



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA  
BAHIA-UESB**  
Campus de Vitória da Conquista  
**PROGRAMA MULTICÊNTRICO EM BIOQUÍMICA E  
BIOLOGIA MOLECULAR -PMBQBM**



**BEATRIZ OLIVEIRA RABELO**

**DESENVOLVIMENTO DE MASSA CALOGENICA EM CLONES  
DE *Theobroma cacao L.*, E CITOGENÉTICA DE CALOS  
RADICULARES.**

**VITÓRIA DA CONQUISTA- BA  
JANEIRO/2019**

**BEATRIZ OLIVEIRA RABELO**

**DESENVOLVIMENTO DE MASSA CALOGENICA EM CLONES  
DE *Theobroma cacao L.*, E CITOGENÉTICA DE CALOS  
RADICULARES.**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

**Orientador (a):** Crislene Viana da Silva

**Coorientador (a):** Eny lochevet Segal Floh

**VITÓRIA DA CONQUISTA- BA  
JANEIRO/2019**

R114d

Rabelo, Beatriz Oliveira.

Desenvolvimento de massa calogenica em clones de *Theobroma cacao* L., e

citogenética de calos radiculares. / Beatriz Oliveira Rabelo, 2019.

44f.; il. (algumas color.)

Orientador (a): Crislene Viana da Silva.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Programa Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular - PMBQBM, Vitória da Conquista, 2019.

Inclui referência F. 37 – 44.

1. *Theobroma cacao* L. 2. Embriogênese somática 3. Variação cromossômica. I. Silva, Crislene Viana. II. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Programa Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular – PMBQBM. T. III.

CDD: 633.74



Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB  
Programa Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular-  
PMBqBM



## DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

**Título:** “Desenvolvimento de massa calogenica em clones de *Theobroma cacao* L, e citogenética de calos radiculares”.

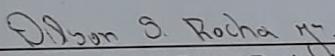
**Autor (a):** Beatriz Oliveira Rabelo.

**Orientador (a):** Profa. Dra. Crislene Viana da Silva

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, pela Banca Examinadora:

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Crislene Viana da Silva – UESB/ Itapetinga - BA

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. José Wildes Barbosa dos Santos – UESB/ Itapetinga - BA

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Dilson Sousa Rocha Júnior – UESC/ Ilhéus - BA

Data de realização: 24 de janeiro de 2019.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço em primeiro lugar a minha orientadora, Professora Doutora Crislene Viana da Silva por todo o empenho, paciência, compreensão, e toda a orientação neste trabalho. Ao Centro de Pesquisa de Cacau-CEPEC por proporcionar o desenvolvimento da minha pesquisa. A todos os meus colegas do Mestrado cujo apoio e amizade estiveram presentes em todos os momentos. A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia agradeço pelo bolsa, a qual sem ela tudo isso não seria possível. E por último, à minha família e amigos pelo apoio me deram.

**Resumo:** O desenvolvimento de sistemas de propagação rápidos e eficientes para a multiplicação vegetativa de genótipos de elite de *Theobroma cacao* L. associados com estudos citogenéticos e histológicos poderão ser ferramentas valiosas para a compreensão dos mecanismos envolvidos e no melhoramento sistêmico da planta. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a resposta calogênica dos clones BN34, CEPEC 2002, CCN51 de *Theobroma cacao* L., contribuir para o conhecimento citogenético do gênero. A embriogênese somática foi desenvolvida respeitando as as três etapas de do protocolo utilizado. Já a histologia e a citogenética foi realizada com os protocolos existentes nos próprios laboratórios. Durante o desenvolvimento foi observado o crescimento satisfatório de calos no processo de embriogênese somática de cacau. Os estaminódios e as pétalas mostraram-se como bons explantes para a obtenção de calos, os quais são intermediários na formação dos embriões. Nas análises anatômicas, foram observadas células embriogênicas e não embriogênicas em um mesmo calo, presença de grãos amido e compostos fenólicos. Já na citogenética, percebeu-se que tanto as raízes de origem de calos radiculares como raízes vindas de plantas não embriogênicas apresentam o mesmo número de cromossomos que são  $2n=20$ . Desse modo, pode-se considerar que o protocolo de embriogênese somática utilizado não promove variações cromossômicas, sendo capaz de estimular a formação de calos nos explantes, e que as células embriogênicas a presença grãos de amido e compostos fenólicos.

**Palavras-chaves:** Cacau, Embriogênese somática, Variação cromossômica.

**Abstract:** The development of fast and efficient propagation systems for the vegetative multiplication of elite genotypes of *Theobroma cacao* L. associated with cytogenetic and histological studies may be valuable tools for the understanding of the mechanisms involved and the systemic improvement of the plant. The present work aimed to evaluate the calogenic response of BN34, CEPEC 2002, CCN51 clones of *Theobroma cacao* L., to contribute to the cytogenetic knowledge of the genus. Somatic embryogenesis was developed respecting the three steps of the protocol used. Histology and cytogenetics were performed using existing protocols in the laboratories. During development, it was observed the satisfactory growth of calli in the cocoa somatic embryogenesis process. Staminodes and petals have been shown to be good explants for callus formation, which are intermediates in the formation of embryos. In the anatomical analyzes, embryogenic and non-embryogenic cells were observed in the same callus, presence of starch grains and phenolic compounds. In cytogenetics, it was noticed that both roots of root calluses and roots coming from non-embryogenic plants have the same number of chromosomes that are  $2n = 20$ . Thus, it can be considered that the somatic embryogenesis protocol used does not promote chromosomal variations, being able to stimulate the formation of callus in the explants, and that the embryogenic cells the presence of starch grains and phenolic compounds.

**Keywords:** Cocoa, Somatic embryogenesis, Chromosome variation.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>8</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>9</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b>	<b>10</b>
<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>11</b>
<b>OBJETIVO</b>	<b>13</b>
OBJETIVO GERAL	13
OBJETIVO ESPECÍFICOS	13
<b>CAPÍTULO 01- UMA REVISÃO DO ESPÉCIE <i>Theobroma cacao</i> L.</b>	<b>14</b>
<b>Theobroma cacao L.</b>	<b>14</b>
<b>CACAUEIRO</b>	<b>15</b>
CLONE BN34	16
CLONE CCN 51	16
CLONE CEPEC 2002	16
<b>EMBRIOGÊNESE</b>	<b>17</b>
<b>REGULADORES DE CRESCIMENTO</b>	<b>18</b>
<b>EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM <i>Theobroma cacao</i> L.</b>	<b>19</b>
<b>CAPÍTULO 02: AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE CALOS EM <i>Theobroma cacao</i> L.</b>	<b>22</b>
<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>22</b>
<b>MATERIAL E MÉTODO</b>	<b>24</b>
LOCALIZAÇÃO DO EXPERIMENTO	24
EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA	24
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>25</b>
<b>CONCLUSÃO</b>	<b>30</b>
<b>CAPÍTULO 03: OBTENÇÃO DE CROMOSSOMOS DE <i>Theobroma cacao</i> L. DE CALOS RADICULARES GERADOS “in vitro”</b>	<b>32</b>
<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>32</b>
<b>MATERIAL E MÉTODO</b>	<b>33</b>
LOCALIZAÇÃO DO EXPERIMENTO	33
TÉCNICA PARA OBTENÇÃO DE CROMOSSOMOS	34

<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>35</b>
<b>CONCLUSÃO</b>	<b>36</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>37</b>

## **LISTA DE FIGURAS**

**Figura 01:** Médias de calos formados por explantes em meio ICP. p. (0,05).

**Figura 02:** Médias de calos formados por explantes em meio ICS. p. (0,05).

**Figura 03:** Características celulares

**Figura 04:** Compostos fenólicos em calos de BN34.

**Figura 05:** Presença de amido e compostos fenólicos em calos radiculares e não radiculares em BN34.

**Figura 06:** Cromossomos de raízes de calo e de planta não embriogênica.

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

2,4-D - Ácido diclorofenoxiacético

AIA - Ácido indol-3-acético

ANOVA - Análise de Variância

BAP-6- Benzenilaminopurina

CDKs- Quinases dependentes de ciclinas

CEPEC- Centro de Pesquisa do Cacau

CEPLAC- Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira

CKO- Citocinas oxidase

CYCs- Ciclinas

DP- Dimerization partner

E2Fa- E2promoter binding factora

ED- Desenvolvimento embrionário

ES- Embriogênese somática

H2O2- Peróxido de hidrogênio

ICP- Indução de calo primário

ICS- Indução de calo secundário

TDZ- Thidiazuron

## INTRODUÇÃO

O *Theobroma cacao* L. pertence à Família Malvace, é uma espécie monóica, do tipo cauliflora, com presença de almofadas florais (THOMAS et al., 2012, LEMOS, 2014). O cacauero, como é popularmente conhecido, é uma planta de grande importância econômica, em razão dos produtos gerados a partir do seu fruto que são usados para a produção de chocolate, manteiga de cacau, licor, polpa, mel de cacau e seus subprodutos que podem ser utilizados como adubo (ROCHA,2008).

Um estudo recente desenvolvido por Carvalho et al (2018) mostra o efeito do chocolate amargo sobre colesterol HDL e LDL, pressão arterial, glicose e consumo de oxigênio durante atividades físicas moderadas, indicando ser benéfico para a saúde humana. Um estudo distinto feito por Silva (2018) mostrou que a casca do cacau pré-tratada pode se tornar um resíduo promissor para a produção de etanol. Como observado por Malta, Silva e Gobetti (2018), o farelo de cacau usado como fonte alimentícia para os animais apresenta uma alta quantidade de nutrientes, podendo ser utilizado na ração animal diminuindo o seu custo e não afetando o desenvolvimento do animal.

Embora algumas plantas de cacau apresentem resistência às doenças, outras não tem essa característica e precisam de agentes externos para combate doenças e pragas, segundo um artigo publicado por Fantinato et al (2018), a aplicação de silício nas folhas das plantas diminui os efeitos provocados pela vassoura-de-bruxa e ainda permite o aumento de enzimas e atividade fotossintética. De acordo com Pereira (2018), a aplicação de solução hidroalcoólica eleva o enraizamento de miniestacas dos clones BN34 e Cepec2002, onde ácido-indool-3-butirico (AIB) proporcionou 100% de enraizamento em BN34 quando comparado com CEPEC2002.

Dentre as mais diversas linhas de pesquisa que estudam o cacauero a biotecnologia, área voltada para o melhoramento genético de plantas, promovendo o progresso da agricultura sustentável e permitindo a seleção de genes com características benéficas vem caminhando em passos lentos

(CARRER;BARBOSA;RAMIRO,2010). Nesse contexto a cultura de tecido, uma vertente da biotecnologia, vem sendo utilizada para a multiplicação de plantas, avaliação de germoplasma, produção de mudas livres de pragas e vírus, tendo potencial de ser empregada para o aumento da variabilidade. A qual pode ser manuseada por três vias, a organogênese, embriogênese somática e micropropagação (EMBRAPA, 2002).

A via de embriogênese somática (ES) é o processo pelo qual células somáticas, em condições de indução, geram células embriogênicas, que através de uma série de mudanças morfológicas e bioquímicas, resultam na formação de um embrião somático. Desse modo a embriogênese somática corresponde a um modelo para o estudo das características morfológicas, eventos fisiológicos, moleculares e bioquímicos em plantas superiores e com potencial aplicações biotecnológicas na propagação clonal de espécies (QUIROZ- FIGUEIROA et al., 2006).

A técnica de embriogênese somática já foi aplicada em cultura de milho tropical (SALGADO; CARNEIRO; SOUZA, 2017), *Olea europaea* L. (PIRES, 2018), *Amburana cearensis* (PINTO et al., 2016), *Phalaenopsis* (ZANELLO, 2018) *Theobroma grandiflorum* Schum (FERREIRA et al., 2005), e *Coffea arabica* (FERRARI, 2016).

O processo embriogênico também já vem sendo executado nos vários clones da espécie de *Theobroma cacao* após o estabelecimento de um protocolo por Li et al (1998), como realizado por Silva et al (2008) com os clones TSH 565 e TSH 1188 com resultados positivos para regeneração de plantas a partir de pétalas. Os clones SCA6, CCN51 e PS1319 também foram submetidos ao protocolo de embriogênese somática observando embriões já na segunda repicagem de meio ED (QUEIROZ et al., 2012). Quinga (2013) submeteu os genótipos EET 103, EET 111, SA 1, SA 2 e AS 3 à embriogênese somática, mostrando uma respostas embriogênica distinta entre os materiais, além de ter constatado uma redução da metilação do DNA quando os embriões iniciam o processo de conversão para plântula.

## OBJETIVO

### OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo observar a progressão da formação de massa calogênica dos clones BN34, CEPEC 2002 e CCN51 de *Theobroma cacao* L. e estabelecer o protocolo de citogenética para as variações de cacaueteiro estudada.

### OBJETIVO ESPECÍFICOS

- Avaliar o desempenho dos explantes em meios ICP e ICS;
- Verificar a presença de substâncias relacionadas ao processo embriogênico;
- Estabelecer um protocolo de citogenética;
- Observar os cromossomos de origem de calos radiculares.

## CAPÍTULO 01- UMA REVISÃO DA ESPÉCIE *THEOBROMA CACAO* I.

### *Theobroma cacao* L.

O cacaeiro foi inicialmente chamado de Cacahualt, o que significa “sagrado” pelos povos mesoamericanos que acreditavam que o alimento era de origem divina, na época de cultivos eram realizadas solenes cerimônias religiosas, influenciando mais tarde na denominação da planta por Linneu (1707-1778), no qual a chamou de *Theobroma cacao* significando “manjar dos deuses” (CEPLAC, 2008).

Classificado como uma planta perene, arbórea, dicotiledônea, que passou por algumas modificações depois de estudos filogenéticos da espécie, alternando sua família de Sterculiaceae para Malvaceae, estando atualmente na ordem Malvales, gênero *Theobroma* e espécie *Theobroma cacao* L., sendo esta a única a ser usada na produção alimentícia em forma de chocolate (LEMONS, 2012; CRUZ, 2012). Tem um número diplóide de cromossomos que é  $2n = 20$  com  $0,43$  ou  $0,415 \times 10^9$  picogramas (FIGUEIRA; JANICK; GOLDSBROUGH, 1992). É uma planta com alta variabilidade genética em suas características, principalmente tamanho, cor do fruto, das sementes e forma (DE NETTANCOURT, 2000).

De acordo com os botânicos a distribuição geográfica do *Theobroma* influenciou no aparecimento de três variedades da planta, podendo ser diferenciados entre eles através da sua origem botânica, esses foram denominados como criollo, forasteiro e trinitário: criollo, o qual é caracterizado pelo formato alongado, com extremidade proeminente. Sua extensão exterior contém sulcos e é enrugada, suas sementes são ovais e soltas do fruto, seus cotilédones apresentam-se sem pigmentação (MATTIETTO, 2001; LOPES, 2000). O forasteiro, é definido pela forma arredondada, com superfície quase lisa e casca endurecida, com semente aderida à polpa, demonstrando-se achatada, seus cotilédones possuem coloração violeta devido à cor das células. O último tipo é derivado do cruzamento das características do cacau

Criollo e Forasteiro, formando assim o trinitário, estando caracterizado com cotilédones que se alteram de branco a violeta-pálido (CRUZ,2012).

## **CACAUEIRO**

Em decorrência da sua elevada variabilidade que permite a manipulação pelo processo de melhoramento (Dias, 2001), é possível promover o desenvolvimento de diversas plantas resistentes ou com características de interesse industrial. Dentre as diversas espécimes de cacau existentes no mercado, existem os genótipos BN34, Cepec2002 e CCN51, estando estes entre os 14 clones recomendados pela Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (Ceplac), os quais apresentam autocompatibilidade e boa produtividade (CEPLAC,2018- Dados cedidos, mas não publicados).

O clone CCN51 é de origem equatoriana, sendo produzido pelo cruzamento do IMC 67 x ICS 95, que geraram uma planta F1, esta foi cruzada com canelo, apresenta porte mediano, crescimento ereto e ordenado, autocompatível, vigoroso. Seus frutos são grandes de coloração vermelho arroxeado, quando imaturo, rugoso, com sulcos medianamente profundos, de formato alongado, tem alta produtividade, pode ser cultivado em vários tipos de solo, e devido a sua moderada resistência à vassoura de Bruxa foi selecionado pela CEPLAC (SODRÉ, 2017;CEPLAC- Dados cedidos, mas não publicados).

O clone BN34 está entre os híbridos produzidos pela Centro de Pesquisa do Cacau (CEPEC) e é considerado um clone regional com frutos vermelhos, porte pequenos, que apresenta moderada resistência a *Moniliophthora perniciosa*, trópico, apresenta bom crescimento vegetativo, ramos vigorosos, precocidade, boa adaptação para podas, em termos de altura da planta e diâmetro do caule. Além disso, o clone BN 34 tem alta produtividade, podendo ser plantados em baixadas, terço médio e superior (SANTOS;NETO, 2012; SODRE; LEITE, 2018).

Já o clone CEPEC 2002 foi originado pelo cruzamento dos cacauzeiros Amazônico e Trinitário, gerando assim a seleção F1 de população de híbridos.

Com características de porte médio, autocompatível, arquitetura uniforme, precoce e elevada produtividade, com frutos pequenos na cor verde quando imaturos, mas quando maduros são de cor amarela e rugosidade mediana. Apresenta resistência à vassoura-de-bruxa e podridão parda. Em observações realizadas pela CEPLAC, o clone mantém a estabilidade de comportamento e resistência. É indicado para todos os tipos de solos, mas precisa de irrigação em áreas geográficas que as chuvas são irregulares (SODRÉ, 2017 e CEPLAC- Dados cedidos, mas não publicados).

## **EMBRIOGÊNESE**

Baseada na totipotência celular das plantas, a embriogênese somática, processo pelo qual células somáticas dão origem a células embriogênicas gerando plantas completamente formadas sem a fusão de gametas, a qual apresenta a formação de uma estrutura bipolar, constituída por um ápice caulinar e radicular, apresentando as etapas de desenvolvimento pró-embriônico e embriônico e estruturas de embriões globulares e cordiforme similar a estruturas da embriogênese zigótica (GUERRA;TORRES;TEIXEIRA, 1999), passou a ser aplicada como técnica de pesquisa e interesse industrial por proporcionar rápida multiplicação de várias espécies (PINTO; SILVA;LOUREIRO, 2011).

O processo consiste no isolamento de explantes de um organismo vegetal, desinfectados e cultivados em meios específicos por tempo indeterminado, cuja a finalidade é conseguir plantas idênticas à planta-matriz, isto é, a técnica fornece a obtenção de um clone vegetal sem alteração genotípica mantendo-o fiel ao seu ancestral ( EMBRAPA,2003).

A embriogênese somática pode ser desempenhada de forma direta ou indireta. Na via direta as células somáticas irão formar o embrião sem passar por uma fase intermediária, já a via indireta o embrião será gerado por células embriogênicas obtidas através da fase intermediária do explante. (GUERRA;TORRES;TEIXEIRA, 1999).

A obtenção dos embriões é dependente de vários acontecimentos que ocorrem em decorrência de sinais que atuam em associação. A atividade de auxina irá acarretar a resposta celular composta pela reorganização da estrutura celular, arranjo da cromatina, expressão gênica e em decorrência, as células em diferenciação assumem competência embriogênica, regulação da polaridade, remodelamento da cromatina, desdiferenciação celular, reprogramação embriogênica e a diferenciação dos embriões (FEHÉR, 2005, JIMENEZ., 2005 ).

## **REGULADORES DE CRESCIMENTO**

Os reguladores de crescimentos são substâncias responsáveis por promoverem o crescimento e o desenvolvimento vegetal, produzidos em pequenas quantidades e em regiões específicas da planta os quais são depois distribuídos para todos os órgãos, podendo atuar inibindo ou estimulando vários processos fisiológicos e bioquímicos essenciais. Substâncias similares são produzidas em laboratório e são chamadas de fitorreguladores (TAIZ & ZEIGER, 2013).

A descoberta e a sintetização destas substâncias, promoveu um avanço em diversas áreas, na cultura de tecido a utilização dos fitorreguladores são de grande importância por reproduzir os processos que acontecem de forma natural na planta, onde a combinação entre as substâncias melhora o crescimento e o desenvolvimento do material (EMBRAPA,1999 ; PEREIRA et al., 2007). De acordo com Skoog & Miller (1957), o balanço entre auxinas e citocininas é essencial para que se tenha um controle do crescimento e diferenciação da cultura “in vitro”, sendo esses os mais usados em cultura de tecido.

As auxinas são capazes de promover a divisão celular, alongamento, diferenciação celular e dominância apical (TAIZ & ZEIGER, 2013). As baixas concentrações de auxinas apresentam efeitos de desenvolvimento de embrião normal e crescimento radicular enquanto uma concentração elevada promove o aparecimento de calos e tem efeito inibitório (RAGHAVAN;SRIVASTAVA, 1982,

PILET;SAUGY, 1987). Atuando em conjunto com as auxinas, as citocininas vão estar envolvidas no crescimento da parte aérea, controle da divisão celular e síntese de proteínas ligadas ao fuso mitótico (GEORGE; SHERRINGTON, 1984).

### **EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM *Theobroma cacao* L.**

Devido ao seu longo ciclo vegetativo e uma base genética bem restrita, o melhoramento genético no cacauero é mais demorado, dificultando os avanços da técnica, aumentando a procura por processos como estaquia ou produção de mudas através de sementes (FIGUEIRA;JANICK, 1995). A propagação clonal vegetativa do cacauero vem sendo usada em diversos clones com características de alta qualidade visando aumentar sua produção (WOOD;LASS,1987).

Inicialmente a embriogênese somática foi feita através da rota direta, com embriões zigóticos, mas os resultados foram insatisfatórios, apresentando baixa conversão em plantas e problemas com a germinação (ESAN,1977; PENCE;HASEGAWA;JANICK,1979). Assim, foi necessário buscar outras fontes, chegando ao uso de botões florais e tecidos nucleares, por diminuir a heterozigose que era presente em tecidos zigóticos (LI et al, 1998).

Embora, com sua desvantagem de baixa conversão, os explantes florais e de tecidos nucleares foram definidos como os mais úteis para a técnica, já que esses conservavam as características da planta doadora (WANG;JANICK,1984).

Dentre as várias descobertas feitas na época, a pesquisa de Li et al (1998) se destacou, de acordo com o estudo, os meios deveriam ser suplementados com reguladores de crescimento e sais DKW, o que proporciona rápido crescimento. Sendo o seu protocolo dividido em três partes: indução, desenvolvimento do embrião e regeneração da planta (QUINGA, 2013).

## **CAPÍTULO 02: AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE CALOS EM *Theobroma cacao* L.**

### **Avaliação da formação de calos em *Theobroma Cacao* L.**

Beatriz Oliveira Rabelo<sup>1</sup>, Crislene Viana da Silva<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, e-mail: [beatriz.beatrizrabelo@gmail.com](mailto:beatriz.beatrizrabelo@gmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, e-mail: [crislenavs@gmail.com](mailto:crislenavs@gmail.com)

**Resumo:** O *Theobroma cacao* L., é uma planta de grande importância econômica devido seu uso nas mais diversas áreas da indústria. Pesquisas foram realizadas para desenvolvimento de um protocolo de embriogênese somática eficiente visando diminuir o impacto negativo ocasionada pelas doenças e pragas . Assim, o objetivo do trabalho é avaliar a formação de calos nos clones BN34, CCN51 e CEPEC2002 de *Theobroma cacao* L. gerados durante a fase primária da embriogênese somática segundo o protocolo de Maximova et al. (2005). A pesquisa mostrou que os explantes utilizados durante o processo foram capazes de sofrer a rediferenciação formando calos, Destacando os estaminódios por mostrarem uma maior taxa na formação de calo, quando comparados com pétalas. Assim, o uso da técnica com o protocolo atual é uma ótima opção para a propagação clonal do cacaueiro *in vitro*.

**Palavras-chaves:** Cacau, Calogênese, Clonagem, Embriogênese.

## **INTRODUÇÃO**

O *Theobroma cacao* L. ou cacaueiro como é popularmente conhecido, é uma planta perene, integrante da família da Malvace, gênero *Theobroma*. É classificada como uma dicotiledônea, estando na classe das plantas cauliflora, constituindo uma estrutura chamada almofada floral, as flores que compõem essa estrutura são hermafroditas e pentâmeras, com pétalas, sépalas, estames e estaminódios (MONTEIRO;AHNERT, 2007).

No início dos anos 40, o estado da Bahia começou a produzir plantas de cacau com sementes vindas da Amazonas, o que a tornou uma das maiores regiões produtoras do Brasil (CRUZ, 2012). Mas este cenário mudou com a chegada de doenças e pragas que devastaram as produções e atingiram a economia, gerando um grande impacto para os agricultores. Para reverter o dano socioeconômico, criou-se vários clones resistentes às mais diversas pragas e doenças, tornando-se uma forma de controle (SCOTTON,2012).

Com a obtenção dos clones resistentes, uma nova abordagem se iniciou com a finalidade de produzirem mudas saudáveis em um pequeno espaço de tempo e mantendo-as idênticas, através da embriogênese somática (EMBRAPA,1999).

A embriogênese somática consiste em células ou tecidos somáticos de caráter não sexual que desenvolvem uma planta completa, a partir de diversas etapas (ALMEIDA;MASCARENHAS;MIDDLEJI, 2001). Sendo o resultado de vários acontecimentos gerados por estímulos externos que levará a resposta celular formando a reorganização da estrutura celular, arranjo da cromatina, expressão gênica, em decorrência, as células sem diferenciação assumem competência embriogênica (FEHÉR, 2005).

Existem algumas vantagens nessa técnica, entre elas: uma alta taxa de multiplicação, a independência do embrião com a fonte de explante, baixo custo de produção, plantas geneticamente iguais à planta-matriz, possibilidade de transferência de genes (CARVALHO et al, 2007). Assim o objetivo é analisar o desenvolvimento de calos *in vitro* nos genótipos de Cepec2002, BN34 e CCN51.

## **MATERIAL E MÉTODO**

### **LOCALIZAÇÃO DO EXPERIMENTO**

O experimento foi realizado em associação com a Centro de Pesquisa do Cacau-CEPEC/CEPLAC, onde o desenvolvimento da técnica de

embriogênese somática foi realizado no Laboratório de Biotecnologia da CEPEC/CEPLAC. O material vegetal foi fornecido pela Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira-CEPLAC.

## EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

O protocolo usado no experimento da embriogênese somática de *Theobroma cacao L.* foi de Maximova et al. (2005) e levou em conta três etapas: indução de calo primário (ICP), crescimento de calo secundário (ICS) e expressão da embriogênese com o desenvolvimento de embriões (ED).

Os explantes utilizados foram estaminódios e pétalas de flores imaturas, sendo desinfetados de acordo os procedimentos descritos por Li *et al.* (1998), que consiste na preparação de uma solução de hipoclorito de sódio 2%, onde os botões florais eram colocados e permanecia por 20 minutos, no fim deste período os mesmos foram lavados três vezes em água autoclavada. Os explantes foram inoculados em placas de Petri contendo meio de cultura semissólido para indução de calo primário (ICP), composto pelos sais DKW (DRIVER & KUNIYUKI, 1984). Suplementado com glicose (20g/L), 2,4- D (2 ml/L), TDZ (20 $\mu$ l /L), vitamina DKW (1ml/L), glutamina (20g/L), myo-inositol (100mg/L) e Phytigel® (2g/L). Após 14 dias, as culturas foram transferidas para o meio de cultura para indução de calo secundário (ICS), composto por Mc Cowns Salts (2,3g/L), suplementado com glicose (20g/L), 2,4-D (2ml/L), vitamina B5 (1ml/L), BAP (50 $\mu$ l /L) e Phytigel® (2,2 g/L), durante 14 dias. Após este tempo, as culturas foram transferidas para meio de cultura para desenvolvimento embrionário (ED), composto por pelos sais DKW (DRIVER & KUNIYUKI, 1984), suplementado com sacarose (30g/L), vitamina DKW (1ml/L), glicose (2g/L), Phytigel® (2g/L) e isento de fitorreguladores. As culturas foram subcultivadas no mesmo meio de cultura a cada duas semanas durante 90 dias. As culturas foram mantidas no escuro em câmara de crescimento com temperatura de 28°C $\pm$ 1. Todos os meios foram autoclavados por 20 minutos a 120°C.

O delineamento experimental foi em blocos casualizado. Onde foram realizadas cinco repetições, constituídas por 4 amostras, contendo dois tipos de explantes (pétala e estaminódios), cada amostra era formada por cinco estaminódios ou cinco pétalas. Os dados de indução de calo na técnica de embriogênese somática, foram coletados a cada 15 dias de cultivo. Para detectar a diferença da resposta calogênica, os dados coletados foram analisados pelos SISVAR 5.6 e submetidos aos testes de ANOVA e teste de TUKEY ( $p < 0,05$ ).

### PREPARO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISES MICROSCÓPICAS

A técnica de histologia foi realizada com o material coletado com 15, 30 e 45 dias. Foram coletadas 3 amostras onde cada amostra era composta por 3 explantes para cada período, foram fixados em FAA 70% e estocados até a preparação das lâminas. As lâminas permanentes foram preparadas com glicol- metacrilato (Historesin-Leica), conforme instruções do fabricante e seccionados transversal e longitudinalmente, em micrótomo rotativo, com 5  $\mu$ m de espessura. Antes da inclusão em historesina, o material passou por uma etapa de desidratação com etanol e FAA. Os cortes foram submetidos a azul-de- toluidina para metacromasia, lugol para detecção de amido e cloreto férrico 10% para detecção de compostos fenólicos. Após coloração, as lâminas foram analisadas em microscópio de luz com registro fotográfico em fotomicroscópio (LEICA DMI 300B) com sistema Leica Application Suite (LAS).

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os explantes inoculados em meio de calo primário apresentaram formação de calo a partir do oitavo dia, mostrando-se sensíveis a presença de auxinas no meio. A massa calogênica se iniciou no local do corte se estendendo posteriormente para todo material. Também se observou que os estaminódios respondiam mais rápido aos fitorreguladores presentes no meio

quando comparado com pétalas, mas ambos os explantes tem competência para desenvolvimento de calo.

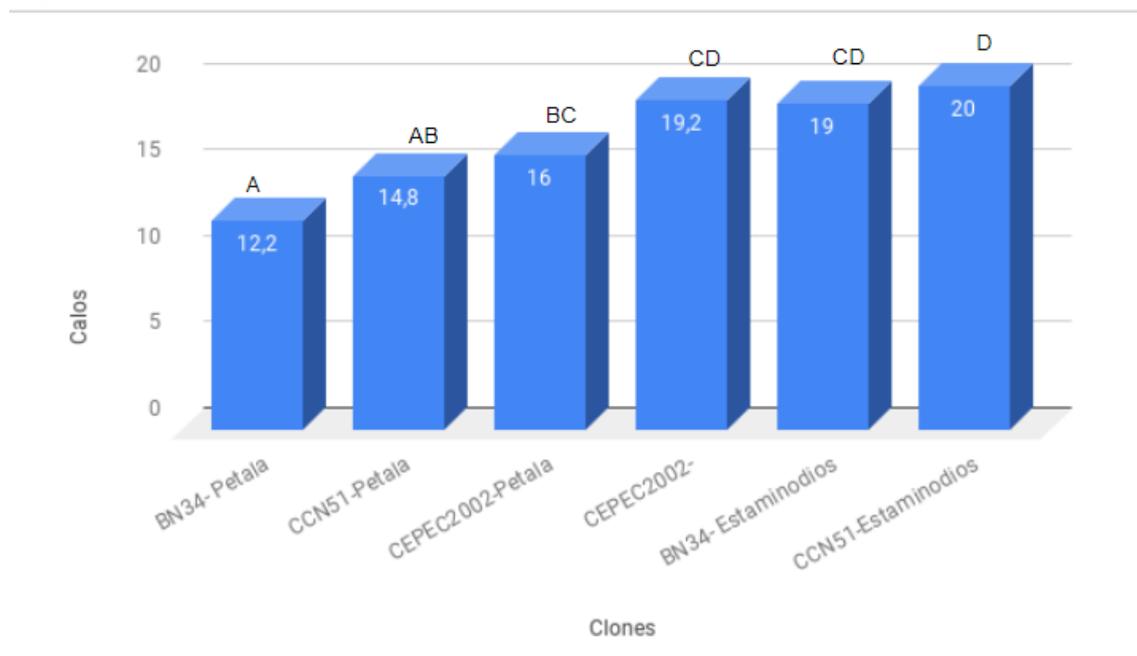
Durante a contagem da formação de calo com auxílio do estereomicroscópio foi observada a presença de dois tipos de calos durante o desenvolvimento do explantes, sendo denominados como calos não embriogênicos e calos embriogênicos. Os calos chamados de embriogênicos apresentavam-se pequenos, friáveis e com coloração amarelado ou amarronzados, já os calos não embriogênicos eram compactos de coloração branca. De acordo com uma pesquisa realizada em *C. arábica*, onde observaram dois tipos de massa celulares diferenciando entre si apenas pela capacidade embriogênica, estudos mais aprofundados mostraram que a competência embriogênicas está relacionada com a diferença na expressão gênica do material, sugerindo que a expressão gênica modula as células e desde modo a sua aptidão embriogênica (EMBRAPA,2009).

De acordo com os dados apresentados, não foi observado diferença estatística entres os estaminódios, os mesmos apresentavam abundante divisão celular, já nas pétalas, notou-se uma menor divisão celular e diferenças estatísticas, onde pétala de BN34 apresentou diferença significativa entre pétala de Cepec 2002, estaminódios de CCN51, BN34 e Cepec 2002, pétala de CCN51 mostrou diferença estatística entre estaminódios de CCN51, BN34 e Cepec 2002, e pétala de Cepec 2002 mostrou diferença significativa em estaminódios de CCN51. Essas diferenças podem estar relacionadas a quantidade de auxina e citocininas exógenas das pétalas de cada clone (Figura 01).

Após transferência para meio ICS, os explantes tiveram comportamento similares entre si com exceção de pétala de Cepec 2002 que mostrou diferença significativa quando comparado com estaminódios de CCN51, foi observado um aumento na massa calogênica. A alteração de meio mostrou-se positivo para as pétalas, pois o número de calos foi maior quando transferidos para meio ICS quando comparado com meio ICP. A resposta positiva das pétalas pode está relacionada com a adaptação que ocorreu em meio ICP e a troca de

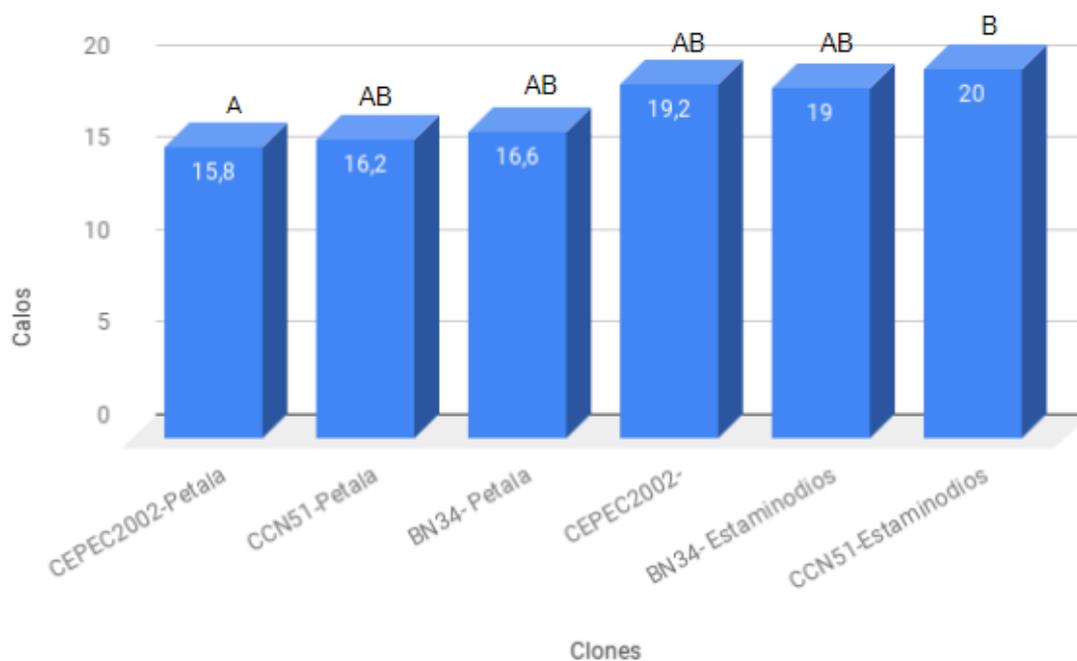
TDZ por BAP. Também foi perceptível a semelhança entre os explantes e os clones, uma vez que em meio ICS a desproporcionalidade de formação de calo entre eles foi menor (Figura 02).

**Figura 01:** Médias de calos formados por explantes em meio ICP. p. (0,05)



As letras maiúsculas indicam diferença estatística entre os genótipos BN34, CEPEC2002, CCN51. Os dados foram submetidos a ANOVA e teste de separação de médias TUKEY ( $p < 0,05$ ).

**Figura 02:** Médias de calos formados por explantes em meio ICS. p. (0,05).



As letras maiúsculas indicam diferença estatística entre os genótipos BN34, CEPEC2002, CCN51. Os dados foram submetidos a ANOVA e teste de separação de médias TUKEY ( $p < 0,05$ ).

Os resultados encontrados referentes às respostas positivas de estaminódios na formação de calos são semelhantes aos encontrados por Silva e colaboradores (2006), onde avaliaram a resposta de algumas espécies de *Theobroma* e verificaram a formação de calos consistentes e abundantes. Já Correa et al (2009), analisaram a resposta de indução calogênica de *Theobroma grandiflorum* em meio com e sem carvão ativado, e obtiveram respostas similares a deste trabalho referente a baixa presença de calos em pétalas quando comparados com estaminódios em meio sem carvão ativado, no qual pétalas representou 60% de resposta calogênica e estaminoide 74,3%.

Embora tenha se observado formação de calos em ambos explantes, o seu tempo de resposta foi diferente podendo esse está relacionado a composição fisiológica, a qual responderá ao estresse abiótico e o desenvolvimento do material no meio. A presença de auxinas e citocininas no meio usadas como reguladores de crescimentos vegetal é importante por estarem envolvidas na regulação tanto do crescimento como na diferenciação celular (FEHÉR;PASTERNAK; DUDITS,2003).

A presença de dois reguladores distintos no meio de cultura está relacionada a função que cada um exerce durante a embriogênese somática. A auxina é responsável pelo crescimento celular através da indução de transcrição de mRNA's, atua na estimulação da acidificação da parede celular levando a uma alta extensibilidade, e estimula substâncias aos processos de desdiferenciação e rediferenciação por modificar a especificidade e atribuir competência celular (RICHARD et al., 2002; GUERRA;TORRES;TEIXEIRA, 1999., 1999).

A 2,4-D é a auxina mais utilizada, estando presente em ambos o meio no protocolo utilizado, a mesma atua de forma indireta pela elevação dos níveis endógenos de AIA, modificando o metabolismo de auxinas do material. De acordo com Fehér e colaboradores (2003), uma concentração maior de 2,4-D,

tem um duplo efeito sobre as culturas celulares, por agirem como auxinas e também como agente estressor que provoca respostas simultâneas capazes de ser a chave para a adaptação celular, levando a reprogramação genéticas, fisiológicas e metabólicas, ocasionando a competência embriogênica.

A reentrada no ciclo celular é uma etapa importante para a iniciação do calo nos explantes, isso porque as células utilizadas no processo de embriogênese encontram-se com o ciclo celular mitótico suprimido. Somente a ativação de um único regulador do núcleo responsável pelo ciclo celular como ciclinas (CYCs), ou as quinases dependentes de ciclinas (CDKs) não é suficiente para iniciar um novo ciclo celular, para que o processo aconteça é necessário que se tenha reguladores transcricionais ou pós-transcricionais envolvidos para que ocorra uma alteração geral nos genes de expressão ou de tradução de proteínas (RIOU-KHAMLICHI et al., 1999; COCKCROFT et al., 2000; DEWITTE et al., 2003).

Um estudo publicado por Berskmans et al. (2011), pressupõe que a importância da auxina no meio está ligada à sua capacidade de provocar a reentrada no ciclo celular através da indução de LBD18 e LDB33 as quais formam um complexo heterodímero ativando a expressão de E2promoter binding factor (E2Fa). E2 Faisone de seis E2Fatores de transcrição em *Arabidopsis* que provocará a dimerização de dimerization partner (DP), promovendo a transcrição de genes essenciais para a replicação do DNA. (INZÉ;DE VEYLLDER, 2006).

No que diz respeito às citocinas o segundo regulador usado nos meios, essas estão relacionadas com a divisão celular, desenvolvimento vascular, dominância apical e a formação e regeneração de tecidos (KURAKAWA et al., 2007).

Ao contrário da auxina, as citocinas utilizadas no meio ICP e ICS são diferentes. O TDZ, citocina utilizada no meio ICP, está ligada a sua capacidade de estimular biossíntese ou modificar o metabolismo de citocinas e modular os níveis endógenos de auxinas (MOK et al,1987). Além disso citocinas do tipo fenilureía são fortes inibidores da atividade de citocinas oxidase (CKO), as

quais são responsáveis por controlar o ciclo celular através da degradação de citocinas, já que uma diminuição de citocinas no material provocaria a inativação de proteínas, não promovendo o avanço do ciclo celular, o TDZ iria atuar através da competição do sítio ativo da enzima com outras citocinas (KERBAUY 2004). O TDZ ainda tem a capacidade de elevar a atividade enzimática da fosfatase ácida promovendo uma interconversão nucleotídeo-nucleosídeo em citocinas endógenas, o que as transformam em substâncias mais ativas (MANTOVANI;FRANCO;VESTENA, 2001).

A modificação de citocininas no meio de cultura aumentou a massa por explantes e em alguns casos o número de calos, isso pode estar relacionado com a troca de TDZ por BAP em meio ICS, segundo a literatura o BAP atua quebrando a dominância apical e proliferação de gemas axilares e desenvolvimento de partes aéreas (MOURA et al., 2012). Segundo Graça et al (2001), a multiplicação de *E.dunnii*, sofreu influência das citocininas utilizadas no meio de cultura, onde os explantes quando colocados em contato com BAP apresentaram maior taxa de brotações quando comparado com TDZ. De acordo com Ribas (1999), o TDZ não provoca o alongamento de brotações, sugerindo a retirada da substância ou adição de uma nova citocina.

Desde modo, é compreensível a alteração do fitohormônio no meio ICS, visto que é o meio posterior ao meio que iniciará o desenvolvimento embrionário e o mesmo não conta com hormônio, outra possível hipótese para o uso de BAP no meio ICS e não continuar com TDZ pode estar relacionada com a estrutura química da substância, já que o TDZ é derivado de feniluréias e BAP de adenina (MOK et al. 1987).

No entanto outros fatores também são responsáveis pela resposta embriogênica, que é a capacidade do material a responder ao estresse oxidativo, responsável por aumentar atividade enzimática e em consequência aceleraria o processo de embriogênese somática (CUI et al., 1999; GANESAN; JAYABALAN, 2004; KONIECZNY et al., 2008; LIBIK et al., 2005).

Uma pesquisa desenvolvida por Cui e colaboradores (1999), observaram que o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) endógeno produzido pelo desbalanço

oxidativo tem a capacidade de atuar como mensageiro de sinalização celular estando responsável pela expressão de genes e a síntese proteica o que acarretaria na embriogênese somática. De acordo com De Gara. Pinto e Arrigoni (1997), a combinação entre  $H_2O_2$  e a rota do ciclo ascobartoglutationa (ASC-GSH) está ligada a manutenção da plasticidade da parede celular e na estimulação da divisão celular de forma organizada.

A parede celular envolvida no crescimento e na diferenciação celular durante o processo de embriogênese, fornece produtos resultantes da hidrólise dos componentes da sua composição, que irão atuar como moléculas de sinal de curta distância na regulação da embriogênese o no desenvolvimento do material.

Outro fator que pode ser um indutor para a embriogênese somática é a formação de compostos fenólicos, em uma pesquisa feita por Kouakou et al. (2007), verificou que culturas embriogênicas têm um aumento na quantidade de compostos fenólicos durante os subcultivos quando comparados com culturas não embriogênicas, sugerindo que a embriogênese somática pode ser influenciada pela formação de compostos fenólicos.

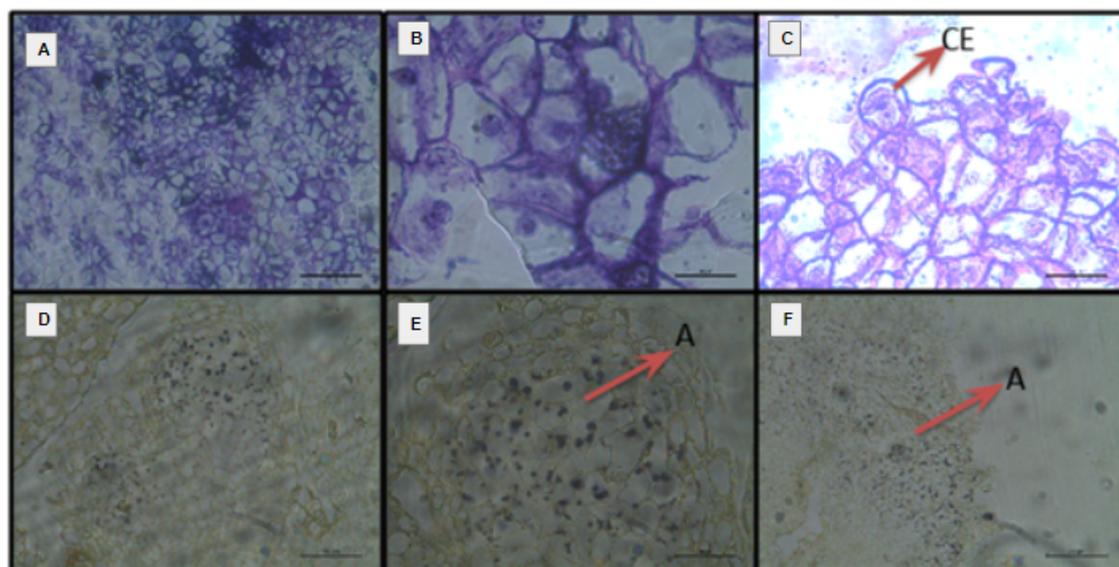
## ANÁLISES DA ANATOMIA E HISTOQUÍMICA

As análises histológicas demonstraram o desenvolvimento da massa calogênica e de calos radiculares nos explantes dos clones estudados, permitindo conhecer como o explantes se comporta no meio de cultura.

Foram observadas células com tamanhos variados, citoplasma denso, núcleo e nucléolo em evidência, crescimento desordenado, parede celular espessa, vacuolizadas (Figura 03). As análises permitem separar as células em embriogênicas e não embriogênicas. Visto que as células embriogênicas tem características similares às células meristemáticas quando em divisão, as quais são, tamanho pequeno, citoplasma denso, isodiamétricas, núcleos grandes e nucléolos evidentes, apresenta pequenos vacúolos e uma expressiva presença de grãos de amido, sugerindo que existe uma intensa expressão de RNA e atividades metabólicas (CARVALHO et al 2001; STEIN et al., 2010).

No presente trabalho foi verificado a presença de grãos de amido durante os períodos analisados o que indica uma intensa atividade metabólica, onde a ausência deste composto indica baixa atividade energética e que não são mais viáveis para aquisição embriogênica (MOURA et al., 2008) De acordo com Stein et al. (2010) a presença de grãos de amido nas células está relacionada com uma alteração ultraestrutural comum em células organogênicas e com a capacidade de aquisição embriogênica do material.

**Figura 03:** Características celulares



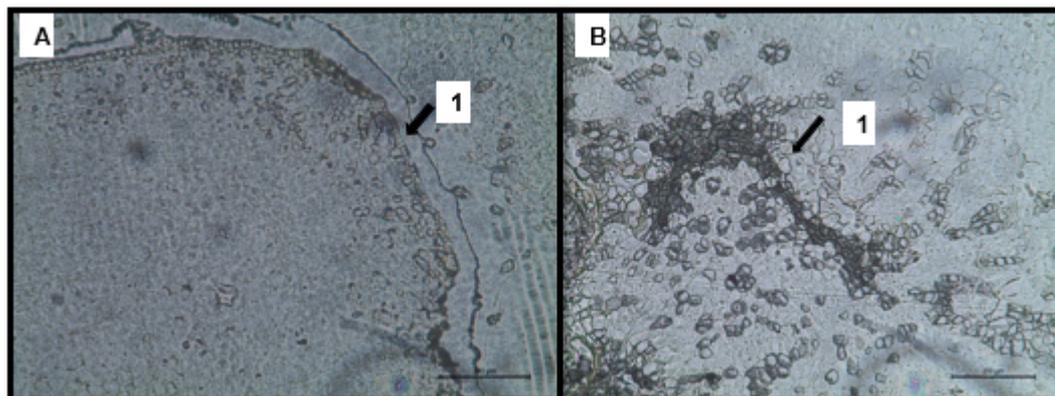
A- Células embriogênicas e células não embriogênicas. B- Células embriogênicas. C- Células embriogênicas. D-. Presença de grãos de amido. E- Presença de grãos de amido (A). F- Presença de grãos de amido (A).

Segundo um estudo publicado por Nogueira (2006), onde analisou calos embriogênicos de murici pequeno, o mesmo observou que a síntese de amido era precedida da síntese de fenóis e um redirecionamento do amido formado para a formação de compostos fenólicos. Confirmando o resultado encontrado, onde observou-se que calos com 15 dias de cultivo apresentam baixa quantidade de composto fenólicos, mas essa quantidade aumenta conforme o material é cultivado (Figura 04).

O amido formado durante o desenvolvimento do material é um importante metabólito primário envolvido na formação da eritose-4fosfato, o qual é um composto chave para ligar o metabolismo primário e secundário.

Sendo originado na rota das pentoses-fosfato, a eritose é uma substância precursora da via de ácido chiquímico, rota que dará origem aos compostos fenólicos (NOGUEIRA,2006).

**Figura 04:** Compostos fenólicos em calos de BN34.



A – 1: Composto fenólicos – com 15 dias de cultivo. B- 1:Composto fenólico – com 45 dias de cultivo.

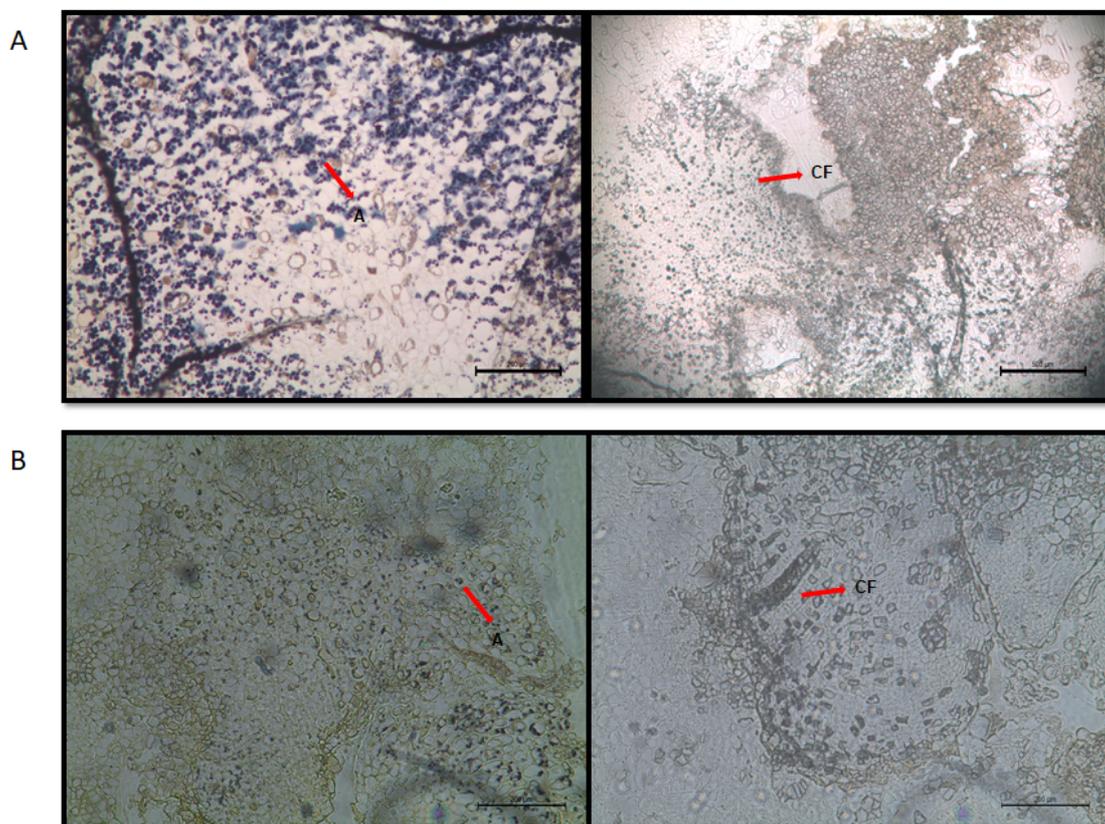
A formação de fenóis também pode ter influência da adição de BAP no meio de indução de calo secundário. O trabalho realizado por Amaral e Castro (2005), demonstrou um aumento de 2,65% de fenóis totais em calos de murici, quando utilizado uma concentração de 1,0 mg L de BAP na ausência de luz.

A presença de fenóis é considerada positiva para a formação de embriões somáticos, já que a produção dos embriões pelas células meristemáticas seria uma resposta para inibir a hiper-hidricidade dos tecidos (CANGAHUALA-INOCENTE et al.2014).

No entanto a presença de altas quantidades de fenóis no material tem efeito negativo, podendo provocar a morte celular. Durante a análise dos dados foi visto que os calos radiculares apresentam maior quantidade de amido e compostos fenólicos quando comparado com calos não radiculares (Figura 05 A e B). Desse modo, uma possível hipótese para uma maior concentração de compostos fenólicos nesse material, pode está relacionada a uma tentativa de eliminação de raiz pelo calo, visto que o desenvolvimento de raiz é uma anomalia. De acordo com Vaughan e Ord (1990), diversos fenóis são fitotóxicos para raízes mesmo em baixas quantidades. Além disso, uma elevada

quantidade de fenóis aumenta a atividade enzimática e produção de quinonas. As quinonas participam de ciclo redox, e produzem espécies reativas de oxigênio que em grandes concentrações são nocivas para os tecido.

**Figura 05:** Presença de amido e compostos fenólicos em calos radiculares e não radiculares em BN34.



A: Presença de amido e compostos fenólicos em calos radiculares em BN34. B: Presença de amido e compostos fenólicos em calos não radiculares em BN34 . A- Amido; CF- Composto Fenólico.

## CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, os explantes estudados apresentaram competência embriogênica. O protocolo estabelecido para embriogênese somática em *Theobroma cacao* L. mostrou-se eficiente para a formação de calo, proporcionando a totipotência celular o que pode levar a uma futura diferenciação para embrião somático. As análises anatômicas mostraram presença de amido e compostos fenólicos, onde o aumento na presença de fenóis está relacionado à presença de amido em fases anteriores do processo de embriogênese somática.

## **CAPÍTULO 03: OBTENÇÃO DE CROMOSSOMOS DE *Theobroma cacao* L. DE CALOS RADICULARES GERADOS “in vitro”**

### **Obtenção de cromossomos de *Theobroma cacao* L. de calos radiculares gerados “in vitro”**

Beatriz Oliveira Rabelo<sup>1</sup>, Crislene Viana da Silva<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, e-mail: [beatriz.beatrizrabelo@gmail.com](mailto:beatriz.beatrizrabelo@gmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, e-mail: [crislenavs@gmail.com](mailto:crislenavs@gmail.com)

**Resumo:** Devido ao seu uso pela indústria alimentícia e de cosméticos e o impacto provocado pela vassoura-de-bruxa, o uso de técnicas de melhoramento genético começou a ser utilizada visando diminuir e suprir a necessidade da indústria. Em decorrência do uso de uma técnica que visa alterar o ciclo celular do material e fazer uma reprogramação genética, o processo que pode promover variações cromossômicas, assim o uso da citogenética se torna uma ferramenta para validar a eficiência do processo sem que o mesmo apresente alterações genéticas. O objetivo é obter cromossomos dos clones BN34, CEPEC2002 e CCN51 visando avaliar seu número de cromossomos de raízes obtidas pelo processo de cultura “in vitro” em contraste com plantas não embriogênicas. Os resultados encontrados não mostraram diferença nos números de cromossomos do material “in vitro” quando comparado com o material “ex vitro”. Então, a embriogênese somática indireta não promove variações cromossômica.

**Palavra-chave:** Citogenética, *Theobroma*, Cacau, Embriogênese

## **INTRODUÇÃO**

O *Theobroma* é um gênero neotropical, estando distribuídos pela floresta tropical úmida (SCONTTON., 2012). Sendo bastante conhecido pela espécie

*Theobroma cacao* L., utilizada por todo o mundo para a produção de chocolate e na indústria de cosméticos. Estudo realizado por Carletto (1946), mostrou que a espécie *Theobroma cacao* é diploide com  $2n=20$  cromossomos, onde dez são cromossomos bivalentes.

De acordo com Souza e colaboradores (1992), a citogenética fornece um grande número de informações o que auxilia para a caracterização cromossômica de diversas espécies, pois pode ser determinado o número cromossômico, número de pólias e o comportamento dos cromossomos na meiose e mitose, o que contribui para a viabilidade de programas de melhoramento genético.

Assim, o uso de técnica de citogenética para verificação da eficiência da embriogênese somática no material é de muita importância, visto que a via de embriogênese somática aplicada nos explantes de cacau é a indireta é mais provável a apresentar variações somaclonais (BAIRU et al., 2010). Desde modo o estudo objetivou obter os cromossomos dos clones BN34, CCN51, Cepec 2002 com a finalidade de avaliar o seu número de cromossomos através de raízes de plantas não embriogênicas e de raízes geradas “*in vitro*”.

## **MATERIAL E MÉTODO**

### **LOCALIZAÇÃO DO EXPERIMENTO**

O experimento foi realizado no Laboratório de Citogenética/UESB. O material vegetal foi fornecido pela Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira-CEPLAC e obtido através de calos que apresentaram raízes.

### **TÉCNICA PARA OBTENÇÃO DE CROMOSSOMOS**

O protocolo utilizado para obtenção de cromossomos dos clones estudados foi baseado no protocolo já utilizado no laboratório de realização da técnica.

As amostras foram coletadas a partir de plantas criadas em vermiculita (plantas não embriogênicas) e raízes oriundas de calos radiculares obtidos através do processo de embriogênese somática pelo protocolo de Maximova et al (2005). Essas amostras após coletadas foram lavadas em água autoclavada e colocadas por quatro horas e meia em temperatura ambiente em 8-hidroxiquinolina 0,002M, sendo depois retiradas e fixadas em metanol- ácido acético (3:1) por vinte quatro horas em refrigeração, depois da fixação o material foram transferido para álcool etílico P.A 70% e refrigerados até o uso. Para obtenção dos cromossomos as amostras devem passar por três lavagem de 10 minutos em água destilada, e após foram colocadas em HCL 1N por 30 minutos em banho maria a 60°C, no fim dessa etapa o material deve ser transferido para água gelada para a hidrólise ácida.

O material foi corado emorceína 2% por quatro horas e meia em temperatura ambiente, após a coloração o material foi colocado sobre uma lâmina com uma gota de ácido acético 45%, foi então feito um corte próximo da região meristemática e essa foi então triturada com a ponta do bisturi e sobre o material foi colocada uma lamínula e pressionada sobre a amostra. A lâmina identificada foi levada ao microscópio na objetiva de 40x para verificar a eficiência da técnica e depois colocada no congelador por vinte e quatro horas a fim de secar, depois o material foi transformado em permanente, onde era retirada a lamínula e então a lâmina e a lamínula foram colocadas para secar em temperatura ambiente, sendo depois colocado uma gota de bálsamo do Canadá e a mesma lamínula foi colocada sobre a gota e a lâmina estava pronta para uso.

Foram selecionadas as lâminas que apresentaram melhor distribuição de cromossomos e então levadas para o fotomicroscópio e fotografadas para serem contadas, a verificação dos números de cromossomos foi feita com o programa Imagem J. Avaliou-se três lâminas e dez células de cada material.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

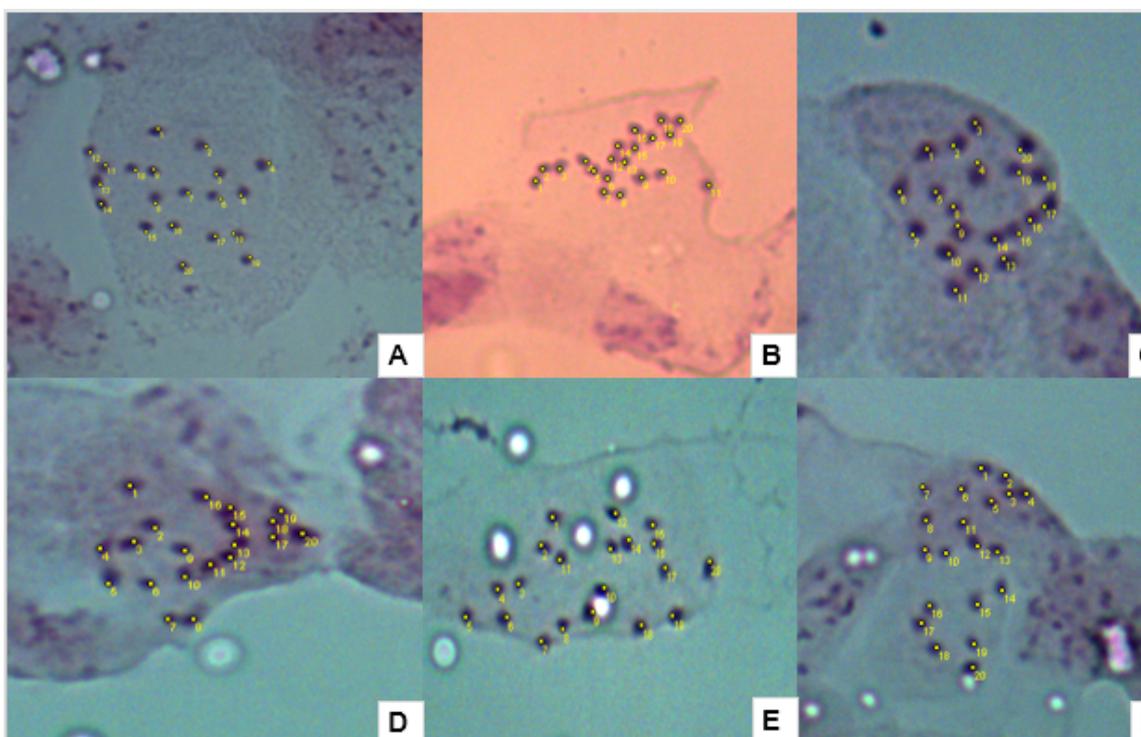
O protocolo utilizado no presente trabalho foi desenvolvido para *Amburana cearenses* modificado para os materiais, visto que não se obteve resposta satisfatória com protocolos descritos na literatura para o *Theobroma cacao*. A morfologia dos cromossomos tanto do material vindo de plantas não embriogênicas quando das raízes de calos radiculares não apresentaram características visuais capazes de montar cariógrama, estando isso relacionado ao protocolo utilizado, além disso não se alcançou rompimento de parede celular com a enzima pectinase em tempos e temperaturas diferentes, dificultando espalhamento do material na lâmina.

O número de cromossomos observados para os três clones, BN34, CCN51 e CEPEC 2002, estudados em raízes oriundas de calos e das raízes coletadas de plantas não embriogênicas, foi  $2n=20$  cromossomos, corroborando com o que já é discutido em literatura (Figura 05). Dados semelhantes foram encontrados em *T. cacao* L., *T. speciosum* Willd., *T. grandiflorum* (Willd. ex. Spreng.) Schum e *T. Subincanum* Mart (PAVESE;KARSBURG,2009), Cacau Rui, Cacau Pucala, Cacau Jaca e Cacau Sem Vidro (FIGUEIREDO,2008).

A relevância dos estudos de citogenética está relacionada a quebra do controle do ciclo celular para que a celular possa se desdiferenciar através da ação de fitorreguladores, ocasionando modificações no genoma em razão da célula ter que sobreviver e se adaptada ao meio de cultura e possíveis variações advindas desse processo, têm a capacidade de provocarem alterações fenotípicas na anatomia e na fisiologia, e no metabolismo do material (ZHANG et al., 2009; PHILLIPS;KAEPLER; OLHOFT, 1994).

No presente trabalho, variações somaclonais relacionadas ao número de cromossomos não foram observadas. Mostrando que os reguladores de crescimento utilizados no protocolo de embriogênese somática e o processo de transferências do material de meios de cultura não alteraram o ciclo celular, após as células serem induzidas para reiniciar o processo de mitose.

**Figura 05:** Cromossomos de raízes de calo e de planta não embriogênica.



A-cromossomos do clone CCN51 de planta não embriogênica. B-cromossomos do clone CCN51 de calo radicular. C-cromossomos do clone BN34 de planta não embriogênica. D-cromossomos do clone BN34 de calo radicular. E-cromossomos do clone CEPEC2002 de planta não embriogênica. F-cromossomos do clone CEPEC2002 de calo radicular.

A ausência de alterações na ploidia dos materiais de origem “*in vitro*” gerados a partir da embriogênese somática indireta indica que embora se tenha a etapa de formação de calo e condições de estresses que poderiam ocasionar distúrbios na divisão celular, essas alterações não foram observadas. De acordo com Evans e Sharp (1983), grande parte das alterações estão relacionadas com a separação de cromossomos o que ocasionaria poliplodias ou aneuploidias, quebras e pontes cromossômicas, mas não herdáveis o que as fazem ser de pouco risco para a embriogênese somática.

Além disso, a idade do explante e a quantidade de repicagem também são fatores que devem ser levados em consideração já que quanto mais jovem for o material menor será a probabilidade de acontecer alguma alteração genética e que quanto maior a quantidade de repicagem que o material

passou, eleva a possibilidade de variações. Assim, a escolha de explantes jovens e a obtenção de planta com o mínimo de repicagem garante uma maior confiabilidade na técnica e na manutenção da identidade clonal (CASARIN, 2016).

## **CONCLUSÃO**

Diante dos resultados encontrados foi possível confirmar o número cromossômico da espécie tanto no material de origem "*in vitro*" como no "*ex vitro*" de  $2n=20$  cromossomos. A técnica de embriogênese somática via indireta se apresenta como sendo segura para ser utilizada, visto que não observou-se alteração no número de cromossomos. Mas é necessário que se aperfeiçoe o protocolo da citogenética a fim de se fazer análises mais aprofundadas, verificando a morfologia e a quantidade de DNA, visto que a técnica de embriogênese somática é um processo novo, ainda está em avanço e se tem muito para se descobrir.

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA, F.A., MASCARENHAS, G.C.C., MIDDLEJ, R.R.. Estudo da Cadeia Agroindustrial do Cacau. In: VIEIRA, R..C.M.T., **Cadeias produtivas no Brasil: análise da competitividade**. Brasília, FGV/EMBRAPA,2001. p. 109-135.

AMARAL, P. A.; CASTRO, A. H. F. **Efeito do BAP na indução de calos e nos teores de fenóis e taninos totais em murici (Byrsonima verbascifolia Rich. Ex. A. Juss.)**. Resumos do XI Seminário Mineiro de plantas medicinais, 2ª jornada farmacêutica de Diamantina. 2005. p.102.

BAIRU, M. W. ADEYEMI O. AREMU, A.O., STADEN, J.V.. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. **Plant Growth Regulation**. v.63, p 147–173. mar. 2010

BERCKMANS, B.,VASSILEVA,V.,SCHMID, S.P.C., MAES,S.,PARIZOT,B., NARAMOTO,S., MAGYAR,Z., KAMEI, C.L.A., KONCZ, C.,BÖGRE, L., PERSIAU, G., DE JAEGER, G., FRIML, J., SIMON, R., BEECKMAN, T., DE VEYLDER L. Auxin-dependent cell cycle reactivation through transcriptional regulation of Arabidopsis E2Fa by lateral organ boundary proteins. **Plant Cell**, v. 23, p.3671–3683. out. 2011.

CANGAHUALA-INOCENTE, G. C.; STEINER, N.; SANTOS, M.; GUERRA, M. P. Morphohistological analysis and histochemistry of Feijoa sellowiana somatic embryogenesis. **Protoplasma**, v. 224, p. 33-40.out. 2004.

CARLETTO, G.M. **O número de cromossomos em cacauzeiros**, Boletim Técnico do Instituto de Cacau da Bahia, Salvador, n. 6, p. 35-39, 1946.

CARRER,H., BARBOSA,A.,L., RAMIRO,D.A., Biotecnologia na agricultura, **Estudos avançados**, v.24, n.70,p.149-164, 2010

CARVALHO, H.A.S., 2007. 87 f. **Análise bioquímica e molecular de proteases na interação Theobroma cacao- Moniliophthora perniciosa**. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular)-Universidade Estadual de Santa Cruz. 87 f. 2007.

CARVALHO, J. M. F. C.; GONZÁLEZ-BENITO, E.; PEREZ, C. 2001. Análise histológica de calogênese e embriogênese das cultivares de algodão cnpa precoce 2 e coker 312. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, Campina Grande, v. 5, n. 1, p. 235-239.2001.

CARVALHO, M.A.N., ANJOS,A.V.M.,PEREIRA,M.F., SANTOS, P.S., MENDES, R.B.E., **Benefícios do cacau (Theobroma Cacao L.) para a saúde**

humana. Faculdade de Juazeiro do Norte. X Semana de Iniciação da FJN, 2018.

CASARIN, T. **Propagação in vitro de pinhão-manso**. 2016. 63 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)-Universidade Federal de Pelotas. Pelotas. 2016.

COCKCROFT, C.E., DEN BOER, B.G., HEALY, J.M., MURRAY, J.A. Cyclin D control of growth rate in plants. **Nature**, v. 405, p.575–579. jun. 2000.

Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira - CEPLAC, **Cacau História e evolução**, Disponível em <[http://www.ceplac.gov.br/radar/radar\\_cacau.htm](http://www.ceplac.gov.br/radar/radar_cacau.htm)>, 2008,

CORREA.L.M., SOUSA, N.S., SOUZA, A.G.C., QUISEN, C.R. **Embriogênese Somática De Cupuaçu (Theobroma Grandiflorum):** Indução De Calogênese. In: Anais da VI Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental. p.88-97. 2010.

CUI., K.R., XING, G.S., LIU, X.M., XING, G.M., WANG, Y.F. Effect of Hydrogen Peroxide on Somatic Embryogenesis of Lycium barbarum L. **Plant Sci.** v. 146 p.9–16, ago. 1999.

CRUZ, J.F.M. 2012. 102 f. **Caracterização das sementes de variedades de cacau Theobroma cacao L. resistentes à vassoura de bruxa durante a fermentação e após a secagem**. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos)-Universidade Federal da Bahia. Salvador..2012.

DE GARA, L., DE PINTO, M.C. & ARRIGONI, O. Ascorbate synthesis and ascorbate peroxidase activity during the early stage of wheat germination. **Physiologia Plantarum**, v. 100, p. 894–900. jan. 1997.

DE NETTANCOURT. **Incompatibility and incongruity in wild and cultivated plants**. 2.ed. Berlin, Springer, p. 332. 2001.

DEWITTE, W., RIOU-KHAMLICHI, C., SCOFIELD, S., HEALY, J.M., JACQMARD, A., KILBY, N.J., MURRAY, J.A. Altered cell cycle distribution, hyperplasia, and inhibited differentiation in Arabidopsis caused by the D-type cyclin CYCD3. **Plant Cell**. vol. 15. p. 79–92. jan. 2003.

DIAS, L.A.S. **Melhoramento genético do cacaueiro**. Viçosa: Funape, p. 578. 2001.

Embrapa Cerrados. Andrade, Solange Rocha Monteiro de. Princípios da cultura de tecidos vegetais. Planaltina, Embrapa Cerrados, 2002

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Teixeira, João Batista. **Otimização da metodologia de embriogênese somática visando a**

**propagação clonal de genótipos elite de cacau (Theobroma cacao L.)** - Brasília, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.2003.

EMBRAPA. Centro Nacional de pesquisa de Algodão (Campinas Grande-PB). Julita Maria Frota Chagas Carvalho, Marina Medeiros de Araújo Silva e Terezinha Rangel Camara. **Mecanismos Antioxidativos Associados à Embriogênese Somática.**2009.

EMBRAPA. Centro Nacional de pesquisa de Algodão (Campinas Grande-PB). Julita Maria Frota Carvalho. **Técnicas de micropropagação.** 1999.

ESAN, E. B. **Tissue culture studies on cacao (Theobroma cacao L.), a supplementation of current research.** In International cocoa research conference, Idaban, Resume, p. 116-125.1977.

EVANS, D.A.; SHARP, W.R. Single gene mutations in tomato plants regenerated from tissue culture. **Science**, Washington, v.221, n.4614, p.949-951.set. 1983.

FANTINATO,D.E., ZANETTI,L.V., AGUILAR, M.A.G., SOUZA,C.A.S., CUZZUOL,G.R.F., VINÍCIUS N. GAMA, V.N., MILANEZ, C.R.D. Effects of silicon on biochemical and physiological aspects in Theobroma cacao under inoculation with *Moniliophthora perniciosa*. **Revista de Ciências Agrárias** , vol. 41, ed.3, p. 841-848. mai. 2018.

FEHÉR, A. **Why Somatic Plant Cells Start to form Embryos?. Somatic Embryogenesis.** In: Mujib A., Šamaj J. (eds) Somatic Embryogenesis. Plant Cell Monographs, vol 2. Springer, Berlin, Heidelberg. p. 85-101. dez. 2005.

FEHÉR, A.; PASTERNAK, T. P.; DUDITS, D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.74, p. 201-228. set. 2003.

FERRARI, I.F., 2016. 74 f., **Caracterização anatômica e molecular da embriogênese somática direta e indireta de Coffea arabica.** Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Campinas, 74 f. 2016.

FERREIRA, M.G.R., CARVALHO,C.H.S., CARNEIRO, A.A., FILHO, C.F.D., Indução de embriogênese somática em cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* schum.), **Rev. Bras. Frutic.**, v. 27, n. 3, p. 500-503, dez. 2005

FIGUEIRA, A.; JANICK, J.; GOLDSBROUGH, P.Genome size and DNA polymorphism in *Theobroma cacao* L. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, St. Joseph, v. 117, n. 4, p. 673-677.1992.

FIGUEIRA, A.; JANICK, J. **Somatic embryogenesis in woody plants. The Netherlands**, Kluwer Academic, c. 16, p. 291-310. 1995.

FIGUEIREDO, G. F.S., 2008. 57 f. **Análise cariotípica em Theobroma cacao I. em mutantes espontâneo**. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) -Universidade Estadual de Santa Cruz.. 57 f. 2008.

GANESAN, M.; JAYABALAN, N. Evaluation of haemoglobin (erythrogen): for improved somatic embryogenesis and plant regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L. cv. SVPR 2). **Plant Cell Report**, v.23, p.181–187.nov.2004.

GEORGE, E.F.; SHERRINGTON, P.D.**Plant propagation by tissue culture; handbook and directory of commercial laboratories**. Great Britain: British Library, p. 709.1984.

GRAÇA, M.E.C., FILHO, A.N.K., MEDEIROS, A.C.S. TAVARES, F.R. Efeitos das citocininas benzilamino purina e thidiazuron, na multiplicação “in vitro” de brotações de eucalyptus dunnii maid. **Bol. Pesq. Fl.**, Colombo, n.43, p.107-112. jul/dez. 2001.

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. **Embriogênese somática e sementes sintéticas**. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (eds.), *Cultura de tecidos e transformação genética em plantas*, Brasília: EMBRAPA-SPI, v.2, p.533-568. 1999.

INZÉ, D., DE VEYLLER, L. Cell cycle regulation in plant development. **Annu. Rev Genet.** v. 40, p.77–105.2006.

JIMENEZ, V.M. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on in vitro somatic embryogenesis. **Plant Growth Regulation**, v. 47, p. 91–110. nov. 2005.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal**. São Paulo, Ed. Guanabara-Koogan. p. 452.2004.

KONIECZNY, R.; LIBIK, M.; TULEJA, M.; NIEWIADOMSKA, M. Oxidative events during in vitro regeneration of sunflower. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.30, p.71-79. jan.2008.

KOUAKOU, T. H.; WAFFO-TÉGUO, P.; KOUADIO, Y. J.; VALLS, J.; RICHARD, T.; DECENDIT, A.; MÉRILLON, J.M. Phenolic compounds and somatic embryogenesis in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 90, p. 25-29. jul.2007.

KURAKAWA, T.; UEDA, N.; MAEKAWA, M.; KOBAYASHI, K.; KOJIMA, M.; NAGATO, Y.; SAKAKIBARA, H.; KYOZUKA, J. Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. **Nature**, v. 445, p. 652-655. fev. 2007.

LEMOS, C.Q., 2014. 72f. **BELHA Plebeia cf. flavocincta Como Potencial Polinizador do Cacaueiro (Theobroma Cacao L.) No Semiárido Brasileiro.** Dissertação (Mestrado em Zootecnia)- Universidade Federal do Ceará. 72 f. 2014..

LI, Z.; TRAORE, A.; MAXIMOVA, S.; GULTINAN, M. **Somatic embryogenesis and plant regeneration from floral explants of cacao (Theobroma cacao L.) using tidiazuron.** In *Vitro Cell Developmental Biology*, New York, v. 34, p. 293-299. 1998.

LIBIK, M.; KONIECZNY, R.; PATER, B.; SLESIAK, I.; MISZALSKI, Z. Differences in the activities of some antioxidant enzymes and in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content during rhizogenesis and somatic embryogenesis in callus cultures of the ice plant. **Plant Cell Reports**, vol. 23, p.834-841. mar. 2005.

LOPES, A. S. 2000. 130 f. **Estudo químico e nutricional de amêndoas de cacau (Theobroma cacao L.) e cupuaçu (Theobroma grandiflorum Schum) em função do processamento.** Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos)- Universidade Estadual de Campinas . 130 f. 2000

MALTA, S.K.C., SILVA, G., GOBETTI, S.T.C., Cacau na alimentação animal. **Ciência Veterinária Unifil**, [S.l.], v. 1, n. 1, p. 33-39, abr. 2018. ISSN 2595-7791. Disponível em: <http://periodicos.unifil.br/index.php/revista-vet/article/view/28>>. Acesso em: 30 jan. 2019.

MANTOVANI, N. C.; FRANCO, E. T. H.; VESTENA, S. Regeneração in vitro de louro-pardo (*Cordia Trichotoma* (Vellozo) Arrabida Ex Steudel). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 11, n. 2, p. 93-101. 2001

MATTIETO, R.A. 2001. 139f. **Estudo das transformações estruturais e físico-químicas durante o processo fermentativo em amêndoas de cacau (Theobroma cacao L.) e cupuaçu (Theobroma grandiflorum Schum).** Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos)- Universidade Estadual de Campinas. 139 f. 2001.

MAXIMOVA, S.N.; YOUNG, A.; PISHAK, S.; MILLER, C.; TRAORE, A.; GULTINAN, M.J. **Integrated system for propagation of Theobroma cacao L.** In: S. Jain, G. Mohan, and K. Pramod(eds.). *Forestry sciences. Protocol for somatic embryogenesis in woody plants.* Springer, Dordrecht, The Netherlands, vol. 77. 2005.

MOK, H. C ; MOK, D. W. S.; TURNER, J. E.; HUJER, C. V. Biological and biochemical effects of cytokinin -active phenylurea derivatives in tissue culture systems. **Hortscience**, Alexandria, v. 22, n. 6, p. 1194-1197. 1987.

MONTEIRO, W.R.; AHNERT, D. Melhoramento genético do cacauero. In: VALLE, R.R. **Ciência, tecnologia e manejo do cacauero**. Itabuna BA. p.189-198.2007.

MOURA, E. F., VENTRELLA, M.C., MOTOIKE, S.Y., JÚNIOR, A.Q.S., CARVALHO, M., MANFIO, C.E. Histological study of somatic embryogenesis induction on zygotic embryos of macaw palm (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Martius). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Berlin, v. 95, p. 175-184.2008.

NOGUEIRA, R.C., 2006.50 f. **Caracterização de calos embriogênicos de muricepequeno (*Byrsonima intermedia* a. juss.)**. Tese (Doutorado em Agronomia) -Universidade Federal de Lavras. 50 f. 2006.

PAVESE, F., KARSBUR, I.V. **Caracterização morfométrica dos cromossomos de quatro espécies do gênero Theobroma** I. Universidade do Estado de Mato Grosso. 2º Jornada Científica da Unemat.2009.

PENCE, V. C.; HASEGAWA, P. M.; JANICK, J. Asexual embryogenesis in *Theobroma cacao* L. **Journal of the American Society of Horticulture Science**, Alexandria, n. 104, p. 45-148. 1979.

PEREIRA, R.A., 2018. 80 f. **Enraizamento, crescimento, qualidade e morfoanatomia de miniestacas de cacauero**. Tese (Doutorado em Produção Vegetal)- Universidade Estadual de Santa Cruz. .80 f. 2018.

PEREIRA, A.R.; CARVALHO, S.; PEREIRA de; PASQUAL M.; SANTOS, F.C. Embriogênese somática direta em explantes foliares de *Coffea arabica* L. cv. Acaiá Cerrado: efeito de cinetina e ácido giberélico. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.31, n.2, p.332-336.2007.

PHILLIPS, R.L. KAEPLER, S.M., OLHOFT, P. Genetic instability of plant tissue cultures: Breakdown of normal controls. **Proceedings of the National Academy Science**, v. 91, p. 5222-5226.1994.

PILET, P.E.; SAUGY, M. Effect on root of endogenous and applied IAA and ABA. **Plant Physiology**, v.83, p.33-38.1987.

PINTO, G. SILVA, S.; LOUREIRO, J. Acclimatization of secondary somatic embryos derived plants of *Eucalyptus globulus* Labill.: an ultrastructural approach. **Trees**, Santa Monica, v. 25, p. 383–392.2011.

PINTO, D.I..J.G.E.C., VASCONCELOS,J.N.C., BRITO, A.L., SANTANA, J.R.F., efeito do 2,4-d na indução de calos em *Amburana cearensis*(allemão) a. c. smith. Anais Seminário de Iniciação Científica, n. 20, 2016.

PIRES,R.N., 2018. 86 f. **Ensaio com vista à indução de embriogênese somática em oliveira (*Olea Europaea L.*)**, Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrônoma) - Universidade De Évora. 86 f. 2018.

QUEIROZ, S.R.O.D., NETO, N.N.S., TOMÁS, A.F., SILVA, A.P.S., **Resposta de diferentes clone de *Theobroma cacao L.* ao protocolo de embriogênese somática**, III Congresso Brasileiro de Cacau,2012.

QUINGA,L.A.P, 2013. 121 f. **Embriogênese Somática, Metilação do Dna E Proteômica Em Quatro Genótipos De *Theobroma Cacao L.* Do Equador**; Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais)-Universidade Federal de Santa Catarina.. 121 f. 2013.

QUIROZ-FIGUEROA, F.R., ROJAS-HERRERA, R., GALAZ-AVALO, R.M., LOYOLA-VARGAS,V.M. Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, v. 86, p.,285–301.2006.

RAGHAVAN, V.; SRIVASTAVA, P.S. **Embryo culture**. In: JOHRI, B.M. (Ed.). Experimental embryology of vascular plants. Berlin: Springer Verlag, p.195-230.1982.

RIBAS, L.L.F.,1999. 206 f. **Morfogênese in vitro e micropropagação de *Aspidosperma polyneuron Müll. Arg. (PEROBA-ROSA)***.Tese (Doutorado Engenharia Florestal)-Universidade Federal Do Paraná. 206 f. 1999..

RICHARD, D.; LESCOT, M.; INZÉ, D.; DE VEYLDER, L.Effect of auxin, cytokinin, and sucrose on cell cycle gene expression in *Arabidopsis thaliana* cell suspension cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 69, p. 167-176.2002.

RIOU-KHAMLICHI, C., HUNTLEY, R., JACQMARD, A., MURRAY, J.A. Cytokinin activation of *Arabidopsis* cell division through a D-type cyclin. **Science**. vol. 283. p. 1541–1544.1999.

ROCHA, L. B. **A região cacauêira da Bahia – dos coronéis à vassoura-de-bruxa** : saga, percepção, representação / Lurdes Bertol Rocha. – Ilhéus : Editus. p. 255. 2008.

SALGADO, F.F., CARNEIRO, A.A., SOUZA,E.T.A., Embriogênese somática e regeneração em cultura de tecidos de linhagens de milho tropical. Revista brasileira de ciencias da vida, v.5. n.1. 2017.

SANTOS,D.M.B., NETO,M.T.C. **Impacto da irrigação com água salina sobre o crescimento inicial do cacauêiro BN34 e comum no semiárido da Bahia**, Brasil. III Congresso Brasileiro de Cacau. 2012.

SCONTTON, D.C.,2012. 148 f. **Genômica Funcional da interação do cacaueteiro (Theobroma cacao L.) X Moniliophthora perniciosa por meio do sistema modelo Micro-Tom (Solanum Lycopersicum L).** Tese (Doutorado em Biologia na Agricultura e no meio Ambiente) -Universidade de São Paulo.. 148 f. 2012.

SILVA, M.B., RAMOS, A.R., , VENTURIERI, G.A., Indução de calos em espécies amazônicas do gênero Theobroma, **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 30, n. 2, p. 257-265, mar./abr., 2006.

SILVA, R.O., 2018. 89 f. **Utilização dos resíduos sólidos da indústria cacaueteira para a produção de etanol.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. 89 f.2018.

SODRÉ, G.A. **Cultivo do Cacaueteiro no Estado da Bahia.** p.126. 2017

SODRÉ, A., LEITE, J.B.V. Sistema candelabro": proposta para cultivo intensivo de cacaueteiro, **Agrotropica**, v.30, n.2, p.135 – 146.2018.

SOUZA, A.. G. C.; GUIMARÃES, R. R.; NUNES, C. D. M. **Melhoramento genético do cupuaçueteiro (Theobroma grandiflorum (Willd. ex Spreng.) Schum.).** Manaus: EMBRAPA - CPAA,. Pesquisa em Andamento, n.12. 1992.

STEIN, V. C. PAIVA, R., VARGAS, D.P., SOARES, F.P., ALVES.E., NOGUEIRA, G.F. Ultrastructural calli analysis of Inga vera Willd. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 34, n. 5, p. 789-796. 2010.

SKOOG, F., MILLER, C.O. Chemical Regulation of Growth and Organ Formation In Plant Tissue Cultured in Vitro. **Symposia of the Society for Experimental Biology**, n. 11, 118-131. 1957.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal.** 5. ed., Artmed, p; 918. 2013

THOMAS E., MAARTEN VAN ZONNEVELD,M.V., LOO,J., HODGKIN,T., GALLUZZI,G., ETTENJ.V., Present Spatial Diversity Patterns of Theobroma cacao L. in the Neotropics Reflect Genetic Differentiation in Pleistocene Refugia Followed by Human-Influenced Dispersal. **PLoS One** vo.7. out.2012.

VAUGHAN, D; ORD, B.G. Influence of phenolic acids on morphological changes in roots of Pisum sativum. **Journal of Science of Food and Agriculture**, v. 52, p.289-299. 1990.

WANG, Y. C.; JANICK, J. Inducing precocious germination in asexual embryos of Theobroma cacao L. **Horti Science**, Alexandria, v. 19, p. 839-841.1984.

WOOD, G. A. R.; LASS, R. A. **Cocoa**. 4. ed. New York: Longman Scientific & Technical and John Wiley & Sons.1987.

ZANELLO, C.A., 2018. 90 f. **Propagação in vitro de Orquídeas Phalaenopsis por segmentos de inflorescências e embriogênese somática**. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados) -Universidade Federal de São Carlos. 90 f. 2018.

ZHANG, M., XU C., YAN, H., ZHAO, N., VON WETTSTEIN, D., LIU, B. Limited tissue culture-induced mutations and linked epigenetic modifications in F1 hybrids of sorghum pure lines are accompanied by increased transcription of DNA methyltransferases and 5-methylcytosine glycosylases. **Plant Journal**, v.57, p. 666-679..2009.