embriões e outras três apresentando deficiência de clorofila em algumas folhas) foram transferidas para o substrato e deixadas em aclimatização e todas as plantas se adaptaram bem, mostrando desenvolvimento satisfatório durante o acompanhamento na câmara de crescimento tipo BOD e em seguida na casa de vegetação. Todas essas etapas serão detalhadas em seguida.

6.1 Meio de indução de calos

Foram identificados e diferenciados dois tipos de calos durante a execução do experimento. Um dos tipos, que foi denominado de granular, tem formato de grânulos ou pequenos filamentos, rígidos, fixos ao explante, com coloração variando entre branco translúcido a amarelado translúcido, e medem até $\pm 0,1$ mm (Figura 4A). O outro tipo de calo identificado foi denominado de nodular, tem estrutura nodular, rígida (compacta), às vezes amontoados em grupos, com superfície rugosa, com coloração variando entre branco translúcido a amarelo translúcido e tamanho de até $\pm 1,5$ mm

(Figura 4B). Calos com padrões morfológicos variados também foram relatadas em outros estudos em cacau (Kononowicz *et al.*, 1984; Bustami e Werbrouck, 2017; Ajjah *et al.*, 2016; Garcia *et al.*, 2016; Ramírez *et al.*, 2018; Guillou *et al.*, 2018; Norasekin *et al.*, 2020), porém, percebe-se uma falta de padronização na classificação da variedade de calos entre os estudos.

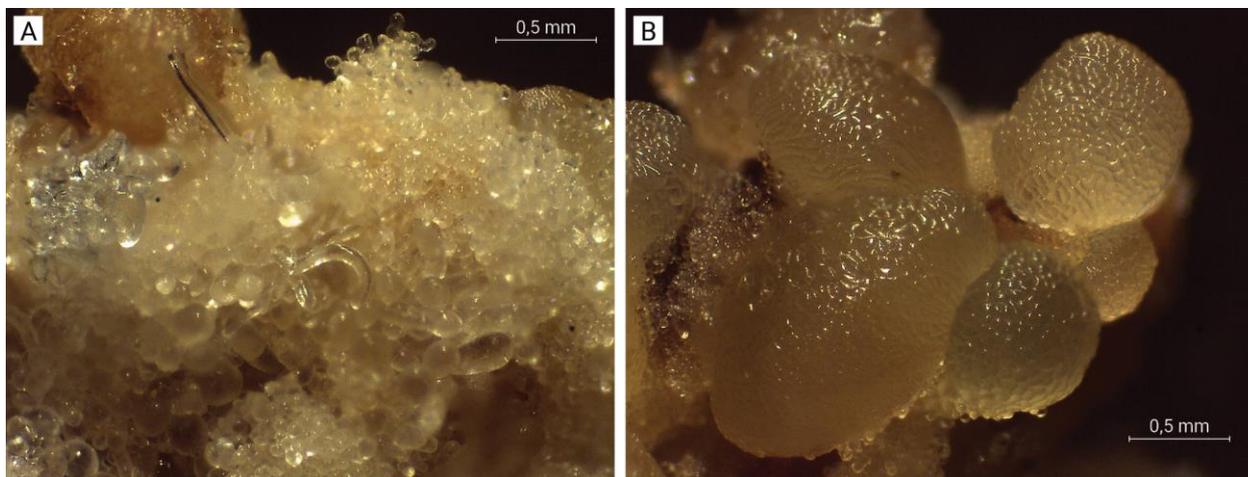


Figura 4. Estruturas calogênicas desenvolvidas em estaminoides de *Theobroma cacao* L. em meio de multiplicação de calos (MMC) após 4 semanas de cultivo. (A) Calos granulares. (B) Calos nodulares.

Nos três genótipos, a calogênese se iniciou na base e em áreas feridas dos estaminoides. Os primeiros calos a surgirem nos explantes inoculados em meio de indução de calos (MIC) foram os granulares, que surgiram logo após o intumescimento dos explantes. Em seguida, surgiram os calos nodulares no mesmo explante.

Com relação à taxa de formação de calos granulares nos explantes, não se verificaram diferenças estatísticas entre os tratamentos testados, com valor médio de 98,9% (Tabela 2). Já com relação ao percentual de calos nodulares, diferenças estatísticas foram observadas somente entre os genótipos avaliados. Os genótipos '752' e '754' apresentaram maiores percentuais de formação de calos nodulares, 71,6% e 80,4%, respectivamente, valores estatisticamente iguais (Tabela 5). Já o genótipo '755', exibiu porcentual inferior em relação aos demais genótipos (51,8%). Calos semelhantes aos aqui classificados como nodulares e granulares também foram observados em cacau por outros autores, e foram considerados embriogênicos e não embriogênicos, respectivamente (Rúa *et al.*, 2016; Ajjah *et al.*, 2016; Ramírez *et al.*, 2018; Guillou *et al.*, 2018), porém o estudo anatômico mostrado mais à frente revelou que ambos têm potencial embriogênico. Dentre os fatores que influenciam a formação de calos em diferentes espécies de plantas, destaca-se a diferença de genótipos. Dentro da mesma espécie vegetal, diferentes genótipos podem apresentar predisposições variadas à formação de calos, tornando necessária a adaptação dos protocolos conforme o material genético em questão, e então criando um protocolo que abranja a maioria dos genótipos de interesse comercial para produção em larga escala.

Para este experimento além dos testes com citocinica e meta-Topolina, os meios de indução e multiplicação de calos (MIC e MMC) foram suplementados com o regulador de crescimento 2,4-D, que é uma auxina considerada eficiente na formação de calos em ES como reportado por Li, *et al.* (1998). Nogueira e colaboradores (2007) avaliaram o efeito de diferentes concentrações da

auxina 2,4-D e a sua interação com citocininas na calogênese em Murici-pequeno. Os resultados demonstraram que na ausência de 2,4-D não ocorre formação de calo em explantes foliares, e adição de BAP ou TDZ não influencia o processo de calogênese.

6.1.1 Formação de calos por regiões do explante (base, centro, ápice) em MIC

A taxa de formação de calos granulares, especificamente nas regiões basal e apical dos explantes, não foi influenciada pelos tratamentos avaliados, com valores médios de 97,9% e 35,9%, respectivamente (Tabela 2). Todavia, o percentual de formação desse tipo calo na região central do explante foi influenciada pelo genótipo (Tabela 3). A região central dos explantes de '752' foi mais responsiva, comparativamente à mesma região dos explantes oriundos dos demais genótipos, com uma taxa de 76,8% de formação de calos granulares. Em '754' e '755', verificou-se taxas estatisticamente iguais de formação de calos granulares nessa região do explante (54,8% e 55,74%, respectivamente).

Tabela 2. Taxa de formação (%) de calos granulares por tratamento e por região do explante (estaminoide), durante a indução da embriogênese somática de cacau (*Theobroma cacao* L.).

Tratamento	Taxa de formação de calos granulares na fase de indução (%)				
	Basal	Central	Apical	Explante	
Controle	98,00	63,33	33,33	99,33	
Cinetina	(1,0 mg L ⁻¹)	98,61	58,33	39,58	98,61
	(0,5 mg L ⁻¹)	98,00	75,33	50,00	100,00
Meta- Topolina	(1,0 mg L ⁻¹)	96,00	51,33	28,00	97,33
	(0,5 mg L ⁻¹)	98,67	64,00	28,67	99,33
Média	97,86	62,47	35,92	98,92	

Tabela 3. Taxa de formação (%) de calos granulares por genótipo e por região do explante (estaminoide), durante a indução da embriogênese somática de cacau (*Theobroma cacao* L.).

Genótipo	Taxa de formação de calos granulares na fase de indução (%)			
	Basal	Central	Apical	Explante
'752'	98,40	76,80	40,40	98,40
'754'	98,80	54,80	34,40	99,60
'755'	96,31	55,74	32,79	98,77
Média	97,84	62,45	35,86	98,92

Assim como observado para os calos granulares, a formação de calos nodulares em relação a região basal do explante não foi influenciada pelos meios de cultivo, mas sim, pelo genótipo (Tabelas 4 e 5). Os dados revelaram que a região basal do genótipo '754' (80,0%) foi mais responsiva comparativamente a essa mesma região nos genótipos '752' (68,4%) e '755' (50,0%). Esses dois

últimos genótipos foram estatisticamente inferiores ao genótipo '754', e estatisticamente diferentes entre si. Similarmente, o meio de cultivo não influenciou o número de estruturas nodulares formadas na região basal dos explantes. Todavia, a análise dos genótipos revelou que em '754' exibiu um maior número, em termos estatísticos, de estruturas nodulares observadas nessa região do explante (valor médio de 6,6 estruturas nodulares por explante), quando comparado aos demais (3,5 e 2,1 para '752' e '755', respectivamente).

Tabela 4. Taxa de formação (%) de **calos nodulares** por tratamento e por região do explante (estaminoide), durante a indução da embriogênese somática de cacau (*Theobroma cacao* L.).

Tratamento	Taxa de formação de calos nodulares na fase de indução (%)				
	Basal	Central	Apical	Explante	
Controle	64,00	12,67	2,67	64,00	
Cinetina	(1,0 mg L ⁻¹)	67,36	22,22	5,56	71,53
	(0,5 mg L ⁻¹)	60,00	17,33	2,67	60,67
Meta-Topolina	(1,0 mg L ⁻¹)	63,33	21,33	6,00	64,67
	(0,5 mg L ⁻¹)	76,67	30,67	3,33	79,33
Média	66,27	20,84	4,04	68,04	

Tabela 5. Taxa de formação (%) de **calos nodulares** por genótipo e por região do explante (estaminoide), durante a indução da embriogênese somática de cacau (*Theobroma cacao* L.).

Genótipo	Taxa de formação de calos nodulares na fase de indução (%)			
	Basal	Central	Apical	Explante
'752'	68,40	23,60	4,40	71,60
'754'	80,00	26,40	4,80	80,40
'755'	50,00	12,30	2,87	51,64
Média	66,13	20,77	4,02	67,88

Já a responsividade da região central do explante com relação a formação de calo nodular foi influenciada pela interação dos fatores composição do meio de cultivo e genótipo. Conforme o desdobramento dos meios de cultivo dentro dos genótipos, o tratamento 0,5 mg de meta-Topolina proporcionou uma maior taxa formação de calos nodulares na região central dos explantes do genótipo '755' (36%). Já, a análise dos genótipos dentro de cada meio de cultivo revelou que o tratamento controle proporcionou uma maior taxa de formação de calo nodular na região central de explantes do genótipo '752' (34%), enquanto o tratamento 0,5 mg de cinetina proporcionou uma maior taxa de formação desse tipo de calo na região central de explantes do genótipo '754' (40%) (Tabela 6).

Tabela 6. Taxa de formação (%) de calos nodulares na região central do explante (estaminoide), entre diferentes meios de cultivo e genótipos, durante a indução da embriogênese somática de cacau (*Theobroma cacao* L.).

Meios de cultivo		Genótipos		
		'752'	'754'	'755'
Controle (0,0 mg L ⁻¹)		34,0 ± 9,8 aA	4,0 ± 2,4 aB	0,0 ± 0,0 bB
Cinetina	(1,0 mg L ⁻¹)	26,0 ± 10,3 aA	26,0 ± 15,4 aA	14,0 ± 9,8 bA
	(0,5 mg L ⁻¹)	12,0 ± 7,3 aB	40,0 ± 15,8 aA	0,0 ± 0,0 bB
Meta-Topolina	(1,0 mg L ⁻¹)	12,0 ± 9,7 aA	40,0 ± 10,5 aA	12,0 ± 7,3 bA
	(0,5 mg L ⁻¹)	34,0 ± 11,2 aA	22,0 ± 5,8 aA	36,0 ± 4,0 aA

Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os meios de cultivo (nas colunas, em cada genótipo) e letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os genótipos (nas linhas, dentro de cada meio de cultivo), pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. Barras representam o erro padrão.

A taxa de formação de calos nodulares especificamente na região apical dos explantes não foi influenciada pelos tratamentos testados, e foi notavelmente mais baixa com relação ao observado nas outras regiões do explante, com valor médio de 4%, independentemente dos genótipos analisados.

O número médio de estruturas nodulares verificadas nas regiões apical e mediana dos explantes não foi influenciado pelos tratamentos testados, com valores médios de 0,1 e 0,7 estruturas nodulares por explante, respectivamente.

Os genótipos '752' e '754' são mais responsivos à indução de calos (ambos com potencial embriogênico, analisados anatomicamente no tópico 6.6), e, de modo geral, que a região basal do estaminoide é mais responsiva, em termos calogênicos, que as demais regiões, o que corrobora com o verificado por Teixeira e colaboradores (2002), que trabalharam com os mesmos genótipos estudados nessa pesquisa, e perceberam que a região basal é a mais expressiva, principalmente se se manter parte do receptáculo junto ao estaminóide, como explante. De acordo com os resultados histoquímicos, mostrado mais a frente, a maior concentração de mucilagem e a menor concentração de compostos fenólicos na região basal do explante pode ter influência na maior responsividade desta região. Outra hipótese é de que essa região tem maior acesso aos hormônios vegetais oriundos da planta por estar mais perto da base da flor.

6.2 Meio de multiplicação de calos

As taxas de formação de calos granulares e nodulares mantiveram-se elevadas durante o cultivo em meio de multiplicação, não sendo constatadas diferenças estatísticas entre os tratamentos testados (tanto em relação aos meios de cultivo quanto aos genótipos), com valor médio de 98,9% de calos granulares e 92,3% de calos nodulares (Tabelas 7 e 8). O que mostra que o protocolo de multiplicação foi efetivo em todos os tratamentos.

Os calos granulares apresentaram maior taxa de formação do que os nodulares, o que condiz com sua forma de manifestação onde seu surgimento ocorre somente após o desenvolvimento dos calos granulares.

Tabela 7. Taxa de formação (%) de **calos granulares** por tratamento e por região do explante (estaminoide), durante a fase de multiplicação de calos de cacau (*Theobroma cacao* L.).

Tratamento	Taxa de formação de calos granulares na fase de multiplicação (%)				
	Basal	Central	Apical	Explante	
Controle	99,33	73,33	44,00	99,33	
Cinetina	(1,0 mg L ⁻¹)	98,52	72,59	47,41	100,00
	(0,5 mg L ⁻¹)	99,33	80,00	55,33	100,00
Meta-Topolina	(1,0 mg L ⁻¹)	97,33	54,00	33,33	98,67
	(0,5 mg L ⁻¹)	96,67	69,33	30,00	96,67
Média	98,24	69,85	42,01	98,93	

Tabela 8. Taxa de formação (%) de **calos nodulares** por tratamento e por região do explante (estaminoide), durante a fase de multiplicação de calos de cacau (*Theobroma cacao* L.).

Tratamento	Taxa de formação de calos nodulares na fase de multiplicação (%)				
	Basal	Central	Apical	Explante	
Controle	83,33	46,73	22,00	88,00	
Cinetina	(1,0 mg L ⁻¹)	90,37	54,81	20,74	94,81
	(0,5 mg L ⁻¹)	92,67	60,67	28,00	94,00
Meta-Topolina	(1,0 mg L ⁻¹)	87,33	30,60	14,67	88,67
	(0,5 mg L ⁻¹)	93,33	50,53	13,33	96,00
Média	89,41	48,67	19,75	92,30	

6.2.1 Formação de calos por regiões do explante (base, centro, ápice) em MMC

Quanto aos percentuais de calos granulares e nodulares observados na base dos explantes, não foram verificadas diferenças estatísticas entre os meios de cultivo e os genótipos testados, com valores médios de 98% e 92%, respectivamente (Tabelas 7, 8, 9 e 10). Contudo, o meio de cultivo influenciou o número médio de estruturas nodulares formadas na região basal dos explantes, conforme observado na Figura 5. Os meios de cultivo suplementados com Cinetina (0,5 e 1,0 mg) e com 0,5 mg de Meta-Topolina proporcionaram maior número médio de estruturas nodulares na região basal do estaminoide, independentemente do genótipo avaliado. Adicionalmente, em '754', verificou-se maior taxa de formação de calos nodulares na região basal do estaminoide (7,4%), valor estatisticamente superior ao observado nos genótipos '752' (5,0%) e '755' (5,0%). Em suma, o genótipo '754' na região basal apresentou superioridade em relação à porcentagem de calos.

Tabela 9. Taxa de formação (%) de **calos granulares** por genótipo e por região do explante (estaminoide), durante a fase de multiplicação de calos de cacau (*Theobroma cacao* L.).

Genótipo	Taxa de formação de calos granulares na fase de multiplicação (%)			
	Basal	Central	Apical	Explante
'752'	98,80	80,80	46,00	98,80
'754'	99,20	68,40	37,60	100,00
'755'	96,60	59,57	42,13	97,87
Média	98,20	69,59	41,91	98,89

Tabela 10. Taxa de formação (%) de **calos nodulares** por genótipo e por região do explante (estaminoide), durante a fase de multiplicação de calos de cacau (*Theobroma cacao* L.).

Genótipo	Taxa de formação de calos nodulares na fase de multiplicação (%)			
	Basal	Central	Apical	Explante
'752'	90,00	56,80	21,20	91,60
'754'	94,80	54,80	21,60	97,60
'755'	82,98	33,11	16,17	87,23
Média	89,26	48,24	19,66	92,14

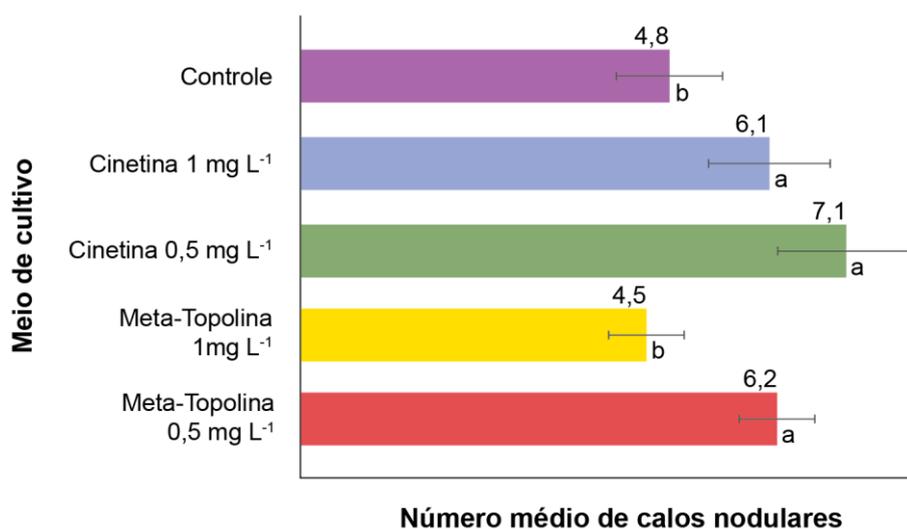


Figura 5. Influência do meio de cultivo na quantidade de calos nodulares formados na região basal do explante (estaminoide), durante a fase de multiplicação de calos de cacau (*Theobroma cacao* L.). Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os meios de cultivo, pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. Barras representam o erro padrão.

O percentual de calos granulares observados na região mediana do explante não foi influenciado pelos tratamentos testados, com valor médio de 69,85% (Tabela 7). O percentual de calos nodulares observados nessa região do estaminoide, embora não tenha sido influenciado pelo meio de cultivo, foi influenciado pelo genótipo, com taxas de formação estatisticamente maiores observadas nos genótipos '752' (56,8%) e '754' (54,8%), enquanto no genótipo '755' observaram-

se 33,1% de formação desse calo na região central do explante (Tabela 10). O número de estruturas nodulares observadas nessa região do explante não foi influenciado pelos tratamentos avaliados, com valor médio de 2,0 estruturas nodulares na região central por explante.

Os percentuais de formação de calos granulares e nodulares observados na região apical dos estaminoides não foram influenciados pelos tratamentos e genótipos testados (Tabelas 7 e 8).

Diferentemente do observado na fase de indução, nesta etapa do cultivo, a taxa média de oxidação dos calos foi baixa, de 4%, sem diferenças entre os tratamentos testados.

6.3 Meio de desenvolvimento de embriões somáticos

Os embriões somáticos apresentaram-se como estruturas rígidas, branco leitoso a branco translúcido (diferentes embriões em mesma fase de desenvolvimento, como mostra a Figura 6B), podendo surgir individualmente ou em grupos, e quando em fase torpedo, destacavam-se do tecido calogênico de origem com facilidade (Figura 6).

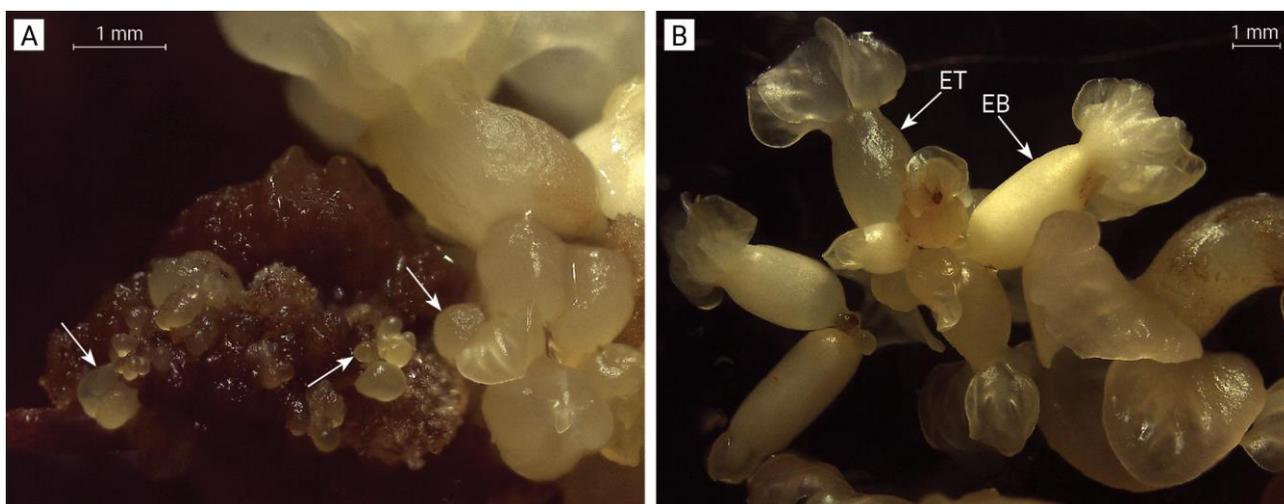


Figura 6. Embriões de *Theobroma cacao* L. oriundos de embriogênese somática. (A) Embriões somáticos se desenvolvendo em tecido escurecido (setas). (B) Aglomerado de embriões somáticos destacados do tecido calogênico, em diferentes estágios de desenvolvimento, e com colorações distintas. Embrião somático translúcido (ET); Embrião somático branco (EB).

A taxa de formação de embriões somáticos foi influenciada pelos meios de cultivo iniciais do processo de ES (meios indutores de calos) e genótipos isoladamente. Os explantes cultivados durante a fase de indução de calos no meio controle e no meio com 1 mg de Cinetina apresentaram 29,2% e 20,0% de formação de embriões somáticos diferenciados, respectivamente, valores estatisticamente iguais (Figura 7). Com relação aos genótipos, o '754' destacou-se em termos estatísticos, com uma taxa de 21% de formação de embriões somáticos. Já os demais genótipos apresentaram uma taxa de 7,5% (cada) de formação de embriões somáticos.

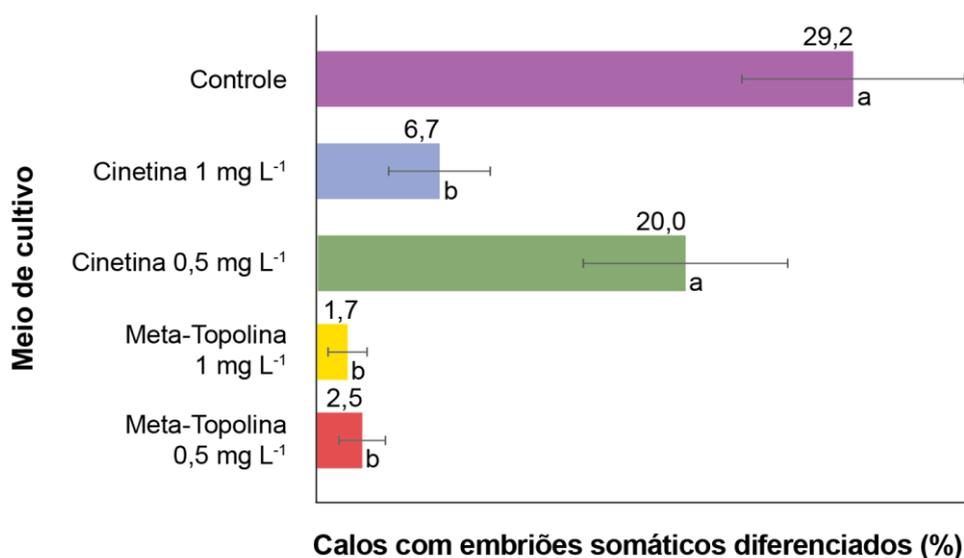


Figura 7. Influência do meio de cultivo de origem (meio de indução de calos e meio de multiplicação de calos) no percentual de calos com embriões somáticos diferenciados, durante a embriogênese somática de *Theobroma cacao* L., a partir de estaminoides. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os meios de cultivo, pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. Barras representam o erro padrão.

Os explantes oriundos do tratamento controle exibiram um maior número de embriões somáticos (33,08), conforme observado na (Figura 8). Contudo, não foram verificadas diferenças entre os genótipos com relação a essa variável, com valor médio de 9,0 embriões somáticos por explante. Lembrando que os explantes oriundos do meio controle apresentaram formação de embriões somáticos porque o meio corresponde ao produzido por Li e colaboradores (1998) contém a auxina 2,4-D, enquanto os demais meios apresentam e as citocininas cinetina ou meta-Topolina adicionadas. Dessa forma, os resultados ratificam a excelência do meio originalmente estabelecido (Li *et al.* 1998), não sendo necessário, portanto, suplementação com as citocininas supracitadas.

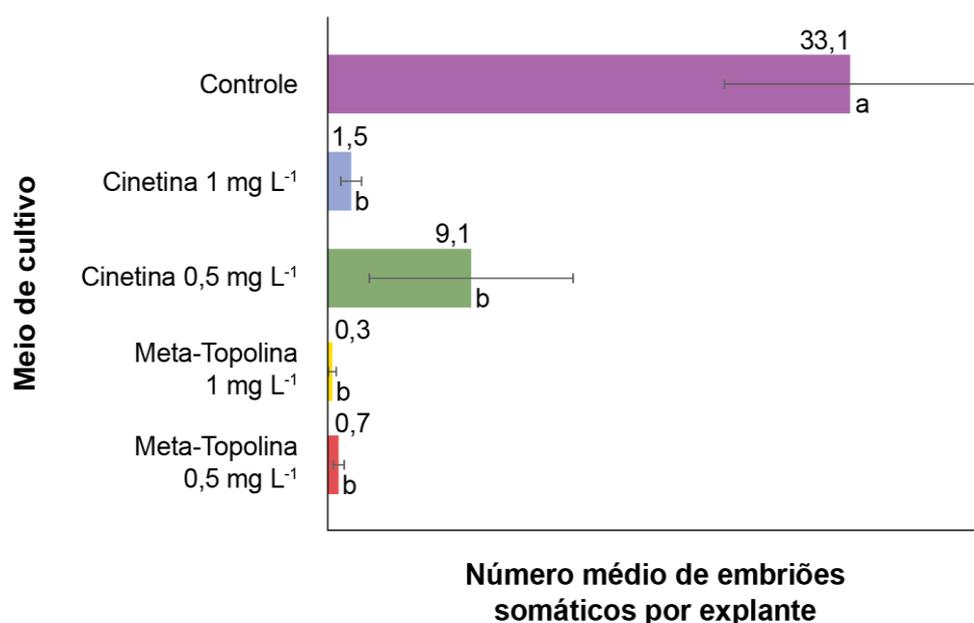


Figura 8. Influência do meio de cultivo de origem (meio de indução de calos e meio de multiplicação de calos) no número médio de embriões somáticos globulares, durante a embriogênese somática de *Theobroma cacao* L., a partir de estaminoides. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os meios de cultivo, pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. Barras representam o erro padrão.

Apesar de relatos de efeitos positivos consequentes do seu uso de cinetina e meta-Topolina na indução da embriogênese somática (ES) em outras espécies, como em *coffea arabica* (café) - 2 mg L⁻¹ cinetina (Maciel *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2009), *Diospyros kaki* (caqui) - 2 mg L⁻¹ cinetina (Carvalho *et al.*, 2004), *Saccharum* spp. (cana-de-açúcar) - 0,2 mg L⁻¹ cinetina (Menezes *et al.*, 2012), e *Pinus pinaster* 25 µmol L⁻¹ de meta-Topolina (De Diego *et al.*, 2008), o seu uso não pareceu favorável na ES de *Theobroma cacao* L. nesse protocolo. É importante notar que a eficácia e os efeitos desses reguladores de crescimento podem variar dependendo da espécie vegetal e das condições específicas do ambiente de cultivo.

Na cultura de tecidos, as citocininas são geralmente empregadas para estimular a formação de brotos adventícios a partir de calos, ou para induzir a brotação lateral a partir de gemas axilares ou apicais (BARRUETO CID *et al.*, 1994). Entretanto, podem elas também inibem a indução de raízes em plântulas, retardam a senescência foliar, e diminuem a dominância apical. Já as auxinas, na cultura de tecidos, são frequentemente utilizadas para induzir a formação de calos a partir de um explante, e promover o enraizamento a partir de brotos. O balanço entre esses reguladores de crescimento para cada espécie é o foco de grande parte dos estudos de otimização de protocolos de ES (Barrueto Cid, 1994).

Foi observado o desenvolvimento de raízes em alguns explantes, porém não houve o desenvolvimento de parte aérea junto às raízes, elas cresceram nos calos e com o tempo oxidaram, esses dados também foram analisados. Quanto à taxa de formação de raízes, não foram constatadas diferenças estatísticas entre os tratamentos testados, com valor médio de 27,1% de formação de raízes. Contudo, com relação ao número médio de raízes foi constatada interação entre os fatores meio de cultivo original e genótipo, a qual foi desdobrada (Tabela 11). De acordo com o desdobramento da interação, considerando os tratamentos dentro do genótipo, explantes cultivados na fase de indução em meio suplementado com 1 mg de Meta-Topolina exibiram um maior número médio de raízes no genótipo 2 (20,5), enquanto que, aqueles oriundos do tratamento controle e 0,5 mg de Cinetina apresentaram um maior número de raízes no genótipo 3, 17,8 e 12,5, respectivamente. A comparação dos genótipos considerando cada meio de cultivo revelou que os explantes do genótipo '755' advindos do tratamento controle exibiram um maior número de desenvolvimento de raízes.

Tabela 11. Influência do meio de indução e multiplicação de calos, e de diferentes genótipos no número médio de raízes a partir de calos de ES em estaminoides de *Theobroma cacao* L.

Meios de cultivo	Genótipos		
	'752'	'754'	'755'
Controle (0,0 mg L ⁻¹)	4,75 ± 4,1 aB	1,75 ± 0,8 bB	17,8 ± 8,5 aA
Cinetina	(1,0 mg L ⁻¹)	2,25 ± 0,9 aA	8,8 ± 3,4 bA
	(0,5 mg L ⁻¹)	4,75 ± 3,3 aA	4,0 ± 1,8 bA
Meta-Topolina	(1,0 mg L ⁻¹)	4,25 ± 1,8 aA	20,5 ± 4,4 aA
	(0,5 mg L ⁻¹)	0,75 ± 0,3 aA	5,3 ± 2,7 bA

Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os meios de cultivo em cada genótipo e letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os genótipos, dentro de cada meio de cultivo, pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. Barras representam o erro padrão.

Durante a fase de desenvolvimento de embriões somáticos, verificou-se alta taxa de oxidação dos explantes, sobretudo, daqueles oriundos do tratamento controle (50,8%) (Figura 9). Adicionalmente, a taxa de oxidação dos explantes variou em termos estatísticos entre os genótipos, com destaque para o genótipo '754', com taxa de oxidação de 36,5%. Os genótipos 1 e 3 apresentaram 15,0% e 20,4% de oxidação, respectivamente, considerados estatisticamente iguais entre si. Enfatiza-se que a ocorrência de oxidação não foi um fator limitante à ES, inclusive, o genótipo mais responsivo apresentou maior taxa de oxidação. Verificou-se que embriões se desenvolveram mesmo em tecido oxidado (Figura 6B), o que mostra que o tecido interno estava vivo e se desenvolvendo, e que o tecido externo oxidado talvez tenha servido como uma barreira de proteção ao estresse causado pelo meio.

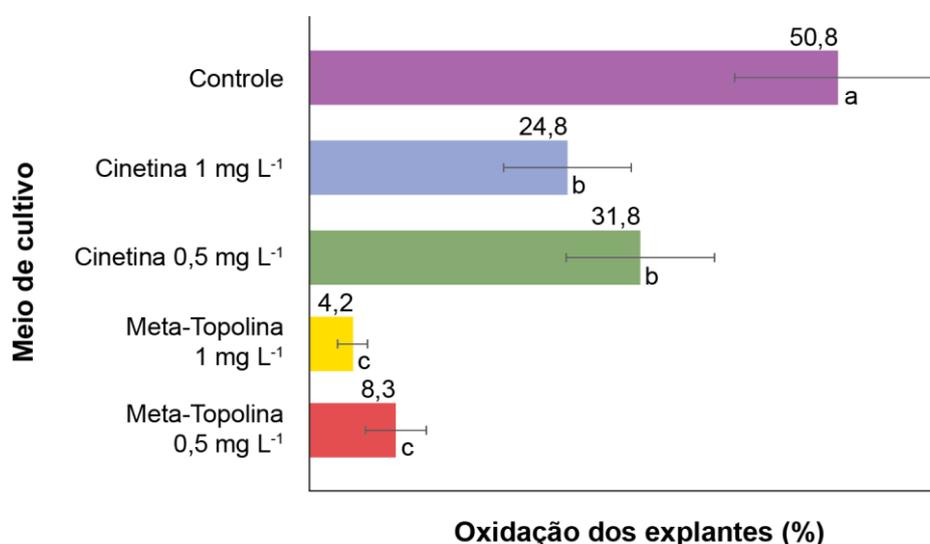


Figura 9. Influência do meio de cultivo de origem (meio de indução de calos e meio de multiplicação de calos) no percentual de oxidação dos explantes durante o cultivo em meio de desenvolvimento de embriões somáticos de *Theobroma cacao* L. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os meios de cultivo em cada genótipo e letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os genótipos, dentro de cada meio de cultivo, pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. Barras representam o erro padrão.

6.4 Regeneração de plantas

A partir de oito semanas em MDE, embriões somáticos quando em estágio maduro (apresentando hipocótilo e cotilédones), foram transferidos para a etapa de regeneração de plantas, em tubos de ensaio com meio de regeneração de plantas (MRP), por duas semanas.

Com quatro semanas de inoculação foi observada a presença de características de anormalidade em todos os tratamentos (Figura 10), como: folhas apresentando coloração rosada (Figura 10B, 10F e 10I), folhas fusionadas (Figuras 10C e 10G), folhas com deficiência em clorofila (Figuras 10D e 10E), folhas com aspecto anormal, pequenas, enrugadas e ou engrossadas (Figuras 10D a 10F e 10H, a 10K), ausência no desenvolvimento ou má formação de raiz (Figuras 10E a 10G e 10I a 10K), somente o desenvolvimento de raízes (Figura 10M), embriogênese secundária (Figuras 10J e 10K), estagnação no desenvolvimento do embrião (Figura 10L), e oxidação total do embrião após o início do desenvolvimento foliar (Figura 10N).

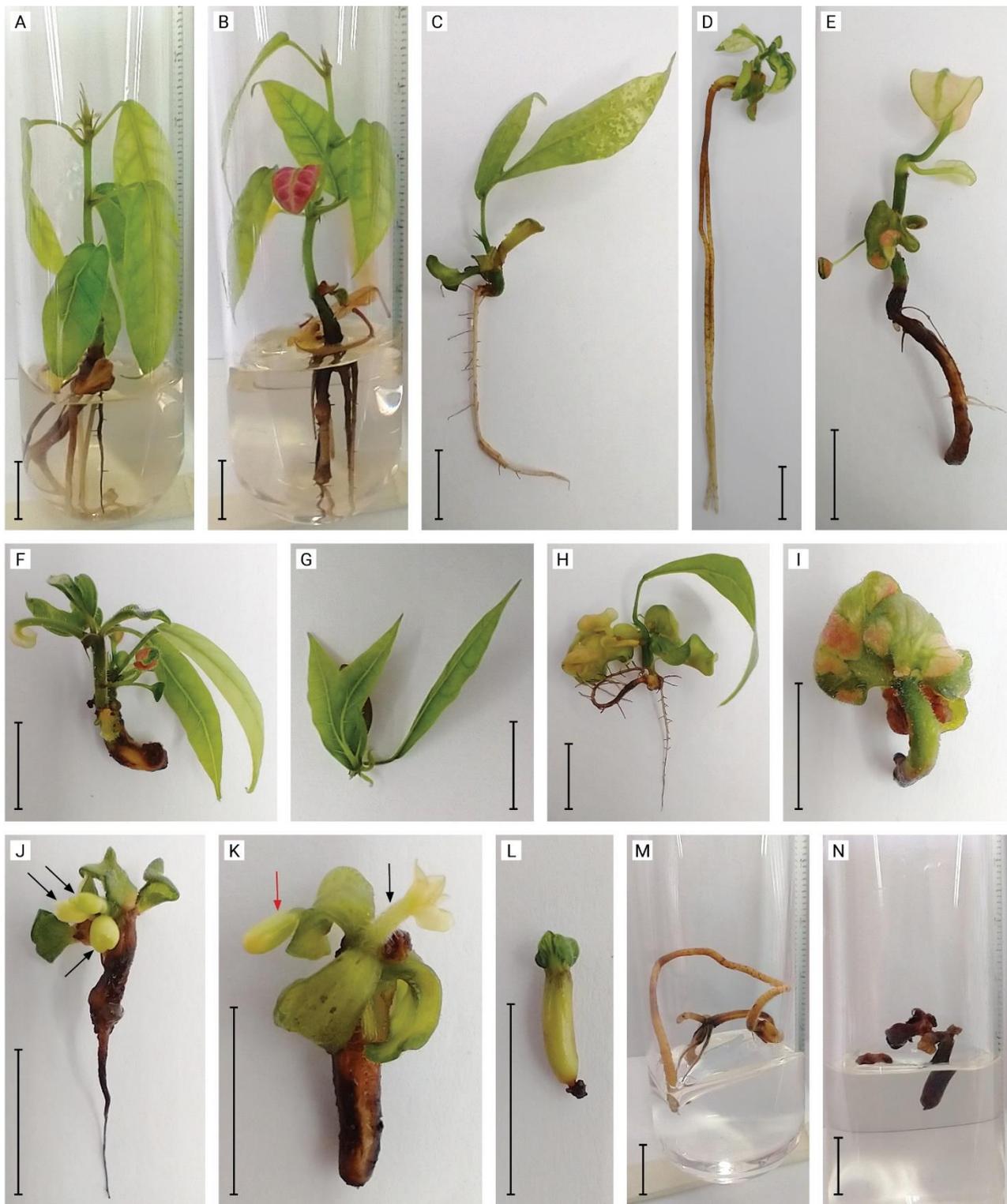


Figura 10. Aspecto dos embriões após quatro semanas em meio de regeneração de plantas (MRP) apresentando características de anormalidade. (A) Planta de aspecto normal. (B) Planta com folha de coloração rosada. (C) Planta com folhas fusionadas. (D) Planta com folhas pequenas e com deficiência em clorofila. (E) Planta com folhas anormais e deficiência em clorofila. (F) Planta com má formação de raízes e folhas anormais pequenas junto a folhas normais. (G) Planta com folhas fusionadas e má formação de raiz. (H) Planta com folhas normais junto a folhas anormais grossas, enrugadas e com deficiência em clorofila. (I) Planta apresentando ausência do desenvolvimento da raiz e folhas com aspecto anormal, grossas, enrugadas e de coloração rosada. (J e K) Plantas apresentando embriogênese secundária; setas pretas indicando ES provinda de meristema apical; seta vermelha indicando ES foliar. (L) Embrião com seu desenvolvimento estagnado. (M) Desenvolvimento somente radicular. (N) Oxidação total do embrião após o início do desenvolvimento foliar. Barras: 1 cm.

Dos 688 embriões separados dos calos, independente do tratamento, somente 123 (17,9%) foram convertidos em plantas completas (com emissão de ambos os meristemas), desenvolvendo folhas verdes e raízes de pelo menos 3 cm, sem diferença significativa entre os genótipos, que desenvolveram em média de 42 plantas completas cada.

A maior parte dos embriões (64,5%) desenvolveu somente parte aérea, sem diferença significativa entre os genótipos, com média de 21,7% entre eles, e 0,7% somente raiz. Do total, 16,9% não chegou a se desenvolver, dentre os quais 58,6% sofreram oxidação, 25,9% ficaram estagnados como embriões, os demais 6,9% foram descartados por contaminação.

Dos embriões convertidos em plantas, houve diferença significativa entre os meios de cultura de origem, sendo 65,8% provindos do meio controle e 22,4% do meio com cinetina a 0,5 mg L⁻¹. Os números de plantas podem ser vistos na Figura 11.

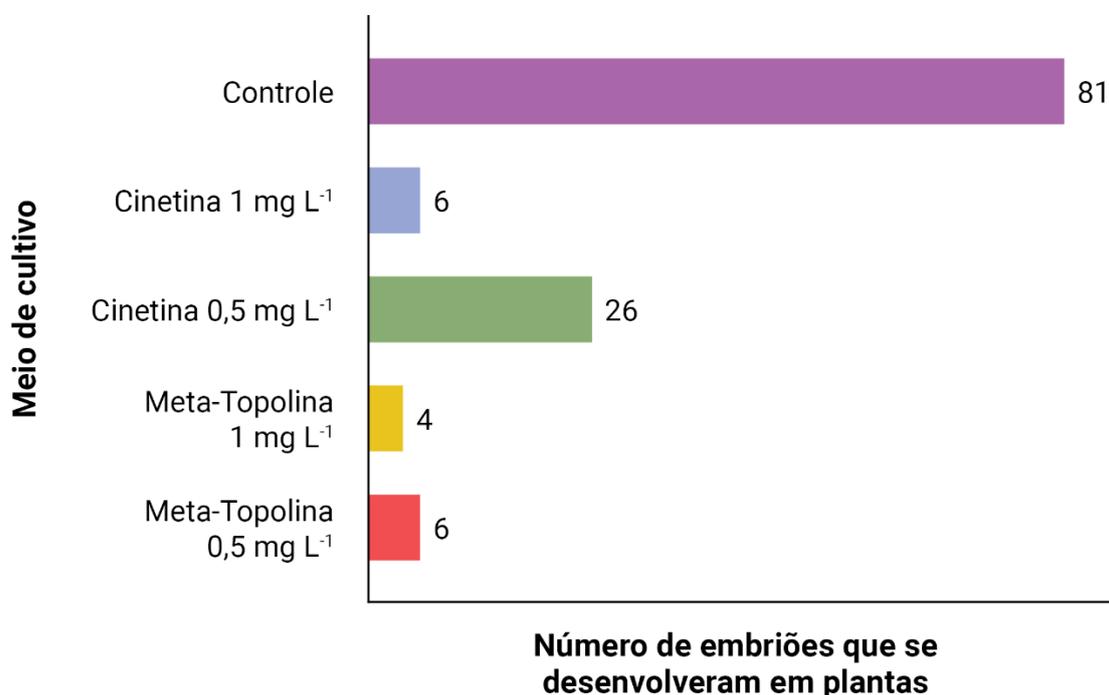


Figura 11. Número de embriões somáticos de *Theobroma cacao* L. que se desenvolveram em plantas completas (com emissão de ambos os meristemas), desenvolvendo folhas verdes e raízes de pelo menos 3 cm, provindos de embriogênese somática indireta em diferentes meios de cultivo (controle e outros com adição de 0,5 mg L⁻¹ cinetina, 1 mg L⁻¹ cinetina, 0,5 mg L⁻¹ meta-Topolina e 1 mg L⁻¹ meta-Topolina).

A embriogênese somática secundária (ESS) notada no experimento, é um estágio subsequente na cultura de tecidos vegetais, no qual os embriões somáticos previamente formados durante a embriogênese somática primária (ESP) passam por um processo de desenvolvimento adicional. A ESS tem sido relatada como capaz de aumentar a taxa de multiplicação e a eficiência de regeneração em muitas espécies de plantas em comparação com a ESP (Li *et al.*, 2002; Pinto *et al.*, 2008). Porém, a ESS ocorrida nesse estudo não passou pelo protocolo de ESS e surgiu quando as plantas já estavam em fase de regeneração, tanto em folhas quanto em raízes e meristemas apicais.

A ESS foi observada em 17,6% das plantas. Embriões fusionados ocorreram em 12,8% das plantas, e notou-se a falta de clorofila em pelo menos uma folha em 7,27% das plantas.

Em relação às características foliares, 76,2% das plantas apresentaram somente folhas anormais (com uma ou mais dessas características: coloração rosada, fusionadas, pequenas, com deficiência em clorofila, grossas, enrugadas), 0,7% somente folhas normais e 5,52% ambas normais e anormais na mesma planta.

A cultura *in vitro* frequentemente resulta em um aumento significativo na ocorrência de variantes genéticas, conhecida como "variação somaclonal", onde clones regenerados por ES apresentam uma alta frequência de genótipos mutantes em comparação com as plantas parentais (Phillips *et al.*, 1994, Alemanno *et al.*, 1997, Rodriguez-López *et al.*, 2004, Lin *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2006, Rodriguez-López *et al.*, 2010). Porém, em um estudo de Guillou e colaboradores (2018) com ES em cacau utilizando meio líquido, que teve como objetivo aumentar a osmolalidade (número de partículas osmoticamente ativas de soluto presentes em um quilograma do solvente, para os explantes terem maior área de contato com nutrientes) e estender a etapa de maturação dos embriões, mostrou um aumento da taxa de embriões normais e diminuição da taxa de anormais, o que indica que a anormalidade, normalmente encontrada em ES de cacau, provavelmente se deve a distúrbios fisiológicos resultantes da maturação incompleta, e não da variação somaclonal.

Ao comparar a embriogênese zigótica de *Theobroma cacao* L. com a ES a partir de explantes florais, Alemanno *et al.* (1997) observaram uma taxa de anormalidade de 80% nos embriões somáticos de *Theobroma cacao* L. Análises histológicas feitas em um estudo por Rodriguez-López e colaboradores (2010) revelaram deficiência em amido e proteínas de reserva, bem como um alto teor de água em comparação com os embriões zigóticos. Dos nove marcadores SSR iniciais testados, 34,8% dos regenerantes exibem perfis genéticos distintos, enquanto nas folhas das árvores progenitoras essa taxa é inferior a 1,2%. Também notaram que embriões secundários exibiram uma menor taxa de variantes genéticas (23,3%) em comparação com os embriões primários (37,6%), contrastando com outros sistemas de multiplicação *in vitro*. Um estudo anterior em cacau demonstrou a ausência de mutações em embriões somáticos secundários (Fang *et al.*, 2009).

6.5 Aclimatização de plantas

Foram transferidas para o substrato seis plantas normais (Figuras 12A e 12B) provindas dos meios controle e cinetina $0,5 \text{ mg L}^{-1}$, três com a anormalidade de fusão de embriões (Figuras 12D e 12E) e três apresentando deficiência de clorofila em algumas das folhas. Todas elas apresentaram boa adaptação e desenvolvimento (100% de sobrevivência) no período de acompanhamento na câmara de crescimento tipo BOD e na casa de vegetação (Figuras 12C e 12F).

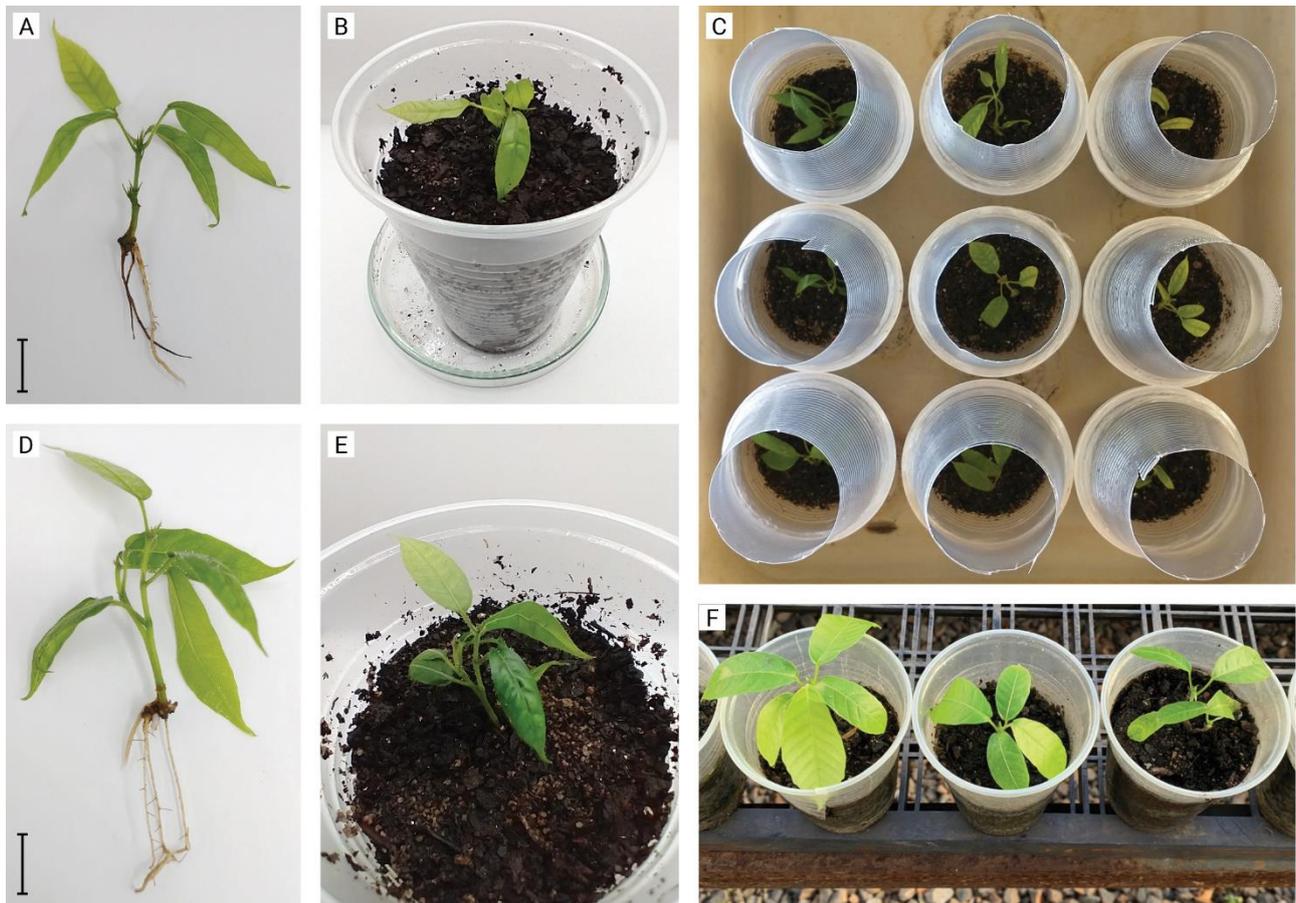


Figura 12. Plantas de *Theobroma cacao* L., providas de embriogênese somática indireta, em fase de aclimatização. (A e B) Planta sem anormalidades sendo transferida para substrato. (C) Plantas na terceira semana de desenvolvimento em câmara de crescimento tipo BOD, com a base do copo “tampa” removida para menor retenção de umidade para dar início às regas a cada dois dias. (D e E) Planta anormal, provida de fusão de dois embriões sendo transferida para substrato. (F) Mudanças clone crescendo na casa de vegetação, as bases dos copos “tampas” foram removidas para diminuir a umidade disponível para as plantas e elas passaram a ser regadas a cada dois dias. Barras: 1 cm.

6.6 Análises morfoanatômicas e histoquímicas

A fim de melhor compreender os eventos morfogênicos envolvidos com a indução da calogênese e embriogênese somática (ES) de *Theobroma cacao* L. (cacaueiro) a partir de estaminoides, foram conduzidas análises morfoanatômicas do explante inicial - estaminóide (antes da inoculação no meio de indução de calos) (Figura 13), de diferentes formações calogênicas, (Figuras 14-16) e de embriões somáticos em diferentes estádios de desenvolvimento (Figuras 17 e 18). Realizaram-se também análises histoquímicas dos materiais supracitados (Figura 19).

Conforme as análises, os estaminoides (Figura 13A) apresentam vesículas de mucilagem conspicuas distribuídas da sua base às proximidades do ápice (Figura 13B), epiderme com tricomas (Figuras 13A, 13B, 13B.2, 13B.3, e 13D), células parenquimáticas (Figuras 13B.3, 13C, e 13D) e sistema vascular evidente, o qual se estende da base às proximidades do ápice do estaminóide (Figuras 13B-13D). A descrição supracitada corrobora com o previamente descrito por Maximova *et al.* (2002) e Rúa *et al.* (2016). As células da epiderme, distribuídas ao longo de todo o explante, apresentam núcleos grandes, geralmente um nucléolo, e grandes vacúolos preenchidos por compostos fenólicos (Figuras 13B-13D). Já as células parenquimáticas exibem formato

predominantemente arredondado e vacúolos proeminentes; algumas exibiram compostos fenólicos distribuídos aleatoriamente (Figuras 13B-13D).

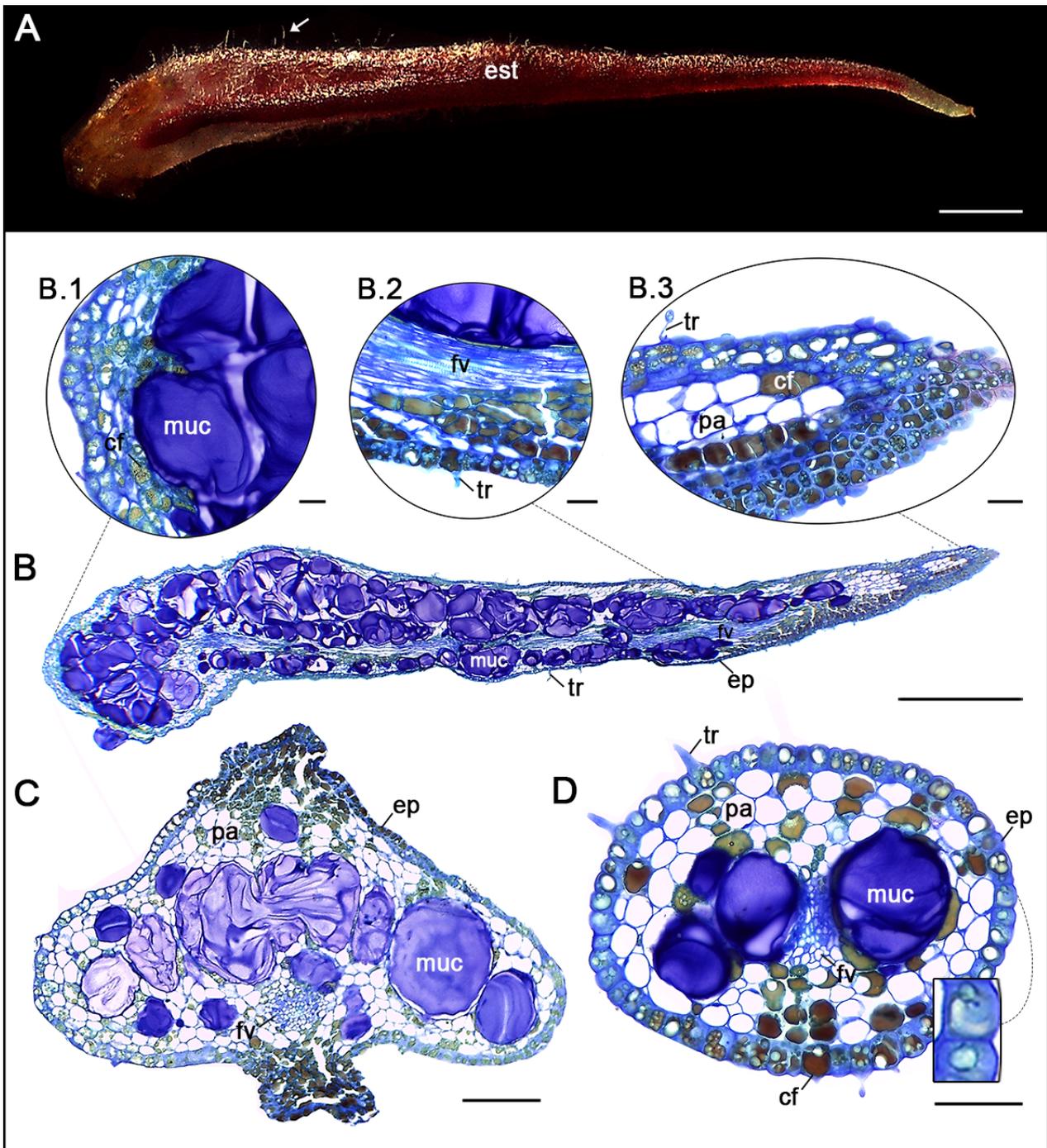


Figura 13. Caracterização morfoanatômica de estaminoides usados como explantes para indução da embriogênese somática em *Theobroma cacao* L. (cacaueiro). (A) Estaminoide; notar tricomas (seta). (B) Seção longitudinal do estaminoide evidenciando conspicuas vesículas de mucilagem. (B.1) Detalhe da base do estaminoide, rica em compostos fenólicos. (B.2) Detalhe dos feixes vasculares do estaminoide. (B.3) Detalhe do ápice do estaminoide, com tricoma visível e camadas de células com compostos fenólicos. (C, D) Seções transversais do estaminoide; observar tricomas e células da epiderme em maior magnificação em D. Barras: A, B = 500 μ m; B.1-3 = 25 μ m; C = 100 μ m e D: 50 μ m. Abreviações: est - estaminoide; cf - compostos fenólicos; ep - epiderme; fv - feixe vascular; muc - vesícula de mucilagem; pa - célula parenquimática; tr - tricoma.

Como ressaltado anteriormente, maior taxa de formação de calos foi observada na região basal dos explantes (Tabelas 2-5). Salienta-se, contudo, que a estrutura anatômica não evidencia

diferenças significativas nas características morfoanatômicas das células observadas na base, na região central e no ápice do explante (Figura 13), que justifiquem essa responsividade diferente. Uma hipótese para a maior responsividade na região basal do explante é a proximidade dessa região com a base da planta, o que torna maior seu contato com hormônios vegetais que favorecem a diferenciação celular. Todavia, observa-se uma quantidade aparentemente mais expressiva de compostos fenólicos na região apical do estaminoide (Figuras 13B e 13B.3), o que pode ser o fator de inibição da responsividade desta região.

Após 14 dias de cultivo em meio de indução de calos, verificaram-se três tipos de calos sobre o explante, em todos os tratamentos testados, com diferentes proporções. Os calos granulares, formado por estruturas arredondas a filamentosas, foram distinguidos na anatomia, sendo os granulares aqueles com formato arredondado, diminuto e com coloração variando entre branca e bege (Figuras 14-16), e filamentosos, composto por células alongadas translúcidas, geralmente associado ao calo granular (Figura 14). Também foram verificados os calos nodulares (caracterizado por nódulos amarelados ou beges, com superfície enrugada e brilhosa) (Figuras 14-16). Como previamente ressaltado, um único estaminoide pode gerar mais de um tipo de calo. Essa composição variada é refletida também na variabilidade de tipos celulares identificados pelas análises histológicas (Figuras 14-17).

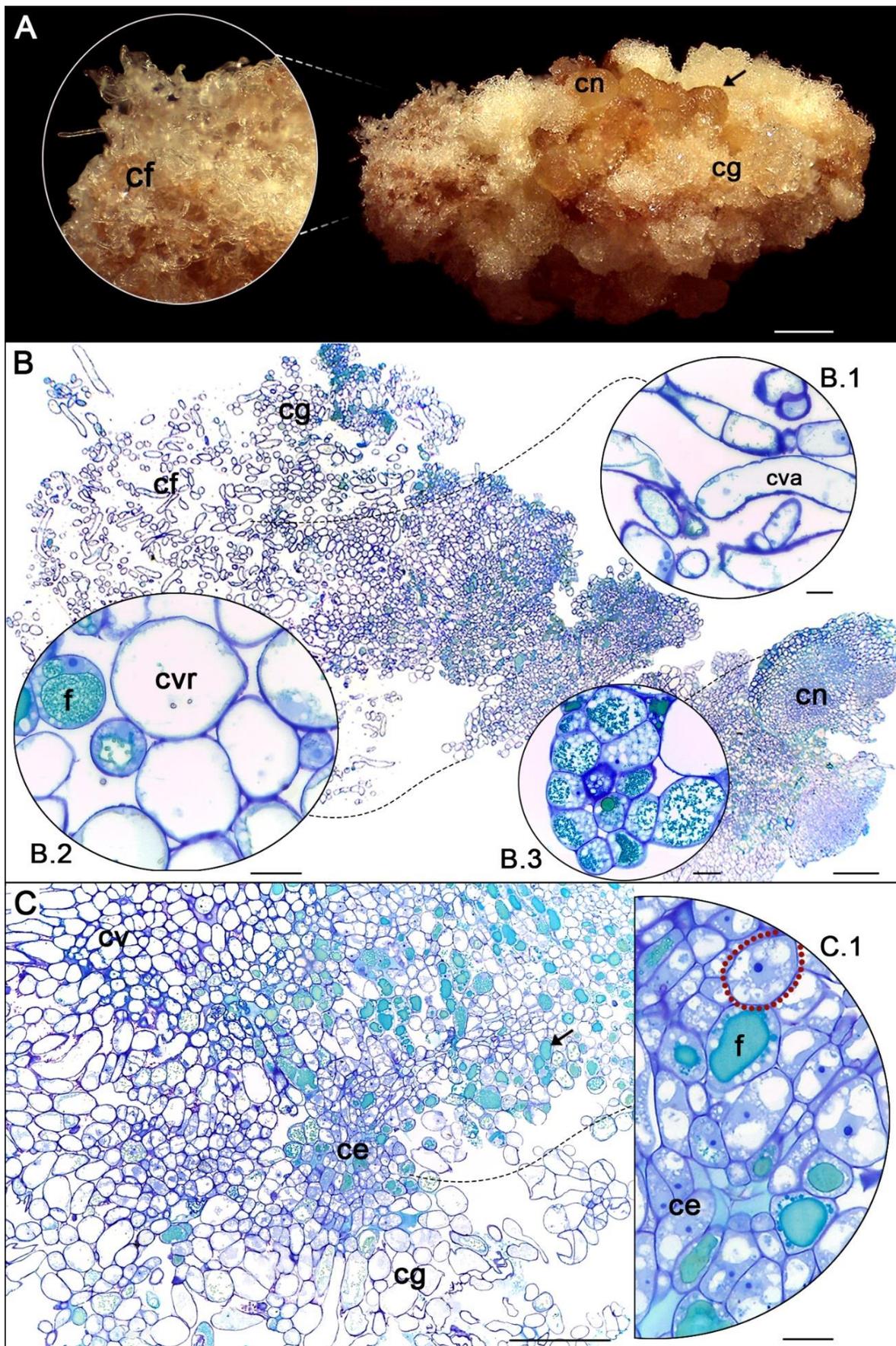


Figura 14. Caracterização morfoanatômica de calos (filamentoso, granular e nodular) de *Theobroma cacao* L. (cacaueiro) oriundos de estaminoide após 14 dias de cultivo em meio de indução de calos. (A) Diferentes tipos de calos sobre um único estaminoide (calo filamentosso em detalhe lateral, calo nodular apontado pela seta e granular). (B) Células vacuoladas alongadas e arredondadas características dos calos filamentosos e granulares, respectivamente. (B.1)

Células vacuoladas alongadas (calos filamentosos). (B.2) Células vacuoladas arredondadas em meio a células citoplasmáticas ricas em compostos fenólicos (calos granulares). (B.3) Células com paredes celulares mais espessas e com abundância de compostos fenólicos (calo nodular). (C) Aglomerado de células com características embriogênicas em meio a células vacuoladas alongadas e arredondadas; notar compostos fenólicos esverdeados (seta). (C.1) Células com características embriogênicas em maior magnificação; observar célula pontilhada com núcleo central. Barras: A = 1 mm; B = 250 μm e B.1-3 = 25 μm ; C = 200 μm e C.1 = 25 μm . Abreviações: ce - célula embriogênica; cf - calo filamentoso; cg - calo granular; cn - calo nodular; cva - célula vacuolada alongada; cvr - célula vacuolada arredondada; f - composto fenólico; ze - zona embriogênica.

Os calos classificados como granulares (Figuras 14A e 15A) são formados por grupos de células vacuoladas, algumas isoladas por paredes celulares aparentemente mais espessas (Figuras 14B, 14B.2, 14C, 15B, e 15B.3). Adicionalmente, apresentam, em meio às células vacuoladas, células com características embriogênicas (de acordo com Fehér (2005), células embriogênicas competentes podem ser reconhecidas morfológicamente como pequenas, arredondadas, com muito citoplasma e pequenos vacúolos), em grupos ou isoladas, e ricas em compostos fenólicos (Figuras 14B e 14C). Essas células são caracterizadas por núcleos centrais com um único nucléolo evidente e vacúolos fragmentados (Figuras 14B, 14B.2, 14C, e 14C.1). Algumas delas possuem um ou mais vacúolos com dimensões maiores, preenchidos com compostos fenólicos (Figuras 14B.2 e 14C.1). Geralmente, associadas as células dos calos granulares, observaram-se também células alongadas e vacuoladas, a grande maioria sem núcleos visíveis (Figuras 14B e 14B.1), células características do calo classificado como filamentoso (Figuras 14A e 15A).

Similar ao relatado neste trabalho, Maximova e colaboradores (2002) mencionaram, a partir de 30 dias de cultivo de estaminoides de cacauero em meio de indução de calos, o surgimento de agrupamentos de células arredondadas, com cerca de 40 μm de diâmetro, e de células alongadas. Segundo esses autores, as células arredondadas foram associadas com a formação dos embriões somáticos, e as alongadas não foram relacionadas com a ES. Essas observações foram oriundas de análises com Microscopia Eletrônica de Varredura. De acordo com as análises de microscopia de luz realizadas aqui, as células alongadas provavelmente correspondem às células típicas dos calos filamentosos, as quais, por serem vacuoladas, não apresentam potencial embriogênico (Figuras 13B e 13B.1). Enquanto aquelas arredondadas correspondem às células características dos calos granulares, os quais exibem além de células vacuoladas, células com características embriogênicas (Figuras 14B, 14B.2, 14C, e 14C.1), como acima detalhado.

Em meio aos calos supracitados, verificam-se estruturas nodulares em formação (Figuras 14A, 14B, 15A, e 15B). Alguns explantes foram totalmente cobertos por calos granulares e/ou filamentosos, sem ou com brotações de estruturas nodulares (Figuras 14A e 15A). Já outros explantes apresentavam predominantemente aglomerados de calos nodulares, geralmente, observados na região basal do estaminoide (Figura 16A). Esses calos exibiam zonas de células com características embriogênicas (núcleos evidentes com um único nucléolo proeminente, com vacúolos de pequenas dimensões ou com um ou dois vacúolos com dimensões maiores) envolvidas por células vacuoladas (Figuras 14B, 15B, 15B.1, 16B, 16B.1, e 16C). Células com características embriogênicas similares foram descritas por Alemmano e colaboradores (1996) em calos nodulares oriundos de estaminoides cacauero.

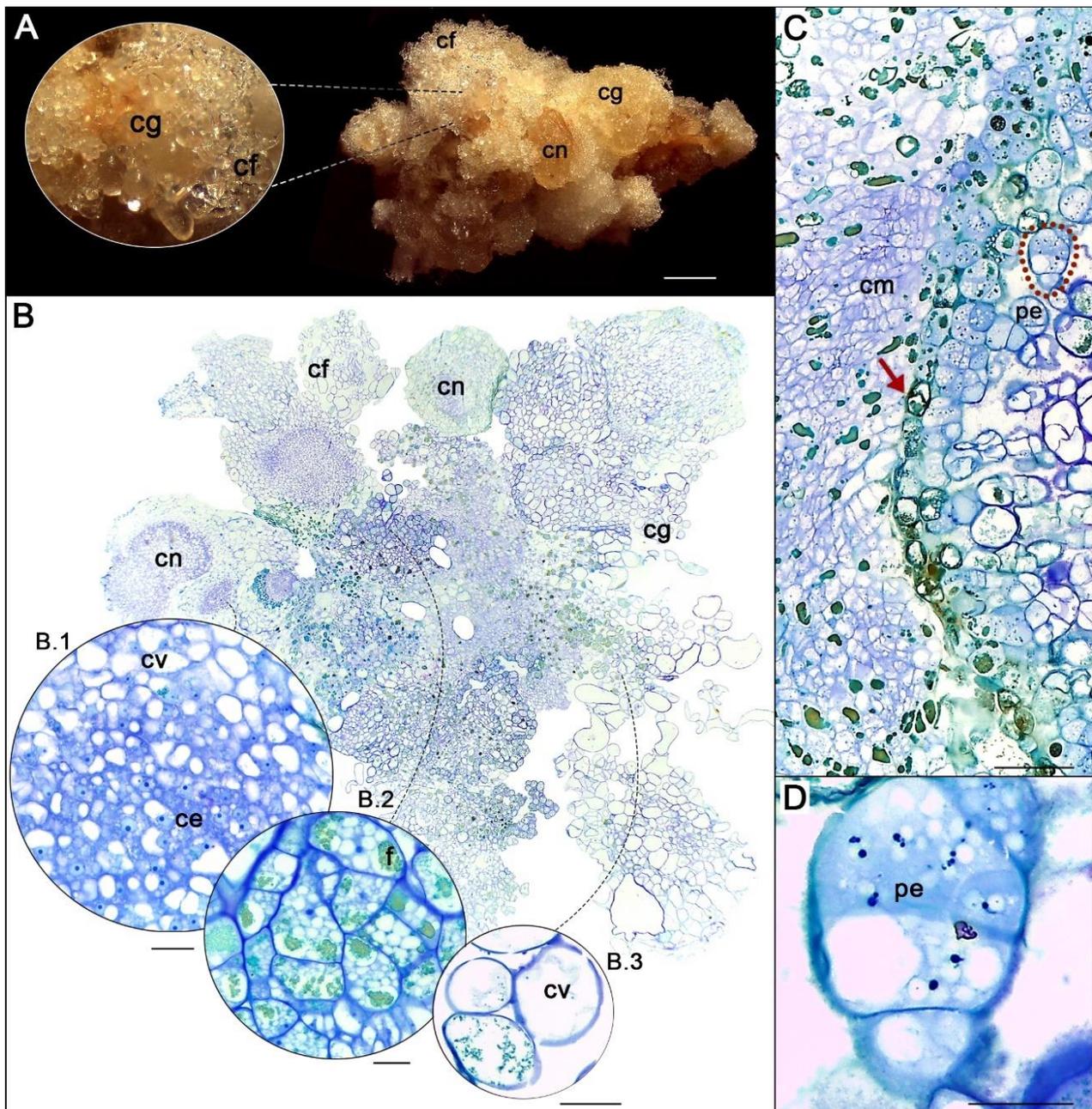


Figura 15. Caracterização morfoanatômica de calos (filamentoso, granular e nodular) de *Theobroma cacao* L. (cacaueiro) oriundos de estaminoide após 14 dias de cultivo em meio de indução de calos. (A) Diferentes tipos de calos sobre um único estaminoide (calo filamentoso, nodular e granular - detalhe lateral). (B) Diferentes tipos celulares. (B.1) Células embriogênicas observadas em calos nodulares. (B.2) Células com paredes celulares espessas. (B.3) Células vacuoladas arredondadas. (C) Multiplicação de células meristemáticas para fora do explante e de proembriões (pontilhado) para dentro do explante; seta indicando a epiderme do explante rica em compostos fenólicos. (D) Detalhe do proembrião referente à letra C. Barras: A = 1 mm; B = 250 μ m, B.1, 3 = 25 μ m, B.2 = 100 μ m; C = 50 μ m; D = 25 μ m. Abreviações: ce - célula embriogênica; cf - calo filamentoso; cg - calo granular; cm - célula meristemática; cn - calo nodular; cv - célula vacuolada; f - compostos fenólicos; pe - proembrião.

Alguns nódulos apresentam células vacuoladas desprendendo-se da região periférica, em meio a compostos fenólicos. Algumas delas envolvidas com mucilagem. As zonas embriogênicas foram observadas na região central ou na periferia dos calos nodulares (Figuras 14B, 15B e 16B). Dada a natureza embriogênica das células observadas nos calos granulares e dos calos nodulares, bem como a visualização posterior do surgimento de embriões somáticos a partir desses tipos calos (nodular isolado e do nodular e granular associados), eles foram considerados como embriogênicos.

Em adição, observaram-se, nas bordas de calos nodulares ou dispersas mais internamente nos explantes, células com vacúolos ricos em compostos fenólicos, paredes celulares mais espessas e, aquelas que exibiam núcleos, apresentavam um único nucléolo (Figuras 14B, 14B.3, 15B, e 15B.2). Verificou-se também a formação de zonas meristemáticas nas adjacências da epiderme do explante (Figuras 15C e 18B) e nas laterais dos feixes vasculares (Figura 16B).

Massas de células embriogênicas oriundas dos calos nodulares apresentavam sinais de isolamento – espessamento, das quais certamente originariam embriões somáticos globulares (Figuras 16C e 16D), o que caracteriza a origem multicelular. Kononowicz *et al.* (1984) também mencionaram a formação de estruturas nodulares a partir de tecidos cotiledonares de cacauero. Tais autores relataram a ocorrência de linhas de fragmentação, aparentemente formadas por paredes celulares mais espessas. A partir de alguns desses aglomerados de células classificadas como meristemáticas, verificou-se a formação de embriões somáticos. Similarmente, Alemanno *et al.* (1996) e Maximova *et al.* (2002) reportaram a formação de embriões somáticos primários de cacauero a partir da fragmentação de massas embriogênicas oriundas de estaminoides, caracterizando origem multicelular.

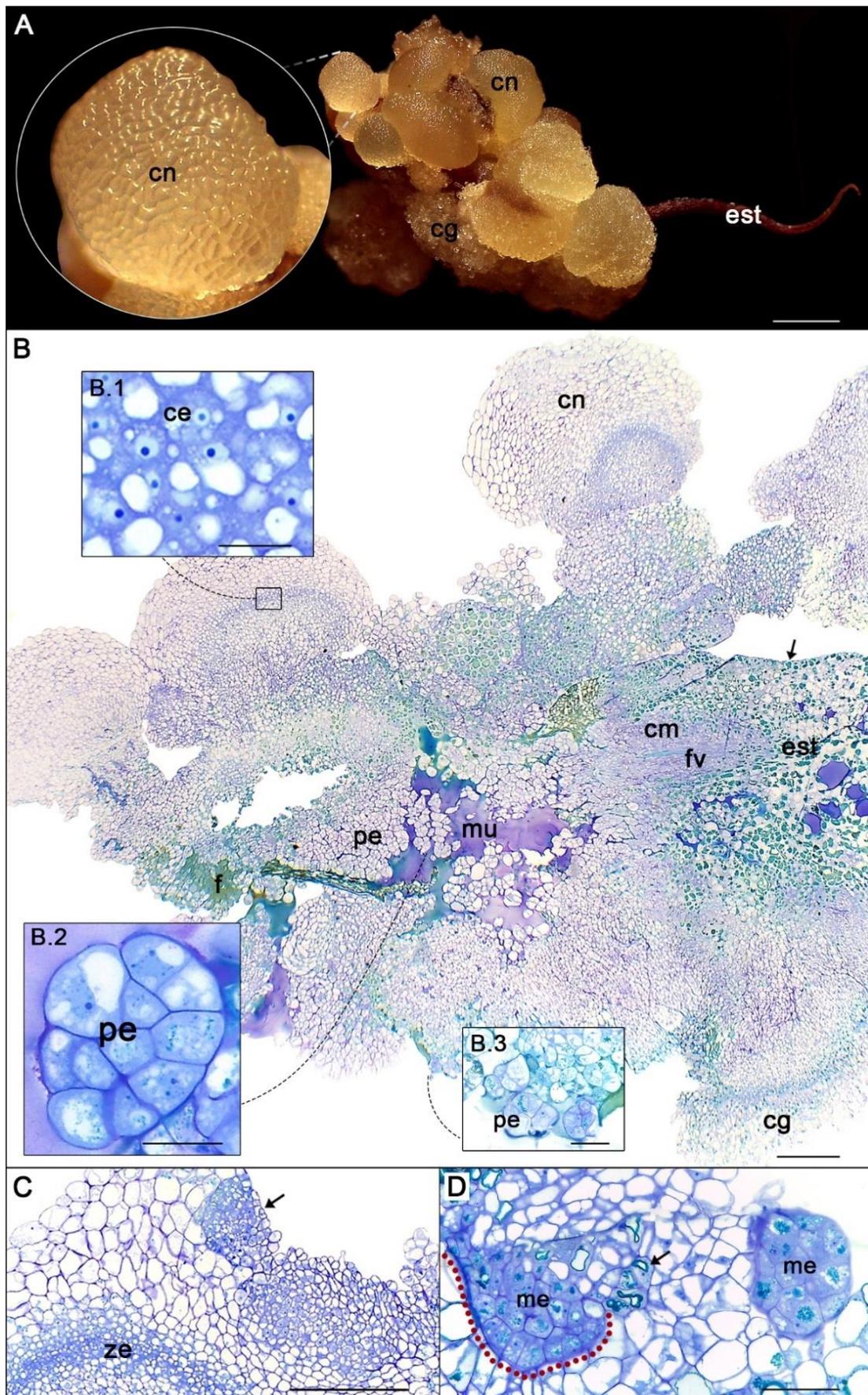


Figura 16. Caracterização morfoanatômica de calos (granular e nodular) de *Theobroma cacao* L. (cacaueiro) oriundos de estaminoides após 15 dias de cultivo em meio de indução de calos. (A) Estaminóide com aglomerado de calos nodulares; observar calo granular abaixo dos calos nodulares. (B) Secção anatômica do explante apresentado na letra A; notar calos nodulares e multiplicação de células meristemáticas nas adjacências dos feixes vasculares. Setas indicando

epiderme do estaminoide. (B.1) Calos nodulares com zonas embriogênicas. (B.2) Proembriões localizados internamente no estaminoide. (B.3) Proembriões localizados externamente ao estaminoide. (C) e (D) Zonas embriogênicas com sinais de fragmentação (setas). Barras: A = 1 mm; B = 250 μ m, B.1, 2 = 25 μ m e B.3 = 50 μ m; C = 200 μ m; D = 50 μ m. Abreviações: ce - célula embriogênica; cg - calo granular; cm - células meristemáticas; cn - calo nodular; est - estaminoide; f - compostos fenólicos; fv - feixe vascular; me - massa embriogênica; pe - proembrião; mu - mucilagem, ze - zona embriogênica.

Adicionalmente, observaram-se, neste trabalho, a formação de proembriões, os quais foram visualizados imediatamente abaixo da epiderme (Figuras 15C e 15D), na parte central dos explantes (em meio a mucilagem) e na periferia de aglomerados de células vacuoladas arredondadas (Figuras 16B, 16B.2, e 16B.3). Os proembriões consistem em grupos de células indiferenciadas que ainda não adquiriram características específicas de tecidos ou órgãos. Com o tempo e sob condições adequadas de cultura, ele pode se desenvolver em um embrião vegetal completo capaz de gerar uma planta adulta.

Provavelmente, tais proembriões, indicativos de origem unicelular, são oriundos da divisão de células com paredes celulares nitidamente mais espessas (Figuras 14B, 14B.3, 15B, e 15B.2), as quais também podem ser classificadas como embriogênicas. Proembriões oriundos de estaminoides de cacauero também foram mencionados por Alemanno *et al.* (1996). Esses autores relataram que essas estruturas falharam no desenvolvimento de embriões somáticos, concomitantemente com a acumulação de compostos fenólicos e vacuolização. De acordo com esses autores, isso ocorreu, provavelmente, em função da inadequação do meio de cultivo. Indícios de ocorrência das duas vias (unicelular e multicelular) também têm sido relatados em outras espécies, como em *Bactris gasipaes* (Almeida *et al.*, 2012) e *Syagrus oleracea* (Silva-Cardoso *et al.*, 2019b).

Após quatro semanas em meio de multiplicação (MMD), dois comportamentos característicos foram notados: i) a contínua proliferação de calos granulares brancos, sem sinais de escurecimento (oxidação), naqueles explantes inicialmente cultivados em meios com meta-Topolina como regulador de crescimento (Figura 17A) e ii) escurecimento expressivo de calos nodulares associados ou não a massas calogênicas granulares (Figura 17C), além de aquisição de uma consistência mucilaginosa (hidratada).

Os calos granulares, com coloração branca ou bege (Figura 17A), são formados predominantemente por células vacuoladas (Figura 17B), e, portanto, foram classificados como desprovidos de potencial embriogênico, quando foi desenvolvido somente esse tipo de calo no explante, sem o acompanhamento de calos nodulares. Todavia, condições específicas de cultivo, como o uso de meta-Topolina como regulador de crescimento, provavelmente, favoreceram a proliferação de células vacuoladas em detrimento das embriogênicas. Diversos estudos mostraram o sucesso no uso da meta-Topolina na cultura de tecidos vegetais, contudo, os impactos negativos em relação ao crescimento, enraizamento e adaptação a determinadas espécies que apresentam recalcitrância, bem como a indução de outros distúrbios fisiológicos, também foram observados (Aremu *et al.*, 2012).

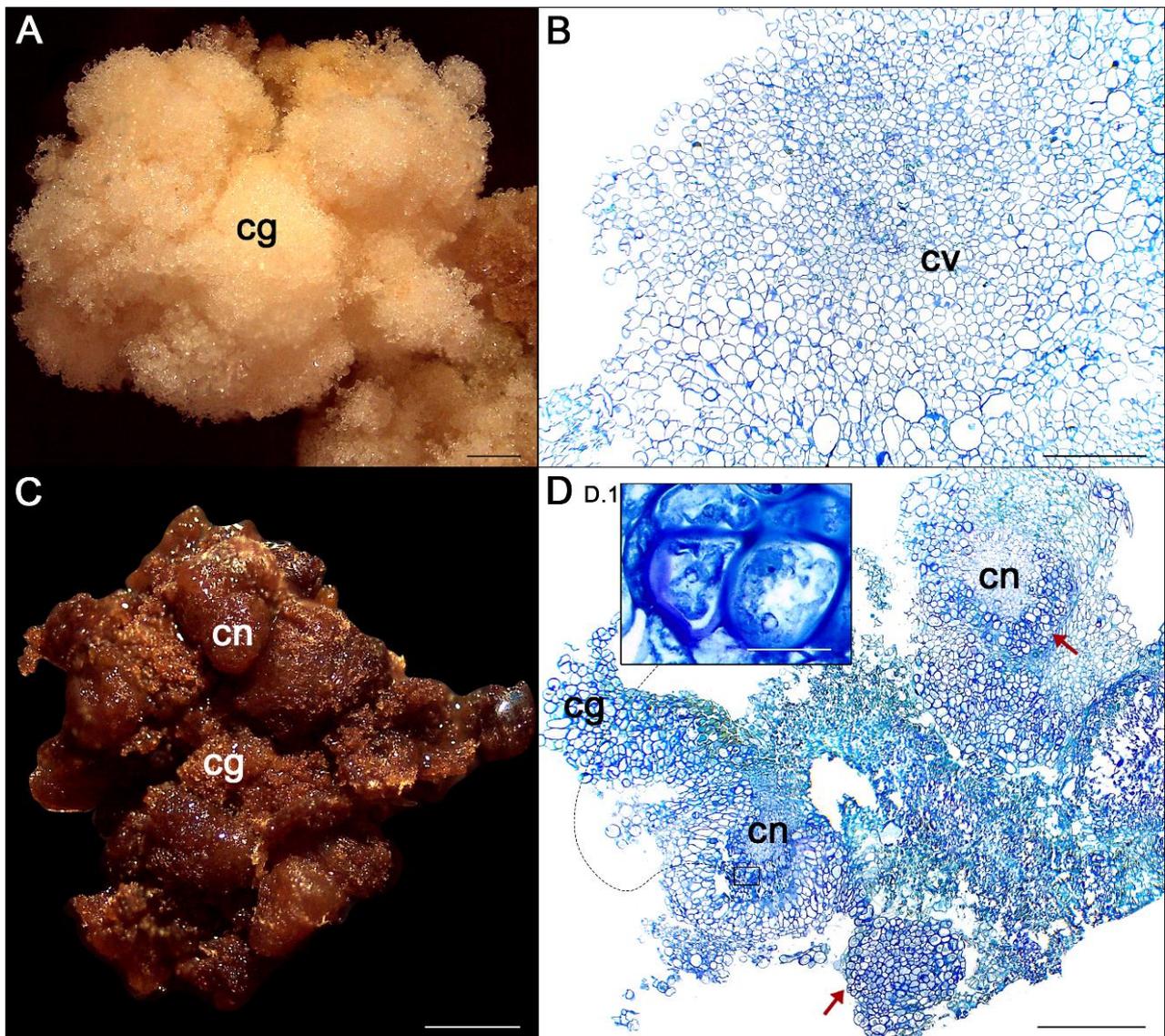


Figura 17. Caracterização morfoanatômica de calos (granular e nodular) de *Theobroma cacao* L. (cacaueiro) oriundos de estaminoides, após seis semanas de cultivo. (A) Calo granular sem sinais de escurecimento. (B) Secção anatômica do calo apresentado na letra A, rico em células vacuoladas. (C) Calos nodulares associados a calos granulares com escurecimento expressivo. (D) Secção anatômica do calo apresentado na letra C; observar células com paredes espessas (setas). (D.1) Célula com características embriogênicas; notar espessamento da parede celular. Barras: A, C = 1 mm; B = 200 µm; D = 500 µm e D.1 = 25 µm. Abreviações: cg - calo granular; cn - calo nodular e cv - células vacuoladas.

Já os calos com escurecimento expressivo (Figura 17C) apresentavam tanto células vacuoladas quanto células embriogênicas (Figuras 17D e 17D.1), essas últimas observadas em menor proporção e localizadas, principalmente, nas proximidades das regiões nodulares. Essas células que mantiveram as características embriogênicas, geralmente, apresentavam um espessamento notável das suas paredes celulares. Células vacuoladas com paredes espessas e conteúdo citoplasmático reduzido, também foram observadas (Figura 17D).

O escurecimento dos calos foi positivamente associado com a formação de embriões somáticos, o que corrobora com o previamente mencionado em *Theobroma cacao* L. (Garcia *et al.*, 2016; Rúa *et al.*, 2016) e em outras espécies (Liu *et al.*, 2015; Sousa *et al.*, 2022). *T. cacao*, por se tratar de uma espécie lenhosa, naturalmente apresenta uma liberação expressiva de compostos fenólicos, com vários relatos da ocorrência do escurecimento (oxidação desses compostos) dos calos obtidos durante o processo embriogênico (Garcia *et al.*, 2016; Rúa *et al.*, 2016; Bustamia;

Werbrouck, 2017; Modeste *et al.*, 2017). Silva-Cardoso *et al.* (2019b), que também reportaram o envolvimento de compostos fenólicos com a ES numa palmeira (*Syagrus oleracea*), levantaram duas possíveis hipóteses para explicar sua participação no processo embriogênico: i) que tais compostos exercem uma função de proteção às condições estressantes *in vitro* e ii) possível participação no metabolismo da auxina. Estudos bioquímicos e moleculares devem ser executados para elucidação do papel dos compostos fenólicos e dos produtos da sua oxidação na ES na espécie.

Similar ao retratado neste trabalho, Rúa *et al.* (2016) mencionaram a ocorrência de três tipos de calos morfológicamente distintos oriundos de estaminoides de cacaueteiro, após 45 dias de cultivo: calo composto por células brancas-vítreas, redondas e translúcidas (similar ao calo granular branco e calo filamentososo branco) e calo granular ceroso amarronzado (similar ao calo oxidado supramencionado). Esse último foi considerado embriogênico, o que corrobora com os resultados obtidos aqui.

Após duas semanas de cultivo em meio de desenvolvimento de embriões (MDE), foi observado o surgimento de embriões somáticos a partir de explantes compostos por calos nodulares (Figura 18A). Foram visualizados embriões somáticos em diferentes estádios de desenvolvimento (Figura 18A – detalhe lateral). As secções anatômicas evidenciaram embriões somáticos globulares, com protoderme em formação (Figuras 18B e 18B.1), bem como embriões somáticos em estágio similar ao torpedo (Figura 18C). Análises histoquímicas não evidenciaram a presença de grãos de amido nos embriões analisados, todavia indicaram a presença de resquícios proteicos, via uso do corante Xilidine Ponceau, em células localizadas na região central de embriões somáticos globulares (Figuras 18B e 18B.2).

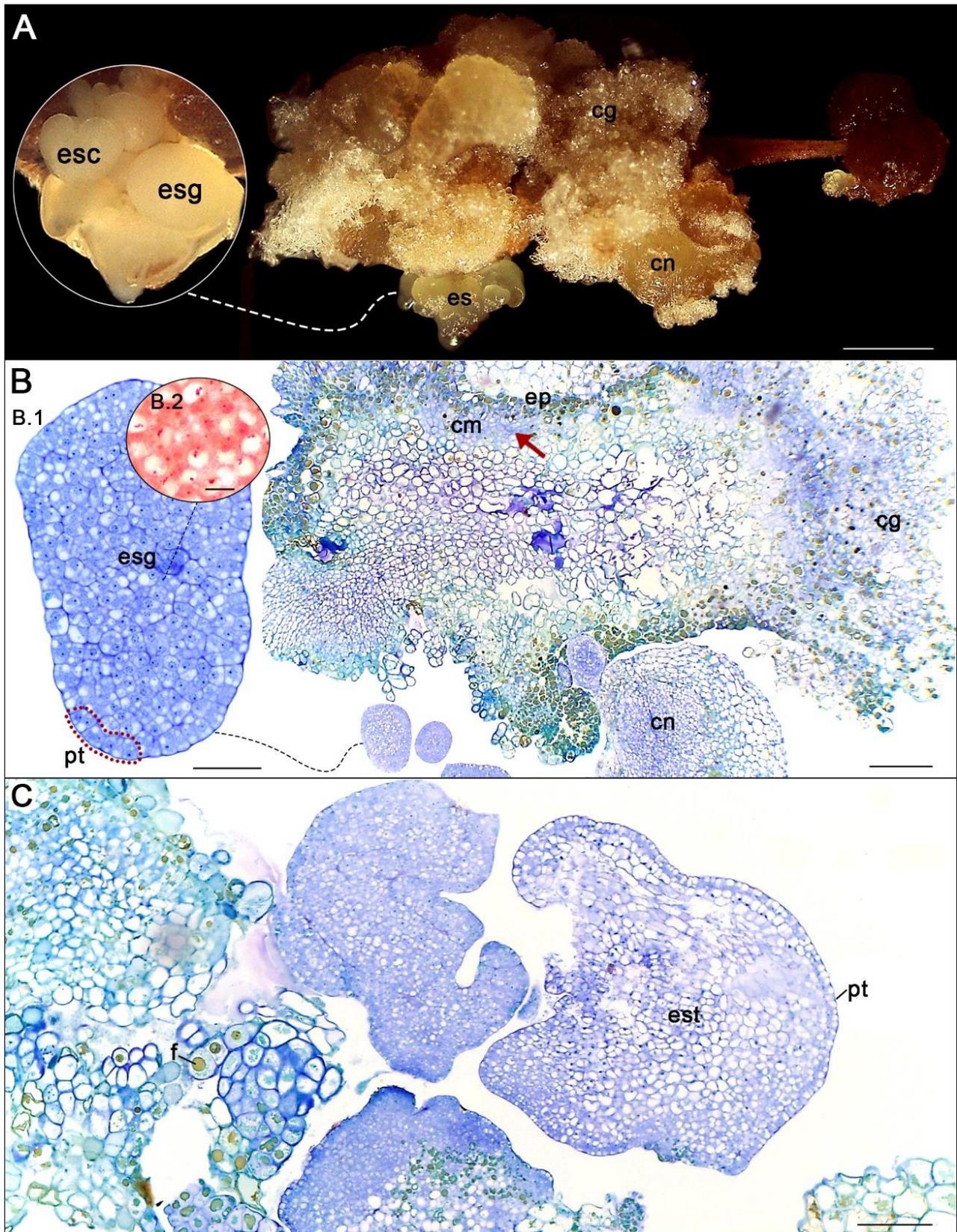


Figura 18. Caracterização morfoanatômica de embriões somáticos de *Theobroma cacao* L. (cacaueiro) oriundos de estaminoide. (A) Estaminoide com as regiões basal e central cobertas por calos nodulares associados com calos granulares e com um agrupamento de embriões somáticos em diferentes estádios de desenvolvimento. (B) Secção anatômica do explante apresentado na letra A, com embriões somáticos globulares; notar proliferação de células meristemáticas subepidérmicas (seta), calo nodular e calo granular. (B.1) Embrião somático globular em maior magnificação; notar protoderme em formação (pontilhado). (B.2) Resquícios de proteína, corados com Xylidine Ponceau, observados em células centrais de embrião somático globular. (C) Embriões somáticos em estágio similar ao torpedo. Barras: A = 1 mm; B = 100 µm, B.1= 50 µm e B.2 = 12,5 µm; C = 100 µm. Abreviações: cg - calo granular; cm -

células meristemáticas; cn - calo nodular; es - embriões somáticos; ep – epiderme, esc - embrião somático em estágio cordiforme; esg - embrião somático globular; est - embrião somático em estágio torpedo e pt - protoderme.

Embriões somáticos cotiledonares também foram analisados em termos morfoanatômicos e histoquímicos (Figura 19). Segundo as análises, tais embriões apresentam todos os meristemas primários, protoderme (Figuras 19B e 19B.4), procâmbio (Figuras 19B e 19B.2), meristema apical caulinar (Figuras 19B e 19B.1) e radicular (Figuras 19B e 19B.3), típicos de embriões zigóticos. Ademais, uma barreira fenólica conspícua também foi observada na epiderme e células subepidérmicas (Figuras 19B e 19B.4). Cerri *et al.* (2019) identificaram entre 5 e 6 camadas externas de polifenóis em embriões zigóticos de cacaueteiro. De acordo com Rúa *et al.* (2016), a localização periférica da camada de compostos fenólicos em embriões somáticos de cacaueteiro mimetiza o padrão observado em embriões zigóticos da espécie e pode ser um indicativo de capacidade regenerativa. Conforme tais autores, o acúmulo desses compostos em embriões zigóticos assume o papel de proteção contra patógenos, configurando-se como uma primeira barreira de defesa.

As análises histoquímicas não identificaram a presença de amido, contudo revelaram a presença de alguns resquícios de reservas proteicas nas células do meristema fundamental (Figuras 19B e 19B.5), diferentemente do relatado por Alemanno *et al.* (1996), que verificaram quantidades irrisórias de amido em embriões somáticos de cacaueteiro, e por Rúa *et al.* (2016), que identificaram alto conteúdo proteico em embriões somáticos da espécie.

É importante enfatizar que embora indícios de origem multicelular e unicelular de embriões somáticos tenham sido observados, os cortes anatômicos das amostras dos embriões somáticos analisados não permitiram identificar a origem em questão. Porém, em função da predominância de calos nodulares (onde visualizou-se fragmentações e conseqüente formação de massas embriogênicas) e da observação do surgimento de embriões somáticos a partir desses calos, supõe-se que a origem multicelular predominou neste sistema.

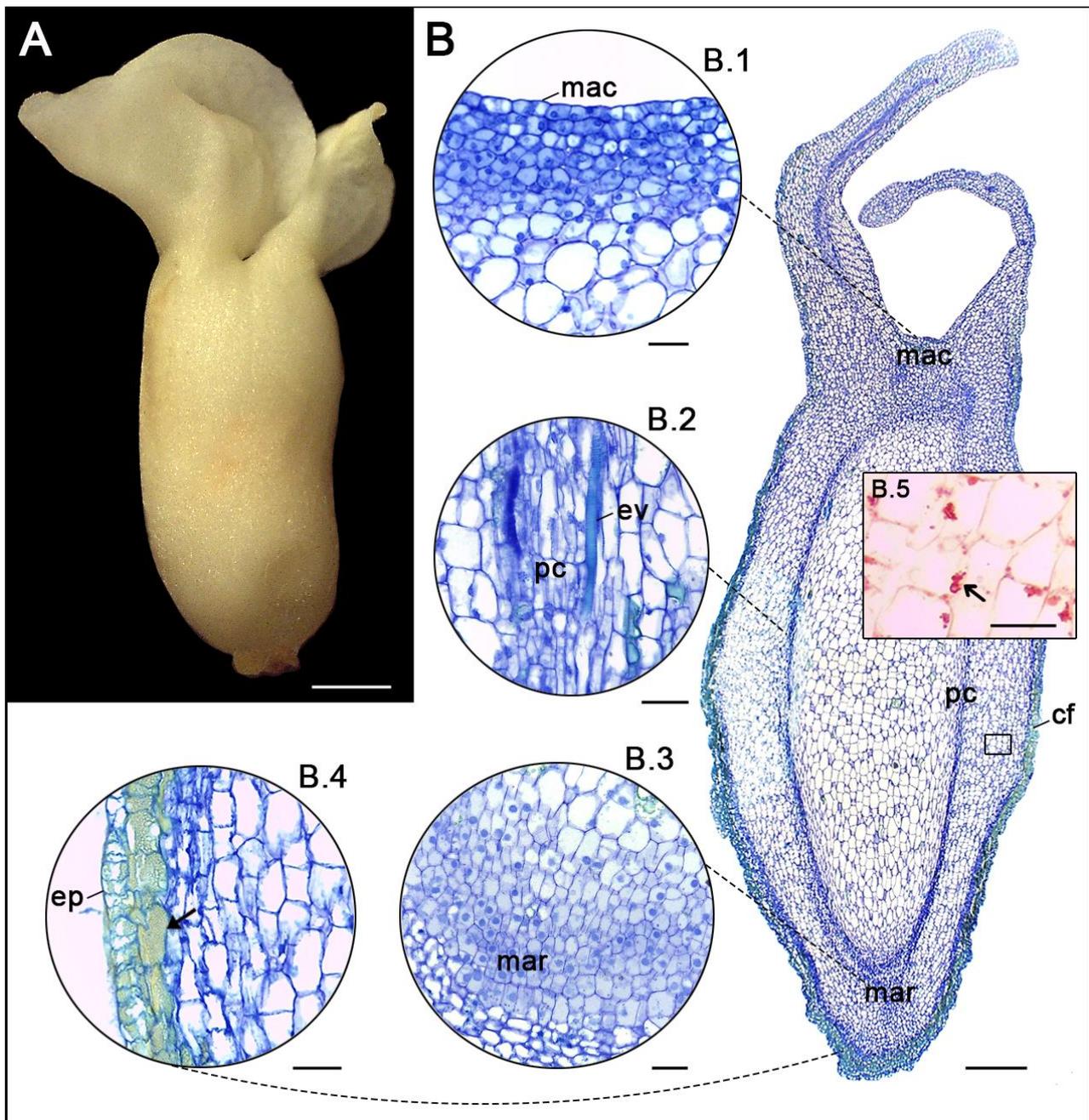


Figura 19. Caracterização morfoanatômica de embrião somático cotiledonar de *Theobroma cacao* L. (cacaueiro) oriundo de estaminoide. (A) Embrião cotiledonar. (B) Secção anatômica longitudinal do embrião apresentado na letra A. (B.1) Detalhe do meristema apical caulinar. (B.2) Detalhe do cordão procambial; notar elemento de vaso. (B.3) Detalhe do meristema apical radicular. (B.4) Camada fenólica na periferia do embrião somático. (B.5) Resquícios de proteína, corados com Xylydine Ponceau, observados em células de embrião somático cotiledonar. Barras: A = 500 µm; B = 250 µm e B.1-5 = 25 µm. Abreviações: cf - compostos fenólicos; ep - epiderme; ev - elemento de vaso; mac - meristema apical caulinar; mpr - meristema apical radicular e pc - procâmbio.

As análises histoquímicas revelaram a presença de grãos de amido (corados com reagentes Periodic Acid Shiff e Lugol) na maioria dos tipos de células analisadas (células vacuoladas dos calos granulares iniciais e tardios – Figuras 20A e 20B; células com paredes espessas, prováveis precursoras de proembriões – Figuras 8D e 8E; células dos proembriões – Figuras 8F e 8G). Entretanto, grãos de amido não foram visualizados nas células embriogênicas observadas nos calos nodulares (Figuras 8J e 8K).

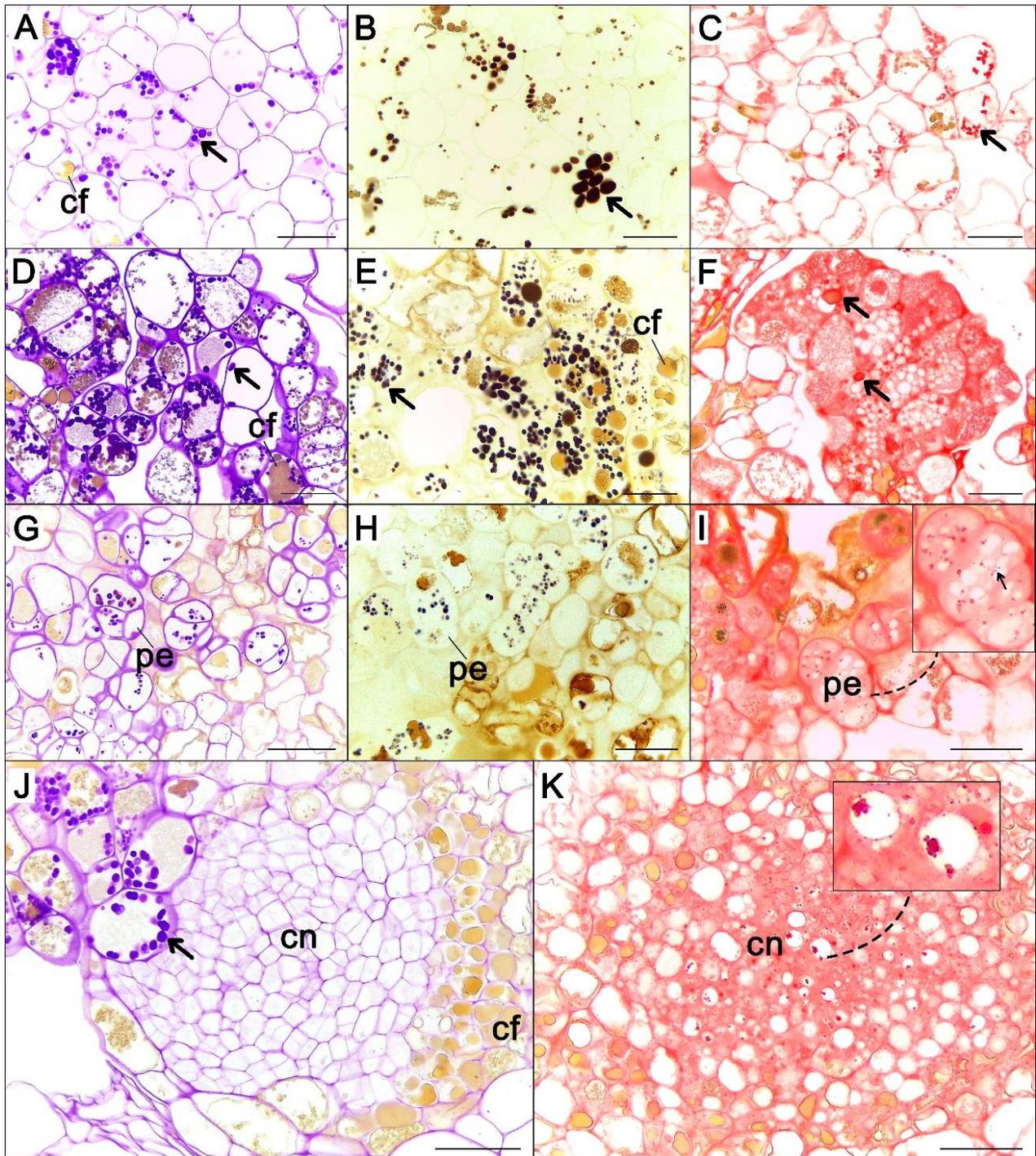


Figura 20. Caracterização histoquímica dos tipos celulares envolvidos na calogênese de *Theobroma cacao* L. (cacaueiro) oriunda de estaminoide visando à embriogênese somática (A, D, G, J – secções coradas com Periodic Acid Schiff; B, E, H – secções coradas com Lugol e C, F, I, K – secções coradas com Xilidine Ponceau). (A, B) Grãos de amido (setas) identificados em células vacuoladas de calos granulares. (C) Resquícios de proteínas em células vacuoladas dos calos granulares. (D, E) Grãos de amido (setas) identificados em células com paredes espessas (setas). (F) Reserva proteica em células com paredes espessas (setas). (G, H) Grãos de amido (setas) identificados em proembriões. (I) Resquícios de proteínas em proembriões. (J) Grãos de amido (seta) visualizados em células vacuoladas adjacentes às células embriogênicas localizadas no interior de calo nodular. (K) Reserva proteica em vacúolos de células embriogênicas localizadas no interior de calo nodular. Barras = 25 μm. Abreviações: cf - compostos fenólicos; cn - calo nodular e pe - proembrião.

A presença de grãos de amido em proembriões de cacaueiro também foi reportada por Alemanno *et al.* (1996) e, provavelmente, funciona como suporte energético para as divisões celulares. Quanto aos embriões somáticos, como anteriormente mencionado, grãos de amido não

foram verificados nos embriões somáticos. A presença de conteúdo polissacarídico na maioria dos tipos celulares indicam um papel importante na ES de cacaueteiro no metabolismo de carboidrato e metabolismo energético, como reportado por Noah *et al.* (2013).

Quanto às reservas proteicas, essas foram constatadas, mediante uso do corante Xilidine Ponceau, em quantidades irrisórias em algumas células vacuoladas típicas dos calos granulares (Figura 20C), no interior de alguns proembriões (Figura 20I), no vacúolo de células embriogênicas localizadas no interior dos nódulos embriogênicos (Figura 20K) e, como anteriormente descrito, nos embriões somáticos obtidos (Figuras 18B.2 e 19B.5). Algumas das células com paredes espessas, prováveis precursoras de proembriões, apresentaram quantidades mais significativas de proteínas (Figura 20I). A presença de reserva proteica em células embriogênicas de nódulos de cacaueteiro também foi mencionada por Maximova *et al.* (2002). Tais reservas, provavelmente, configuram-se como fontes de energia necessárias às divisões celulares.

Diferentemente do observado nos embriões somáticos obtidos, embriões zigóticos maduros (cotiledonares) de cacaueteiro são ricos em reservas, como amido e proteínas (Rangel-Fajardo *et al.*, 2012; Cerri *et al.*, 2019). A ausência de reservas em embriões somáticos tem sido relatada em *T. cacao* (Alemanno *et al.*, 1997; Niemenak *et al.*, 2015) e tem sido associada, em diferentes espécies, a uma etapa de maturação ineficiente (Pinto *et al.*, 2010; Silva-Cardoso *et al.*, 2019a; Martins *et al.*, 2022). Diferentes estratégias, como adição de fontes de carbono (Kononowicz; Janick, 1984), ácido abscísico (Alemanno *et al.*, 1997) e Polietilenoglicol - PEG (Cruz *et al.*, 2022), podem ser adotadas para o incremento dessas reservas e a melhoria da qualidade da germinação e das plantas obtidas.

Em resumo, este estudo oferece uma análise abrangente das características anatômicas e histoquímicas dos estaminoides, calos granulares e nodulares, bem como dos embriões somáticos do cacaueteiro. Os estaminoides demonstraram características como a presença de mucilagem, tricomas, células parenquimáticas e um sistema vascular bem desenvolvido. A concentração mais elevada de mucilagem e menos elevada de compostos fenólicos na região basal dos estaminoides sugere uma influência na maior responsividade desta região. Os calos granulares e nodulares exibiram morfologias distintas, com células vacuoladas e células com potencial embriogênico. Os embriões somáticos do cacaueteiro demonstraram características anatômicas semelhantes aos embriões zigóticos, embora exibissem uma barreira fenólica na epiderme e células subepidérmicas e falta de grãos de amido e reservas proteicas, indicando uma maturação potencialmente menos eficiente.

7. Conclusões

Em suma, para a espécie estudada, *Theobroma cacao* L., foi constatada uma notável especificidade genotípica em resposta à embriogênese somática (ES). Durante o experimento, ficou evidente que o protocolo base (controle) de Li *et al.* (1998) se mostrou mais eficaz no genótipo '754', resultando em uma taxa de desenvolvimento superior de calos nodulares e embriões somáticos. Portanto, o uso de cinetina e meta-Topolina não se revelou favorável para a ES no cacau nesse protocolo.

A análise anatômica dos estaminoides revelou características como vesículas de mucilagem, epiderme com tricomas, células parenquimáticas e um único feixe vascular. Além disso, foi observado que a região basal do estaminoide apresenta maior responsividade à calogênese. Em análise histoquímica percebeu-se maior concentração de mucilagem e a menor concentração de compostos fenólicos na região basal do explante em comparação com o meio e o ápice, o que sugere uma influência na maior responsividade da região basal. Outra hipótese é de que essa região tem maior acesso aos hormônios vegetais oriundos da planta por estar mais perto do recertáculo.

Foram identificados e diferenciados três tipos de calos: filamentosos (células vacuoladas longas, misturados aos calos granulares), granular (com formato de grânulos ou pequenos filamentos com tamanho de ± 0.1 mm) e nodular (com estrutura compacta e superfície rugosa com tamanho de ± 1.5 mm), cada um com suas características distintas. A análise anatômica dos calos filamentosos mostrou que eles são células alongadas e vacuoladas, sem potencial embriogênico. Já, as granulares revelaram que eles são compostos por grupos de células vacuoladas, algumas isoladas por paredes celulares aparentemente mais espessas, e apresentam células com características embriogênicas ricas em compostos fenólicos. Por sua vez, os calos nodulares se caracterizaram por nódulos amarelados ou beges, com superfície enrugada e brilhosa, envolvendo zonas de células com características embriogênicas.

Surpreendentemente, a oxidação dos calos não teve um impacto negativo na formação de embriões e esteve mais presente no tratamento mais responsivo (meio controle, genótipo '754'). As hipóteses levantadas sugerem que a oxidação pode ter uma função de proteção às condições estressantes *in vitro* e/ou uma possível participação no metabolismo de auxinas. Porém estudos bioquímicos e moleculares são necessários para melhor elucidação dessa interação.

Os embriões somáticos apresentaram cor branca leitosa a translúcida, podendo surgir individualmente ou em grupos, e na fase torpedo, destacavam-se do tecido calogênico. Quando analisados morfoanatomicamente, os embriões somáticos apresentaram todos os meristemas primários típicos de embriões zigóticos. Em análise histoquímica, observou-se a presença de uma barreira fenólica na epiderme e células subepidérmicas dos embriões somáticos e presença de alguns resquícios de reservas proteicas nas células do meristema fundamental, porém não se identificou a presença de amido. No entanto, é importante notar que embriões somáticos apresentaram uma deficiência desses compostos em comparação com os embriões zigóticos, o que tem sido observado em diferentes espécies e está relacionado a uma etapa de maturação ineficiente.

Já na fase de regeneração, foi observada uma alta taxa de anormalidades, incluindo folhas com coloração rosada, fusionadas, com deficiência de clorofila, pequenas, grossas e/ou enrugadas,

além de problemas no desenvolvimento da raiz, embriogênese secundária, estagnação no desenvolvimento do embrião e oxidação total do embrião após o início do desenvolvimento foliar. Devido à vasta ocorrência de anormalidades, a taxa de regeneração de plantas foi relativamente baixa, no entanto, todas as plantas em fase de aclimatização demonstraram uma boa adaptação e desenvolvimento durante o período de acompanhamento na câmara de crescimento tipo BOD e na casa de vegetação.

Por fim, esses resultados contribuem para uma compreensão mais profunda dos processos de embriogênese somática no cacaueteiro e fornecem insights valiosos para futuras pesquisas nesta área.

8. Referências bibliográficas

ADU-AMPOMAH, Y.; NOVAK, F.; AFZA, R.; VAN DUREN, M.; PEREA-DALLOS, M. Initiation and Growth of Somatic Embryos of Cocoa (*Theobroma cacao*). **Café, Cacao, Thé**, v. 31, n. 3, p. 187-199, 1988.

AGUILAR, M. E.; VILLALOBOS, V.; VÁSQUEZ, N. Production of Cocoa Plants (*Theobroma cacao* L.) Via Micrografting of Somatic Embryos. **In vitro Cell. Dev.**, v. 28, p. 15-19, 1992.

AK, B. E.; HATIPOĞLU, İ. H.; DIKMETAŞ, B. Propagation of Fruit Trees. In: PAKYÜREK, M. (ed.). **Recent Headways in pomology**. Iksad Publishing House, 2021. 398 p.

ALEMANNI, L.; BERTHOULY, M.; MICHAUX-FERRIERE, N. A comparison between *Theobroma cacao* L. zygotic embryogenesis and somatic embryogenesis from floral explants. **In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 33, p. 163-172, 1997.

ALEMANNI, L.; BERTHOULY, M.; MICHAUX-FERRIÈRE, N. Embryogenèse somatique du cacaoyer à partir de pièces florales. **Plantations, Recherches, Développement**, p. 225-237, 1996.

ALMEIDA, M.; ALMEIDA, C. V.; GRANER, E. M.; BRONDANI, G. E.; ABREU-TARAZI, M. F. Pre-procambial cells are niches for pluripotent and totipotent stem-like cells for organogenesis and somatic embryogenesis in the peach palm: a histological study. **Plant Cell Reports**, v. 31, p. 1495-1515, 2012.

ALMEIDA, R. F.; MEIRA, F. S.; GOMES, H. T.; BALZON, T. A.; BARTOS, P. M. C.; MEIRA, R. de O.; CUNHA, R. N. V. da; LOPES, R.; MEHTA, A.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Capacity for somatic embryogenesis of adult oil palm genitors (*Elaeis guineensis*, var. Pisifera) from immature leaf tissues. **South African Journal of Botany**, v. 131, p. 229-239, 2020.

ALVIM, P. T. Flowering of cocoa. **Cocoa Growers Bulletin**, v. 25, p. 23-31, 1984.

AJIJAH, N.; HARTATI, R. S.; RUBIYO; SUKMA, D.; SUDARSONO. Effective cacao somatic embryo regeneration on kinetin supplemented DKW medium and somaclonal variation assessment using SSRs markers. **AGRIVITA Journal of Agricultural Science**. v. 38. p. 80-92, 2016.

AJIJAH, N.; RUBIYO; SUDARSONO. Callogenesis and somatic embryogenesis of cacao using thidiazuron through one step of callus induction (in Indonesian). **Jurnal Penelitian Pertanian Tanaman Industri**, v. 20, n. 4, p. 179–186, 2014.

AREMU, A. O.; BAIRU, M. W.; DOLEŽAL, K.; FINNIE, J. F.; VAN STADEN, J. Topolins: a panacea to plant tissue culture challenges?. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 108, p. 1–16, 2012.

AWOTEDU, B. F.; OMOLOLA, T. O.; AKALA, A. O.; AWOTEDU, O. L.; OLAOTI-LAARO, S. O. Vegetative Propagation: A Unique Technique of Improving Plants Growth. **World News of Natural Sciences**, v. 35, p. 83-101, 2021.

BARRUETO CID, L. P. **Cultivo in vitro de plantas**. 3ª edição. EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, 2013.

BARRUETO CID, L. P.; ILLG, R. D.; PIEDRABUENA, A. E. Regeneration of garlic plants (*Allium sativum* L., cv “Chonan”) via cell culture in liquid medium. **In Vitro-Plant**, v. 30, p. 150-155, 1994.

BENSON, E. E. ; ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K. A. Oxidative stress in recalcitrant tissue cultures of grapevine. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 16, n. 3, p. 355-362, 1994.

- BERBIYE, I. Y. **Raw cocoa (*Theobroma cacao* L.) quality parameters with special reference to West Africa**. Tese (PhD), University of Hamburg, Hamburg, 144 p., 2014.
- BOUTCHOUANG, R. P.; AKITIO, O. F. Z.; TCHOUATCHEU, A. G. N.; NIEMENAK, N. Influence of the position of flowers buds on the tree on somatic embryogenesis of cocoa (*Theobroma cacao* L.). **International Journal of Plant Physiology and Biochemistry**, v. 8, n. 2, p. 7-16, 2016.
- BUSTAMI, M. U.; WERBROUCK, S. P. Comparison of two protocols for somatic embryo induction in a Sulawesi elite *Theobroma cacao* L. clone. **Acta Horticulturae**, v. 1155, p. 71-76, 2017.
- CAMPOS, S. S. de; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; BERND, R. B.; FIOR, C. S.; SCHWARZ, S. F. Somatic embryogenesis as an alternative for in vitro multiplication of *Butia odorata* from mature zygotic embryos. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 92, supl. 1, 2020.
- CARDOSO, J. C.; GERALD, L. T. S.; SILVA, J. A. T. da. Micropropagation in the Twenty-First Century. In: LOYOLA-VARGAS, V. M.; OCHOA-ALEJO (eds.). **Plant Cell Culture Protocols**, 4. ed., Humana Press, 507 p., 2018.
- CARNEIRO, W. M. A.; BRAINER, M. S. de C. P.; SANTOS, J. A. N. dos S.; SOUZA, G. S. de; SILVA, C. E. G. e. A agroindústria de alimentos derivados de cacau no nordeste brasileiro. **Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural**. 2008.
- CARVALHO, D. C. de; BIASI, L. A.; RIBAS, L. L. F.; TELLES, C. A.; ZANETTE, F. Embriogênese somática do caquizeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, n. 2, 2004.
- CERRI, M.; REALE, L.; ZADRA, C. Metabolite storage in *Theobroma cacao* L. seed: cyto-histological and phytochemical analyses. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, n. 1599.
- CHAN, J. L.; SAÉNZ, L.; TALAVERA, C.; HORNING, R.; ROBERT, M.; OROPEZA, C. Regeneration of coconut (*Cocos nucifera* L.) from plumule explants through somatic embryogenesis. **Plant Cell Reports**, v. 17, p. 515-521, 1998.
- CRUZ, K.Z.C.M.; ALMEIDA, F.A.; VALE, E.M.; BOTINI, N.; VETTORAZZI, G.; SANTOS, R.C.; SANTA-CATARINA, C.; SILVEIRA, V. PEG induces maturation of somatic embryos of *Passiflora edulis* Sims 'UENF Rio Dourado' by differential accumulation of proteins and modulation of endogenous contents of free polyamines. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 150, p. 527-541, 2022.
- CURRIER, H. B. Callose substances in plant cells. **American Journal of Botany**, v. 44, n. 6, p. 478-488, 1957.
- DE DIEGO, N.; MONTALBÁN, I. A.; LARRINOVA, E. F. de; MONCALEÁN, P. In vitro regeneration of *Pinus pinaster* adult trees. **Canadian Journal of Forest Research**, v. 38, p. 2607-2615, 2008.
- DELPORTE, F.; PRETOVA A., DU JARDIN, P.; WATILLON, B. Morpho-histology and genotype dependence of *in vitro* morphogenesis in mature embryo cultures of wheat. **Protoplasma**, v. 251, p. 1455-1470, 2014.
- DIAS, D. R.; SCHWAN, R. F.; FREIRE, E., S.; SERÔDIO, R. dos S. Elaboration of a fruit wine from cocoa (*Theobroma cacao* L.) pulp. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 42, p. 319-329, 2007.
- DÍAZ-VALDERRAMA, J. R.; LEIVA-ESPINOZA, S. T.; AIME, M. C. The history of cacao and its diseases in the Americas. **Phytopathology**, v. 110, p. 1604-1619, 2020.
- DRIVER, J. A.; KUNIYUKI, A. H. *In vitro* Propagation of Paradox Walnut Rootstock. **HortScience**, v. 19, p. 507-509, 1984.

- ENTUNI, G.; EDWARD, R.; NORI, H.; JAAFAR, A. K. M. Field performance of selected Malaysian cocoa clones regenerated through somatic embryogenesis cultures. **Malaysian Applied Biology**, v. 47, n. 1, p. 97-102, 2018.
- ESAN, E. B. Tissue culture studies on cacao (*Theobromae cacao* L.): a supplementation of current research. In: INTERNATIONAL CACAO RESEARCH CONFERENCE, 5., 1875. **Proceedings**. Ibadan, Nigeria: Cacao Research Institute, 1977. p. 116-125.
- ESCHRICH, W.; CURRIER, H. B. Identification of callose by its diachrome and fluorochrome reactions. **Stain Technology**, v. 39, p. 303-307, 1964.
- FANG, J.-Y.; WETTEN, A.; ADU-GYAMFI, R.; WILKINSON, M., RODRÍGUEZ-LÓPEZ, C. M. R. Use of secondary somatic embryos promotes genetic fidelity in cryopreservation of cocoa (*Theobroma cacao* L.). **Agricultural and Food Science**, v. 18, p. 152–159, 2009.
- FAOSTAT. **Food and agriculture organization of the United Nations**. 2022. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en>>. Acesso em 29/04/2022.
- FEHÉR, A. Somatic embryogenesis – stress-induced remodeling of plant cell fate. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1849, n. 4, p. 385-402, 2015.
- FEHÉR, A. Why somatic plant cells start to form embryos? In: MUJIB, A., SAMAJ, J. (eds). **Somatic Embryogenesis** (Plant Cell Monographs Book 2) Springer-Verlag Berlin Heidelberg. p. 85-101, 2005.
- FEHÉR, A.; PASTERNAK T.P.; DUDITS, D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, n. 74, p. 201–228, 2003.
- FIGUEIRA, A.; JANICK, J. Development of nucellar somatic embryos of *Theobromae cacao*. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 336, p. 231-238, 1993.
- FIGUEIRA, A.; JANICK, J. Somatic embryogenesis in cacao (*Theobroma cacao* L.). **Forestry Sciences**, p. 291–310, 1995.
- GABE, M. **Techniques histologiques**. Paris: Masson et Cie, 1113 p., 1968.
- GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**. v. 50, p. 151–158, 1968.
- GARCIA, C.; CORRÊA, F.; FINDLEY, S.; ALMEIDA, A-A.; COSTA, M.; MOTAMAYOR, J. C.; SCHNELL, R.; MARELLI, J-P. Optimization of somatic embryogenesis procedure for commercial clones of *Theobroma cacao* L. **African Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 36, p. 1936–1951, 2016.
- GELDNER, N.; FRIML, J.; STIERHOF, Y.-D.; JÜRGENS, G.; PALME K. Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. **Nature**, n. 413, p. 425-428, 2001.
- GLOBAL Cocoa Market Outlook. Expert Market Research, 2023. Disponível em: <<https://www.expertmarketresearch.com/reports/cocoa-market>>. Acesso em: 20 set. 2023.
- GUAN, Y.; LI, S-G.; FAN, X-F.; SU, Z-H. Application of Somatic Embryogenesis in Woody Plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. 938, 2016.

- GUILLOU, C.; FILLODEAU, A.; BRULARD, E.; BRETON, D.; MARASCHIN, S. F.; VERDIER, D.; SIMON, M.; DUCOS, J. Indirect somatic embryogenesis of *Theobroma cacao* L. in liquid medium and improvement of embryo-to-plantlet conversion rate. ***In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant***, v. 54, n. 4, p. 377–391, 2018.
- GUILLOU, C.; VERDIER, D. *Theobroma cacao*: Somatic Embryogenesis. In: RAMIREZ-MOSQUEDA, M. A. (ed.). Somatic Embryogenesis: Methods and Protocols. ***Methods in Molecular Biology***, v. 2527. Humana: Nova York, 2022.
- GUILTINAN, M. J.; VERICA, J.; ZHANG, D.; FIGUEIRA, A. Genomics of *Theobroma cacao*, “the Food of the Gods”. ***Genomics of Tropical Crop Plants*** (Moore, P.H. and Ming, R., eds), pp. 145–170, 2008.
- GUTMANN, M.; VON ADERKAS, P.; LABEL, P.; LELU, M. A. Effects of abscisic acid on somatic embryo maturation of hybrid larch. ***Journal of Experimental Botany***, v. 47, n. 12, p. 1905–1917, 1996.
- GUIRACOCHA, G.; HARVEY, C.; SOMARRIBA, E.; KRAUSS, U.; CARRILLO, E. Conservación de la biodiversidad en sistemas agroforestales con cacao y banano en Talamanca, Costa Rica. ***Agroforestería en las Américas***, v. 8, n. 30, p. 7-11, 2001.
- HAND, M. L.; VRIES, S. de; KOLTUNOW, A. M. G. A Comparison of *In vitro* and In Vivo Asexual Embryogenesis. In: GERMANÀ, M. A.; LAMBARDI, M. (eds.) ***In vitro Embryogenesis in Higher Plants***. 558 p., Humana Press, 2016.
- HANDRO, W.; FLOH, E. I. S. Aspectos básicos do controle da morfogênese *in vitro*. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (eds.). ***Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas***, Embrapa, 1990.
- HERRERA-GARCÍA, K.; ARAGÓN-OBANDO, E.; AGUILAR-BUSTAMANTE, V. Diversidad genética en 105 accesiones de cacao (*Theobroma cacao* L.) colectadas en Nicaragua, utilizando 10 marcadores moleculares tipo SSR. ***La Calera***, v. 15, n. 25, p. 54–62, 2015.
- HUGHES, J.; MCCULLY, M. E. The use of an optical brightener in the study of plant structure. ***Stain Technology***, v. 50, p. 319-329, 1975.
- ILIEV, I.; GAJDOŠOVÁ, A.; LIBIAKOVÁ, G.; JAIN, S. M. Plant Micropropagation. In: DAVEY, M. R.; ANTHONY, P. ***Plant Cell Culture: Essential Methods***. Wiley-Blackwell, 341 p., 2010.
- JOHANSEN, D. ***Plant microtechnique***. New York: Mc Graw Hill, 523 p. 1940.
- KALVATCHEV, Z.; GARZARO, D.; CEDEZO, F. G. *Theobroma cacao* L.: Un nuevo enfoque para nutrición y salud. ***Agroalimentaria***, n. 6, p. 23-25, 1998.
- KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron-microscopy. ***Journal of Cell Biology***, v. 27, p. 137-138A, 1965.
- KONIECZNY, R.; SLIWINSKA, E.; PILARSKA, M.; TULEJA M. Morphohistological and flow cytometric analyses of somatic embryogenesis in *Trifolium nigrescens* Viv. ***Plant Cell, Tissue and Organ Culture***, v. 109, p. 131-141, 2012.
- KONONOWICZ, A. K.; JANICK, J. The influence of carbon source on the growth and development of asexual embryos of *Theobroma cacao*. ***Physiologia Plantarum***, v. 61, p. 155-162, 1984.
- KONONOWICZ, H.; KONONOWICZ, A. K.; JANICK, J. Asexual Embryogenesis via Callus of *Theobroma cacao* L. ***Zeitschrift für Pflanzenphysiologie***, v. 113, n. 4, p. 347-358, 1984.

- KOUASSI, M. K.; KAHIA, J.; KOUAME, C. N.; TAHI, M. G.; KOFFI, E. K. Comparing the effect of plant growth regulators on callus and somatic embryogenesis induction in four elite *Theobroma cacao* L. genotypes. **HortScience**, v. 52, n. 1, p. 142–145, 2017.
- KRIKORIAN, A. D.; BERQUAM, D. L. Plant cell and tissue culture: the role of Haberlandt. **Botanical Review**, v. 35, p. 59–88, 1969.
- LALIBERTÉ, B.; END, M. (ed.). Supplying new cocoa planting material to farmers: a review of propagation methodologies. **Bioversity International**, Rome, Italy. 200 p. 2015.
- LAMEIRA, O. A.; LEMOS, O. F.; MENEZES, I. C. de; PINTO, J. E. B. P. **Cultura de Tecidos (manual)**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2000. 41 p. (Embrapa Amazônia Oriental. Documentos, 66).
- LEÃO, A. C. **O cultivo do Cacau no Brasil**. Itabuna: Allana, 2010.
- LI, X.; KRASNYSKI, S. F.; KORBAN, S. S. Somatic embryogenesis, secondary somatic embryogenesis, and shoot organogenesis in *Rosa*. **Journal of Plant Physiology**. v. 159, p. 313–319, 2002.
- LI, Z.; TRAORE, A.; MAXIMOVA, S.; GUILTINAN, M. J. Somatic embryogenesis and plant regeneration from floral explants of cacao (*Theobroma cacao* L.) using thidiazuron. **In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v. 34, p. 293–299, 1998.
- LIN, C. S.; LIN H. L.; JANE, W. N.; HSIAO, H. W.; LIN, C. C.; JHENG, F. Y., CHANG, W. C. Changes in the morphology and cation content of a *Bambusa edulis* xylem mutant, vse, derived from somaclonal variation. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 131: p. 445–451, 2006.
- LITZ, R. E. **Tissue culture studies with *Theobroma cacao***. In: DIMICK, P. S. (Ed.). Proceedings of the Cacao Biotechnology Symposium. Pennsylvania State: University Park, 1986. p. 111–120.
- LIU, C.P.; YANG, L.; SHEN, H.L. Proteomic analysis of immature *Fraxinus mandshurica* cotyledon tissues during somatic embryogenesis: effects de of explant browning on somatic embryogenesis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p. 13692–13713.
- LLOYD, G.; MCCOWN, B. H. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, (*Kalmia latifolia*) by use of shoot tip culture. **Combined Proceedings of International Plant Propagators' Society**, v. 30, p. 421–427, 1980.
- LOPEZ-BAEZ, O.; BOLLON, H., ESKEA, A.; PETIARD, V. Embryogénese somática de cacaoyer *Theobroma cacao* L. à partir de pièces florales. **C.R. Acad. Sci.**, v. 316, p. 579–584, 1993.
- LOYOLA-VARGAS, V. M.; OCHOA-ALEJO, N. An Introduction to Plant Tissue Culture: Advances and Perspectives. In: LOYOLA-VARGAS, V. M.; OCHOA-ALEJO (eds.). **Plant Cell Culture Protocols**, 4. ed., Humana Press, 507 p., 2018.
- MACIEL, A. L. de R.; PASQUAL, M.; PEREIRA, A. R.; REZENDE, J. C. de; SILVA, A. B. da; DUTRA, L. F. Embriogênese somática indireta em explantes foliares de *Coffea arabica* L. cv. Obatã. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, n. 1, p. 107–116, 2003.
- MANLÉ, T. E.; KOUASSI, K. M.; SOUMAHORO, B. A.; KONÉ, T.; Edmond KOFFI, K. E.; KONÉ, M. Effect of water stress induced by polyethylene glycol 6000 on the somatic embryos conversion into whole plantlets in cacao (*Theobroma cacao* L.). **International Journal of Biological and Chemical Sciences**, v. 15, n. 1, p. 12–25, 2021.

- MARELLI, J.; GUEST, D. I.; BAILEY, B. A.; EVAN, H. C.; BROWN, J. K.; JUNAID, M.; BARRETO, R. W.; LISBOA, D. O.; PUIG, A. S. Chocolate under threat from old and new cacao diseases. **The American Phytopathology Society**, v. 109, n. 8, p. 1331-1343, 2019.
- MARTINS, J.; CORREIA, S.; PINTO, G.; CANHOTO, J. Cloning adult trees of *Arbutus unedo* L. through somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 150, p. 611-626, 2022.
- MAXIMOVA, S. N.; ALEMANNI, L.; YOUNG, A.; FERRIERE, N.; TRAORE, A.; GUILTINAN, M.J. Efficiency, genotypic variability, and cellular origin of primary and secondary somatic embryogenesis of *Theobroma cacao* L. **In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 8, p. 252–259, 2002.
- MEIRA, F. S.; LUIS, Z. G.; CARDOSO, I. M. A. S.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Somatic embryogenesis from leaf tissues of macaw palm [*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.]. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 92, n. 3, 2020.
- MENEZES, T. S. A.; SANTOS, T. C.; ARRIGONI-BLANK, M. de F.; BLANK, A. F. Embriogênese somática de variedades superiores de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). **Revista Geintec**, v. 2, n. 1, p. 32-41, 2012.
- MICHAUX-FERRIÈRE, N.; CARRON, M-P. Histology of early somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*: the importance of the timing of subculture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 19, p. 243-256, 1989.
- MINYAKA, E.; NIEMAK, N.; SANGARE, F. A.; NDOUMOU, O. D. Effect of MgSO₄ and K₂SO₄ on somatic embryo differentiation in *Theobroma cacao* L. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 94, n. 2, p. 149–160, 2008.
- MODESTE, K.; ELIANE, M.T.; DAOUDA, K.; BRAHIMA, S.A; TCHOA, K.; KOUABLAN, K.E.; MONGOMAKÉ, K. Effect of antioxidants on the callus induction and the development of somatic embryogenesis of cocoa [*Theobroma cacao* (L.)]. **Australian Journal of Crop Science**, v. 11, n. 1, p. 25-31, 2017.
- MOTAMAYOR, J. C.; RISTERUCCI, A. M.; LOPEZ, P. A.; ORTIZ, C. F.; MORENO, A.; LANAUD, C. Cacao domestication I: the origin of the cacao cultivated by the Mayas. **Heredity**, v. 89, p. 380-386, 2002.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- N'ZI, J.-C.; KAHIA, J.; DIBY, L.; KNORASEKIN, T.; SITI NORHANA, M. A.; KASRAN, R. Induction and propagation of somatic embryos from cell suspension cultures of *Theobroma cacao* L., n. 12, p. 133-139, 2020. OUAMÉ, C. Combatibility of ten elite cocoa (*Theobroma cacao* L.) clones. **Horticulturae**, v. 3, n. 45, 2017.
- NAIR, K. P. P. **The agronomy and economy of important tree crops of the developing world**. Elsevier, 368 p., 2010.
- NIEMENAK, N.; KAISER, E.; MAXIMOVA, S.N.; LAREMORE, T.; GUILTINAN, M.J. Proteome analysis during pod, zygotic and somatic embryo maturation of *Theobroma cacao*. **Journal of Plant Physiology**, v. 15, n. 180, p. 49-60.
- NOAH, A.M.; NIEMENAK, N.; SUNDERHAUS, S.; HAASE, C.; OMOKOLO, D.N.; WINKELMANN, T.; BRAUN, H.-P. Comparative proteoma analysis of early somatic and zygotic embryogenesis in *Theobroma cacao* L. **Journal of Proteomics**, v. 78, p. 123-33, 2013.
- NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, R.; OLIVEIRA, L. M. de; SOARES, G. de A.; SOARES, F. P.; CASTRO, A. H. F.; PAIVA, P. D de O. Indução de calos em explantes foliares de Murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 2, p. 366-370, 2007.

- NOLAN, K. E.; ROSE, R. J. Plant Regeneration - Somatic Embryogenesis. In: DAVEY, M. R.; ANTHONY, P. **Plant Cell Culture: Essential Methods**. Wiley-Blackwell, 341 p., 2010.
- NORASEKIN, T.; SITI NORHANA, M. A.; KASRAN, R. Induction and propagation of somatic embryos from cell suspension cultures of *Theobroma cacao* L. **Malaysian Cocoa Journal**, v. 12, p. 133-139, 2020.
- NOVÁK, F. J.; DONINI, B.; OWUSU, G. Somatic embryogenesis and *in vitro* plant development of cocoa (*Theobroma cacao*). In: International symposium on nuclear techniques and *in vitro* culture for plant improvement. **Proceedings**. Vienna: IAEA, p. 443-449, 1986.
- O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MCCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, v. 59, p. 368-373, 1964.
- O'BRIEN T. P.; MCCULLY, M. E. **The study of plant structure: principles and selected methods**. Melbourne: Termarcarphi, 358 p., 1981.
- ORCHARD, J. E.; COLLIN, H. A.; HARDWICK, K. Culture of shoot apices of *Theobroma cacao*. **Physiologia Plantarum**, v. 47, n. 4, p. 207-210, 1979.
- PAIVA, R.; PAIVA, P. D. de O. **Cultura de Tecidos**. UFLA/FAEPE, 97 p., 2001.
- PANCANINGTYAS, S. Callogenesis and Embryogenic Potential of New Superior Cocoa (*Theobroma cacao* L.) Genotypes Treated with Ascorbic Acid. **Pelita Perkebunan**, v. 37, n. 3, p. 184-196, 2021.
- PANCANINGTYAS, S., Characterizing Patterns in Developmental Stages of Somatic Embryo of Cocoa (*Theobroma cacao* L.). In **Enhancing Strategic Plant Physiological Research and Technologies for Sustainable Resources**, Indonesia: Malaysian Society of Plant Physiology p. 180-188, 2015a.
- PANCANINGTYAS, S. Evaluation of quantity and hyperhydricity of cocoa somatic embryo obtained from solid culture, liquid culture, and sequence subculture. **Pelita Perkebunan**, n. 29, p. 10-19, 2013.
- PANCANINGTYAS, S. Study on the presence and influence of phenolic compounds in callogenesis and somatic embryo development of cocoa (*Theobroma cacao* L.). **Pelita Perkebunan**, v. 31, n. 1, p. 14-20, 2015.
- PEARSE, A. G. E. **Histochemistry: theoretical and applied**. London: Churchill, 3ª edição, 518 p., 1972.
- PEDROSO, M. C.; TAVARES, R.; LINO-NETO, T.; ROUBELAKIS-ANGELAKIS, M. S. PAIS. Early events in somatic embryogenesis induction. In: AHUJA, M. R.; BOERJAN, W.; NEALE, D. B. (ed.) **Somatic cell genetics and molecular genetics of trees**. The Netherlands: Kluwer Acad. Publishers, 1996. p. 17-22.
- PENCE, V.; HASEGAWA, M.; JANICK, J. Asexual Embryogenesis in *Theobroma cacao* L. **Journal of American Society for Horticultural Science**, v. 104, n. 2, p. 145-148, 1979.
- PEREIRA, A. R.; CARVALHO, S. P. de; PASQUAL, M.; SANTOS, F. C. Embriogênese somática direta em explantes foliares de *Coffea arabica* L. cv. acaia cerrado: efeito de cinetina e ácido giberélico. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 2, p. 332-336, 2007.
- PHILLIPS, R. L.; KAEPLER, S. M.; OLHOFT, P. Genetic instability of plant tissue cultures: break down of normal controls. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v. 91, p. 5222-5226, 1994.

PINTO, G.; PARK, Y. S.; SILVA, S.; NEVES, L.; ARAUJO, C.; SANTOS, C. Factors affecting maintenance, proliferation, and germination of secondary somatic embryos of *Eucalyptus globulus* Labill.: Basalmedium and anti-browning agents. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 95, n. 1, p. 69–78, 2008.

PINTO, G.; SILVA, S.; NEVES, L.; ARAÚJO, C.; SANTO, C. Histochemical changes and reserve accumulation during somatic embryogenesis in *Eucalyptus globulus*. **Trees**, v. 24, p. 763–769, 2010.

POSSE, R. P.; OLIVEIRA, V. de S.; VALANI, F.; SILVEIRA, S. S.; SILVA, S. M. F. da; SOUZA, C. A. S.; POSSE, S. C. P.; COSTA, G. S.; SCHMILDT, E. R. Sexual propagation of common Bahia cocoa seedlings (*Theobroma cacao* L.) influenced by irrigation depths and the planting seasons. **Australian Journal of Crop Science**, v. 14, n. 10, p. 1583–1588, 2020.

QUAINOO, A. K.; DWOMO, B. I. The effect of TDZ and 2, 4-D concentrations on the induction of somatic embryo and embryogenesis in different cocoa genotypes. **Journal of Plant Science**, v. 1, n. 72, 2012.

QUAINOO, A.; WETTEN, A.; ALLAINGUILLAUME, J. The effectiveness of somatic embryogenesis in eliminating the cocoa swollen shoot virus from infected cocoa trees. **Journal of Virological Methods**, v. 149, p. 91–96, 2008.

QUAINOO, A. K.; DWOMO, B. I. The effect of TDZ and 2,4-D concentrations on the induction of somatic embryo and embryogenesis in different cocoa genotypes. **Journal of Plant Studies**, v. 1, n. 1, p. 72–78, 2012.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna: R foundation for Statistical Computing. 2012. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>> Acesso em: 19/07/2020.

RANGEL-FAJARDO, M.A.; ZAVALA-MANCERA, H.A.; CORDOVA-TÉLLEZ, L.; LÓPEZ-ANDRADE, A.P.; DELGADO-ALVARADO, A.; VIDALES FERNÁNDEZ, I.; VILLEGAS-MONTER, A. Anatomía e histoquímica de la semilla del cacao (*Theobroma cacao* L.) Criollo Mexicano. **Revista de Fitotecnia Mexicana**, v. 35, n. 3, p. 189–197, 2012.

RAMÍREZ, A. M. H.; VASQUEZ, T. H.; OSORIO, T. M. O.; GARCÉS, L. A.; TRUJILLO, A. I. U. Evaluation of the potential of regeneration of different Colombian and commercial genotypes of cocoa (*Theobroma cacao* L.) via somatic embryogenesis. **Scientia Horticulturae**, v. 229, p. 148–156, 2018.

RODRÍGUEZ-LÓPEZ C. M. R.; WETTEN A. C., WILKINSON M. J. Detection and quantification of in vitro-culture induced chimerism using simple sequence repeat (SSR) analysis in *Theobroma cacao* (L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 110: p. 157–166, 2004.

RODRÍGUEZ-LÓPEZ, C. M. R.; WETTEN, A. C.; WILKINSON, M. J. Progressive erosion of genetic and epigenetic variation in callus-derived cocoa (*Theobroma cacao*) plants. **New Phytologist**, v. 186, p. 856–868, 2010.

RÚA, A. M. G.; RAMÍREZ, A. M. H.; TRUJILLO, A. I. U.; GARCÉS, L. A. Polyphenols distribution and reserve substances analysis in cocoa somatic embryogenesis. **Acta Biológica Colombiana**, v. 21, n. 2, p. 335–345, 2016.

SAÉNZ, L.; AZPEITIA, A.; CHUC-ARMENDARIZ, B.; CHAND, J. L.; HOCHER, V.; OROPEZA, C. Morphological and histological changes during somatic embryo formation from coconut plumule explants. **In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 42, p. 19–25, 2006.

SANDOVAL, E. Y. A.; MERCHÁN, P. J. A.; RODRIGUEZ, A. F. B.; DÍAZ, E. P.; SERRANO-CELY, P. A. Estado actual de la cacaocultura: una revisión de sus principales limitantes. **Revista Ciencia y agricultura**, v. 17, n. 2, p. 1–11, 2020.

SANÉ, D.; ABERLENE-BERTOSSI, F.; GASSAMA-DIA, Y. K.; SAGNA, M.; TROUSLOT, M. F.; DUVAL, Y.; BORGEL, A. Histochemical analysis of callogenesis and somatic embryogenesis from cell suspensions of date palm (*Phoenix dactylifera*). **Annals of Botany**, v. 98, p. 301–308, 2006.

- SANTOS, R. C.; PIRES, J. L.; CORREA, R. X. Morphological characterization of leaf, flower, fruit and seed traits among Brazilian *Theobroma* L. species. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 59, p. 327–345, 2012.
- SCHWAN, R. F.; WHEALS, A. E. The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 44, p. 205–221, 2004.
- SCHWENDIMAN, J.; PANNETIER, C.; MICHAUX-FERRIÈRE, N. Histology of somatic embryogenesis from leaf explants of the oil palm *Elaeis guineensis*. **Annals of Botany**, v. 62, p. 43-52, 1988.
- SERVIÇO NACIONAL DE APRENDIZAGEM RURAL. **Cacau**: produção, manejo e colheita. Coleção Senar, Brasília, 2018.
- SILVA, A. S.; LUZ, J. M. Q.; RODRIGUES, T. M.; MARQUES, S. V.; MARQUES, R. V.; PASQUAL, M. Diferentes reguladores de crescimento na indução de calos e pró-embriões em anteras de cafeeiro. **Bioscience Journal**, v. 25, n. 4, p. 19-27, 2009.
- SILVA-CARDOSO, I.M.A.; MEIRA, F.S.; GOMES, A.C.M.M.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E. Anatomy and histochemistry of somatic embryogenesis of *Syagrus oleracea* from immature inflorescences under low auxin concentration. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 19, n. 4, p. 444-450, 2019a.
- SILVA-CARDOSO, I. M. de A.; MEIRA F. S.; GOMES, A. C. M. M.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Histology, histochemistry and ultrastructure of preembryogenic cells determined for direct somatic embryogenesis in the palm tree *Syagrus oleracea*. **Physiologia Plantarum**, v. 168, p. 845-875, 2019b.
- SILVA, M. B.; RAMOS, A. de R.; VENTURIERI, G. A. Indução de calos em espécies amazônicas do gênero *Theobroma*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 2, p. 257-265, 2006.
- SILVA, T. dos S.; CARVALHO FILHO, R. S. L.; TANAN, T. T.; ROCHA, T. C.; SANTANA, J. R. F. de. Calogênese em *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. **Ciência Florestal**, v. 30, n. 3, p. 700-717, 2020.
- SILVA NETO, P. J. **Sistema de produção de cacau para a Amazônia Brasileira**. Belém: CEPLAC, 2001.
- SÖNDAHL, M. R.; LIU, S.; BELLATO, C. M.; BRAGIN, A. Cacao somatic embryogenesis. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 336, p. 245-248, 1993.
- SODRÉ, G. A.; GOMES, A. R. S. Cocoa propagation, technologies for production of seedlings. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 41, n. 2, 2019.
- SOUSA, P. C. A. de; SOUZA, S. S. S. E.; MEIRA, F. S.; MEIRA, R. de O.; GOMES, H. T.; SILVA-CARDOSO, I. M. de A.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Piper aduncum* L. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 56, p. 618–633, 2020.
- SOUSA, P. C. A. de; SOUZA S. S. S. e; NOGUEIRA, G. F.; SILVA-CARDOSO, I. M. de A.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Indirect somatic embryogenesis of *Piper hispidinervum* L. and evaluation of the regenerated plants by flow cytometry. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 20, n. 40, 2022.
- TEIXEIRA, J. B.; MARBACH, P. A. S.; SANTOS, M. O. **Otimização da metodologia de embriogênese somática visando a propagação clonal de genótipos elite de cacau (*Theobroma cacao* L.)**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2002.
- THE PLANT LIST**. Version 1.1, 2013. Disponível em: <<http://www.theplantlist.org/>>. Acesso em 29/04/2022.

- TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Vol. I e II. EMBRAPA-CNPq, Brasília, DF, 1998.
- TRAORE, A. Effect of carbon source and explant type on somatic embryogenesis of four cacao genotypes. **Journal of Horticultural Sciences**, v. 41, n. 3, p. 753–758, 2006.
- VIDAL, B. C. Dichroism in collagen bundles stained with xylydine-Ponceau 2R. **Annales d’Histochemie**, v. 15, p. 289-296, 1970.
- VOORA, V.; BERMÚDEZ, S.; LARREA, C. **Global Market Report: cocoa**. International Institute for Sustainable Development, 2019.
- WICKRAMASURIYA A. M.; DUNWELL J.M. Cacao biotechnology: current status and future prospects. **Plant Biotechnology Journal**, v. 16, n. 1, p. 4-17, 2018.
- WOOD, G. A. R.; LASS, R. A. **Cocoa**. Wiley-Blackwell, 4 ed., 2001.
- ZARRILLO, S.; GAIKWAD, N.; LANAUD, C.; POWIS, T.; VIOT, C.; LESUR, I.; FOUET, O.; ARGOUT, X.; GUICHOUX, E.; SALIN, F.; SOLORZANO, R. L.; BOUCHEZ, O.; VIGNES, H.; SEVERTS, P.; HURTADO, J.; YEPEZ, A.; GRIVETTI, L.; BLAKE, M.; VALDEZ, F. The use and domestication of *Theobroma cacao* during the mid-Holocene in the upper Amazon. **Nature Ecology & Evolution**, v. 2, p. 1879-1888, 2018.
- ZHANG, J. H.; ZHANG, S. G.; LI, S. G.; HAN, S. Y.; LI, W. F.; LI, X. M.; QI, L. W. Regulation of synchronism by abscisic-acid-responsive small noncoding RNAs during somatic embryogenesis in larch (*Larix leptolepis*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 116, n. 3, p. 361–370, 2013.
- ZHAO, Y. P.; ZHOU, Y.; GROUT, B. W. W. Variation in leaf structures of micropropagated rhubarb (*Rheum raphanistrum* L.). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 85, p. 115–121, 2006.