



CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA DE DIFERENTES TIPOS DE CALOS DE CACAU (*Theobroma cacao* L), VARIEDADE PH16, INDUZIDOS DURANTE A EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

ANATOMICAL CHARACTERIZATION OF DIFFERENT TYPES OF COCOA (*Theobroma cacao* L.) CALLI, VARIETY PH16, INDUCED DURING SOMATIC EMBRYOGENESIS

Iara Pereira Gomes Pedroza^{1*}; Inaê Mariê de Araújo Silva-Cardoso²; Jonny Everson Scherwinski-Pereira³

¹Universidade de Brasília (UnB), Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília, DF, CEP 70910-900, Brasil, iarapedroza2001@gmail.com,
Apresentador do trabalho

²Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF Parque Estação Biológica - PqEB, Brasília, DF. CEP 70770-901, Brasil.
inaemarie@hotmail.com; jonny.pereira@embrapa.br.

INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* por meio da embriogênese somática permite a rápida propagação de clones, com características morfológicas desejáveis e resistentes a patógenos (WICKRAMASURIYA; DUNWELL, 2018). Esse processo se inicia com a inoculação de explantes em meio de cultura contendo nutrientes, açúcares e reguladores de crescimento que proporcionam a desdiferenciação celular do explante (formação de calos) e posterior rediferenciação em embriões somáticos (OLIVEIRA, 2023). Nesse contexto, salienta-se a relevância da caracterização anatômica dos calos produzidos durante o processo, visando à identificação daqueles que possuem células com características embriogênicas e, portanto, que exibem potencial deformação de embriões somáticos.

A embriogênese somática tem sido utilizada com sucesso para a propagação clonal de várias culturas agrônomicas, incluindo o cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.) (MAXIMOVA et al., 2002; GARCIA et al., 2016). Essa espécie lenhosa pertence à família botânica Malvaceae, com distribuição natural em florestas tropicais úmidas e quentes e exerce grande influência na economia mundial, contribuindo com produtos nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética, como destaque para o chocolate oriundo de suas sementes (GARCIA et al., 2016; GUILLOU; VERDIER, 2022). A embriogênese somática tem possibilitado a clonagem de genótipos superiores de cacauzeiro, bem como a geração de materiais (calos embriogênicos e embriões somáticos) passíveis de serem conservados sob condições criogênicas (FANG et al., 2004; ADU-GYAMFI; WETTEN, 2012). Diante do exposto, objetivou-se caracterizar diferentes formações calogênicas oriundas de uma variedade de cacauzeiro via análises morfoanatômicas, visando a sua classificação quanto ao potencial embriogênico.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os calos avaliados foram oriundos de estaminoides provenientes de flores da variedade PH16 de *Theobroma cacao* L., os quais foram cultivados em meio de indução de calos conforme Li et al. (1998), com subcultivos quinzenais. Após quatro meses no meio mencionado, foram coletados três tipos de calos compactos caracterizados morfológicamente como marrons (oxidados - Fig. 1A), nodulares amarelos (Fig. 1B) e brancos (Fig. 1A).

As amostras foram colocadas em microtubos com uma solução de Karnovsky modificada (KARNOVSKY, 1965), composta por paraformaldeído 4%, glutaraldeído 2,5% e tampão cacodilato de sódio 0,05 M (pH 7,2), sob vácuo por 24 horas. Em seguida, foram realizadas três lavagens em solução de cacodilato de sódio (0,05 M, pH 7,2), por 1 hora (sob vácuo) as duas primeiras e 24 horas (sob vácuo) a última lavagem.

A desidratação foi realizada em soluções com concentrações crescentes de etanol (30%, 50%, 70%, 80%, 90% e 100%) com 1 hora ao vácuo entre cada uma, com exceção da solução de 70% que ficou por 24 horas. A infiltração em historesina (Leica, Heidelberg, Alemanha) e a polimerização foram feitas de acordo com as especificações do fabricante.

Foi utilizado o micrótomo rotativo manual (Leica®, RM212RT) para realizar cortes longitudinais (3-7 µm), que foram aderidos em lâminas microscópicas, e, em seguida, corados com Azul de Toluidina (0,5%) para caracterização estrutural e identificação de compostos fenólicos. A obtenção e análise de imagens foram realizadas via microscópio Leica DM 750 e programa Leica Application Suite EZ.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De modo geral, as células apresentaram crescimento sem direcionamento, com diâmetro e formato desuniformes, a grande maioria vacuoladas, com presença de compostos fenólicos (Fig. 1). Os calos marrons (oxidados) apresentaram maior concentração de compostos fenólicos e resquícios de citoplasma, o qual exibia algumas sinuosidades (Fig. 1A-C). Provavelmente, trata-se de calos brancos/amarelos que passaram por um processo de oxidação. O escurecimento de calos é consequente da oxidação de compostos fenólicos presentes no explante, que pode comprometer o crescimento/desenvolvimento celular (NOJOSA et al., 2003) e é muito comum em espécies lenhosas. Os compostos fenólicos comumente encontrados nas células do cacauero estão relacionados à resistência da espécie a ataques de patógenos, como um mecanismo bioquímico e fisiológico de defesa (NOJOSA et al., 2003).

Os calos brancos e amarelos, por sua vez, apesar de apresentarem diferenças na morfologia externa, não se diferenciaram anatomicamente. De modo geral, foram caracterizados por células com citoplasmas poucos densos, com alguns núcleos evidentes e, geralmente, um nucléolo (Fig. 1E, F, H, I). Compostos fenólicos também foram observados nesses calos (Fig. 1F, I). Especificamente nos calos brancos, visualizaram-se divisões periclinais, formando colunas de células (Fig. 1H, E).

Conforme Silva-Cardoso et al. (2020), os calos analisados não apresentam potencial embriogênico. Segundo esses autores, calos embriogênicos são caracterizados pela presença de parede celular mais espessas do que células não embriogênicas, citoplasma denso, alta relação de núcleo/citoplasma, com predominância do formato isodiamétrico, núcleo e nucléolos grandes, pequenos vacúolos e presença de espaço intercelulares. Os resultados obtidos corroboram Oliveira (2023), que caracterizou anatomicamente diferentes formações calogênicas de cacauero oriundas de genótipos não comerciais, incluindo um tipo de calo classificado como filamentosso não embriogênico, bastante similar ao calo branco investigado aqui. Tal autora relatou também a formação de calos nodulares amarelados, com superfície brilhosa e rugosa, os quais foram classificados em termos anatômicos como embriogênicos.

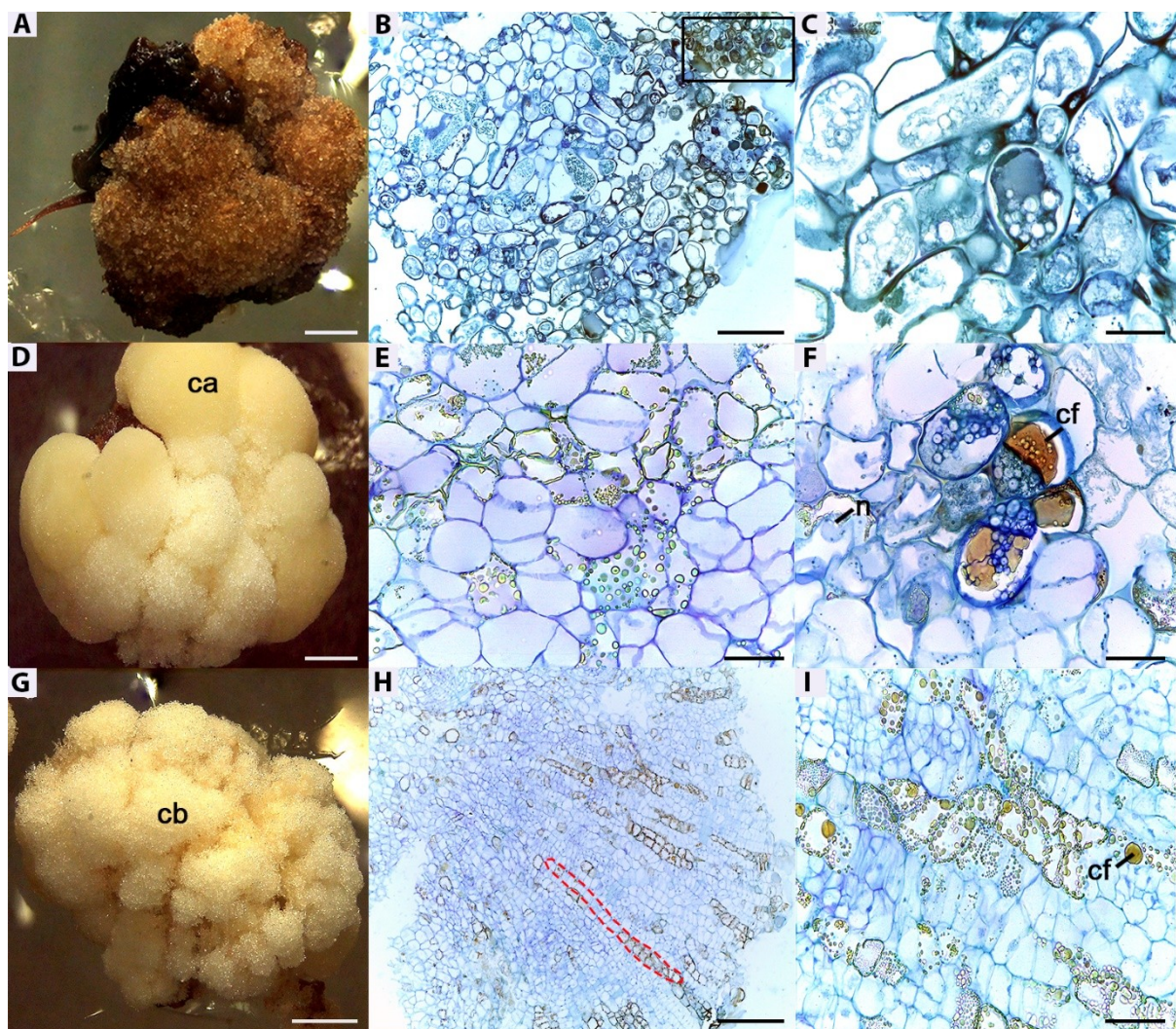


Figura 01. Caracterização morfoanatômica de diferentes calos (oxidado, amarelo e branco) oriundos de estaminoides da variedade PH16 de *Theobroma cacao* L. A. Calo oxidado. B. Secção anatômica do calo oxidado. C. Células do calo oxidado observadas em maior magnificação; observar compostos fenólicos (retângulo). D. Calo amarelo. E. Secção anatômica do calo amarelo. F. Células do calo amarelo em maior magnificação; notar núcleos, nucléolos e compostos fenólicos. G. Calo branco. H.



Secção anatômica do calo branco; notar células enfileiradas (tracejado vermelho). I. Secção anatômica do calo branco em maior magnificação. Escalas: A, D e G: 2 mm, C, E, F e I: 50 µm e B e H: 200 µm. Legenda: ca= calo amarelo; cb= calo branco, cf= compostos fenólicos, e n= núcleo.

CONCLUSÃO

Os calos oriundos da variedade PH16 de cacaueteiro, conforme as análises anatômicas, não são considerados embriogênicos, devido à alta predominância de células vacuoladas e compostos fenólicos. Isso indica recalcitrância do genótipo investigado e/ou a necessidade de manipulação do protocolo utilizado para a indução da embriogênese somática.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADU-GYAMFI, R.; WETTEN, A. Cryopreservation of cocoa (*Theobroma cacao* L.) somatic embryos by vitrification. **CryoLetters**, v. 33, n. 6, p. 494-505, 2012.

FANG, J.-Y.; WETTEN, A.; HADLEY, P. Cryopreservation of cocoa (*Theobroma cacao* L.) somatic embryos for long-term germplasm storage. **Plant Science**, v. 166, n. 3, p. 669-675, 2004.

FISTER, A.S.; LANDHERR, L.; PERRYMAN M.; ZHANG, Y.; GUILTINAN, M.J.; MAXIMOVA, S.N. Glucocorticoid receptor-regulated TeLEC2 expression triggers somatic embryogenesis in *Theobroma cacao* leaf tissue. **PLoS One**, v. 13, n. 11, p. e0207666, 2018.

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: RAMÍREZ-MOSQUEDA, M.A. (eds) Somatic Embryogenesis. **Methods in Molecular Biology**, New York, v. 2527, n. unico, p. 69-81, 2022.

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

LI, Z.; TRAORE, A.; MAXIMOVA, S.N.; GUILITINAN, M.J. Somatic Embryogenesis and plant regeneration from floral explants of cacao (*Theobroma cacao* L.) using thidiazuron. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Pennsylvania, v. 34, n. unico, p. 293-299, 1998.



MAXIMOVA, S.N.; ALEMANNI, L.; YOUNG, A.; FERRIERE N.; TRAORE A.; GUILITINAN M. J. Efficiency, genotypic variability, and cellular origin of primary and secondary somatic embryogenesis of *Theobroma cacao* L. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Pennsylvania, v. 38, n. unico, p. 252-259, 2002.

NOJOSA, G.B.A.; RESENDE, M.L.V.; AGUILAR, M.A.G.; BEZERRA, K.M.T.; ANHERT, D. E. Componentes fenolicos e enzimas oxidativas em clones de *Theobroma cacao* resistentes e suscetiveis a *Crinipellis pernicioso*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 2, p. 148-154, 2003.

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.

SILVA-CARDOSO, I.M.A.; MEIRA, F.S.; GOMES, A.C.M.M.; SCHERWINSK-PEREIRA, J.E. Histology, histochemistry and ultrastructure of pre-embryogenesis in the palm tree *Syagrus oleracea*. **Physiologia Plantarum**, v. 168, n. 4, p. 845-875, 2020.

WICKRAMASURIYA, A.M.; DUNWELL, J.M. Cacao biotechnology: current status and future prospects. **Plant Biotechnology Journal**, v. 16, n. 1, p. 4-17, 2018.