



# INDUÇÃO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM CACAU (*Theobroma cacao L.*), VARIEDADE PH16

## INDUCTION OF SOMATIC EMBRYOGENESIS IN CACAO (*Theobroma cacao L.*), VARIETY PH16

Iara Pereira Gomes Pedroza<sup>1</sup>; Inaê Mariê de Araújo Silva-Cardoso<sup>2</sup>; Uilson Vanderlei Lopes<sup>3</sup>; Jonny Everson Scherwinski-Pereira<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Universidade de Brasília (UnB), Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília, DF, CEP 70910-900, Brasil, [iarapedroza2001@gmail.com](mailto:iarapedroza2001@gmail.com), [Apresentador do trabalho](#). <sup>2</sup>Pós-doutoranda, CNPq/Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF. <sup>3</sup>Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC/CEPLAC), Ilhéus, BA, Brasil. <sup>4</sup>Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, EB, Brasília, DF, CEP 70770-901, Brasil. [inaemarie@hotmail.com](mailto:inaemarie@hotmail.com); [uvlopesbr@gmail.com](mailto:uvlopesbr@gmail.com); [jonny.pereira@embrapa.br](mailto:jonny.pereira@embrapa.br).

### INTRODUÇÃO

O Brasil sempre esteve em destaque na produção mundial de cacau (*Theobroma cacao L.*), tanto em qualidade de fruto, com o reconhecimento da Organização Mundial do Cacau (ICCO) como país exportador de cacau 100% fino e de aroma em 2019, quanto em produção, assumindo o 6º lugar na produção mundial (GARCIA, et al., 2016). No entanto, a produção de cacau no Brasil sofreu acentuadas perdas a partir da década de 90, época que era o segundo produtor mundial (EMBRAPA, 2004; GARCIA, et al., 2016). Os principais fatores que levaram a essa acentuada perda de produção foram devido às doenças, especialmente causadas pelo fungo *Moniliophthora perniciosa* (TIRADO-GALLEGO, 2016), a qual causa secamento dos botões florais e diminuição significativa da quantidade de frutos.

Nesse sentido, a embriogênese somática aplicada a genótipos resistentes ou imunes a esse fungo vem sendo considerada uma solução viável para esse problema (GARCIA, et al., 2016). Adicionalmente, essa rota de clonagem possibilita a propagação massal e gera materiais passíveis de serem conservados via criopreservação. Ela também sobrepõe gargalos inerentes às formas tradicionais de propagação, como por enxertia ou sementes (MAXIMOVA et al., 2002). Contudo, adaptações e otimizações dos protocolos já disponíveis na literatura são de fundamental importância para genótipos utilizados comercialmente no Brasil, tendo em vista que a competência embriogênica é genótipo dependente (GARCIA, et al., 2016). Segundo Guillou e Verdeir (2022), cerca de 80% das cultivares de *T. cacao* respondem à embriogênese somática, apesar da forte genótipo-dependência e da alta variabilidade lote a lote. Diante do exposto, este estudo objetivou avaliar o potencial embriogênico de explantes florais (estaminóides) da variedade PH16 de *cacau*, considerada de alto potencial econômico.

### MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados como explantes estaminóides oriundos de botões florais ainda não abertos, coletados de plantas matrizes de *cacau*, variedade PH16. Para tanto, inicialmente os botões florais foram coletados e esterilizados em solução de hipoclorito de sódio 4-6% por 3 minutos, seguido de imersão, por 10 minutos, em solução de álcool 70%, e, por fim, tríplice lavagem em água destilada e autoclavada, por 5 minutos. Os cinco estaminóides presentes em cada botão floral foram separados e inoculados em

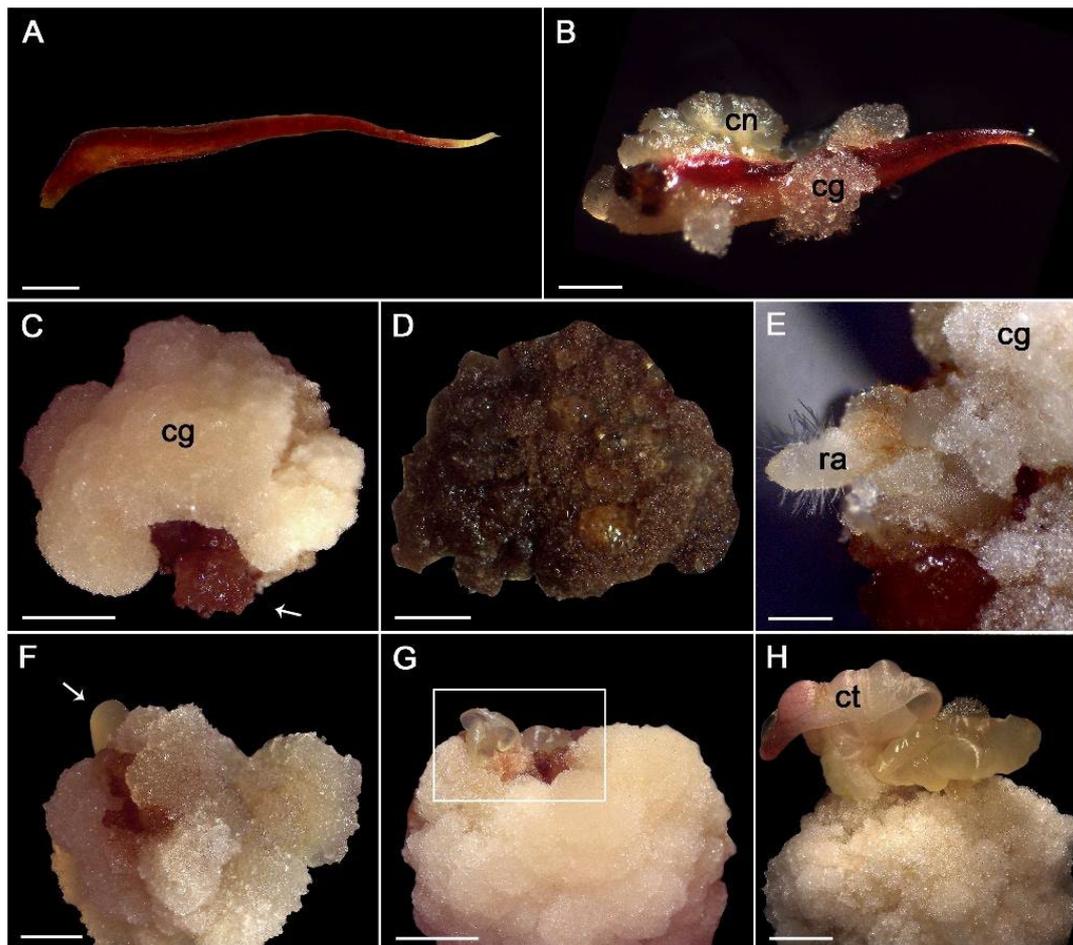


placas de Petri (15 x 90 mm) com o meio de cultura específico, conforme Li et al. (1998). No total foram utilizadas 23 placas, cada uma com 5 explantes (estaminóides). Após 14 dias de indução, os explantes foram transferidos para o meio de indução de calo secundário. Neste meio, os calos permaneceram pelo mesmo período da etapa de indução, até serem transferidos para o último meio, o de desenvolvimento de embriões somáticos por tempo adicional de 4 meses, com subcultivos realizados a cada 14 dias. As avaliações realizadas neste estudo ocorreram semanalmente e antes da troca dos explantes para cada um dos meios especificados acima. Durante o experimento foram avaliadas a taxa de formação de calo, tipo de calo, posição de formação dos calos no estaminoide, taxa de oxidação (escurecimento) e número de embriões somáticos formados.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Imediatamente antes da inoculação dos estaminóides, verificou-se que eles possuíam a aparência representada na Fig. 1A. Após 15 dias no meio de indução de calos, a maioria dos explantes apresentaram formação de calos, que ocorreram principalmente na base, e, eventualmente, no meio e ápice dos estaminóides, conforme Fig. 1B. Os calos possuíam aspecto granular e nodular (Fig. 1B), e foram observados, tanto explantes somente com calos granulares ou nodulares, quanto explante com ambos os tipos de calos. Após 15 dias, verificou-se uma quantidade pouco expressiva de calos oxidados, caracterizados pela presença de uma pequena porção escurecida (Fig. 1C).

Após 40 dias de inoculação inicial dos explantes, mas com os calos por 14 dias em meio de desenvolvimento de embriões somáticos, foi observado um aumento significativo no tamanho das massas calogênicas, com presença de calos granulares e/ou nodulares, similares aos reportados por Garcia et al. (2016). Observaram-se também oxidação mais significativa (Fig. 1D) e formação de embrião somático tipo globular (Fig. 1F). Verificou-se que os calos nodulares possuem uma tendência maior de oxidação, como observado nas Fig. 1C, E.



**FIGURA 1** - Caracterização da embriogênese somática a partir de estaminoides em cacau, variedade PH16. A. Estaminóide imediatamente antes da inoculação. B. Estaminóide com calos granulares e nodulares após 15 dias de cultivo. C. Calo com sua parte granular não oxidada e a parte nodular oxidada. D. Calo completamente oxidado. E Crescimento radicular com pelos radiculares. F. Embrião somático com formato globular. G Formação de dois pares de cotilédones com bases fusionadas. H. Cotilédones mais desenvolvidos. Abreviações: cn, calo nodular; cg, calo granular; ct, cotilédone; ra, raiz. Barras: A, B, E = 0,5 mm, D, F = 1 mm, C, G, H = 2mm.

Aos 50 dias de cultivo, constatou-se, na maioria das placas de cultivo, a presença de calos envolvendo todo o explante com predominância do calo granular. Não se verificou formação de novos embriões somáticos, embora tenha se constatado a ocorrência de organogênese (formação de raízes) (Fig. 1E).

Após 60 dias não houve mudança significativa em relação à formação de calos, tipos de calos e percentual de oxidação. No entanto foi observada a formação de novos embriões somáticos, em estágio de desenvolvimento mais avançado, com presença de cotilédones (Fig. 1G, H), além de fusão. Maximoxa et al. (2002) também descreveram embriões de cacau anormais, além de baixa taxa de regeneração. Devido à baixa taxa de formação de embriões somáticos normais de cacau a partir da



embriogênese somática primária, tem-se optado pela reindução da embriogênese a partir de cotilédones de embriões somáticos primários, visando à melhoria morfofisiológica dos embriões secundários obtidos (MAXIMOVA, et al. 2002). Outras vantagens de produzir embriões secundários em espécies lenhosas, como o cacau, inclui-se a possibilidade de multiplicação em larga escala de linhas selecionadas (Reamakers; Jacobsen; Visser, 1995).

Na avaliação realizada aos 90 dias, contataram-se mais três calos com mais de um embrião somático fusionado. Todos os embriões foram observados na porção mais oxidada dos calos, o que indica possível influência positiva do estresse oxidativo na morfogênese em cacau, já reportada por outros autores (GARCIA et al., 2016).

Após 140 dias de cultivo, avaliaram-se a taxa de formação de calos, oxidação e a formação de embriões somáticos (Tabela 1). Conforme os dados obtidos, embora tenha havido uma alta taxa de formação de calos (94%), somente uma pequena porção tornou-se embriogênica, com 4% de formação de embriões somáticos. Notou-se também expressiva taxa de oxidação. Essa baixa eficiência na formação de embriões somáticos pode ser uma característica inerente ao genótipo ou um indicativo que as formulações dos meios utilizados, baseados no protocolo de Li et al. (1998), não são apropriadas para o genótipo em questão.

**TABELA 1** - Avaliação da formação de calos, percentual de oxidação e formação de embriões somáticos a partir de estaminóides de cacau, variedade PH16, após 140 dias de cultivo.

<b>Avaliação após 140 (%)</b>	
<b>Formação de calos</b>	<b>94</b>
<b>Formação de embriões somáticos</b>	<b>4</b>
<b>Taxa de oxidação do explante (% da área total do estaminóide)</b>	
<b>Nº de estaminóide com 25% de oxidação</b>	<b>59</b>
<b>Nº de estaminóide com 50% de oxidação</b>	<b>17</b>
<b>Nº de estaminóide com 75% de oxidação</b>	<b>24</b>
<b>Nº de estaminóide com 100% de oxidação</b>	<b>49</b>



## CONCLUSÃO

A variedade de cacau PH16 possui alta formação de calos granulares, caracterizados como de baixo potencial embriogênico. A taxa de formação de embriões somáticos, sob as condições de estudo, é, com alta frequência de anormalidade, sendo necessárias, portanto, otimizações futuras do protocolo testado.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- EMBRAPA. Importância Econômica e Evolução da Cultura do Cacau no Brasil e na Região dos Tabuleiros Costeiros da Bahia entre 1990 e 2002. **Documentos 72**. ISSN 1678-1953, 2004.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Data Production and Trade**. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>. Acesso em: 28, jun, 2023.
- 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.
- GUILLOU, C.; VERDIER, D. *Theobroma cacao*: Somatic Embryogenesis. In: **Somatic Embryogenesis: Methods and Protocols**. New York, NY: Springer US, 2022. p. 69-81.
- 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 & Developmental Biology-Plant**, v. 34, p. 293-299, 1998.
- MAXIMOVA, S. N.; ALEMANNI, L.; YOUNG, A.; FERREIRE, 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. 38, p. 252-259, 2002.
- TIRADO-GALLEGO, P. A.; LOPERA-ÁLVAREZ, A.; RÍOS-OSORIO, L. A.. Estrategias de control de *Moniliophthora roreri* y *Moniliophthora perniciosa* en *Theobroma cacao* L.: revisión sistemática. **Ciencia y Tecnología Agropecuaria**, v. 17, n. 3, p. 417-430, 2016.