



# ESTABELECIMENTO DE CULTIVOS EM SUSPENSÃO DE *Theobroma Cacao* L. COM POTENCIAL EMBRIOGÊNICO

## ESTABLISHMENT OF SUSPENSION CULTURES OF *Theobroma cacao* L. WITH EMBRYOGENIC POTENTIAL

Stefhania Alzate Lozano<sup>1\*</sup>; Iara Pereira Gomes Pedroza<sup>2</sup>; Inaê Mariê de Araújo Silva Cardoso<sup>3</sup>; André Luís Xavier de Souza<sup>4</sup>; Jonny Everson Scherwinski-Pereira<sup>5</sup>.

<sup>1</sup>Doutoranda em Ciências Florestais. Departamento de Engenharia Florestal, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil. [stefhania.alzate@gmail.com](mailto:stefhania.alzate@gmail.com).

<sup>2</sup>Graduanda em Engenharia Florestal. Universidade de Brasília- DF, Brasil. [iarapedroza2001@gmail.com](mailto:iarapedroza2001@gmail.com).

<sup>3</sup> Pós-doutoranda. Funarbe/Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, Brasil. [inaemarie@hotmail.com](mailto:inaemarie@hotmail.com).

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

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

### INTRODUÇÃO

*Theobroma cacao* L., mais conhecido como cacaueteiro, é uma espécie neotropical que possui alto valor econômico (NAIR, 2021). O cultivo de cacaueteiro apresenta desafios significativos devido à presença de doenças e pragas como a vassoura-de-bruxa, a rubelose ou mal rosado, a murcha de *Ceratocystis* e a podridão mole, entre outras (MARELLI et al., 2019). Essas doenças são difíceis de detectar e gerenciar com produtos químicos, o que aumenta a ênfase no desenvolvimento de genótipos melhorados (elite) e mais resistentes a pragas, como é o caso do genótipo PH16 (SENA GOMES et al., 2015), destacando a importância de estabelecer protocolos para sua produção em larga escala.

Técnicas de micropropagação baseadas na embriogênese somática (ES) configuram como uma ferramenta poderosa para a propagação de genótipos elite da espécie (HENAO RAMIREZ et al., 2023). Sistemas de ES em meio líquido e o uso de biorreatores de imersão temporária são desejáveis em comparação com metodologias em meio semissólido por razões práticas e econômicas e surgem como estratégias de grande importância para o avanço tecnológico na produção de cacaueteiro (BUSTAMI; WERBROUCK, 2024). Esse cenário ressalta a necessidade contínua de otimização de protocolos, assim como estudos de desenvolvimento que visem uma compreensão detalhada das diversas etapas da ES em *T. cacao*.

A observação do desenvolvimento de células ou grupos de células por meio de técnicas histológicas tem se mostrado extremamente útil na compreensão da embriogênese (SÁENZ et al., 2006; KRUGLOVA et al., 2023). Assim, o entendimento da dinâmica e do destino das células envolvidas na ES, mediante técnicas de microscopia, permite uma análise detalhada do processo ao longo do tempo.

Diante do exposto, o presente estudo visa estabelecer e realizar a caracterização histológica de cultivos em suspensão de *T. cacao*, variedade PH16, investigando seu potencial embriogênico. Esta



pesquisa busca não apenas ampliar nosso entendimento sobre os processos de regeneração de cultivos em suspensão, mas também, fornecer informação valiosas para o desenvolvimento de tecnologias voltadas à produção em larga escala de cacauero.

## MATERIAIS E MÉTODOS

**Indução de calos:** O estabelecimento dos cultivos iniciou-se a partir de calos derivados de estaminódios de *T. cacao* da variedade PH16. Os estaminódios foram inoculados em placas de Petri com cerca de 25 mL de meio de crescimento de calo primário (MCP). Após duas semanas nesse meio, foram transferidos para meio de crescimento de calo secundário (MCS), onde permaneceram por mais duas semanas (LI et al., 1998). Posteriormente, os explantes foram transferidos para o meio de desenvolvimento de embriões (MDE), onde foram mantidos por 6 meses. O meio utilizado para MCP foi DKW, enquanto para MCS utilizou-se o meio WPM. Todos os meios foram gelificados com 2,5 g L<sup>-1</sup> de Phytigel, pH ajustado para 5,8 ± 0,1 e autoclavados. As culturas foram mantidas a 26 ± 2 °C, 60% de umidade e fotoperíodo de 16/8 h, com intensidade luminosa de 50 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

**Estabelecimento de culturas em suspensão:** Amostras de calos mais escuros, com formato nodular (0,04 g), foram inoculadas em erlenmeyers de 125 ml com 30 ml de meio DKW contendo 4,52 μM de 2,4-D, 0,46 μM de cinetina e 20 g/L de glicose. O meio líquido foi renovado e multiplicado inicialmente após 2 meses, seguido por quatro renovações a cada 15 dias, adicionando-se 15 ml de cultura em 15 ml de meio novo. A cada duas renovações foi realizada seleção em razão da granulometria dos materiais em suspensão, por meio de peneiramento, totalizando duas. Em cada uma foram retirados os aglomerados maiores, deixando os menores e as células em suspensão.

**Análise anatômica:** Para análises anatômicas, aglomerados do meio líquido, após o segundo e quarto subcultivos, foram submetidos à fixação, desidratação, infiltração e emblocamento em historesina. A fixação foi realizada em solução de Karnovsky modificada, por 24 horas, seguida por lavagens em cacodilato de sódio. A desidratação foi conduzida em etapas crescentes de álcool, e as amostras foram infiltradas com historesina. Cortes longitudinais e transversais de 3-7 μm foram obtidos com micrótomo rotativo manual, aderidos às lâminas a 40 °C e corados com azul de Toluidina (0,5%) para caracterização estrutural, seguindo o método de O'Brien et al. (1965).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após seis meses no meio de desenvolvimento de embriões, os calos apresentaram características heterogêneas, incluindo zonas granulares, nodulares e friáveis, áreas com variações de cor, como branco, bege e marrom claro, com algumas regiões mais escuras indicando processos de oxidação (Figura 1). Após dois meses de cultivo no meio líquido, foi identificado crescimento celular, com a presença de aglomerados celulares nas bordas do Erlenmeyer e uma aparência turva; nesse momento foi realizada a multiplicação do material em meio. Após mais um mês de cultivo, foram identificados aglomerados celulares caracterizados por tonalidades bege e branca, de cerca de 1-2 mm (Figura 2a).

Os aglomerados tinham consistência sólida e macia, formato nodular, e no centro destacavam-se células embriogênicas, proembriões e áreas com compostos fenólicos (Figura 2c, e, g). Já na periferia, verificaram-se células vacuoladas de grandes dimensões, de até 100  $\mu\text{m}$  (Figura 2e).



**FIGURA 1.** Calo oriundo de estaminódios de *Theobroma cacao*, após 6 meses de cultivo em meio semissólido, com áreas com diferentes graus de oxidação e consistência friável.

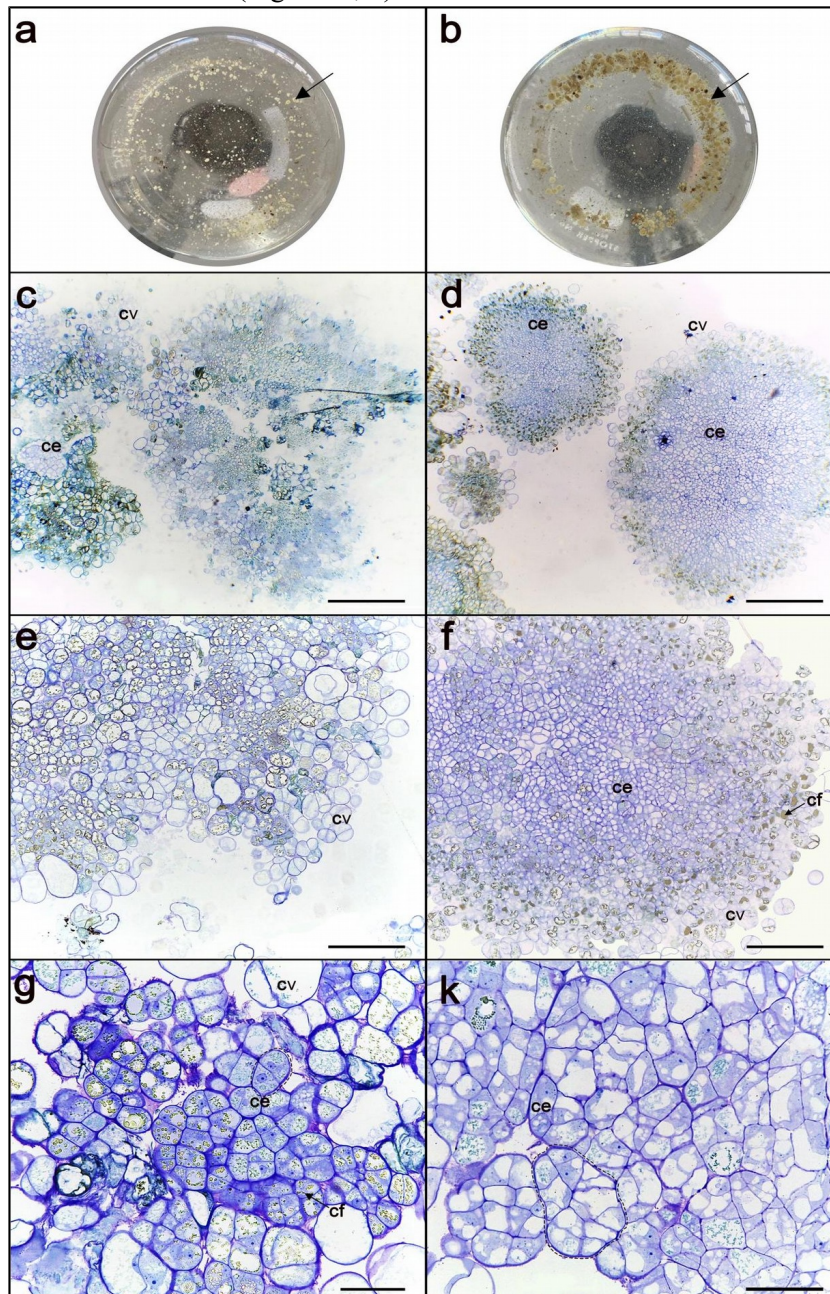
O sucesso da formação de calos *in vitro* é determinado por um complexo de fatores endógenos e exógenos inter-relacionados; o uso de reguladores de crescimento é um dos principais fatores exógenos (KRUGLOVA et al., 2023). A auxina 2-4 D é geralmente conhecida por seu importante papel no estabelecimento de culturas *in vitro* e na obtenção de calos embriogênicos em diferentes espécies, incluindo *T. cacao* (HENAO RAMIREZ et al., 2023).

Do ponto de vista histológico, a presença de células alvo morfogeneticamente competentes nos explantes deve ser considerada o principal fator endógeno no sucesso da formação de calos (KRUGLOVA et al., 2023). Em *T. cacao*, a presença predominante de células com características embriogênicas (isodiamétricas, com alta relação núcleo: citoplasma, citoplasma denso, pouco vacuolada), e o escurecimento dos calos pode estar positivamente associado à formação de embriões somáticos (OLIVEIRA, 2023). A caracterização histológica dos calos de *T. cacao* do tipo nodular evidenciaram seu potencial embriogênico. Sendo assim, o estabelecimento exitoso desse genótipo no meio líquido pode ter sido consequente tanto da composição do meio quanto das características celulares do tipo de calo que foi utilizado como inóculo.

As características dos aglomerados são consistentes com as descritas por Oliveira (2023) para calos com potencial embriogênico em *T. cacao*. Nas zonas internas dos calos, distinguem-se os chamados centros morfogênicos, uma zona central de células meristemáticas, a qual é envolvida por uma zona periférica de células vacuoladas, geralmente, soltas, que perderam atividade meristemática (KRUGLOVA et al., 2023). Esses dados revelam a efetividade da metodologia utilizada para fornecer material com características embriogênicas capaz de se multiplicar ao longo do tempo.

Após 30 dias do primeiro peneiramento, observou-se aumento tanto na quantidade quanto na densidade celular no meio, e uma aparência mais turva dos cultivos. Conferiu-se um maior número de aglomerados e aglomerados de maior tamanho (Figura 2b). Nesse momento, realizou-se um novo

peneiramento, evidenciando um aumento na taxa de multiplicação do material em cultivo (Figura 2b), o que também indica um estabelecimento exitoso das suspensões. Os aglomerados oriundos do segundo peneiramento apresentaram formato nodular, células vacuoladas soltas nas periferias, contudo, destacaram-se por uma presença mais acentuada de compostos fenólicos (Figura 2d, f). Uma camada mais interna mostrou células com citoplasma mais denso. Na região mais interna, verificaram-se também proembriões visíveis (Figura 2f, k).



**FIGURA 2.** Características anatômicas de aglomerados celulares em culturas de meio líquido de *Theobroma cacao*. a: Suspensão celular após 30 dias da primeira multiplicação no meio líquido. b: Suspensão celular após 60 dias da primeira multiplicação no meio líquido. Setas mostrando os aglomerados. c, e, f: Secção anatômica dos aglomerados oriundos da segunda peneiração. d, f, k: Secção anatômica dos aglomerados oriundos da segunda peneiração. Abreviações: ce: células



embriogênicas; cf: compostos fenólicos; cv: células vacuoladas; Barras: c, d: 500  $\mu\text{m}$ ; e, f: 200  $\mu\text{m}$ ; g, k: 50  $\mu\text{m}$ .

Após mais dois subcultivos, observou-se homogeneidade no aspecto do meio, o qual exibiu tonalidade mais uniforme e aparência de cultivos dispersos. Existe a possibilidade de que esses aglomerados não apresentem diferenciação e sofram degeneração, com perda de viabilidade, ou proliferem indefinidamente, a depender das condições de cultivo (intervalo de subcultivo, composição do meio) (GHIORGHITA, 2019). O segundo panorama vai assegurar a manutenção de material embriogênico ao longo do tempo, para ao uso em diversos estudos dessa espécie, o que inclui estudos direcionados à diferenciação de embriões somáticos e subsequente conversão em plantas.

## CONCLUSÕES

O protocolo desenvolvido proporcionou o estabelecimento bem-sucedido de cultivos em suspensão para a variedade PH16 de cacaueteiro e abriu caminho para a exploração do potencial embriogênico deste material em suspensão. Embora as culturas tenham apresentado aglomerados com características embriogênicas e aumento da taxa de multiplicação, as células competentes ainda precisam de estímulos, como tempo e mudanças no meio de cultura, para transitar da fase de indução de calos para a de expressão do potencial embriogênico, o que será foco de estudos futuros por nossa equipe.

## REFERÊNCIAS

- BUSTAMI, M. U.; WERBROUCK, S. P. O. Cyclic Somatic Embryogenesis in Indonesian Elite *Theobroma cacao* L. Clones. **Horticulturae**, v. 10, n. 1, p. 1-16, 2024.
- GHIORGHITA, G. A journey into of the universe of *in vitro* cultures of plants. Callogenesis. **Environment and Natural Resources Research**, v. 9, n. 4, p. 45–60, 2019.
- HENAO RAMIREZ, A. M.; CANO MARTINEZ, D. M.; ALBERTO HOYOS SÁNCHEZ, R.; URREA TRUJILLO, A. I. 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. 1–13, 2023.
- KRUGLOVA, N.; ZINATULLINA, A.; YEGOROVA, N. Histological Approach to the Study of Morphogenesis in Callus Cultures In Vitro: A Review. **International Journal of Plant Biology**, v. 14, n. 2, p. 533–545, 2023.
- 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.
- MARELLI, J.-P.; GUEST, D. I.; BAILEY, B. A.; EVANS, 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. **Phytopathology**, v. 109, n. 8, p. 1331–1343, 2019.



NAIR, K. P. **Tree Crops: Harvesting Cash from the World's Important Cash Crops**. Cham: Springer International Publishing, 2021. 536 p.

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

SÁENZ, L.; AZPEITIA, A.; CHUC-ARMENDARIZ, B.; CHAN, J. L.; VERDEIL, J.-L.; HOCHER, V.; OROPEZA, C. Morphological and histological changes during somatic embryo formation from coconut plumule explants. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 42, n. 1, p. 19–25, 2006.

SENA GOMES, A. R.; ANDRADE SODRÉ, G.; GUILTINAN, M.; LOCKWOOD, R.; MAXIMOVA, S.; LALIBERTE, B.; END, M. Supplying new cocoa planting material to farmers: a review of propagation methodologies. **Bioversity International**, 2015. 190 p.