



IDENTIFICAÇÃO DE ANORMALIDADES EM EMBRIÕES SOMÁTICOS DE *Theobroma cacao* L. DURANTE A GERMINAÇÃO *in vitro*

IDENTIFICATION OF ABNORMALITIES IN SOMATIC EMBRYOS OF *Theobroma cacao* L. DURING *in vitro* GERMINATION

Leny Paula Lisbôa de Oliveira¹; Inaê Mariê de Araújo Silva²; André Luís Xavier de Souza³; Jonny Everson Scherwinski-Pereira⁴

¹Mestranda da Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, CEP 70910-900, Brasília, DF, Brasil. lenypaula@gmail.com.
Apresentador do trabalho.

²Pós-doutoranda da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, CEP 70770-917, Brasília, DF, Brasil. inaemarie@hotmail.com.

³Analista da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, CEP 70770-917, Brasília, DF, Brasil. andre.luis@embrapa.br.

⁴Pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, CEP 70770-917, Brasília, DF, Brasil. jonny.pereira@embrapa.br.

INTRODUÇÃO

Theobroma cacao L. (cacaueiro) é considerado uma das culturas arbóreas mais relevantes do mundo, devido, sobretudo, a suas sementes, as quais fornecem os ingredientes básicos para a indústria multibilionária do chocolate, dentre outros produtos. Essa espécie lenhosa tem sido cultivada exclusivamente em países de clima tropical (BUSTAMI; WERBROUCK, 2024), para atender, principalmente, o alto consumo per capita de chocolate na Europa, com destaque para a Suíça (11,8 kg/ano) e EUA (9 kg/ano) (STATISTA MARKET INSIGHTS, 2022).

Para atender à crescente demanda deste produto, métodos eficientes de propagação vegetativa precisam ser utilizados, sendo a embriogênese somática considerada uma das opções mais vantajosas e viáveis para a clonagem em massa do cacaueiro (BUSTAMI; WERBROUCK, 2024). Essa rota de micropropagação apresenta vantagens práticas em comparação aos métodos convencionais de propagação, como a possibilidade de geração rápida de plantas uniformes e com características genéticas altamente valorizadas (RAMIREZ et al., 2023).

Contudo, o sucesso da aplicação da embriogênese somática está estritamente ligado à eficiência das etapas de germinação e conversão de plantas, que são dependentes da qualidade morfofisiológica dos embriões somáticos obtidos. Na literatura, são recorrentes relatos de anormalidades, como fusionalamento, falta de meristemas apicais e radiculares, embriões translúcidos e presença de múltiplos cotilédones (revisado por GARCIA et al., 2022). Conforme Garcia et al. (2022), a composição do meio de cultura, condições ambientais e genótipo são alguns dos fatores responsáveis pela ocorrência de anormalidades e que podem ser alterados visando à sobreposição dessa problemática. Diante do exposto, objetivou-se analisar o processo germinativo de embriões somáticos oriundos de estaminoides de um genótipo não comercial de cacaueiro, com ênfase na descrição morfológica de eventos de anormalidade.



MATERIAIS E MÉTODOS

Embriões somáticos (688 no total) foram obtidos a partir de estaminoides extraídos de botões florais de *Theobroma cacao* L. de três genótipos não comerciais ('752', '754' e '755') provenientes de matrizes localizadas na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, Brasil. O experimento foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais 2 (LCT2) da Embrapa supracitada. Para a obtenção dos embriões, os estaminoides foram cultivados numa sequência de meios de cultivos preparados conforme descrito por Li et al. (1998), com modificações (OLIVEIRA, 2023).

Após oito semanas em meio de desenvolvimento de embriões somáticos (LI et al., 1998), 688 embriões somáticos maduros, com hipocótilo e cotilédones, passaram para a etapa de regeneração de plantas. Os embriões foram inseridos em tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo 10 mL de meio de regeneração de plantas. Esse meio foi constituído de 1/5 dos sais do meio de DKW (DRIVER; KUNIYUKI, 1984), acrescido de 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 2 mg L⁻¹ de tiamina-HCL, 1 mg L⁻¹ de ácido nicotínico, 2 mg L⁻¹ de glicina, 5 g L⁻¹ de sacarose, 10 g L⁻¹ de glicose, 0,2 g L⁻¹ de nitrato de potássio e 1,7 g L⁻¹ de Phytigel, conforme protocolo desenvolvido por Li et al. (1998). O pH do meio foi ajustado para 5,8 ± 0,1 e o meio foi esterilizado por autoclavagem à 121 °C, durante 20 minutos, à 1.5 atm de pressão. Nas primeiras duas semanas de cultivo dos embriões somáticos em meio de regeneração de plantas, a concentração de mio-inositol foi de 200 mg L⁻¹, seguindo sua concentração original nas subculturas seguintes.

Os embriões somáticos foram mantidos em sala à 25 °C ± 2 °C e fotoperíodo de 16 h de luz, com intensidade de 100 µmol m² s⁻¹, até obtenção de plantas com ao menos duas folhas maduras e raiz desenvolvidas, com subcultivos realizados a cada quatro semanas. Após esse período, analisaram-se a porcentagem de embriões somáticos convertidos em plantas (emissão de ambos os meristemas), que desenvolveram folhas verdes e raízes de pelo menos 3 cm, bem como a ocorrência de anormalidades diversas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 688 embriões somáticos obtidos a partir dos três genótipos utilizados, somente 123 (17.9%) foram convertidos em plantas completas (com emissão de ambos os meristemas) (Fig. 1A), os quais exibiram folhas verdes e raízes com pelo menos 3 cm. Com quatro semanas de inoculação foram observadas anormalidades variadas (Fig. 1). Cerca de 76.2% das plantas regeneradas apresentaram folhas anormais, com uma ou mais das seguintes características: coloração rosada (Fig. 1B, F, I), fusionalidade (Fig. 1C, G), deficiência em clorofila em pelo menos uma folha (Fig. 1D, E) e dimensões reduzidas, engrossamento e/ou aspecto enrugado (Fig. 1D-F, H, K). Enfatiza-se ainda que se verificaram 0.7% de plantas com folhas normais e 5.52% com folhas normais e anormais na mesma planta.



A maior parte dos embriões somáticos (64.5%) desenvolveu somente parte aérea (Fig. 1I, K). Do total, 16.9% não se desenvolveram, dentre os quais 25.9% ficaram estagnados como embriões (Fig. 1L), 58.6% sofreram oxidação (Fig. 1N) e, os demais (6.9%) foram descartados por contaminação. Constataram-se também embriogênese secundária em 17.6% das plantas regeneradas (Fig. 1J, K).

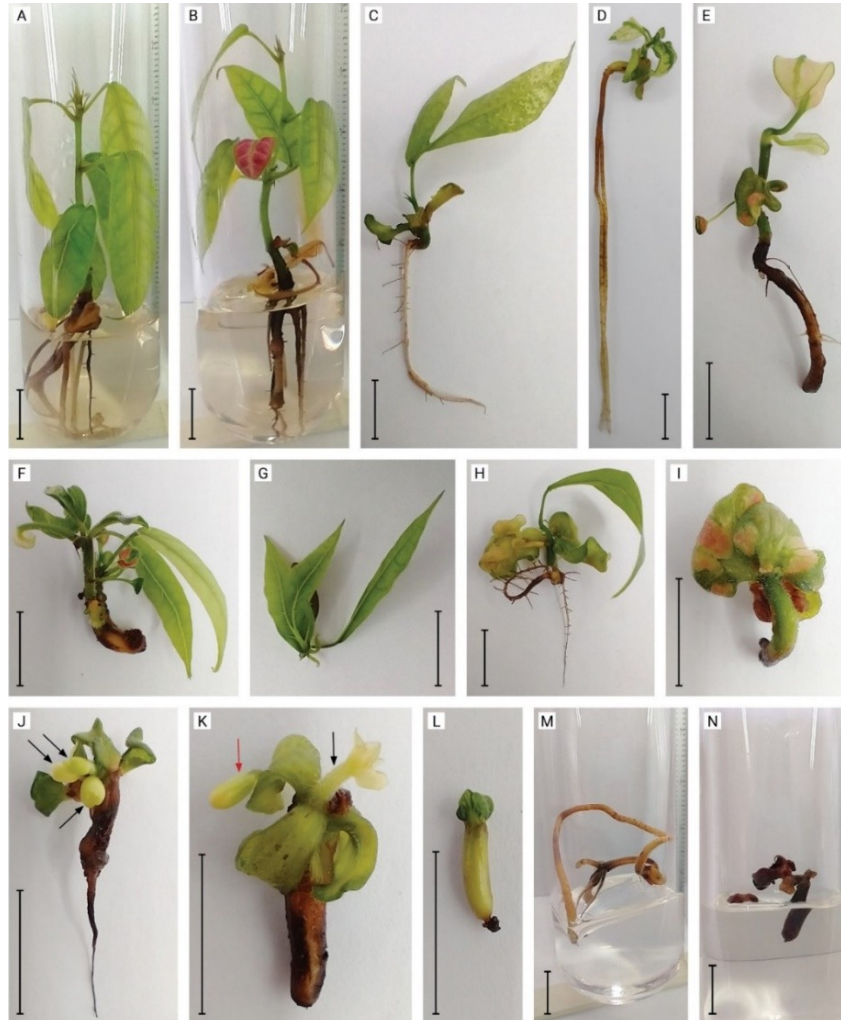


Figura 1. Aspectos morfológicos de embriões somáticos de *Theobroma cacao* L. após quatro semanas em meio de regeneração de plantas. A. Planta de aspecto normal. B. Planta com folha de coloração rosada. C. Planta com folhas fusionadas. D. Planta com folhas subdesenvolvidas e com deficiência em clorofila. 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, K. Plantas apresentando embriogênese secundária; setas pretas indicando embriões somáticos provindos de meristema apical; seta vermelha indicando embriões somáticos oriundos de tecidos foliares. L. Embrião com seu desenvolvimento



estagnado. M. Desenvolvimento somente radicular. N. Oxidação total do embrião após o início do desenvolvimento foliar. Bars: 1 cm.

Embora protocolos de embriogênese somática tenham sido desenvolvidos desde os anos de 1950 (STEWART et al., 1958), anormalidades morfofisiológicas e mesmo morfogenéticas têm sido comumente reportadas nesse sistema para variadas espécies, inclusive para o cacauzeiro (ALEMANNO et al., 1997; TAN; FURTEK, 2003; MONTOYA et al., 2022; GARCIA et al., 2022). Diferentes trabalhos têm atribuído a sua ocorrência à auxina indutora 2,4 diclorofenoxyacético - 2,4-D (GARCIA et al., 2022 OLIVEIRA et al., 2023), ou a longos períodos de exposição a reguladores de crescimento (KHATRI; JOSHEE, 2024). Embriões somáticos anormais comprometem o processo germinativo e a eficiência dessa rota de propagação vegetativa.

Mais recentemente, Garcia et al. (2022) identificaram sete tipos de anormalidades em embriões somáticos primários e secundários de *T. cacao*, com uma taxa média de 81.62%. Tais anormalidades foram associadas a modificações epigenéticas, principalmente, com diferenças nos perfis de metilação de genes envolvidos com desenvolvimento estrutural dos embriões somáticos, transporte de auxina, respostas a estresses abióticos e efeitos da produção de compostos celulares. Tais autores hipotetizaram uma possível participação da síntese de etileno na ocorrência desses fenótipos anormais. O etileno é normalmente associado à falta de oxigênio no ambiente do cultivo *in vitro* (hipoxia) e sua produção pode ser mediada pelo 2,4-D, principal regulador de crescimento utilizado para a indução de calos em cacauzeiro.

CONCLUSÕES

Este trabalho descreve com detalhes as principais anormalidades identificadas durante a germinação de embriões somáticos de *Theobroma cacao* L. e alerta para a importância da realização de estudos detalhados sobre os principais fatores responsáveis pela ocorrência desses eventos na espécie, visando a sua superação e o consequente aumento da eficácia da aplicação da embriogênese somática em cacauzeiro.

REFERÊNCIAS

ALEMANN, L.; BERTHOULY, M.; MICHAUX-FERRIERE, M. A comparison between *Theobroma cacao* L. zygotic embryogenesis and somatic embryogenesis from floral explants. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 33, n. 3, p. 163-172, 1997.

BUSTAMI, M.U.; WERBROUCK, S.P.O. Cyclic somatic embryogenesis in Indonesian elite *Theobroma cacao* L. clones. **Horticulturae**, v. 10, n. 24, p. 1-16, 2024.

DRIVER, J. A.; KUNIYUKI, A. H. In vitro propagation of paradox walnut rootstock. **HortScience**, v. 19, n. 4, p. 507-509, 1984.



GARCIA, C.; ALMEIDA, A.A.F.; COSTA, M.; BRITTO, D. Single-base resolution methylomes of somatic embryogenesis in *Theobroma cacao* L. reveal epigenome modifications associated with somatic embryo abnormalities. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 1-19, 2022.

KHATRI, P.; JOSHEE, N. Effect of picloram and desiccation on the somatic embryogenesis of *Lycium barbarum* L. **Plants**, v. 13, n. 2, 151, p. 1-14, 2024.

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, n. 4, p. 293-299, 1998.

MONTOYA, T.O.; RAMÍREZ, A.M.H.; VASQUEZ, T.H.; TRUJILLO, A.I.U. Propagation of IMC67 plants, universal cacao (*Theobroma cacao* L.) rootstock via somatic embryogenesis. **International Journal of Fruit Science**, v. 22, n. 1, p. 78-94, 2022.

OLIVEIRA, J.P.S.M.; A.J.D.; CATRINCK, M.N.; CLARINDO, W.R. Embryonic abnormalities and genotoxicity induced by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid during indirect somatic embryogenesis in *Coffea*. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, 9689, p. 1-14, 2023.

OLIVEIRA, L.P.L. **Embriogênese somática em variedades de cacau (*Theobroma cacao* L.)**. Dissertação (Mestrado em Botânica). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília. Brasília, p. 92. 2023.

RAMIREZ, A.M.H.; MARTINEZ, D.M.C.; SÁNCHEZ, A.H.R.; TRUJILLO, A.I.U. Propagation of cacao (*Theobroma cacao* L.) clone ‘CCN51’ using somatic embryogenesis: from pilot scale to commercial production. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 98, n. 6, p. 814-826, 2023.

STATISTA MARKET INSIGHTS. Chocolate Confectionery – Worldwide. 2022. Disponível em: <https://www.statista.com/outlook/cmo/food/confectionery-snacks/confectionery/chocolate-confectionery/worldwide>. Acessado em: 04 de março de 2024.

STEWART, F. C.; MAPES M. O.; MEARS K. Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in culture grown freely suspended cells. **American Journal of Botany**, v. 45, n. 10, p. 705-708, 1958.

TAN, C.L.; FURTEK, D.B. Development of an in vitro regeneration system for *Theobroma cacao* from mature tissues. **Plant Science**, v. 164, n. 3, p. 407-412, 2003.