



## UM ESTUDO DO EFEITO DA CRIOPRESERVAÇÃO SOBRE A ANATOMIA DE CALOS DE *Theobroma cacao* L.

### A STUDY OF THE EFFECT OF CRYOPRESERVATION ON THE ANATOMY OF CALLI FROM *Theobroma cacao* L.

Mila Cristine Almeida dos Santos<sup>1</sup>; Inaê Mariê de Araújo Silva<sup>2</sup>; Frederico Henrique da Silva Costa<sup>3</sup>; André Luís Xavier de Souza<sup>4</sup>; Jonny Everson Scherwinski-Pereira<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Mestranda da Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, CEP 70910-900, Brasília, DF, Brasil. [lenypaula@gmail.com](mailto:lenypaula@gmail.com).  
Apresentador do trabalho.

<sup>2</sup>Pós-doutoranda da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, CEP 70770-917, Brasília, DF, Brasil. [inaemarie@hotmail.com](mailto:inaemarie@hotmail.com).

<sup>3</sup>Pós-doutorando. Professor da Universidade Federal do Acre, Rio Branco, AC, Brasil. [frederico.costa@ufac.br](mailto:frederico.costa@ufac.br)

<sup>4</sup>Analista da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, CEP 70770-917, Brasília, DF, Brasil. [andre.luis@embrapa.br](mailto:andre.luis@embrapa.br).

<sup>5</sup>Pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, CEP 70770-917, Brasília, DF, Brasil. [jonny.pereira@embrapa.br](mailto:jonny.pereira@embrapa.br).

## INTRODUÇÃO

O cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.) é uma das culturas comerciais mais importantes nos países tropicais, onde geralmente é plantado para a produção de sementes, matéria-prima valiosa para a indústria do chocolate. Os recursos genéticos de *T. cacao* são fonte de variabilidade genética necessária para o desenvolvimento de novas variedades e melhoramento de cultivares e, conseqüentemente, o aprimoramento do sistema de produção que sustenta a indústria do cacau (OLASUPO; AIKPOKPODION, 2019).

Por apresentar sementes recalcitrantes, a criopreservação configura-se como uma das únicas alternativas para a conservação *ex situ* por longo prazo de germoplasma de cacauzeiro (NIEVES-ORDUÑA et al., 2023). Essa técnica pode ser conceituada como um processo de resfriamento e armazenamento de partes vegetais como células, tecidos ou órgãos em nitrogênio líquido (-196 °C) ou vapor de nitrogênio líquido (-160 °C), visando interromper as reações metabólicas e bioquímicas na célula. Para tal, o material vegetal precisa ser desidratado adequadamente para evitar a formação de cristais de gelo intracelulares, que podem causar morte celular e destruição de organelas celulares durante o processo de congelamento (BENELLI et al., 2021). Dentre os tipos de estruturas que podem ser criopreservadas mencionam-se calos embriogênicos e embriões somáticos. Em cacauzeiro, há relatos escassos de sucesso de protocolos de criopreservação de embriões somáticos (ADU-GYAMFI; WETTEN, 2020).

Conforme Benelli et al. (2021), os protocolos de criopreservação são multietapas. E cada uma delas requer cuidados para garantir o sucesso da criopreservação, associados com investigações detalhadas em termos anatômicos, moleculares e fisiológicos, e procedimentos de cultura *in vitro* necessários para apoiar a recuperação de explantes criopreservados. Nesse contexto, este trabalho objetivou avaliar as modificações morfoanatômicas de explantes florais (estaminoides com calos embriogênicos) de cacauzeiro submetidos à criopreservação.



## MATERIAIS E MÉTODOS

Para análise anatômica, foram coletados estaminoides de *Theobroma cacao* L. (genótipos 752 – não comercial) cultivados por 14 dias em meio de crescimento de calo primário (com calos embriogênicos) e, posteriormente, submetidos à dessecação em 0,3 M de sacarose por 48 horas e, posteriormente, às técnicas de *Vitrification* (20 min em *Loading Solution*; 40 min em *Plant Vitrification Solution 2*) ou *Droplet vitrification*, com e sem imersão em nitrogênio líquido (controle).

Para a anatomia, as amostras foram submetidas às etapas fixação, desidratação, infiltração e polimerização. Para a fixação, as amostras de cada um dos tratamentos, com e sem formação de calos, foram imersas em solução de Karnovsky modificada (KARNOVSKY, 1965), composta por paraformaldeído 4%, glutaraldeído 2,5% e tampão cacodilato de sódio 0,05 M (pH 7,2). Em seguida, foram imersas em solução de cacodilato de sódio (0,05 M, pH 7,2), por três vezes, por um período de uma hora cada, sob vácuo. Para a desidratação, as amostras foram submetidas a um gradiente crescente etanólico. Nas etapas de infiltração e polimerização em historinha (Leica, Heidelberg, Alemanha), seguiram-se as especificações do fabricante. Posteriormente, cortes (3-7 µm) foram obtidos em micrótomo rotativo manual (Leica®, RM212RT), distendidos e aderidos às lâminas microscópicas em placa aquecida à 40 °C. A obtenção e análise de imagens foram realizadas via microscópio Leica DM 750 e programa Leica Application Suite EZ.

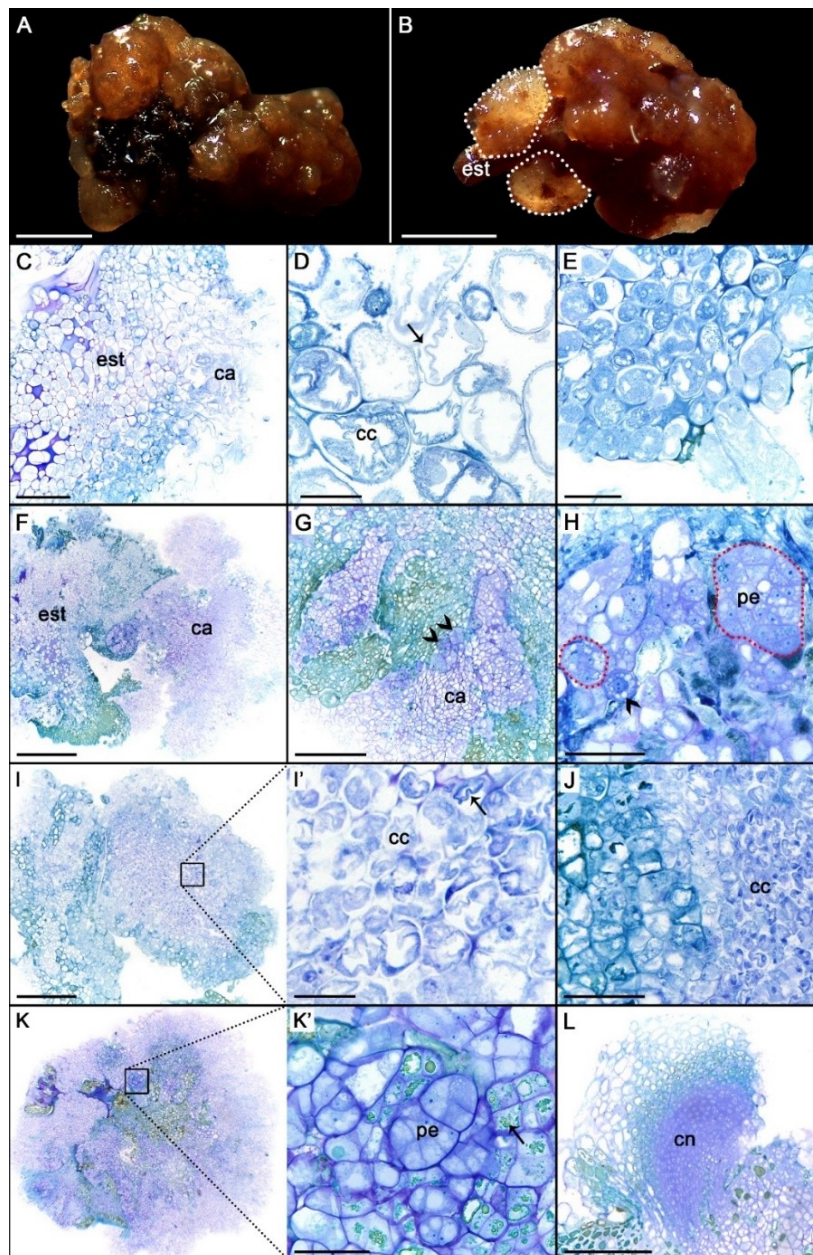
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os calos formados previamente à criopreservação (NL+), independentemente da técnica utilizada, geralmente, eram nodulares, hidratados e escurecidos (alta taxa de oxidação) (Fig. 1A). Os calos formados após a criopreservação surgiam como protuberâncias sobre o explante oxidado e apresentavam coloração mais clara (Fig. 1B). As seções anatômicas dos explantes (estaminoides com calos formados antes e após a criopreservação) evidenciam, de modo geral, a natureza heterogênea da calogênese em cacauero. Os calos de cacauero possuem células não embriogênicas (células mais vacuoladas, com dimensões maiores, sem núcleo e nucléolo visíveis) distribuídas em meio a células com características embriogênicas (alta relação núcleo: citoplasma, núcleo e nucléolos evidentes), além de alta concentração de compostos fenólicos (Fig. 1).

Verificou-se que a capacidade de formação de calos novos foi comprometida após a aplicação da técnica *Vitrification* seguida de imersão em NL (Fig. 1A, C-E), diferentemente do verificado para a técnica *Droplet vitrification* seguida de imersão em NL, a qual exibiu formação de novos calos (Fig. 1B, L). Salienta-se que o tratamento controle (*Vitrification*, sem imersão em NL) proporcionou a formação de novos calos (Fig. 1F-G). Isso indica que essa técnica não garantiu modificações nas características celulares dos explantes que assegurassem a viabilidade após a imersão em NL.

Todos os explantes já com calos presentes submetidos às técnicas de *Vitrification* e *Droplet vitrification*, após imersão em NL, que não produziram calos após a criopreservação, exibiram, características anatômicas similares. As regiões dos estaminoides não reagentes apresentavam células

vacuoladas ricas em compostos fenolicos e os calos formados previamente exibiam células com sinais de plasmolizacão (sem compartimentalizacão clara entre núcleo e citoplasma e presenca de paredes onduladas, com sinuosidades) (Fig. 1C-E, I-J).



**Figure 1.** Aspectos morfoanatômicos de estaminoides de *Theobroma cacao* L. (genótipo 752) sem (A, C-E, I, J) e com (B, F-H, K-L) formacão de calos novos após criopreservacão via técnicas *Vitrification* - V (A, C-H) e *Droplet-vitrification* - DV (B, I-L). A. Estaminóide sem formacão de calos novos. B. Estaminóide com formacão de calos novos (pontilhados). C-E. Secções anatômicas de estaminóides sem novas formacões calogênicas após aplicacão da técnica V e tratamento em Nitrogênio Líquido (NL+); notar calos com células plasmolizadas - citoplasma com ondulações (setas). F. Secçãõ anatômica de estaminóide com novas formacões calogênicas após aplicacão da técnica V, sem passar por tratamento em Nitrogênio Líquido (NL-); notar células ricas em compostos fenólicos esverdeados. G, H. Detalhe da secçãõ anatômica anterior exibindo células embriogênicas (cabeças de seta),



proembriões (pontilhado) e compostos fenólicos (seta). I-J. Secções anatômicas de estaminoídes sem novas formações calogênicas após aplicação da técnica DV e tratamento em NL+. K'. Secções anatômicas de estaminoíde com novas formações calogênicas após aplicação da técnica DV, sem passar por tratamento em Nitrogênio Líquido (NL-). L. Secção anatômica de calo formado após aplicação da técnica DV e tratamento NL+. Abreviações: ca, calo; cm, calo nodular; est, estaminoíde; pe, proembrião.

Segundo Nagel et al. (2024), taxas de congelamento mais baixas podem ocasionar danos às células devido à alta concentração de solutos (efeito tóxico) ou devido elevada desidratação. A ocorrência de plasmolização pode ser uma consequência de estresse osmótico causado pelo congelamento da solução extracelular, o que provoca no aumento das concentrações dos solutos (LIU et al., 2021). Sinais de plasmolização celular similares aos observados aqui foram reportados por Simão et al. (2018), em células radiculares de *Passiflora pohlii*. Como comentado anteriormente, somente alguns explantes submetidos à *Droplet vitrification* conseguiram gerar novas massas de calos após a criopreservação (Fig. 1L).

A *Droplet vitrification* diferencia-se da *Vitrification* no que se refere aos modos de congelamento e descongelamento (ROQUE-BORDA et al., 2021) e é considerado o método mais amplamente utilizado atualmente (NAGEL et al., 2024). O principal diferencial desse método consiste na possibilidade de obtenção de taxas mais elevadas de congelamento e/ou reaquecimento devido a dois fatores: ao baixo volume de meio crioprotetor utilizado, no qual os explantes são colocados, e à condutividade térmica favorável do alumínio (ROQUE-BORDA et al., 2021). Segundo El Merzougui et al. (2023), a *Droplet vitrification* tem como vantagens o contato específico entre o crioprotetor e o explante no interior das gotas e a utilização de folha de alumínio, que por ser um metal com eficiente condutividade térmica, possibilita um resfriamento homogêneo mediante dispersão uniforme de temperatura.

Os calos novos formados após aplicação da técnica *Droplet vitrification* sem imersão em NL (um dos tratamentos controle) apresentavam células com características embriogênicas, algumas isoladas, outras em grupos, formando proembriões com variados números de células (Fig. 1K, K'). Além do mais, esses calos foram caracterizados pela abundância de compostos fenólicos (Fig. 1K'). Esses calos novos assemelham-se histologicamente àqueles formados no tratamento controle (*Vitrification*, sem imersão em NL) (Fig. 1F-H). Já os calos novos que surgiram de explantes submetidos à técnica *Droplet vitrification*, com imersão em NL, foram caracterizados anatomicamente pela presença de grupos de células com características meristemáticas envolvidas por uma camada de células parenquimáticas ricas em compostos fenólicos e por uma camada mais externa de células parenquimáticas desprovidas desses compostos (Fig. 1L). Tais calos apresentam características anatômicas indicativas de potencial embriogênico (MAXIMOVA et al., 2002).



## CONCLUSÕES

Diante do exposto, sugere-se a utilização da técnica *Droplet vitrification* para criopreservação de estaminoides com calos embriogênicos de *Theobroma cacao* L. Embora análises posteriores quanto ao potencial de regeneração desses explantes precisem ser realizadas para ratificar a superioridade dessa técnica.

## REFERÊNCIAS

ADU-GYAMFI, R.; WETTEN, A. Cocoa (*Theobroma cacao* L.) somatic embryos tolerate some ice crystallization during cryopreservation. **Agricultural Sciences**, v. 11, n. 3, p. 223-234, 2020.

BENELLI, C. Plant Cryopreservation: A Look at the Present and the Future. **Plants**, v. 10, n. 2744, p. 1-5, 2021.

EL MERZOUGUI, S.; BENELLI, C.; EL BOULLANI, R.; SERGHINI, M.A. The cryopreservation of medicinal and ornamental geophytes: application and challenges. **Plants**, v. 12, n. 11, 2143, p. 1-31, 2023.

KARNOVSKY, M. J. A. formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, v. 27, n. 2, p. 137-138, 1965.

LIU, X.; XU, Y.; LIU, F.; PAN, Y.; MIAO, L.; ZHU, Q.; TAN, S. The feasibility of antioxidants avoiding oxidative damages from reactive oxygen species in cryopreservation. **Frontiers in Chemistry**, v. 9, n. unico, 648684, p. 1-7, , 2021.

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. 38, n. 3, p. 252-259, 2002.

NAGEL, M.; PENCE, V.; BALLESTEROS, D.; LAMBARDI, M.; POPOVA, E.; PANIS, B. Plant cryopreservation: principles, applications, and challenges of banking plant diversity at ultralow temperatures. **Annual Review of Plant Biology**, v. 75, n. unico, p. 7.1–7.28, 2024.

NIEVES-ORDUÑA, H.E.; KRUTOVSKY, K.V.; GAILING, O. Geographic distribution, conservation, and genomic resources of cacao *Theobroma cacao* L. **Crop Science**, v. 63, n. 4, p. 1750-1778, 2023.

OLASUPO, O.F.; AIKPOKPODION, O.P. Cacao genetic resources conservation and utilization for sustainable production in Nigeria. In: AIKPOKPODION, P. **Theobroma Cacao - deploying science for sustainability of global cocoa economy**. London: IntechOpen, 2024. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.82703>. Acessado em: 05 de março de 2024.

ROQUE-BORDA, C.A.; KULUS, D.; VACARO DE SOUZA, A.; KAVIANI, B.; VICENTE, E.F. Cryopreservation of agronomic plant germplasm using vitrification-based methods: an overview of selected case studies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 11, 6157, p. 1-33, , 2021.