



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA– UESB
PROGRAMA MULTICÊNTRICO EM BIOQUÍMICA E
BIOLOGIA MOLECULAR – PMBqBM



Glécia Leolina de Souza Meira

ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E
CONTAGEM CROMOSSÔMICA EM *Theobroma cacao* L.

VITÓRIA DA CONQUISTA – BA

ABRIL – 2021

GLÉCIA LEOLINA DE SOUZA MEIRA

**ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E
CONTAGEM CROMOSSÔMICA EM *Theobroma cacao* L.**

Tese 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 Doutora.

Orientador: Crislene Viana da Silva

Co-orientador: Carlos Takeshi Hotta

VITÓRIA DA CONQUISTA – BA

ABRIL – 2021

TERMO DE APROVAÇÃO**GLÉCIA LEOLINA DE SOUZA MEIRA****ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E
CONTAGEM CROMOSSÔMICA EM *Theobroma cacao* L.**

Tese apresentada ao Programa Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular, da
Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, para obtenção do título de Doutora em Ciências
(Bioquímica e Biologia Molecular)

27 de abril de 2021

Comissão Examinadora:

Profa. Dra. Crislene Viana da Silva

Universidade Estadual Do Sudoeste Da Bahia



Profa. Dra. Elisa Susilene Lisboa dos Santos

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia



Profa. Dra. Bárbara Dantas Fontes Soares

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia



Prof. Dr. Diego Silva Batista

Universidade Federal da Paraíba



Dra. Lorena Melo Vieira

Universidade Federal de Viçosa

“É preciso que eu suporte duas ou três larvas se
quiser conhecer as borboletas”.

Antoine de Saint-Exupéry

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me permitir vivenciar as dores e deleites que esse programa me proporcionou;

À toda minha família, pelo respeito às minhas decisões e metas, em especial ao meu esposo, Fabiano, pelo apoio incansável e ao meu filho José Pedro que nasceu durante essa Pós-graduação e que me motivou ainda mais em continuar;

Aos meus colegas de curso, em especial a Beatriz Rabelo pelo companheirismo e amizade;

À minha orientadora, Crislene Viana, por acreditar na minha capacidade e ser uma pessoa tão sensível e humana;

À CEPLAC e todos os seus funcionários por permitirem e apoiarem a realização do meu trabalho em suas instalações, em especial à Nádía Nick e George Sodré;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pela bolsa concedida durante parte do tempo do programa.

RESUMO

Theobroma cacao L., árvore que possui ocorrência natural na Mata Atlântica e é extensamente cultivada no sul da Bahia, tem como fruto o cacau, principal matéria prima para a produção de chocolates. O sul da Bahia, já esteve no topo da produção mundial, no entanto, a infestação da vassoura-de-bruxa fez cair essa eficiência produtiva. Nos dias atuais, após altos e baixos da cultura cacauífera no Brasil, ela se reergue no cenário mundial. Tecnologias para aumentar a produtividade e visando a resistência a pragas vem sendo criadas, destacando-se a embriogênese somática, técnica de propagação *in vitro*, a qual auxilia na reprodução de espécies recalcitrantes e de difícil proliferação como o cacauífera. A indução da embriogênese somática depende de fatores determinantes, como o genótipo da planta, fatores ambientais, e da resposta a reguladores de crescimento e ao estresse oxidativo. Estudos correlacionam o aumento da atividade de enzimas antioxidativas com a melhora da resposta embriogênica. Nesse sentido, pretendeu-se estudar a atividade enzimática na embriogênese somática de diferentes clones e explantes do *Theobroma cacao* L.. Além disso, buscou-se desenvolver um protocolo para visualização de cromossomos nos clones cultivados *in vitro* e *ex vitro*. Para indução da embriogênese somática, foram utilizados botões florais (pétalas e estaminoides) dos genótipos CCN51, CEPEC2002 e BN34. Verificou-se que Superóxido dismutase, Ascorbato peroxidase e Peroxidase do guaiacol são marcadores bioquímicos específicos em diferentes estágios do desenvolvimento embriogênico. A reprodução clonal “*in vitro*”, via embriogênese somática indireta não mostrou alteração no número de cromossomos, quando comparada a reprodução *ex vitro*.

Palavras-chave: Cultura de tecidos. Micropropagação. Genótipos de cacau. Cromossomos. Biotecnologia.

ABSTRACT

Theobroma cacao L., a tree that occurs naturally in the Atlantic Forest and is extensively cultivated in southern Bahia, has cocoa as its fruit, the main raw material for the production of chocolates. The south of Bahia was already at the top of world production, however, the witches' broom infestation made this productive efficiency drop. Nowadays, after the ups and downs of the cocoa culture in Brazil, it resurfaces on the world stage. Technologies to increase productivity and target resistance to pests have been created, highlighting somatic embryogenesis, an *in vitro* propagation technique, which helps in the reproduction of recalcitrant and difficult-to-proliferate species such as cocoa. The induction of somatic embryogenesis depends on determining factors, such as the plant's genotype, environmental factors, and the response to growth regulators and oxidative stress. Studies correlate the increase in the activity of antioxidant enzymes with the improvement of the embryogenic response. In this sense, we intended to study the enzymatic activity in somatic embryogenesis of different clones and explants of *Theobroma cacao* L.. In addition, we sought to develop a protocol for visualization of chromosomes in clones cultivated *in vitro* and *ex vitro*. To induce somatic embryogenesis, flower buds (petals and staminoids) of the CCN51, CEPEC2002 and BN34 genotypes were used. It was found that Superoxide dismutase, Ascorbate peroxidase and Peroxidase of guaiacol are specific biochemical markers at different stages of embryogenic development. Clonal reproduction "*in vitro*", via indirect somatic embryogenesis, did not show changes in the number of chromosomes, when compared to *ex vitro* reproduction.

Keywords: Tissue culture. Micropropagation. Cocoa genotypes. Chromosomes. Biotechnology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Flor de <i>Theobroma cacao</i> L.....	14
Figura 2: Frutos de cacau.....	15
Figura 3: Produção de cacau em mil toneladas de 1974 e 2019.	16
Figura 4: Atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) em pétalas e estaminoides.	29
Figura 5: Atividade enzimática da peroxidase do guaiacol (GPX) em pétalas e estaminoides.	31
Figura 6: Atividade enzimática da ascorbato peroxidase (APX) em pétalas e estaminoides.....	32
Figura 7: Atividade enzimática da catalase (CAT) em pétalas e estaminoides.	33
Figura 8: Atividade enzimática de SOD em calos e embriões somáticos dos clones CCN51 e BN34 aos 165 dias de cultivo embriogênico.....	34
Figura 9: Atividade enzimática de SOD em embriões somáticos dos clones CCN51 e BN34 aos 225 dias de cultivo embriogênico.....	35
Figura 10: Atividade enzimática de GPX em calos e embriões somáticos dos clones CCN51 e BN34 aos 165 dias de cultivo embriogênico.	35
Figura 11: Atividade enzimática de GPX em calos e embriões somáticos dos clones CCN51 e BN34 aos 225 dias de cultivo embriogênico.	36
Figura 12: Atividade enzimática de APX em calos e embriões somáticos dos clones CCN51 e BN34 aos 165 dias de cultivo embriogênico.	36
Figura 13: Atividade enzimática de CAT em calos e embriões somáticos dos clones CCN51 e BN34 aos 165 dias de cultivo embriogênico.	37
Figura 14: Atividade enzimática de superóxido dismutase (SOD) em estaminoides marrons dos clones CCN51, BN34 e CEPEC2002 em diferentes dias de cultivo embriogênico.	38
Figura 15: Atividade enzimática de peroxidase do guaiacol (GPX) em estaminoides marrons dos clones CCN51, BN34 e CEPEC2002 em diferentes dias de cultivo embriogênico.	38
Figura 16: Atividade enzimática de ascorbato peroxidase (APX) em estaminoides marrons dos clones CCN51, BN34 e CEPEC2002 em diferentes dias de cultivo embriogênico.	39
Figura 17: Atividade enzimática de catalase (CAT) em estaminoides marrons dos clones CCN51, BN34 e CEPEC2002 em diferentes dias de cultivo embriogênico.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2,4-D - Ácido diclorofenoxiacético

ANOVA – Análise de variância

AI – Autoincompatibilidade

AE – Atividade enzimática

APX – Ascorbato peroxidase

BAP – Benzenilaminopurina

CAT – Catalase

CEPEC- Centro de Pesquisas do Cacau

CEPLAC – Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira

DKW – Driver and Kuniyaki Walnut

DNA – Ácido desoxirribonucleico

E – Estaminoides

ED – Desenvolvimento de embrião

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

ES – Embriogênese Somática

GPX –Peroxidase do guaiacol

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

H₂O – Água

O₂ – Oxigênio

ICP – Indução de calo primário

ICS – Indução de calo secundário

NBT – Nitroazul de tetrazólio

P – Pétalas

POD – Peroxidases

PVP – polivinilpirrolidona

SOD – Enzimas Superóxido Dismutase.

TDZ – Thidiazuron

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	9
INTRODUÇÃO	12
OBJETIVOS	13
OBJETIVO GERAL	13
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
CAPÍTULO 1 – REVISÃO DE LITERATURA	14
<i>THEOBROMA CACAO L.</i> : ASPECTOS GERAIS	14
<i>THEOBROMA CACAO L.</i> : ASPECTOS ECONÔMICOS	16
<i>THEOBROMA CACAO L.</i> : CHOCOLATE FINO	17
EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA	18
EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DO <i>THEOBROMA CACAO L.</i>	19
EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E ESTRESSE OXIDATIVO	21
CAPÍTULO 2 – ATIVIDADE ENZIMÁTICA NA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE CLONES DE <i>Theobroma cacao L.</i>	23
Resumo	23
Introdução	23
Material e Métodos	25
Resultados	27
Atividade enzimática em calos e embriões na embriogênese somática primária	27
Atividade enzimática de SOD	28
Atividade enzimática de Peroxidase do guaiacol (GPX)	30

Atividade enzimática de Ascorbato peroxidase (APX)	32
Atividade enzimática de catalase (CAT)	33
Atividade enzimática em calos e embriões na embriogênese somática secundária	34
Discussão	40
Conclusão	44
Conflitos de interesse	44
Agradecimentos	44
Referências	46
CAPÍTULO 3 - DETERMINAÇÃO DE PROTOCOLO PARA VISUALIZAÇÃO DE CROMOSSOMOS EM CLONES DE <i>Theobroma Cacao</i> L. CULTIVADOS <i>IN VITRO</i> E <i>EX VITRO</i>	49
Resumo	49
INTRODUÇÃO	50
MATERIAL E MÉTODOS	51
RESULTADOS	53
DETERMINAÇÃO DE PROTOCOLO PARA OBTENÇÃO DE CROMOSSOMOS DE <i>THEOBROMA CACAO</i> L.	53
OBTENÇÃO DE CROMOSSOMOS	53
DISCUSSÃO	54
CONCLUSÃO	56
AGRADECIMENTOS	56
CONFLITOS DE INTERESSE	56
REFERÊNCIAS	57
REFERÊNCIAS	60
ANEXOS	69

INTRODUÇÃO

O cacauieiro (*Theobroma cacao L.*) tem como fruto o cacau, que corresponde à principal matéria prima para a fabricação de chocolates, alimento consumido no mundo todo e que movimenta diversos setores da economia. O cultivo do cacau no Brasil já foi mais expressivo, e seu principal produto considerado “fruto de ouro”, no entanto, devido a vassoura-de-bruxa, esse cultivo passou por grandes crises a partir do final da década de 1980 atingindo principalmente a região do sul da Bahia, maior produtora nacional de cacau.

Apesar dos problemas com estiagem nos últimos anos, preço baixo e pragas, a Bahia continua com peso importante na produção nacional, em razão do aumento da produtividade por hectare, no que reflete os esforços dos agricultores, estado e instituições de pesquisa para a manutenção e ampliação da cacauicultura baiana (BRASIL, 2020).

O cacauieiro além de ser um dos principais elementos na economia dos locais onde é cultivado, exerce um papel importante na conservação da biodiversidade pois é plantado na sombra de grandes árvores da mata atlântica, não sendo necessário efetuar o desmatamento, já que consegue conviver bem com a vegetação nativa (CASSANO et al., 2009).

O cacauieiro se caracteriza pela diversidade fenotípica devido a sua heterozigosidade genética. Por conta disso, os genótipos de interesse comercial necessitam serem propagados de maneira assexuada. Dessa forma, a embriogênese somática se configura uma boa alternativa para a propagação de clones com características desejadas de resistência a pragas e boa produtividade.

Com o objetivo de melhorar a reprodução de variedades superiores, centros de pesquisas como a Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC) tem desenvolvido protocolos para a proliferação *in vitro* desses genótipos através da técnica de embriogênese somática (ES).

A técnica de ES que consiste na formação de células embriogênicas através de células somáticas é relativamente nova, sendo que o primeiro protocolo de embriogênese somática para a proliferação do cacau foi desenvolvido por Li et al. (1998). A partir daí pesquisadores como Maximova vem buscando melhor protocolos visando a otimização do processo (QUINGA, 2013).

Sabe-se que a ES é influenciada por diversos fatores como meio de cultura, genótipo e explantes (BISPO et al., 2007), condições do meio ambiente como luz, temperatura, oxigênio e gás carbônico (CID, 2001) e pela adição de fitorreguladores como o ácido abscísico, o etileno, o ácido giberélico (Carvalho et al., 2006) e de agentes estressores como o peróxido de hidrogênio

(Carvalho, 2009). No entanto, são poucos os estudos que analisam a influência desses fatores na otimização da técnica de embriogênese somática.

À vista disso, este estudo poderá ajudar a elucidar mecanismos bioquímicos envolvidos na embriogênese somática preenchendo lacunas do conhecimento nessa área, que possam reduzir o tempo de cultivo e aumentar a produtividade, otimizando o processo de produção do cacau.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

- Avaliar a eficiência da embriogênese somática dos clones CCN51, CEPEC2002 e BN34 de *Theobroma cacao* L. por meio da análise das enzimas antioxidantes.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade enzimática de superóxido dismutase, ascorbato peroxidase, peroxidase do guaiacol e catalase como marcadores de estresse oxidativo em calos e embriões somáticos;
- Estudar a citogenética do material embriogênico para avaliação de possíveis variações somaclonais de ploidia.

CAPÍTULO 1 – REVISÃO DE LITERATURA

Theobroma cacao L: ASPECTOS GERAIS

Theobroma cacao L. é uma espécie arbórea perene, eudicotiledônea e diploide ($2n=20$) (FIGUEIRA et al., 1992), com genoma relativamente pequeno, organizado em dez pares de cromossomos (DA SILVA et al., 2017). É nativa dos bosques úmidos tropicais da América Equatorial (THOMAS et al., 2012), cujo gênero compreende 22 espécies (ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP, 2009), e pertence à Família Malvaceae (ALVERSON et al., 1999).

Considerado como alimento dos deuses, *Theobroma cacao* L. fornece a matéria-prima para a multibilionária indústria do chocolate, além disso, os grãos do cacau têm vários outros usos não alimentares nas indústrias farmacêutica e cosmética (WICKRAMASURIYA, DUNWELL, 2018).

O cacaeiro é uma planta hermafrodita com flores pentâmeras, monóclinas (Figura 1). A espécie é predominantemente alógama e apresenta autoincompatibilidade gametofítica e esporofítica. A autoincompatibilidade (AI) tem sido definida como a incapacidade de uma planta fértil hermafrodita produzir zigotos após a autopolinização (QUINGA, 2013), sendo considerada um mecanismo fisiológico, com base genética, que favorece a alogamia, promovendo a variabilidade genética (SCHIFINO e DALL'AGNOL, 2002).

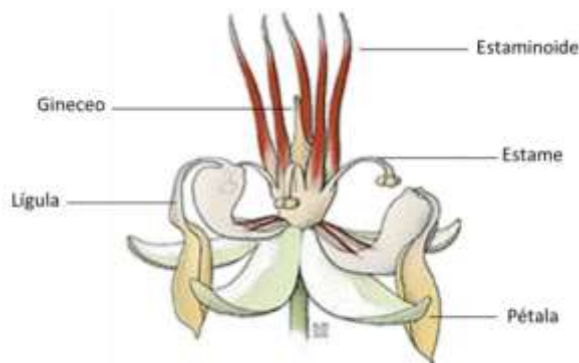


Figura 1: Flor de *Theobroma cacao*
Imagem: ALAM CHOU, 2008. In:
QUINGA (2013).

As plantas de cacau espalharam-se em duas direções geográficas distintas, dando origem a diferentes grupos genéticos (BRAUDEAU, 1969; FIGUEIREDO, 2008), sendo eles Crioulos, Forasteiros e Trinitários, dos quais derivaram as culturas existentes em todo o mundo (DIAS, 2001).

De acordo com Santos (2014), o morfotipo Crioulo compõe um grupo uniforme, que apresenta frutos vermelhos quando imaturos e amarelos ao amadurecer. Apesar de apresentar baixa produção e pouca resistência a doenças, os grãos desse grupo estão relacionados com a

produção de chocolate considerado superior, com sabor e flavor agradáveis, isto é, menos amargos.

O grupo Forasteiro possui fruto verde quando imaturo e amarelo-ouro quando maduros. Possui várias sub-variedades e é mais resistente à pragas do que a variedade Crioulo, o que torna seus grãos mais baratos e competitivos na produção de chocolate correspondendo cerca de 80% da produção (EFRAIM, ALVES, JARDIM, 2011).

Já o Trinitário surgiu em Trinidad, a partir de hibridações naturais entre o cacau Forasteiro e Crioulo (BARTLEY, 2005; YANG et al., 2013). Combina as melhores características de seus predecessores, possuindo a resistência do 'Forasteiro' e o aroma característico do 'Crioulo' (DIAS; KAGEYAMA, 1997). Atualmente, as variedades do grupo Trinitário são reproduzidas assexualmente (enraizamento de estacas, ou enxertia) constituindo-se em clones. Esses clones são muito cultivados na América Central, principalmente em Trindade e Costa Rica, países de onde se originaram, e foram introduzidos em outros países e na zona cacauera da Bahia (HANSEN, 2017).

Entre os 16 clones de cacau recomendados pela Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC) por suas características de produtividade, resistência a pragas e qualidade da amêndoa estão os clones autocompatíveis CCN51, originário do Equador, CEPEC2002 e BN34 originários do Brasil. O clone CCN51 possui frutos grandes de coloração vermelho arroxeado, quando imaturo e amarelo quando maduros, é rugoso, com sulcos medianamente profundos e tem formato alongado. Já o Clone Cepec2002 possui frutos pequenos na cor verde quando imaturos, mas quando maduros são de cor amarela e rugosidade mediana. O BN34 é considerado um clone regional com frutos vermelhos e de porte pequenos (Figura 2) (BRASIL, 2018b).



Figura 2: Frutos de cacau. De cima para baixo: CCN51, CEPEC2002 e BN34. Arquivo do estudo.

Theobroma cacao L.: ASPECTOS ECONÔMICOS

A maior parte da produção mundial de cacau (aproximadamente 80% a 90%) vem de pequenos agricultores (WORLD COCOA FOUNDATION, 2014), sendo que o seu cultivo é importante para a subsistência de mais de 40 milhões de pessoas (BEG et al., 2017). A produção global de cacau em 2017/2018 foi de 75, 2% na África, 18% na América e 6,3% na Ásia e Oceania (ICCO, 2019).

O Brasil já foi o maior exportador de cacau e hoje ocupa a sétima posição na produção mundial (BRASIL, 2020). Na década de 80, a produção chegou ao recorde nacional, atingindo 458,7 mil toneladas, com mais de 655 mil hectares de área colhida, no ano de 1986. Nos anos 2000, a produção regrediu ao patamar abaixo de 200 mil toneladas e, desde então, vem oscilando até atingir a média atual de 250 mil toneladas por ano. A figura abaixo mostra a produção de cacau em mil toneladas no Brasil, na Bahia e no Pará, da década de 70 até a atualidade (BRASIL, 2020). A figura 3 mostra a produção de cacau em mil toneladas no Brasil, na Bahia e no Pará.

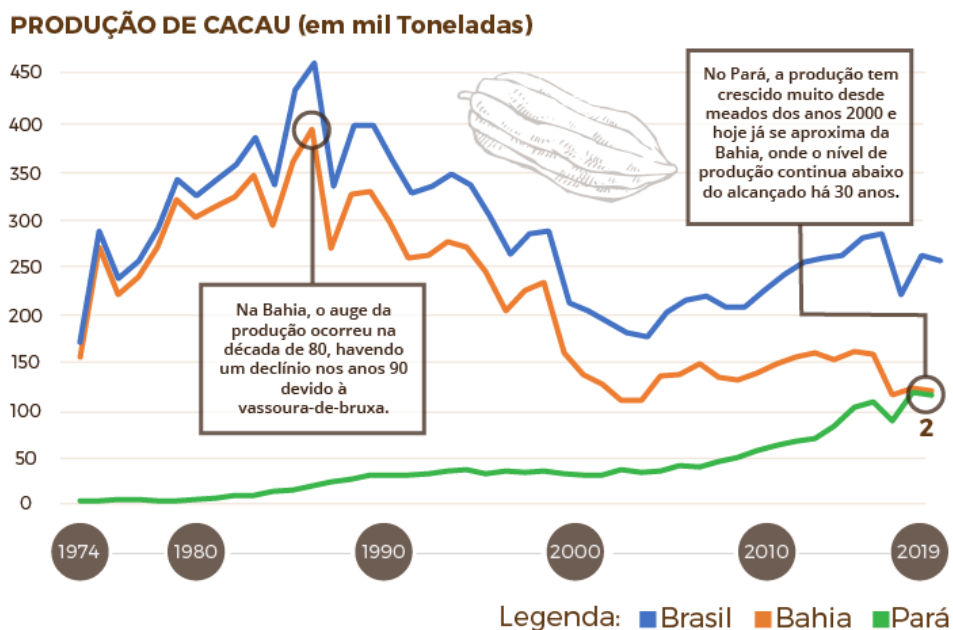


Figura 3: Produção de cacau em mil toneladas de 1974 a 2019. BRASIL, 2020.

O déficit da produção brasileira deu-se em decorrência de diversos fatores, como estiagens, queda nos preços e o avanço da “vassoura-de-bruxa” sobre as lavouras da Bahia, maior produtor do país (BRASIL, 2020).

O fungo *Moniliophthora perniciosa*, causador da “vassoura-de-bruxa”, trata-se de um basidiomiceto, hemibiotrófico, da ordem Agaricales e família Marasmiaceae (SILVA et al., 2002). A denominação da doença provém do sintoma típico que a planta exhibe quando infectada por esse fungo: o superbrotamento dos ramos, semelhante a uma vassoura seca (SCOTTON, 2012).

Apesar de variedades de cacau tolerantes à “vassoura-de-bruxa”, e com alta produtividade já terem sido desenvolvidas, é necessária a manutenção dessa característica com a propagação clonal, considerada a melhor estratégia para uma rápida recomposição das áreas atingidas pela doença (TEIXEIRA, 2002; SCOTTON, 2012). Essa propagação tem sido feita pela CEPLAC, através de enxertia por substituição de copa, enraizamento de estacas ou ainda por meio da micropropagação via embriogênese somática, por meio da qual se pode alcançar altas taxas de proliferação (TEIXEIRA, 2002).

Theobroma Cacao L.: CHOCOLATE FINO

Além de investirem no aumento da produtividade, com o objetivo de crescer no cenário global, produtores investem na venda de produtos com maior valor agregado, como o chocolate fino (BRASIL, 2020). Assim, o mercado de chocolate fino, naturalmente relacionado com o cacau fino, alcança margens de comercialização superiores, chegando, às vezes, com preço ao consumidor dez vezes maior que o chocolate comum. Entre as características do chocolate fino estão: ser obtido de cacau fino, com presença de sabor e aroma marcantes, ausência de lecitina e de aditivos (BRASIL, 2018).

Para distinguir o cacau fino de outros cacaos (bulk) são utilizados parâmetros genéticos/geográficos; químicos; e organolépticos. Em busca de destacar o sabor, aroma e textura originais do chocolate, os produtores estão explorando novas possibilidades para deixar uma identidade diferente no produto final. Segundo os especialistas da CEPLAC, quando o processo de beneficiamento das amêndoas do cacau é feito de forma correta, o produtor consegue eliminar perdas, reduzir custos, ganhar peso do cacau seco e, conseqüentemente, ter mais lucratividade (BRASIL, 2020). Além disso, o desenvolvimento de técnicas pós colheita, fermentação e secagem, podem melhorar a qualidade do cacau brasileiro e aumentar a sua participação no mercado do chocolate fino (BRASIL, 2018b).

Nos últimos anos, o chocolate tem recebido especial atenção por suas propriedades nutricionais benéficas. Os principais compostos do chocolate que contribuem para a saúde humana são os polifenóis encontrados no cacau, que atuam como antioxidantes e possuem

potencial anti-inflamatório, cardioprotetor, anti-hepatotóxico, antibacteriano, antiviral, antialérgico e propriedades anticancerígenas (ACKAR, et al., 2013). Contêm triptofano, que diminui a ansiedade, promove o relaxamento e desencadeia a produção de endorfinas (ROYA KELISHADI, 2005; SOKOLOV, 2013). Em estudo recente, Carvalho et al (2018), mostrou o efeito do chocolate amargo sobre a saúde, melhorando os perfis de colesterol HDL e LDL, pressão arterial, glicose e consumo de oxigênio durante atividades físicas.

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

A embriogênese somática (ES) é o processo pelo qual células somáticas, em condições de indução, geram células embriogênicas, que resultam na formação de um embrião somático (QUIROZ-FIGUEIROA et al., 2006; ZIMMERMANN, 2010). Para adquirir competência embriogênica, as células somáticas necessitam reprogramar padrões de expressão gênica, além de realizar mudanças na morfologia, fisiologia e metabolismo (NAMASIVAYAM, 2007).

Sendo assim, a ES 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 (MORAES, 2003; QUIROZ-FIGUEIROA et al., 2006). Além disso, a ES possibilita a produção clonal de um elevado número de plantas em um curto espaço de tempo, ocupando uma área física bastante reduzida se comparada com os métodos convencionais de multiplicação (PEREIRA et al., 2007).

Em condições específicas de cultura de tecidos, uma única célula somática (ou grupos de células) pode ser convertida em um embrião que se desenvolve em uma planta geneticamente idêntica à planta doadora (KONIECZNY et al., 2012). Dessa forma, a embriogênese somática apresenta vantagens como a obtenção de grande número de propágulos (embriões somáticos) (XAVIER, 2009, KONIECZNY et al., 2012).

À vista disso, a embriogênese somática pode ocorrer de forma direta, em que os embriões somáticos originam-se diretamente de tecidos de matrizes, sem o estabelecimento de estádios intermediários de calos; ou de forma indireta, na qual os embriões somáticos formam-se a partir de calos que apresentam células em diferentes estádios de diferenciação. Em ambos os padrões, o embrião somático segue a mesma sequência de desenvolvimento do embrião zigótico, ou seja, a passagem pelos estádios globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar (DONATO, 2000; ZIMMERMANN, 2010).

A embriogênese somática primária, acontece quando o embrião somático segue a sequência de desenvolvimento acima relatada. Já a embriogênese somática secundária ocorre quando novos embriões são formados a partir de embriões somáticos primários (UZELAC et al., 2007; KARAMI et al., 2008), ou seja, os embriões formados na embriogênese primária são repicados e colocados no meio de desenvolvimento secundário para estimular a formação de novos calos.

Segundo Jariteh et al. (2011) e Vasic et al. (2001), a embriogênese somática secundária tem certas vantagens em comparação com a embriogênese somática primária, como alta taxa de multiplicação, a independência de uma fonte de explante e a repetibilidade de formação de embriões.

Alguns estudos referem que nas técnicas da cultura de tecidos, existe um risco de ocorrer variações genéticas nas células ou nas plantas, conhecidas como variação somaclonal (GEORGE, 2007). O risco de variações genéticas é geralmente maior quando as plantas se originam por embriogênese somática indireta que se deve ao longo período da fase de calogênese (BAIRU et al., 2011). São diversos os mecanismos causadores da variação somaclonal, como variações cromossômicas, a ativação de transposons, mutações em um único gene, metilações do DNA, a poliploidia e as mutações nucleares e citoplasmáticas (SRISAWAT et al., 2005; RIVAL et al., 2009; MADON et al., 2012).

Considerando a importância do cultivo do *Theobroma cacao* L., um método de propagação eficiente do cacaueteiro é essencial para acelerar os programas de melhoramento e evitar interrupções de produção no futuro (LALIBERTE e END, 2015). Nesse sentido, a embriogênese somática, por proporcionar rápida multiplicação vegetal e manutenção da identidade genética das plantas superiores, passou a ser aplicada como técnica de pesquisa e interesse industrial (PINTO, SILVA e LOUREIRO, 2011).

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE *Theobroma cacao* L.

O cacaueteiro é uma espécie que apresenta sementes recalcitrantes, que sofrem desidratação pouco tempo após a maturidade fisiológica, e danos físicos decorrentes da dessecação (TIMMS; STEWART, 1999) não resistindo à secagem e armazenamento. Dessa forma, a propagação de *Theobroma cacao* L. pelo plantio das sementes se torna limitada (BOUTCHOUANG, 2016).

A técnica de embriogênese somática permite a propagação em larga escala, com rendimento de hastes por matriz da embriogênese duas a três vezes superior a matrizes no campo (BRASIL, 2018b).

Como relatado por Teixeira (2002), botões florais bem desenvolvidos, coletados logo antes da antese, são as fontes de estaminoides mais propensas à indução embriogênica, sendo que pétalas e estaminoides têm dado resultados satisfatórios. Entretanto, os estaminoides são os que melhor respondem ao cultivo *in vitro*.

A embriogênese somática secundária, processo pelo qual os embriões adventícios são formados a partir de cotilédones de embriões imaturos (MINYAKA et al., (2008) tem sido amplamente descrita durante a embriogênese somática em *Theobroma cacao L.* e promove melhores resultados para a propagação dessa planta (QUINGA, 2013).

Com isso, destaca-se que os primeiros estudos utilizando a embriogênese somática para a produção do cacau obtiveram baixos rendimentos (SONDAHL et al., 1993). O primeiro protocolo com maior rendimento foi desenvolvido por Li et al. (1998), e mostra a importância da variação genotípica na resposta embriogênica. Esse protocolo básico de embriogênese somática em cacau foi otimizado por Maximova et al. (2002), que desenvolveu um método-chave para a embriogênese somática secundária utilizando explantes de cotilédones da embriogênese somática primária (GARCIA et al., 2016).

Segundo Rodriguez et al. (2010), as linhagens de células mutantes formadas como resultado da indução da embriogênese somática no cacau perdem progressivamente totipotência, de modo que as linhagens de células totipotentes livres de mutações são as que predominam. Foi observado que os embriões somáticos formados na embriogênese somática (primária e secundária) exibiram um baixo número de mutações e que a divergência genética e epigenética entre a planta matriz e o embrião somático não é estatisticamente diferente.

É possível reproduzir clones de elite do *Theobroma cacao L.* utilizando a embriogênese somática (MAXIMOVA et al., 2002). No entanto, sua aplicação é limitada pelo longo período de tempo, desde o início da cultura até a produção de embriões (6–8 meses), e o relativo alto custo por planta produzida (TRAORE et al., 2003).

Segundo Pinto, et al. (2008), quando houver uma melhor compreensão dos fatores que controlam a embriogênese somática, haverá aumento da eficiência de protocolos. Entre essas variáveis estão a interação entre fatores internos (genótipo, idade, tipo de explante, condições fisiológicas) e fatores externos (composição do meio de cultura, reguladores de crescimento, luz, temperatura e presença de compostos antioxidantes).

Estudos bioquímicos, associados aos estudos morfológicos e histológicos estão sendo realizados durante a embriogênese somática em diferentes plantas, proporcionando uma grande quantidade de informações, incluindo aquelas associadas às alterações bioquímicas relacionadas com a indução da competência embriogênica (KOMAMINE et al., 1991).

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E ESTRESSE OXIDATIVO

As espécies reativas de oxigênio (EROs), como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), superóxido ($O_2\bullet$) e radicais hidroxila ($HO\bullet$) são produzidas naturalmente durante os processos metabólicos das células, como a respiração e a fotossíntese nas mitocôndrias, cloroplastos e peroxissomos, e em pequenas quantidades agem como moléculas sinalizadoras para o crescimento e desenvolvimento das células (OBERT et al., 2005; DEL RÍO et al., 2006). No entanto, em concentrações elevadas são capazes de reagir com biomoléculas (DNA, fosfolípídeos e proteínas afetando a integridade e função celular (DEL RÍO et al., 2006). Para conter essa citotoxicidade, as células possuem complexos mecanismos enzimáticos e não-enzimáticos de neutralização de EROs (APEL, HIRT, 2004; MØLLER et al., 2007). Quando o equilíbrio entre a produção e a neutralização é alterado, com aumento dos EROs, ocorre o "estresse oxidativo" (APEL, HIRT, 2004).

As primeiras fases da embriogênese de plantas cultivadas *in vitro* são caracterizadas pela indução de grande quantidade de genes relacionados ao estresse, levando à hipótese de que a ES seja uma resposta extrema ao estresse. Alguns estudiosos têm correlacionado o aumento da atividade de enzimas antioxidativas com a resposta embriogênica, sugerindo que o aumento da atividade delas relaciona-se com o estresse oxidativo, o qual ajuda acelerar o processo de ES (CUI et al., 1999; GANESAN; JAYABALAN, 2004; LIBIK et al., 2005; KONIECZNY et al., 2008; CARVALHO, 2009).

Com isso, essas espécies reativas produzem modificações no padrão de expressão gênica, metabolismo celular e totipotência, essenciais para a competência embriogênica em células somáticas, portanto, acredita-se que um certo nível de estresse oxidativo é necessário para promover a formação de células embriogênicas e desencadear uma rota morfogênica específica (BLAZQUEZ et al., 2009). Porém, novos estudos são requeridos para a elucidação da bioquímica envolvida na embriogênese e, assim, fornecer subsídios para otimizar os sistemas de propagação *in vitro* baseados nesta técnica (CARVALHO, 2009)

Dentre as enzimas antioxidantes, destacam-se as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase (POD). O produto da atividade da SOD é o peróxido de hidrogênio

(H₂O₂), o qual é tóxico em níveis elevados e precisa ser reduzido a H₂O em reações subsequentes. Os níveis intracelulares de H₂O₂ são regulados nas plantas, principalmente, pela CAT e peroxidases. Assim, essas enzimas podem ser consideradas como possíveis "marcadores da morfogênese" (KONIECZNY, 2008).

Diante disso, Cui e colaboradores (1999) mostraram a mudança na atividade das enzimas antioxidantes e o efeito do H₂O₂ exógeno na frequência da ES em *Lycium barbarum* L. Dessa forma, seus resultados apontaram que a atividade da superóxido dismutase aumentou gradualmente nos primeiros dias de cultivo, diminuindo com as divisões adicionais e o desenvolvimento de embriões multicelulares, enquanto que a atividade da peroxidase e catalase foi alta em calos e decaiu rapidamente nos primeiros dias da diferenciação, sugerindo que um aumento intracelular de H₂O₂ foi determinante na formação de células embriogênicas.

Além disso, Amal e Hemmat (2015), indicaram que na tamareira, a atividade da peroxidase possuiu um nível mais alto no calo embriogênico e, em seguida, reduziu gradualmente durante os subsequentes estágios de desenvolvimento.

Em embriões somáticos de um genótipo híbrido de elite de *Theobroma cacao* L. um padrão de diminuição da atividade das peroxidases e da polifenol oxidase foi observado em embriões globulares a cotiledonares. A atividade das peroxidases e da polifenol oxidase foi maior em estaminoides do que em pétalas e nos estágios iniciais da embriogênese somática, apresentando, por outro lado, redução em embriões globulares e no estágio cotiledonar (BOUTCHOUANG, 2016; MINYAKA et al., 2017).

Os resultados, anteriormente descritos, sugerem uma possível relação entre caminhos da embriogênese e resposta ao estresse (DUDITS et al., 1991, 1995). A resposta fisiológica às condições de estresse pode depender de dois fatores principais: o estado fisiológico das células e o nível (tempo e intensidade) de condição de estresse. Quando o nível de estresse excede a tolerância celular, as células morrem, mas se ele é baixo, as células podem induzir mecanismos de adaptação (QUIROZ-FIGUEROA et al., 2006).

CAPÍTULO 2 – ARTIGO 1

Atividade enzimática na embriogênese somática de clones de *Theobroma cacao* L.

Glécia L. de Souza Meira¹. Beatriz Oliveira Rabelo¹. Crislene Viana da Silva¹

¹ Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Departamento de Ciências Exatas e Naturais

glecia.meira@gmail.com

Resumo

Estudos correlacionam o aumento da atividade de enzimas antioxidativas com a melhora da resposta embriogênica em *Theobroma cacao* L. Este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade enzimática anti-oxidativa (AE) na embriogênese somática de clones de *Theobroma cacao* L. nos estádios de embriogênese primária (60, 105 e 120 dias) e embriogênese secundária (165 e 225 dias). Usou-se pétalas e estaminoides dos clones CCN51, CEPEC2002 e BN34 para a indução embriogênica de acordo com Maximova et al. (2005). As enzimas Superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT), Ascorbato peroxidase (APX) e Peroxidase do Guaiacol (GPX), foram analisadas de acordo com protocolos específicos. Usou-se ANOVA e teste Tukey ($P < 0,05$). CAT não apresentou diferença entre os clones em nenhum período avaliado, mostrando sempre uma baixa atividade. Aos 60 dias o clone CCN51 destacou-se por apresentar elevadas atividades de SOD, APX e GPX. Aos 105 dias SOD foi maior nos clones CCN51 e GPX nos grupos CEPEC2002. APX não diferiu entre os clones. Aos 120 dias, SOD foi maior nos clones CEPEC2002 e BN34. GPX foi maior em CEPEC. APX não diferiu. Aos 165 dias SOD e GPX foram maiores nos embriões de BN34 e CCN51. Aos 225 dias a AE de GPX e APX foram maiores em CCN51. SOD não diferiu. De maneira geral, o clone CEPEC2002 apresentou menores AE e os estaminoides apresentaram maior AE que as pétalas. Houve atividade diferencial para as enzimas antioxidantes, em calos e embriões. Ao analisar a AE em diferentes tempos nos estaminoides marrons foi visto redução de SOD e aumento de APX e GPX ao longo do tempo. Verificou-se que SOD, APX e GPX são marcadores bioquímicos específicos em diferentes estágios do desenvolvimento embriogênico o que pode auxiliar na otimização do protocolo embriogênico para os genótipos de interesse.

Palavras-chave: cultura de tecidos, micropropagação, genótipos de cacau, biotecnologia.

Introdução

O gênero *Theobroma* compreende 22 espécies, todas originárias dos bosques úmidos tropicais da América Equatorial (Thomas et al. 2012). Considerado como alimento dos deuses, o *Theobroma cacao* L. fornece a matéria-prima para a multibilionária indústria do chocolate e é a principal fonte de renda para cerca de 6 milhões de pequenos proprietários em todo o mundo. Além disso, os grãos do cacau têm vários outros usos não alimentares nas indústrias farmacêutica e cosmética (Wickramasuriya e Dunwell 2018).

A produção mundial de cacau em 2017/2018 foi de 75, 2% na África, 18% na América e 6,3% na Ásia e Oceania (ICCO 2019). A produção nacional é determinada principalmente pela área colhida, pela produção do ano anterior, pelo preço praticado internamente e pela

presença ou não da vassoura-de-bruxa no local de colheita (Zugaib 2015). Portanto, um método de propagação eficiente do cacaveiro é essencial para acelerar os programas de melhoramento e evitar interrupções de produção no futuro (Laliberte e End 2015).

A embriogênese *in vitro*, ou embriogênese somática (ES), é uma alternativa aos métodos de propagação tradicionais e permite a rápida propagação clonal de mudas livres de doenças (Quainoo et al. 2008). Além disso, a embriogênese somática do cacau favorece a multiplicação em grande escala de genótipos de elite, o beneficiamento genético, a coleta e conservação de germoplasma e a difusão eficiente de material vegetal, gerando mudas para os agricultores (Minyaka et al. 2017).

Dessa forma, a ES é o processo pelo qual células somáticas, em condições de indução, geram células embriogênicas que resultam na formação de um embrião somático (Quiroz-Figueiroa et al. 2006; Zimmermann 2010). Para adquirir competência embriogênica, as células somáticas necessitam reprogramar padrões de expressão gênica, além de realizar mudanças na morfologia, fisiologia e metabolismo (Namasivayam 2007). Na ES do cacau, mutações genéticas e modificações epigenéticas não se acumulam com o envelhecimento de calos induzidos *in vitro* (López et al. 2010; Quinga et al. 2017), sendo isso uma vantagem dessa técnica.

As primeiras fases da embriogênese são caracterizadas pela indução de grande quantidade de genes relacionados ao estresse (Ganesan e Jayabalan 2004; Libik et al. 2005; Obert et al. 2005; Konieczny et al. 2008; Carvalho 2009). O estresse oxidativo é provocado pelo acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Apel e Hirt 2004), como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), superóxido ($O_2\bullet$), e radicais hidroxila ($HO\bullet$), os quais são produzidos naturalmente durante os processos metabólicos das células como a respiração e a fotossíntese e, em pequenas quantidades, agem como moléculas sinalizadoras (Obert et al. 2005; Del Río et al. 2006) regulando processos como defesa de patógenos, morte celular programada e controle estomático (Gill e Tuteja 2010).

Nessa perspectiva, segundo Blázquez et al. (2004), essas espécies reativas induzem modificações no padrão de expressão gênica, no metabolismo celular e na totipotência, aspectos importantes para a competência embriogênica em células somáticas. Portanto, acredita-se que certo nível de estresse oxidativo é requerido para promover a formação de células embriogênicas e desencadear uma rota morfogênica específica. No entanto, em concentrações elevadas, as EROs são capazes de reagir com biomoléculas (DNA, fosfolípídeos e proteínas) afetando a integridade e função celular (Del Río et al. 2006) podendo levar à morte celular devido a sua alta toxicidade (Gill e Tujeta 2010).

Assim, a fim de minimizar os efeitos deletérios das EROs, as plantas possuem mecanismos antioxidativos enzimáticos e não enzimáticos (Apel e Hirt 2004). Os não-enzimáticos incluem ascorbato e glutationa, ácido ascórbico, o β -caroteno e o α -tocoferol (Miller et al. 2018). Dentre os mecanismos enzimáticos está a atuação de enzimas como a dismutase do superóxido (SOD), peroxidase do ascorbato (APX), peroxidase do guaiacol (GPX) e catalase (CAT) (Mittler 2002; Zhang et al. 2010), as quais podem prevenir o acúmulo de EROs e o estresse oxidativo exacerbado (Saher et al. 2004).

A SOD é a primeira enzima que participa do processo de desintoxicação de EROs, catalisando a dismutação de $O_2\bullet$ a H_2O_2 e O_2 (Mittler et al. 2011; Zhang et al. 2010). A CAT realiza a conversão do H_2O_2 em H_2O e O_2 nos peroxissomos (Panda e Choudhury 2005). Já as enzimas GPX e APX, atuam juntamente com a CAT na remoção de H_2O_2 no interior das células, sendo que a GPX utiliza o guaiacol como receptor de elétrons (Asada 2006) e a APX utiliza o ácido ascórbico como doador de elétrons para reduzir H_2O_2 (Dipierro et al. 2005).

Estudos têm mostrado o potencial de algumas enzimas para atuar como marcadores bioquímicos específicos dos estágios embriogênicos que podem ser usados para otimizar

protocolos de embriogênese somática (Kormutřák et al. 2003; Konieczny et al. 2008; Carvalho 2009).

Amal e Hemmat (2015) indicaram que na tamareira a atividade da peroxidase possuiu um nível mais alto no calo embriogênico e, em seguida, reduziu gradualmente durante os subseqüentes estágios de desenvolvimento.

Em embriões somáticos de um genótipo híbrido de elite de *Theobroma cacao L.* um padrão de diminuição da atividade das peroxidases e da polifenol oxidase foi observado em embriões globulares a cotiledonares. A atividade das peroxidases e da polifenol oxidase foi maior em estaminoides do que em pétalas e nos estágios iniciais da embriogênese somática, apresentando, por outro lado, redução em embriões globulares e no estágio cotiledonar (Boutchouang 2016; Minyaka et al. 2017).

Sabe-se que as enzimas como peroxidase e polifenol oxidase participam do metabolismo das auxinas, ácido cumárico e outros compostos fenólicos que são importantes na embriogênese vegetal (Duchovskis et al. 2009). Nesse sentido, novos estudos são requeridos para a elucidação da bioquímica envolvida na embriogênese somática e para o fornecimento de subsídios para o desenvolvimento de marcadores específicos que otimizem protocolos embriogênicos (Kormutřák et al. 2003; Carvalho 2009).

Nesse estudo, avaliou-se as atividades enzimáticas de superóxido dismutase, ascorbato peroxidase, peroxidase do guaiacol e catalase em calos e embriões somáticos de *Theobroma cacao L.* a fim de conhecer o padrão de atividade a depender do expante e/ou clone em diferentes fases do processo embriogênico.

Material e métodos

Embriogênese somática: A embriogênese somática foi realizada no Laboratório de Biotecnologia do Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC) da Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC), Itabuna- BA. O material vegetal e os insumos da pesquisa foram fornecidos por esta instituição. O protocolo de embriogênese somática utilizado foi desenvolvido por Maximova et al. (2005) com algumas modificações. Esse protocolo é dividido em: Indução de calo primário (ICP), crescimento de calo secundário (ICS) e desenvolvimento de embriões (ED).

Foram coletados botões florais de três genótipos de cacau (CCN51, CEPEC2002 e BN34) no período matutino até às 9h da manhã. Os botões foram desinfetados com hipoclorito de cálcio a 2% por 20 minutos e, logo após, lavados três vezes com água autoclavada. Os botões florais foram cortados com bisturi número 11 para extração dos explantes (pétalas e estaminoides), os quais foram inoculados separadamente em placas de Petri totalizando 20 explantes por placa, garantindo um bom contato com o meio de indução de calo primário (ICP). A formação de calos foi avaliada nos sétimo e décimo quarto dias nesse meio de cultura, quando foram transferidos para o meio de indução de calo secundário (ICS) (Tabela 1).

Com isso, os calos foram avaliados morfológicamente em dois tipos: a) brancos e compactos: agrupamentos de células alongadas e brancas que geralmente não formam embriões; e b) marrom e friável: consiste em células redondas, variando entre marrom claro a marrom escuro, frequentemente encontrados em associação com embriões somáticos (Maximova et al. 2002; Scotton, 2012).

Após 14 dias em meio ICS, os calos foram transferidos para o meio de desenvolvimento de embrião (ED) (Tabela 1), e observados quanto à formação de embriões. A cada 14 dias os calos foram subcultivados em meio ED.

Para a indução da embriogênese somática secundária, foram selecionados embriões primários, maturados, com cotilédones desenvolvidos. Os cotilédones foram cortados com um bisturi em peças de aproximadamente 4 mm² e inoculado em meio ICS (Tabela 1) por 14 dias

para formação de calos, em seguida, os calos embriogênicos foram transferidos para o meio ED para a formação de embriões secundários. Os embriões foram transferidos para o meio PEC para formação de plântulas.

Tabela 1. Composição dos meios de cultura utilizados na embriogênese somática

ICP	Composto pelos sais DKW (DRIVER & KUNIYUKI, 1984). Suplementado com glicose (20g/L), 2,4- D (2ml/L), TDZ (20µl /L), vitamina DKW (1ml/L), glutamina (20g/L), myoinositol (100mg/L) e Phytigel® (2g/L).
ICS	Composto por Mc Cown's Salts (2,3g/L), suplementado com glicose (20g/L), 2,4-D (2ml/L), vitamina B5 (1ml/L), BAP (50µl /L) e Phytigel® (2,2 g/L).
ED	Composto pelos sais DKW (DRIVER & KUNIYUKI, 1984), suplementado com sacarose (30g/L), vitamina DKW (1ml/L), glicose (2g/L), Phytigel® (2g/L) e isento de fitoreguladores.

Metabolismo antioxidativo: Coletaram-se amostras de calos e embriões somáticos, produzidos através de pétalas e estaminoides dos clones CCN51, BN34 e CEPEC2002 aos 60, 105, 120 dias de cultivo embriogênico (embriogênese primária) e aos 165 e 225 dias de cultivo (embriogênese secundária). Os calos oriundos de estaminoides foram divididos em brancos ou marrons, de acordo com o aspecto apresentado durante o crescimento.

Imediatamente após a coleta do material vegetal, fez-se a imersão das amostras em nitrogênio líquido e armazenamento em ultrafreezer a -80°C para a liofilização. Em seguida, as amostras foram liofilizadas e armazenadas em freezer -20°C para conservação até a realização das análises bioquímicas.

Preparo do extrato bruto: Para a realização dos ensaios enzimáticos, os tecidos vegetais foram submetidos à maceração em nitrogênio líquido. Posteriormente, foram pesados 40 mg do macerado em balança analítica (SHIMADZU – AUW 220) e, em seguida, foi acondicionado em eppendorfs de 2 mL. Logo após, adicionou-se polivinilpirrolidona (PVP) (0,7 g de PVP/g de tecido) para evitar a oxidação do macerado. Em sequência, o macerado foi ressuspenso em tampão de extração, que variou de acordo com o tipo de enzima: tampão fosfato de potássio, 50 mM, pH 6,0, para a atividade da enzima GPX; tampão fosfato de potássio, 50 mM, pH 7,0, para as atividades das enzimas APX e CAT; tampão fosfato de potássio, 50 mM, pH 7,9, para a atividade da enzima SOD. Foi realizada agitação em vórtex e as amostras foram submetidas à sonicação, em ultrassonicador de sonda (Gex 130, 130 W), sob amplitude de 70%, 8 pulsos de 5s, com intervalos de 10s, seguido de centrifugação (13400 rpm) por 15 min a 4°C.

Seguidamente, coletou-se o sobrenadante, considerado como extrato bruto, e fez-se a sua transferência para um novo microtubo de 2 mL, que foi mantido em isopor com gelo para uso imediato.

Dismutase do superóxido (SOD): A determinação da atividade de SOD foi realizada como proposto por Giannopolitis e Ries (1977), com modificações. A unidade de atividade (UA) foi calculada para medir a capacidade da enzima de inibir 50% da redução fotoquímica de nitroazul de tetrazólio (NBT), que forma o precipitado formazana azul. Adicionou-se ao extrato bruto o tampão de extração (fosfato de potássio, 50mM, pH 7,9), EDTA (1 mM) e metionina (13 mM). A atividade enzimática iniciou-se com a adição de riboflavina (1 mM). Após 10min no escuro, iniciou-se a primeira leitura, e a segunda leitura foi feita após exposição à luz fluorescente de

15W por 20min. Os brancos foram os poços que não continham extrato vegetal. As leituras foram realizadas em comprimento de onda de 560 nm e as amostras lidas em quadruplicatas no espectrofotômetro de microplacas Espectramax Paradigm (Molecular Devices).

Catalase (CAT): A atividade de CAT foi feita por meio do consumo de H_2O_2 , de acordo com Havir e Mchale (1987), com modificações. Foi adicionado tampão de reação (tampão fosfato de potássio, 50 mM, pH 7,0) em 5 μ L do extrato vegetal a 30°C. Adicionada 20 mL de H_2O_2 a 300 mM para início da reação. A leitura foi realizada em comprimento de onda de 240nm por 300s, contra um branco sem extrato vegetal, e expressa em μ mol H_2O_2 g^{-1} MS min^{-1} , usando-se o coeficiente de extinção molar de 36M cm^{-1} no espectrofotômetro de microplacas Espectramax Paradigm (Molecular Devices).

Peroxidase do ascorbato (APX): A determinação da atividade de APX foi de acordo com Nakano e Asada (1981), com modificações. Na reação, a presença de APX no extrato vegetal reduz a concentração de H_2O_2 do meio em função da redução de ácido ascórbico adicionado. Ao extrato vegetal diluído foi acrescentado o tampão de reação (tampão fosfato de potássio, 50 mM, pH 7,0, ascorbato a 5 mM, EDTA a 0,1 mM e H_2O_2 a 0,1 mM). Foram realizadas leituras a cada 30s no comprimento de onda de 290nm. A análise foi realizada em quadruplicatas e os valores expressos em μ mol ascorbato g^{-1} MS min^{-1} no espectrofotômetro de microplacas Espectramax Paradigm (Molecular Devices).

Peroxidase do guaiacol (GPX): A atividade de GPX foi realizada através do preparo do ensaio enzimático, contendo 140 μ L de tampão de reação GPX 2x [guaiacol 40 mmol L^{-1} , H_2O_2 a 0,06% e tampão fosfato de sódio (20 mmol L1, pH 6,0), 139 μ L de tampão fosfato (50 mmol L^{-1} , pH 6,0)] e 1 μ L de extrato enzimático do material vegetal. A leitura foi realizada por 100s e o valor de consumo de GPX expresso com o aumento do consumo de guaiacol em μ mol s^{-1} g^{-1} MS. A conversão dos dados obtidos em valores de absorvância foi feita com o uso da equação $y = 0,1284x + 0,0189$, segundo Rehem et al. (2011). A leitura das amostras foi realizada em quadruplicatas, durante 1min com intervalo de 12s em espectrofotômetro de microplacas (VERSAmax), no comprimento de onda de 470 nm.

As análises foram realizadas na dependência do quantitativo do material embriogênico suficiente para a realização das atividades enzimáticas.

Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com 3 repetições e arranjo fatorial (3x3) correspondentes a 3 clones de *Theobroma cacao* L. (CCN51, CEPEC2002 e BN34) e 3 tipos de calos: oriundos de pétalas, brancos de estaminoides e marrons de estaminoides. Os dados de atividade enzimática das amostras vegetais foram feitos em triplicata e submetidos à análise de variância (ANOVA) e comparação de médias entre os tratamentos usando o teste Tukey se apresentassem normalidade ou homogeneidade dos dados. Em caso de dados não paramétricos, foi usado o teste de qui-quadrado de Kruskal Walls para a comparação ($P \leq 0,05$).

Resultados

Atividade enzimática em calos e embriões na embriogênese somática primária

Os resultados apresentados mostram as atividades das enzimas SOD, GPX, APX e CAT envolvidas na desintoxificação de EROs, em calos embriogênicos de pétalas (P) e de

estaminoides (E) dos clones de cacau CCN51, CEPEC2002 e BN34 aos 60, 105 e 120 dias de cultivo embriogênico.

Atividade enzimática de SOD

Podemos observar na figura 1 que aos 60 dias de cultivo (A) a atividade enzimática foi maior nos calos marrons de estaminoides (EM) dos três clones avaliados CCN51 ($0,79 \text{ UA mg}^{-1}\text{MS min}^{-1}$), CEPEC2002 ($0,79 \text{ UA mg}^{-1}\text{MS min}^{-1}$) e BN34 ($0,79 \text{ UA mg}^{-1}\text{MS min}^{-1}$) sem diferença estatística entre eles, e menor em calos de pétalas (P) de CEPEC2002 ($0,76 \text{ UA mg}^{-1}\text{MS min}^{-1}$) e de BN34 ($0,76 \text{ UA mg}^{-1}\text{MS min}^{-1}$), sem diferença estatística entre eles ($p < 0,05$). Calos brancos de estaminoides (EB) de CCN51 ($0,77 \text{ UA mg}^{-1}\text{MS min}^{-1}$) e de BN34 ($0,77 \text{ UA mg}^{-1}\text{MS min}^{-1}$) e calos de pétalas de CCN51 ($0,78 \text{ UA mg}^{-1}\text{MS min}^{-1}$) não diferiram dos demais grupos.

Por outro lado, aos 105 dias de cultivo (B) houve diminuição da atividade enzimática nos estaminoides marrons dos clones CCN51 ($0,76 \text{ UA mg}^{-1}\text{MS min}^{-1}$) e BN34 ($0,75 \text{ UA mg}^{-1}\text{MS min}^{-1}$) comparado aos demais calos. O clone CEPEC 2002 não apresentou diferença significativa na atividade enzimática entre os calos de pétalas ($0,79 \text{ UA mg}^{-1}\text{MS min}^{-1}$), calos brancos de estaminoides ($0,78 \text{ UA mg}^{-1}\text{MS min}^{-1}$) e calos marrons de estaminoides ($0,79 \text{ UA mg}^{-1}\text{MS min}^{-1}$).

Aos 120 dias de cultivo (C), as pétalas dos 3 clones CCN51 ($0,77 \text{ UA mg}^{-1}\text{MS min}^{-1}$), BN34 ($0,78 \text{ UA mg}^{-1}\text{MS min}^{-1}$) e CEPEC2002 ($0,76 \text{ UA mg}^{-1}\text{MS min}^{-1}$) e calos marrons de CEPEC2002 ($0,77 \text{ UA mg}^{-1}\text{MS min}^{-1}$) apresentaram as menores atividades enzimáticas, sem diferença significativa entre eles. Já as maiores foram nos calos brancos de CEPEC 2002 ($0,79 \text{ UA mg}^{-1}\text{MS min}^{-1}$) e BN34 ($0,80 \text{ UA mg}^{-1}\text{MS min}^{-1}$) e calos marrons de BN34 ($0,80 \text{ UA mg}^{-1}\text{MS min}^{-1}$), sem diferença significativa entre eles.

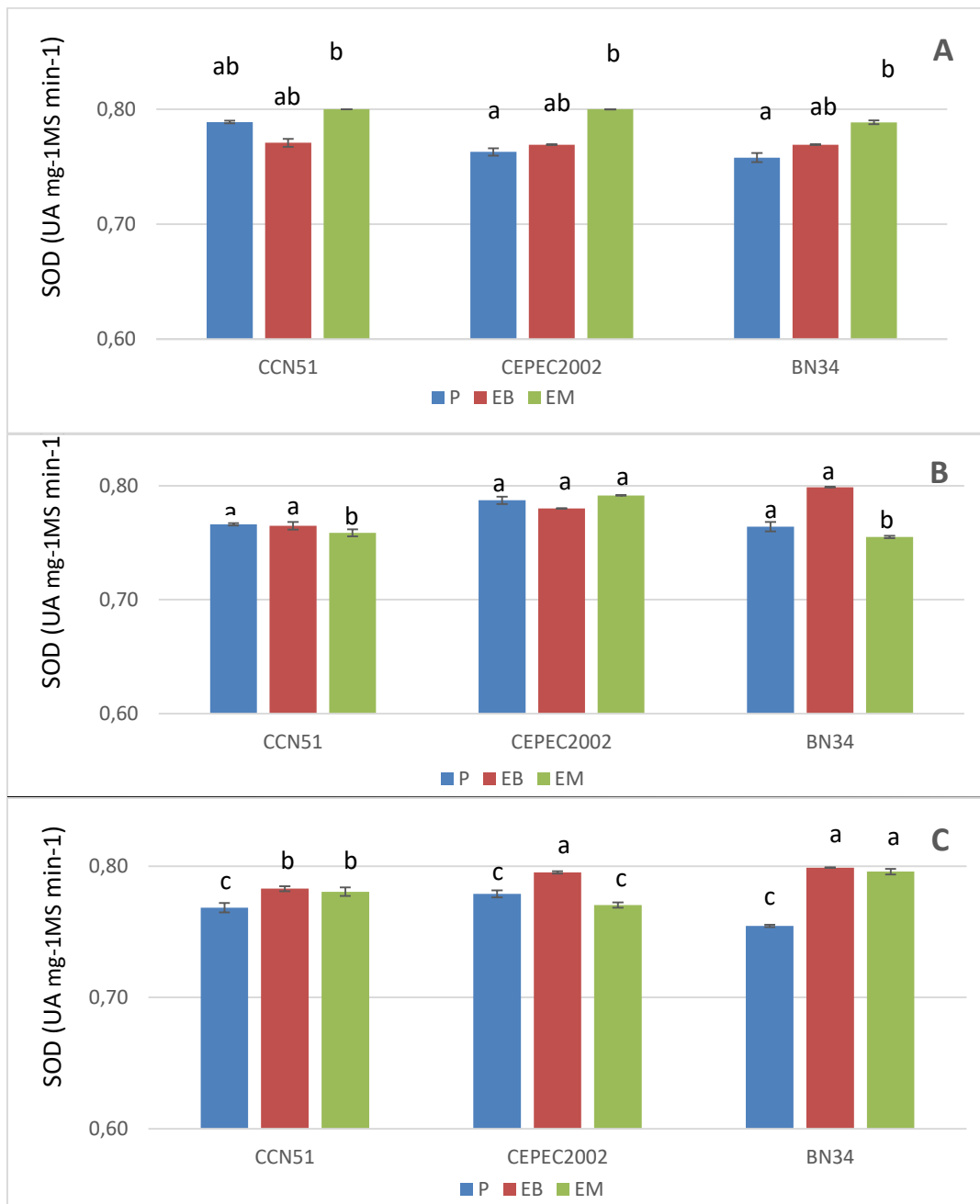


Figura 4: Atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) em calos de pétalas (P) e em calos brancos (EB) ou marrons (EM) de estaminoides, dos clones CCN51, CEPEC2002 e BN34 aos 60 (A), 105 (B) e 120 (C) dias de cultivo embriogênico. Valores médios de três repetições (\pm EP) foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e comparadas as médias entre os tratamentos usando o teste Tukey se apresentassem normalidade ou homogeneidade dos dados. Em caso de dados não paramétricos, foi usado o teste de qui-quadrado de Kruskal Walls. Médias seguidas das mesmas letras minúsculas, não diferem entre si ($P \leq 0,05$).

Atividade enzimática de Peroxidase do guaiacol (GPX)

Observou-se para GPX aos 60 dias de cultivo (A), que a maior atividade enzimática aconteceu nos calos de pétalas do clone CCN51 ($0,003 \text{ UA mg}^{-1}\text{MS min}^{-1}$) e nos calos marrons de estaminoides do clone BN34 ($0,003 \text{ UA mg}^{-1}\text{MS min}^{-1}$), sem diferença significativa entre eles. A menor atividade enzimática aconteceu nos calos de pétalas ($0,0002 \text{ UA mg}^{-1}\text{MS min}^{-1}$) de BN34 e nos três calos do clone CEPEC2002: pétalas ($0,0005 \text{ UA mg}^{-1}\text{MS min}^{-1}$), marrons de estaminoides ($0,0005 \text{ UA mg}^{-1}\text{MS min}^{-1}$) e brancos de estaminoides ($0,0005 \text{ UA mg}^{-1}\text{MS min}^{-1}$), sem diferença significativa entre eles.

Aos 105 dias de cultivo embriogênico (B), o clone CEPEC2002 se destacou por apresentar as maiores atividades enzimáticas nos materiais embriogênicos, comparado aos demais clones, sendo a maior atividade vista nos calos marrons de estaminoides ($0,002 \text{ UA mg}^{-1}\text{MS min}^{-1}$).

Aos 120 dias de cultivo (C), o grupo de calos brancos de estaminoides do clone CEPEC2002 apresentou maior atividade da enzima GPX ($0,0008 \text{ UA mg}^{-1}\text{MS min}^{-1}$). As menores atividades foram nos calos brancos de estaminoides de CCN51 ($0,00007 \text{ UA mg}^{-1}\text{MS min}^{-1}$) e nos calos marrons de estaminoides de BN34 ($0,0001 \text{ UA mg}^{-1}\text{MS min}^{-1}$).

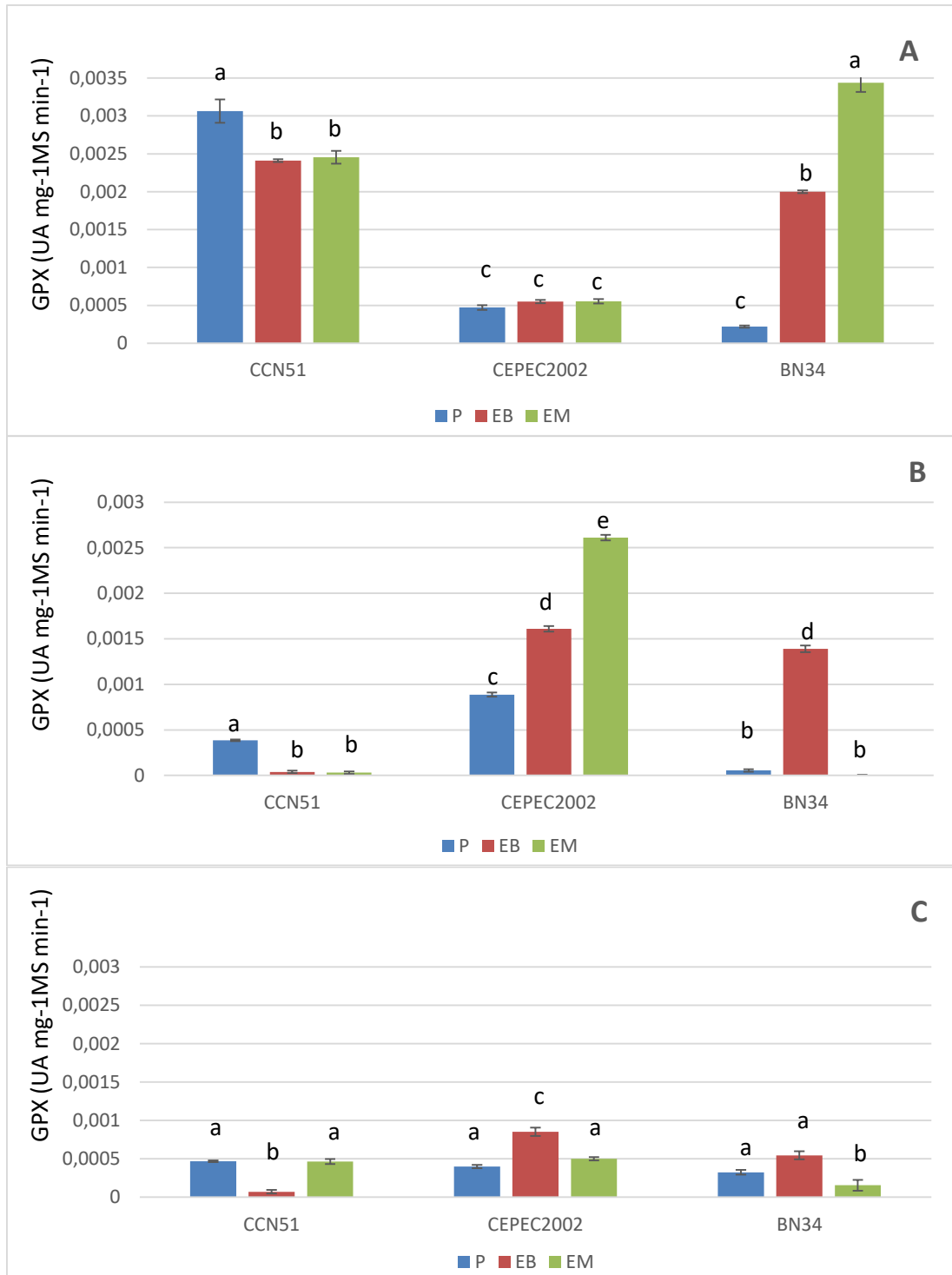


Figura 5: Atividade enzimática da peroxidase do guaiacol (GPX) em calos de pétalas (P) e em calos brancos (EB) ou marrons (EM) de estaminoides, dos clones CCN51, CEPEC2002 e BN34 aos 60 (A), 105 (B) e 120 (C) dias de cultivo embriogênico. Valores médios de três repetições (\pm EP) foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e comparadas as médias entre os tratamentos usando o teste Tukey se apresentassem normalidade ou homogeneidade dos dados. Em caso de dados não paramétricos, foi usado o teste de qui-quadrado de Kruskal Walls. Médias seguidas das mesmas letras minúsculas, não diferem entre si ($p \leq 0,05$).

Atividade enzimática de Ascorbato peroxidase (APX)

A atividade enzimática de APX apresentou diferença entre as médias nos grupos testados aos 60 dias de cultivo embriogênico (A). A maior atividade foi observada em calos marrons de estaminoides do clone CCN51 ($0,02 \text{ UA mg}^{-1}\text{MS min}^{-1}$) e as menores atividades nos demais grupos sem diferença significativa entre eles.

Aos 105 e 120 dias de cultivo embriogênico a atividade enzimática de APX não apresentou diferença entre os clones e os calos embriogênicos analisados.

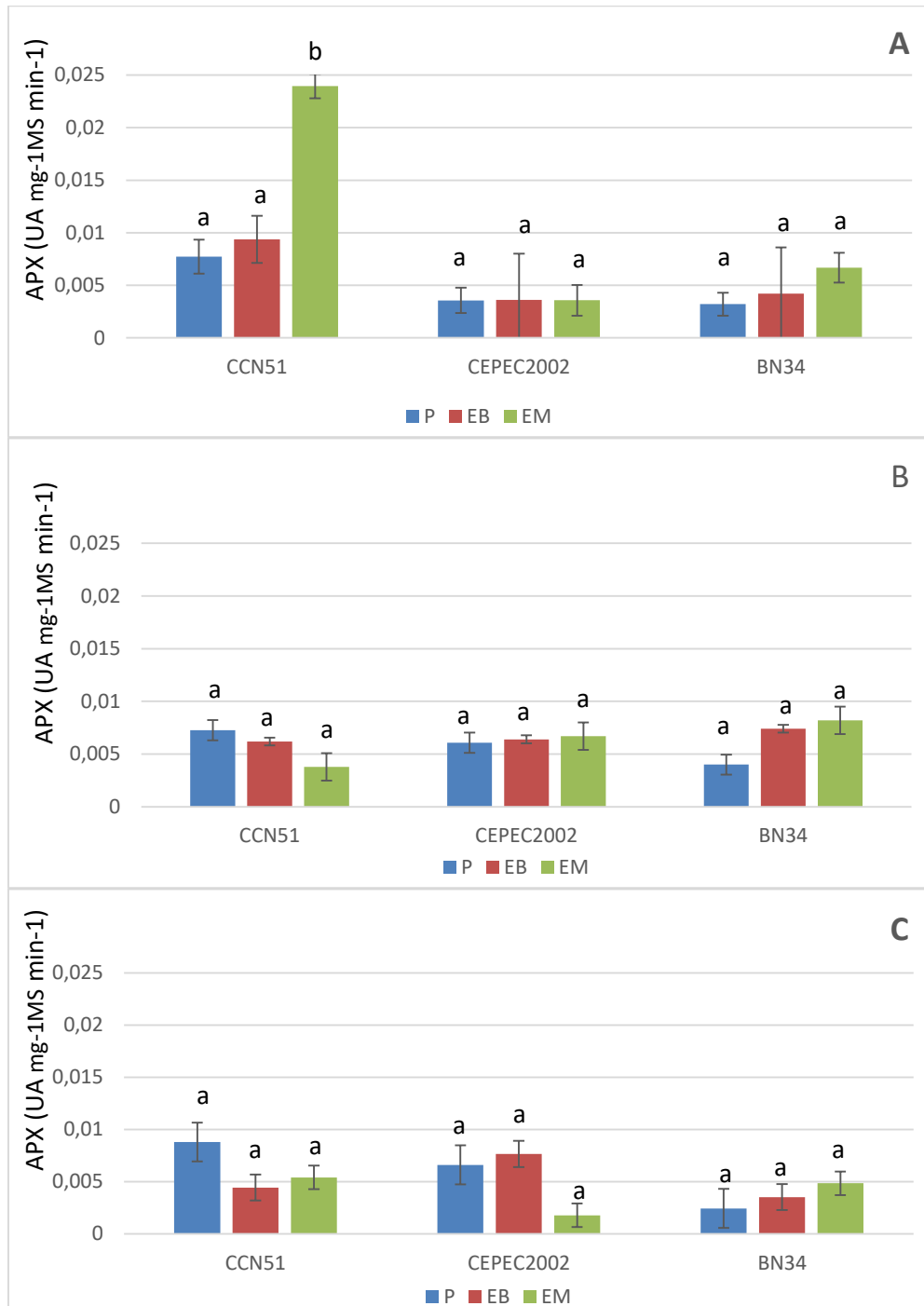


Figura 6: Atividade enzimática da ascorbato peroxidase (APX) em calos de pétalas (P) e em calos brancos (EB) ou marrons (EM) de estaminoides, dos clones CCN51, CEPEC2002 e BN34 aos 60 (A), 105 (B) e 120 (C) dias de cultivo embriogênico. Valores médios de três repetições

(\pm EP) foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e comparadas as médias entre os tratamentos usando o teste Tukey se apresentassem normalidade ou homogeneidade dos dados. Em caso de dados não paramétricos, foi usado o teste de qui-quadrado de Kruskal Walls. Médias seguidas das mesmas letras minúsculas, não diferem entre si ($p \leq 0,05$).

Atividade enzimática de catalase (CAT)

A atividade enzimática de CAT foi muito baixa e não apresentou diferença entre os grupos em nenhum dos períodos avaliados.

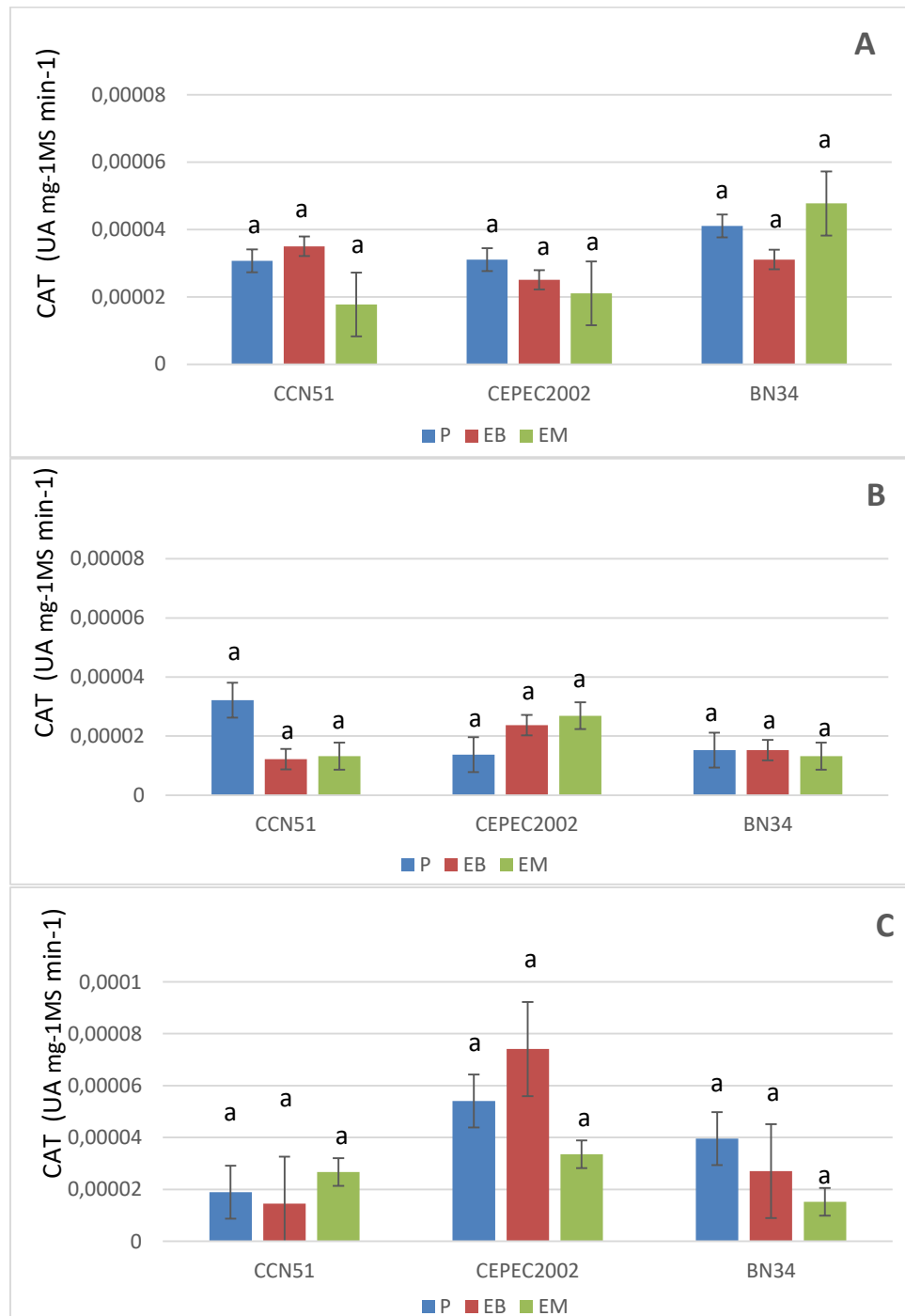


Figura 7: Atividade enzimática da catalase (CAT) em calos de pétalas (P) e em calos brancos (EB) ou marrons (EM) de estaminoides, dos clones CCN51, CEPEC2002 e BN34 aos 60 (A),

105 (B) e 120 (C) dias de cultivo embriogênico. Valores médios de três repetições (\pm EP) foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e comparadas as médias entre os tratamentos usando o teste Tukey se apresentassem normalidade ou homogeneidade dos dados. Em caso de dados não paramétricos, foi usado o teste de qui-quadrado de Kruskal Walls. Médias seguidas das mesmas letras minúsculas, não diferem entre si ($p \leq 0,05$).

Atividade enzimática em calos e embriões na embriogênese somática secundária

Na embriogênese somática secundária, foram avaliados dois tempos de cultivo, 165 e 225 dias. Foram comparadas as atividades enzimáticas dos embriões somáticos com os calos que não formaram embriões.

A atividade enzimática de superóxido dismutase (SOD) aos 165 dias de cultivo (figura 5), não apresentou diferença entre os grupos testados: calos marrons de estaminoides ($0,765 \text{ UA mg}^{-1} \text{ MS min}^{-1}$) e embriões de calos marrons de estaminoides de CCN51 ($0,772 \text{ UA mg}^{-1} \text{ MS min}^{-1}$); e calos marrons de estaminoides ($0,760 \text{ UA mg}^{-1} \text{ MS min}^{-1}$) e embriões de calos marrons de estaminoides de BN34 ($0,766 \text{ UA mg}^{-1} \text{ MS min}^{-1}$).

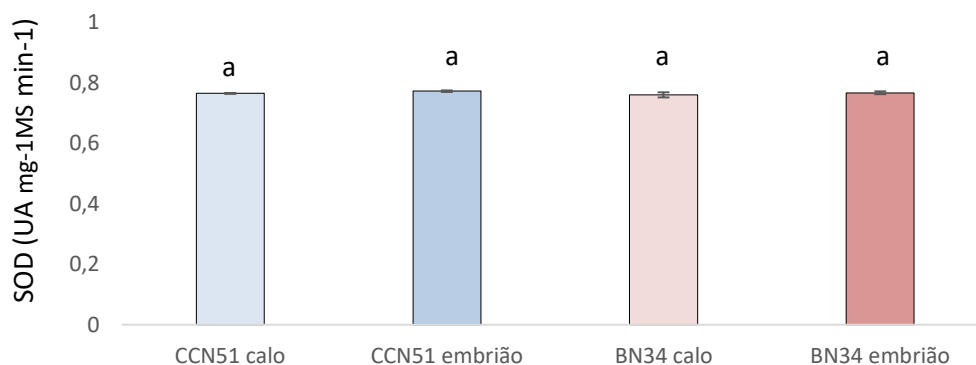


Figura 8: Atividade enzimática de SOD em calos e embriões somáticos dos clones CCN51 e BN34 aos 165 dias de cultivo embriogênico. Valores médios de três repetições (\pm EP) foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e comparadas as médias entre os tratamentos usando o teste Tukey se apresentassem normalidade ou homogeneidade dos dados. Em caso de dados não paramétricos, foi usado o teste de qui-quadrado de Kruskal Walls. Médias seguidas das mesmas letras minúsculas, não diferem entre si ($p \leq 0,05$).

Aos 225 dias de cultivo (figura 6), a atividade enzimática de SOD foi maior em embriões de estaminóide marrons de BN34 E ($0,785 \text{ UA mg}^{-1} \text{ MS min}^{-1}$), seguido de embriões de estaminóide marrons de CCN51 ($0,756 \text{ UA mg}^{-1} \text{ MS min}^{-1}$), e a menor atividade observada em embriões de pétalas de CCN51 P ($0,752 \text{ UA mg}^{-1} \text{ MS min}^{-1}$).

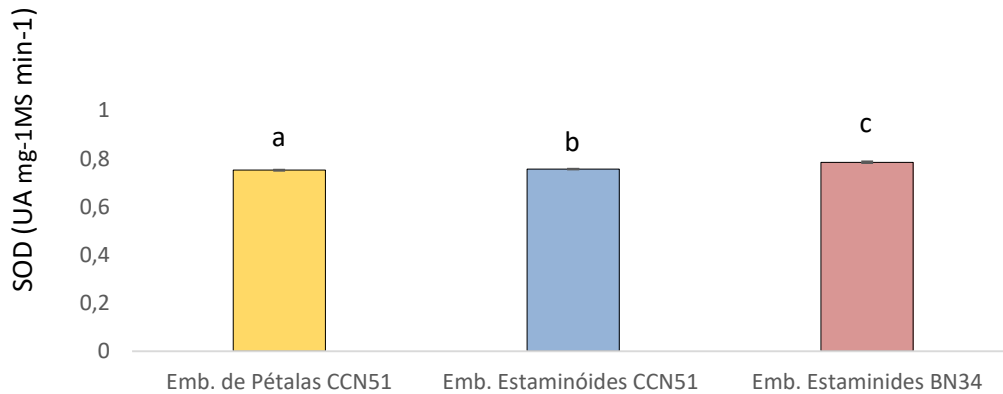


Figura 9: Atividade enzimática de SOD em embriões somáticos dos clones CCN51 e BN34 aos 225 dias de cultivo embriogênico. Valores médios de três repetições (\pm EP) foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e comparadas as médias entre os tratamentos usando o teste Tukey se apresentassem normalidade ou homogeneidade dos dados. Em caso de dados não paramétricos, foi usado o teste de qui-quadrado de Kruskal Walls. Médias seguidas das mesmas letras minúsculas, não diferem entre si ($p \leq 0,05$).

A atividade enzimática de GPX aos 165 dias de cultivo foi maior em calos marrons de estaminóides de CCN51 ($0,003 \text{ UA mg}^{-1}\text{MS min}^{-1}$), seguido de embriões de calos marrons de estaminóides de CCN51 ($0,002 \text{ UA mg}^{-1}\text{MS min}^{-1}$) e foi menor em calos marrons de estaminóides de BN34 ($0,00 \text{ UA mg}^{-1}\text{MS min}^{-1}$).

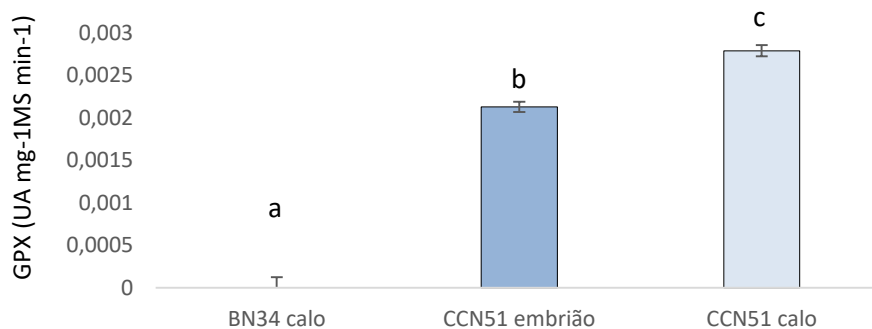


Figura 10: Atividade enzimática de GPX em calos e embriões somáticos dos clones CCN51 e BN34 aos 165 dias de cultivo embriogênico. Valores médios de três repetições (\pm EP) foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e comparadas as médias entre os tratamentos usando o teste Tukey se apresentassem normalidade ou homogeneidade dos dados. Em caso de dados não paramétricos, foi usado o teste de qui-quadrado de Kruskal Walls. Médias seguidas das mesmas letras minúsculas, não diferem entre si ($p \leq 0,05$).

Aos 225 dias de cultivo a atividade enzimática de GPX foi maior nos embriões de calos marrons de estaminoides de CCN51 ($0,003 \text{ UA mg}^{-1}\text{MS min}^{-1}$) comparado aos embriões de calos marrons de estaminoides de BN34 ($0,002 \text{ UA mg}^{-1}\text{MS min}^{-1}$).

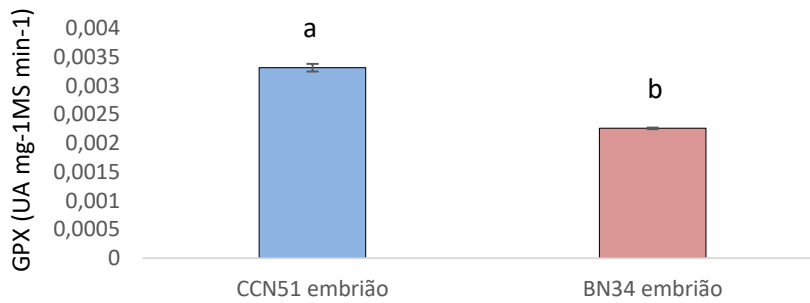


Figura 11: Atividade enzimática de GPX em calos e embriões somáticos dos clones CCN51 e BN34 aos 225 dias de cultivo embriogênico. Valores médios de três repetições (\pm EP) foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e comparadas as médias entre os tratamentos usando o teste Tukey se apresentassem normalidade ou homogeneidade dos dados. Em caso de dados não paramétricos, foi usado o teste de qui-quadrado de Kruskal Walls. Médias seguidas das mesmas letras minúsculas, não diferem entre si ($p \leq 0,05$).

A atividade enzimática de APX aos 165 dias de cultivo, foi maior em embriões de calos marrons de estaminoides de CCN51 ($0,026 \text{ UA mg}^{-1}\text{MS min}^{-1}$), seguido de calos marrons de estaminoides de CCN51 ($0,018 \text{ UA mg}^{-1}\text{MS min}^{-1}$) e a menor em calos marrons de estaminoides de BN34 ($0,009 \text{ UA mg}^{-1}\text{MS min}^{-1}$).

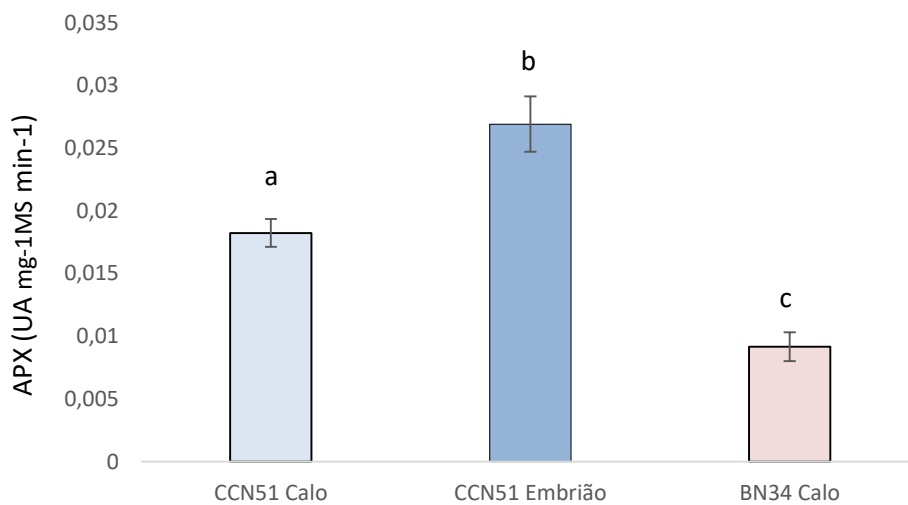


Figura 12: Atividade enzimática de APX em calos e embriões somáticos dos clones CCN51 e BN34 aos 165 dias de cultivo embriogênico. Valores médios de três repetições (\pm EP) foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e comparadas as médias entre os tratamentos usando o teste Tukey se apresentassem normalidade ou homogeneidade dos dados. Em caso de

dados não paramétricos, foi usado o teste de qui-quadrado de Kruskal Walls. Médias seguidas das mesmas letras minúsculas, não diferem entre si ($p \leq 0,05$).

A atividade enzimática de CAT não diferiu entre os materiais vegetais testados aos 165 dias de cultivo embriogênico: calos marrons de estaminoides de CCN51 ($7,71574E-05 \text{ UA mg}^{-1}\text{MS min}^{-1}$), embriões de calos marrons de estaminoides de CCN51 ($0,00011269 \text{ UA mg}^{-1}\text{MS min}^{-1}$) e calos marrons de estaminoides de BN34 ($1,47208E-05 \text{ UA mg}^{-1}\text{MS min}^{-1}$).

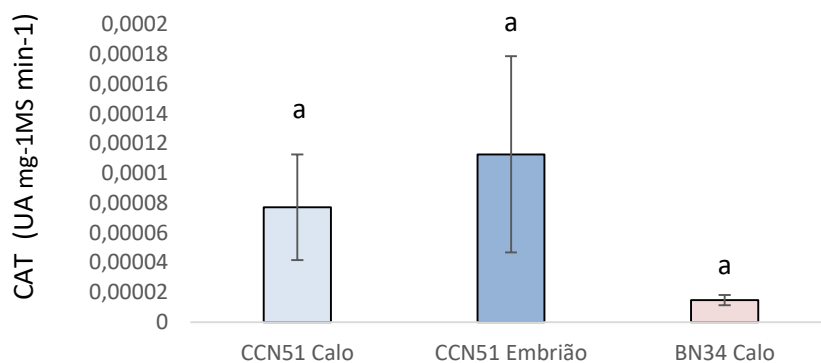


Figura 13: Atividade enzimática de CAT em calos e embriões somáticos dos clones CCN51 e BN34 aos 165 dias de cultivo embriogênico. Valores médios de três repetições (\pm EP) foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e comparadas as médias entre os tratamentos usando o teste Tukey se apresentassem normalidade ou homogeneidade dos dados. Em caso de dados não paramétricos, foi usado o teste de qui-quadrado de Kruskal Walls. Médias seguidas das mesmas letras minúsculas, não diferem entre si ($p \leq 0,05$).

Não houve material vegetal suficiente para análise da atividade enzimática de APX e CAT aos 225 dias de cultivo embriogênico.

Considerando que os calos marrons de estaminoides apresentaram boa eficiência embriogênica nos três clones avaliados, comparamos as atividades enzimáticas em diferentes períodos de tempo. Aos 165 dias de cultivo, avaliamos os calos e os embriões dos clones CCN51 e BN34, já que CEPEC2002 não teve material suficiente para análise.

No clone CCN51, a atividade enzimática de SOD nos calos marrons de estaminoides diferiu em todos os períodos de tempo avaliados, sendo maior aos 60 dias de cultivo embriogênico ($0,799 \text{ UA mg}^{-1}\text{MS min}^{-1}$).

No clone BN34 a atividade enzimática teve flutuações semelhantes em relação aos períodos de tempo avaliados, com a diferença que a maior atividade enzimática de SOD aconteceu aos 120 dias de cultivo ($0,785 \text{ UA mg}^{-1}\text{MS min}^{-1}$). Tanto em CCN51 quanto em BN34 a atividade enzimática de SOD foi maior nos embriões em relação aos calos aos 165 dias.

Em CEPEC2002, a maior atividade foi aos 60 dias ($0,799 \text{ UA mg}^{-1}\text{MS min}^{-1}$) e a menor aos 120 dias ($0,77 \text{ UA mg}^{-1}\text{MS min}^{-1}$), sendo que não houve calos e embriões para avaliação aos 165 dias de cultivo embriogênico.

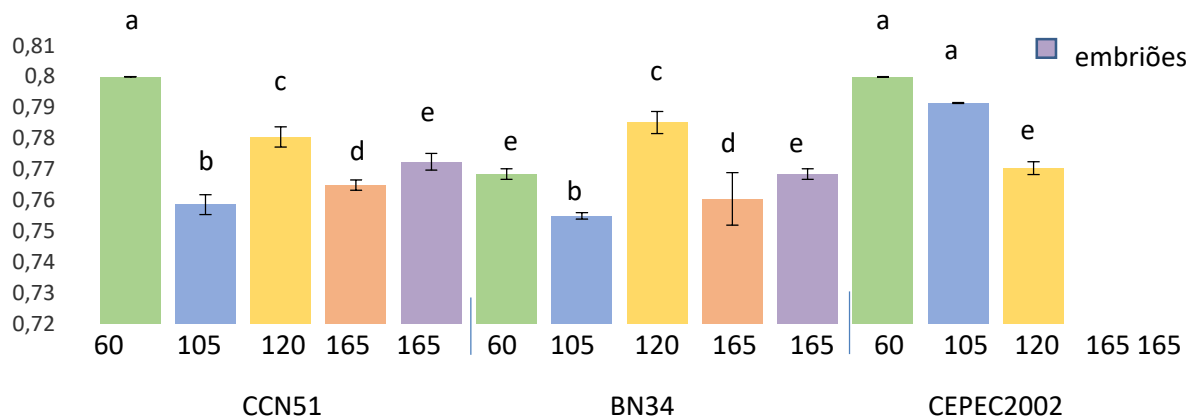


Figura 14: Atividade enzimática de superóxido dismutase (SOD) em estaminoides marrons dos clones CCN51, BN34 e CEPEC2002 em diferentes dias de cultivo embriogênico. Valores médios de três repetições (\pm EP) foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e comparadas as médias entre os tratamentos usando o teste Tukey se apresentassem normalidade ou homogeneidade dos dados. Em caso de dados não paramétricos, foi usado o teste de qui-quadrado de Kruskal Walls. Médias seguidas das mesmas letras minúsculas, não diferem entre si ($p \leq 0,05$).

A atividade enzimática de GPX em calos marrons de estaminoidese e nos embriões divergiu bastante no decorrer do tempo entre os clones. Nos clones CCN51 e BN34 a atividade reduziu bastante aos 105 dias, se assemelhando ao comportamento de SOD. Por outro lado, em CEPEC2002 a maior atividade enzimática de GPX ocorreu aos 105 dias ($0,002 \text{ UA mg}^{-1} \text{ MS min}^{-1}$), não havendo diferença nos demais tempos.

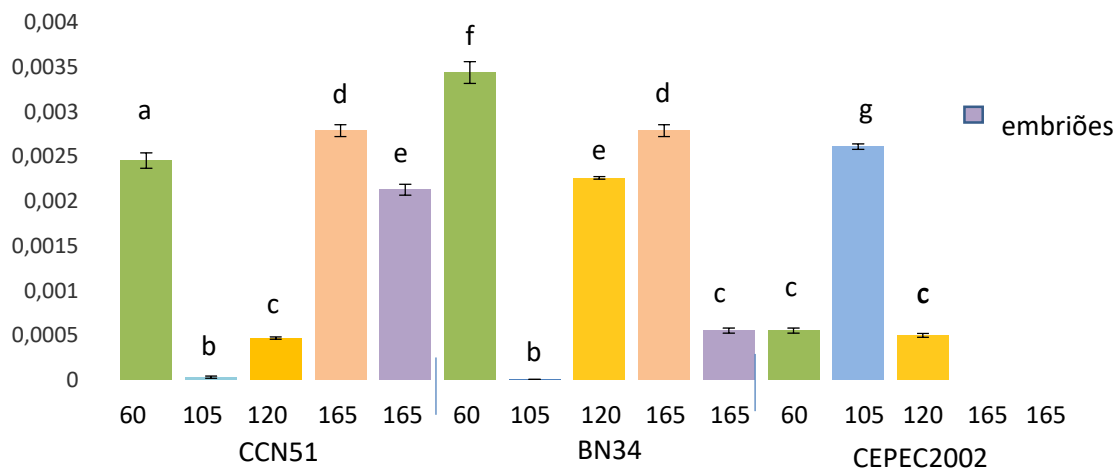


Figura 15: Atividade enzimática de peroxidase do guaiacol (GPX) em estaminoides marrons dos clones CCN51, BN34 e CEPEC2002 em diferentes dias de cultivo embriogênico. Valores médios de três repetições (\pm EP) foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e comparadas as médias entre os tratamentos usando o teste Tukey se apresentassem normalidade

ou homogeneidade dos dados. Em caso de dados não paramétricos, foi usado o teste de qui-quadrado de Kruskal Walls. Médias seguidas das mesmas letras minúsculas, não diferem entre si ($p \leq 0,05$).

A atividade enzimática de APX no clone CCN51, reduziu aos 105 dias ($0,004 \text{ UA mg}^{-1} \text{ MS min}^{-1}$) voltando a aumentar progressivamente, sendo que sua maior atividade em embriões aos 165 dias ($0,026 \text{ UA mg}^{-1} \text{ MS min}^{-1}$). No clone BN34 houve grande variação da atividade enzimática, sendo que esta foi maior aos 165 dias nos calos ($0,009 \text{ UA mg}^{-1} \text{ MS min}^{-1}$). Em CEPEC2002 a maior de APX foi aos 105 dias de cultivo ($0,007 \text{ UA mg}^{-1} \text{ MS min}^{-1}$).

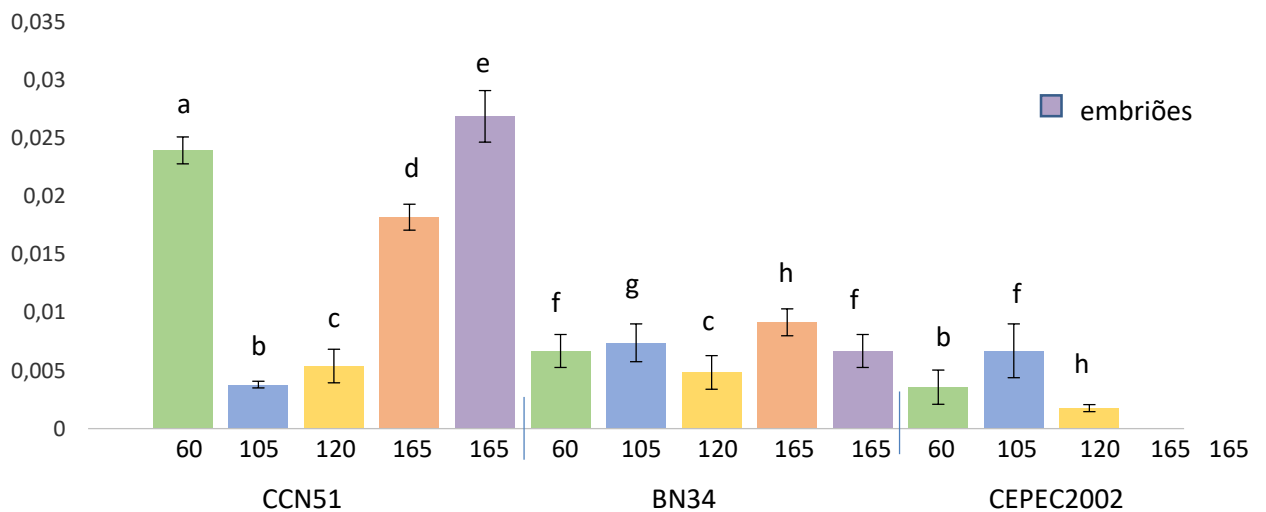


Figura 16: Atividade enzimática de ascorbato peroxidase (APX) em estaminoides marrons dos clones CCN51, BN34 e CEPEC2002 em diferentes dias de cultivo embriogênico. Valores médios de três repetições (\pm EP) foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e comparadas as médias entre os tratamentos usando o teste Tukey se apresentassem normalidade ou homogeneidade dos dados. Em caso de dados não paramétricos, foi usado o teste de qui-quadrado de Kruskal Walls. Médias seguidas das mesmas letras minúsculas, não diferem entre si ($p \leq 0,05$).

A catalase (CAT) não apresentou diferença na atividade enzimática em estaminoides marrons dos clones CCN51, BN34 e CEPEC2002 diferentes tempos avaliados.

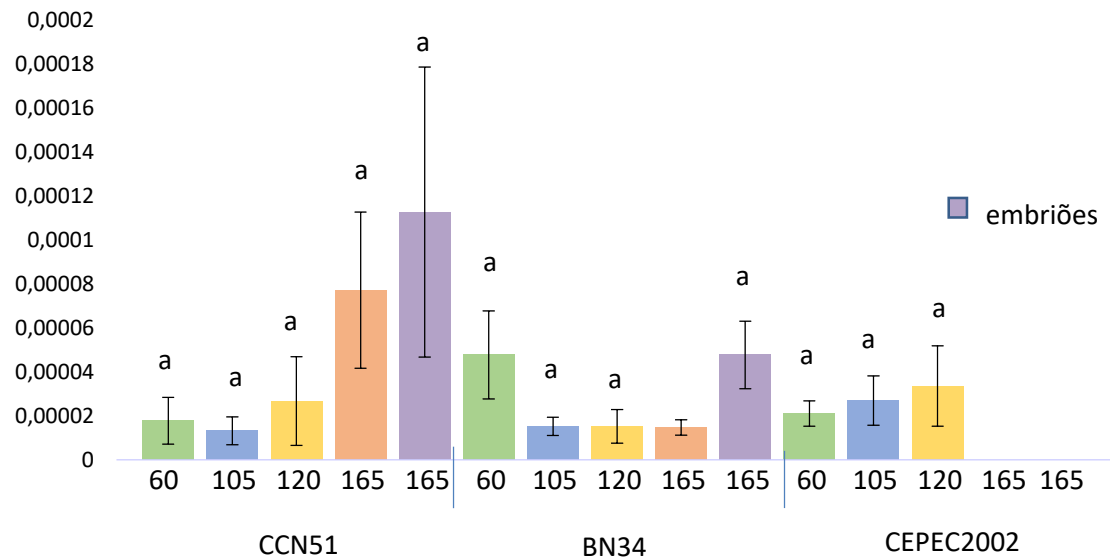


Figura 17: Atividade enzimática de catalase (CAT) em estaminoides marrons dos clones CCN51, BN34 e CEPEC2002 em diferentes dias de cultivo embriogênico. Valores médios de três repetições (\pm EP) foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e comparadas as médias entre os tratamentos usando o teste Tukey se apresentassem normalidade ou homogeneidade dos dados. Em caso de dados não paramétricos, foi usado o teste de qui-quadrado de Kruskal Walls. Médias seguidas das mesmas letras minúsculas, não diferem entre si ($p \leq 0,05$).

Discussão

De acordo com Grene (2002), a capacidade de responder às alterações do ambiente é uma das mais importantes funções das células vegetais. Portanto, é um dos grandes objetivos da biologia das plantas a compreensão das conexões entre as respostas iniciais aos variados tipos de estresses, os quais a conferem sucesso no ajuste às condições alteradas de crescimento.

As plantas, quando expostas a condições estressantes como seca, baixa temperatura, alta salinidade, alta intensidade de luz ou cultura *in vitro* podem produzir espécies reativas de oxigênio em excesso, fenômeno conhecido como estresse oxidativo (Konieczny et al. 2008).

A superprodução ou acúmulo de EROs pode causar danos nas células (Cassells e Curry 2001) e para evitar que isso ocorra, as células vegetais possuem sistemas bem desenvolvidos de enzimas antioxidantes, como SOD, CAT, POD, APX que regulam o nível de EROs e reduzem o dano oxidativo (Dat et al. 2000; Mittler 2002).

No que se refere ao cultivo embriogênico, segundo Blazquez et al. (2009), um certo nível de estresse oxidativo é requerido para promover a formação de células embriogênicas e desencadear uma rota morfogênica específica. O crescimento de células e calos em ritmo acelerado gera uma maior concentração de radicais livres estimulando a síntese de enzimas antioxidantes para a desintoxicação e o fornecimento de moléculas para biossíntese celular (Nunes 2015).

Assim, a resposta antioxidante concomitante ao crescimento, desenvolvimento e diferenciação celular sugere uma ligação entre a produção de EROs e os processos morfogênicos das plantas (Prudente et al. 2020).

Depreende-se que a avaliação da atividade enzimática neste estudo mostrou que houve diferenças entre os grupos, tanto na embriogênese primária (60, 105 e 120 dias de cultivo) quanto na secundária (165 e 225 dias de cultivo embriogênico).

No nosso estudo, o clone CCN51 apresentou maiores atividades das enzimas antioxidantes, comparado aos demais clones, o que pode ter relação com a boa reprodutibilidade desse clone no cultivo *in vitro*, mostrada por Ramírez et al. (2018) e Garcia et al. (2016). Em estudo recente da embriogênese somática de cultivares de alto rendimento de *Theobroma cacao L.*, Jones et al. (2020) observou que o clone CCN51 teve uma boa eficiência, formando mais de 10 embriões por explante.

O clone CEPEC 2002 e BN34 carecem de estudos relacionados à eficiência embriogênica. No entanto, estudo recente do nosso grupo de pesquisa mostrou uma eficiência dos estaminoides na formação de calos, semelhante ao clone CCN51 (Rabelo, 2019).

Com relação ao explante utilizado foi observada, de maneira geral, uma maior atividade enzimática nos estaminoides, destacando maior atividade de SOD, GPX e APX nos estaminoides marrons nas primeiras etapas do cultivo *in vitro*. Esse comportamento pode estar relacionado à maior eficiência embriogênica dos estaminoides marrons para a formação de embriões, conforme relatado por Tan *et al.* (2003), Traore et al. (2006) e mais recentemente por Jones et al. (2020).

Segundo Garcia et al. (2016) durante a embriogênese somática de pétalas e estaminoides de *Theobroma cacao L.*, uma maior proporção de calo marrom pode explicar maior geração de embriões somáticos, possivelmente devido a maiores populações de células competentes. A saber, o calo marrom caracteriza-se pela presença de compostos fenólicos oxidados que cobrem toda a superfície do explante, enquanto o calo branco tem aparência compacta e uniforme e não produz embriões.

Em síntese, durante a embriogênese primária, a atividade enzimática de SOD e GPX diferiu entre os grupos em todos os períodos de cultivo embriogênico avaliados, a de APX diferiu somente aos 60 dias e a de CAT não mostrou diferença em nenhum período.

Na embriogênese somática secundária, a atividade enzimática de SOD diferiu entre os grupos aos 225 dias. A atividade de GPX mostrou diferença entre os grupos aos 165 e 225 dias e a atividade de APX diferiu aos 165 dias de cultivo entre calos e embriões existentes no meio de cultura nesses períodos.

A atividade de SOD é a primeira linha de defesa contra as EROs e catalisa a dismutação de dois radicais superóxido ($O_2^{\bullet-}$), gerando peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2) (Mittler 2002). Estudos realizados por Isah e Mujib (2012) revelaram que a diferenciação de calos em embriões somáticos parece ter relação com a alta atividade de SOD associada com a indução de sinal para a aquisição de competência embriogênica.

O peróxido de hidrogênio é gerado via SOD durante o transporte de elétrons e pode funcionar como um componente da complexa cadeia de transdução de sinal necessária para regular a embriogênese somática (Van Breusegem et al. 2001; Neill et al. 2002). Durante o estresse oxidativo, embora a progressão do ciclo celular esteja sob controle negativo de EROs, a adição de H_2O_2 ao meio pode favorecer a divisão celular durante a ES (Vranova 2002).

O peróxido de hidrogênio pode atuar como mensageiro secundário, amplificando a sinalização intracelular para a ativação do ciclo celular, induzindo a expressão gênica e a síntese de proteínas necessárias para regular rotas morfogenéticas e produzir a embriogênese somática (Zhang et al. 2015). Kairong et al. (2002) mostraram a mudança na atividade das enzimas antioxidantes e o efeito do tratamento com H_2O_2 na frequência embriogênica em *Lycium barbarum L.*

Além disso, o peróxido de hidrogênio é responsável por diversos processos metabólicos dentro da célula: produção de radicais livres, lignificação e produção de compostos fenólicos,

além de gatilho para respostas de resistência sistêmica adquirida (SAR), relacionada a múltiplas reações de defesa das plantas (Resende et al. 2003).

No nosso estudo, a análise da atividade enzimática de SOD em calos marrons de estaminoides mostrou uma variação em diferentes fases da embriogênese somática, sendo que no clone CCN51 foi maior em calos aos 60 dias de cultivo comparado aos embriões. Resultado semelhante ao estudo de Blázquez (2009) durante a ES em *Crocus sativus L.*, o qual detectou um aumento significativo da SOD durante a formação de calos, seguido por progressivo decréscimo durante os estágios de desenvolvimento dos embriões somáticos. Da mesma forma, a atividade da superóxido dismutase em *Lycium barbarum L.* aumentou gradualmente nos primeiros dias de cultivo, diminuindo com as divisões adicionais e o desenvolvimento de embriões multicelulares (Cui et al. 1999). Isso mostra a importância de SOD no controle das EROS nos calos para que eles possam se diferenciar em embriões.

A atividade enzimática de APX aos 60 dias de cultivo também foi alta nos calos marrons de estaminoides de CCN51. Houve uma redução aos 105 dias voltando a aumentar progressivamente, sendo que sua maior atividade em embriões aos 165 dias, mostrando que ela pode estar relacionada com a diferenciação de calos em embriões e ainda com a formação de plântulas, já que estas enzimas aumentam suas atividades nos embriões.

A maior atividade enzimática de APX e SOD, verificada na maior parte dos embriões somáticos no nosso trabalho, sugere que embriões em desenvolvimento podem gerar quantidades significativas de EROS, necessitando controle rígido por mecanismos antioxidantes.

A APX é uma heme-proteína, da Classe I da superfamília das peroxidases, com diferentes formas isoenzimáticas reguladas de maneiras distintas. Suas isoformas podem ser encontradas em citosol, mitocôndrias, peroxissomos, cloroplastos e parede celular (Dabrowska et al. 2007).

A APX juntamente com a CAT é uma importante enzima na desintoxicação do H_2O_2 . Nos cloroplastos e mitocôndrias, a APX atua no ciclo ascorbato-glutationa, no qual o H_2O_2 formado pela ação da SOD é reduzido a água pela APX, utilizando o ascorbato como doador de elétrons (Mittler 2002; Locato et al. 2010).

O ciclo ascorbato glutaciona parece desempenhar um papel central na embriogênese e crescimento celular, pois está relacionado com o controle da progressão do ciclo celular (De Tullio e Arrigoni, 1999), modulando a expressão de genes envolvidos em vias de sinalização hormonal (Pastori et al., 2003).

A remoção de H_2O_2 por peroxidases requer uma pequena molécula redutora (ou proteínas como o citocromo C ou tioredoxina) para agir como um co-fator de regeneração (Mhamdi et al. 2012). A APX tem alta afinidade com o H_2O_2 , permitindo a eliminação dele em baixas concentrações (Locato et al. 2010; Sharma et al. 2012).

Em estudo realizado por Jariteh et al. (2011) durante a embriogênese somática secundária em *Juglans regia L.*, a avaliação da atividade enzimática em calos marrom-escuros mostrou que CAT e APX tiveram as atividades mais altas enquanto a atividade de SOD mostrou níveis mais baixos, de maneira diferente do nosso estudo que verificou níveis mais altos de SOD. Essa diferença pode estar relacionada ao comportamento de distintas espécies e explantes estudados, além da influência do meio de cultura utilizado.

A atividade de GPX foi menor em pétalas e estaminoides do clone CEPEC2002 aos 60 dias, aumentando posteriormente aos 105 e 120 dias. O clone CEPEC2002 apresentou menor formação de calos e embriões no nosso estudo, o que pode estar relacionado ao atraso na elevação da atividade enzimática de GPX e APX comparada aos demais clones. As enzimas peroxidase e polifenol oxidase participam do metabolismo das auxinas, ácido cumárico e outros compostos fenólicos que são importantes na embriogênese vegetal (Duchovskis et al. 2009).

O clone CEPEC2002 destaca-se por apresentar baixa atividade enzimática de maneira geral e retardo na elevação de GPX e APX que aumenta aos 105 dias enquanto que em CCN51 e BN34 é alta já aos 60 dias de cultivo. Esse fato pode estar relacionado a menor eficiência embriogênica na formação de calos e embriões comparado aos demais clones. Além disso, podemos observar que o clone CEPEC2002 não possuiu material embriogênico suficiente para ser analisado na embriogênese somática secundária.

No nosso estudo, a atividade enzimática da catalase não diferiu entre os grupos em nenhum momento da embriogênese somática, ou seja, apresentou os mesmos níveis de atividade em calos e embriões. A atividade de CAT também foi considerada muito baixa em todas as amostras e tratamentos estudados. A baixa atividade enzimática da catalase também foi visualizada por Cui et al. (1999) na embriogênese de *Lycium barbarum L.* e por Gupta e Datta (2004) ao avaliar o cultivo *in vitro* de *Gladiolus hybridus* aplicando antioxidantes.

A CAT é uma das principais enzimas na eliminação do H₂O₂ gerado durante a fotorrespiração e a β-oxidação dos ácidos graxos. Ela converte duas moléculas de H₂O₂ a H₂O e O₂ e atua nos peroxissomos e glioxissomos, podendo também ser encontrada nas mitocôndrias. A CAT atua sem agente redutor (Sharma et al. 2012), sendo efetiva, principalmente, em concentrações relativamente altas de H₂O₂, por isso é considerada indispensável para a desintoxicação de EROs em condições de estresse severo (Dubey 2011). No entanto, em baixas concentrações de H₂O₂, a atuação da catalase nos peroxissomos não parece ser tão eficiente para a degradação deste, visto que o peróxido de hidrogênio já foi reduzido no ciclo ascorbato-glutationa (Arora et al. 2002), o que pode justificar a baixa atividade da CAT observada nesse estudo.

Sendo assim, um número crescente de publicações associa EROs com a indução da ES, sugerindo que a indução do estresse em explantes cultivados *in vitro* pode desencadear diferenciação celular, levando à embriogênese (Correa-Aragunde 2006; Martin et al. 2018).

De acordo com Gupta e Datta (2003), o estresse oxidativo está inevitavelmente presente no desenvolvimento do embrião somático como uma diferenciação celular particular. As diferentes atividades que ocorreram nas enzimas antioxidantes foram consideradas como marcadores para os estágios da embriogênese somática e, ao mesmo tempo, fundamental para rastrear o estresse oxidativo em várias espécies vegetais (Blazquez et al. 2009). Através dos perfis de atividades das enzimas antioxidativas, a iniciação e o desenvolvimento de embriões somáticos podem ser monitorados e modulados bioquimicamente (Minyaka et al. 2017).

Dessa forma, os resultados do nosso trabalho indicaram que as atividades de SOD, GPX e APX cooperam para ajustar a diferenciação e o desenvolvimento de embriões somáticos em clones de *Teobroma cacao L.* As diferentes respostas nas atividades enzimáticas nos diferentes clones e explantes provavelmente refletem as influências da variação genética (BISPO et al., 2007), e de compostos produzidos endogenamente que influenciam a embriogênese somática como por exemplo a auxina relacionadas ao fototropismo, ao geotropismo, à dominância apical e à iniciação e alongação radicular (CASTRO et al. 2005).

No futuro, os estudos em genômica, proteômica e metabolômica poderão ajudar a compreender as redes bioquímicas envolvidas nas respostas celulares ao estresse oxidativo, possibilitando uma visão mais extensa da função das EROs em todos os aspectos do crescimento e desenvolvimento das plantas (Barbosa et al. 2014), gerando um impacto significativo na agricultura e biotecnologia, levando ao desenvolvimento de safras com maiores rendimentos (Mittler et al. 2011).

Conclusão

A avaliação da atividade enzimática dos explantes em diferentes fases do cultivo pode ajudar na melhoria da embriogênese somática de espécies recalcitrantes como o *Theobroma cacao* L..

Através das análises realizadas no estudo aqui destacado foi possível verificar SOD, APX e GPX como marcadores bioquímicos específicos em diferentes estágios do desenvolvimento embriogênico em 3 clones de elite do cacau.

Assim sendo, estudos futuros com o uso de antioxidantes podem melhorar a resposta embriogênica e ajudar na elaboração de novos protocolos.

Conflito de interesse: Os autores declaram não haver conflito de interesse.

Agradecimentos: O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

Referências

- Amal FM, Eldin Z; Hemmat AI (2015) Some biochemical changes and activities of antioxidant enzymes in developing date palm somatic and zygotic embryos in vitro. *Annals of Agricultural Sciences*.
- Apel K, Hirt H (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55:373-399.
- Arora, A.; Sairam, R.K.; Srivastava, G.C. (2002) Low temperature and oxidative stress. *Current Science*, V.82,P.1227-1238.
- Asada K (2006) Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology* 141:391-396.
- Barbosa MR, Medeiros MAS, Willadino L, Ulisses C, Rangel TC (2020) Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. *Cienc. Rural* [online]. 2014, vol.44, n.3 [citado 2020-11-30], pp.453-460. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782014000300011&lng=pt&nrm=iso>. ISSN 0103-8478. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782014000300011>.
- Blazquez S, Olmos E, Hernández JÁ, Fernández-García N, Fernández JÁ, Piqueras A (2009) Somatic embryogenesis in saffron (*Crocus sativus* L.). Histological differentiation and implication of some components of the antioxidant enzymatic system. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 97:49-57.
- Blázquez S, Olmos E, Hernández JA, Hellín E, Fernández JA, Piqueras A (2004) Somatic Embryogenesis in Saffron (*Crocus sativus* L.): Morphological Differentiation and the Role of the Antioxidant Enzymatic System. *Acta Hort* 650, ISHS.
- Boutchouang RP, Akitio OFZ, Tchouatcheu AGN, Niemenak N (2016) Influence of the position of flowers buds on the tree on somatic embryogenesis of cocoa (*Theobroma cacao* L.). *International Journal of Plant Physiology and Biochemistry*, 8(2):7-16.
- Carvalho JMFC, Lima MMA, Aires PSR, Vidal MS, Pimentel NW (2006). Embriogênese somática, (Documentos 152) – Campina Grande, PB. Embrapa Algodão, p. 35.

- Carvalho, JMFC (2009) Mecanismos Antioxidativos Associados à Embriogênese Somática/por Julita Maria Frota Chagas Carvalho, Marina Medeiros de Araújo Silva e Terezinha Rangel Camara. Campina Grande: Embrapa Algodão.
- Cassells AC, Curry RF (2001) Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. *Plant Cell Tiss Org Cult* 64:145–157.
- Castro, PRC; Kluge, RA., Peres, LEP (2005) Hormônios e reguladores vegetais. In: Manual de Fisiologia Vegetal. Editora Agronômica Ceres, Piracicaba. p. 389-399.
- Cid, LPB (2001) A propagação in vitro de plantas. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, v. 2, n.19, p.16-21.
- Correa-Aragunde N, Graziano M, Chevalier C, Lamattina L (2006) Nitric oxide modulates the expression of cell cycle regulatory genes during lateral root formation in tomato. *J Exp Bot* 57:581–588.
- Cui K, Xing G, Liu X, Xing G, Wang Y (1999). Effect of hydrogen peroxide on somatic embryogenesis of *Lycium barbarum* L. *Plant science* 146:9-16.
- Dabrowska G, Kata A, Goc A, Szechynska-Hebda M, Skrzypek E (2007) Characteristics of the plant ascorbate peroxidase family. *Acta Biologica Cracoviensia* 49:7-17. Disponível em: <http://www.ib.uj.edu.pl/abc/pdf/49_1/01dabrow.pdf>.
- Dat J, Vandenaabee S, Vranova E (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell Mol Life Sci* 57:779–795
- Del Río LA, Sandalio LM, Corpas FJ, Palma JM, Barroso JB (2006) Reactive Oxygen Species and Reactive Nitrogen Species in Peroxisomes. Production, Scavenging, and Role in Cell Signaling. *Plant Physiology* 141:330-335.
- De Tullio MC, Paciolla C, Dalla Vesshia F, Rascio N, D'emerico S, De Gara L, Liso R, Arrigoni O (1999) Changes in onion root development induced by the inhibition of peptidyl-prolyl hydroxylase and influence of the ascorbate system on cell division and elongation. *Planta*. 209: 424-434.
- Dipierro N, Mondelli D, Paciolla C, Brunetti G, Dipierro S (2005) Changes in ascorbate system in the response of pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) roots to aluminum stress. *Journal of Plant Physiology, Jena* 162:529-536.
- Duchovskis P, Stanys V, Šikšnianienė BJ, Staniėnė G, Šikšnianas T, Česlovas B (2009). Peroxidase and polyphenoloxidase polymorphism during embryogenesis in *Eucoreosma* section currants. *Temės Ūkio Mokslai* 1-2:47-52.
- Dubey RS (2011) Metal toxicity, oxidative stress and antioxidative defense system in plants. In: GUPTA SD. *Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants*. Enfield: Science Publishers 9:178-203.
- Fehér A.; Pasternak, TP; Dudits, D (2003) Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v.74, p. 201–228.
- Gaj MD (2004) Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Growth Regulat.* v.43, p. 27–47.
- Ganesan M, Jayabalan N (2004) Evaluation of haemoglobin (erythrocyte): for improved somatic embryogenesis and plant regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L. cv. SVPR 2). *Plant Cell Rep* 23:181-187.
- Garcia C, Corrêa F, Findley S, Almeida A, Costa M, Motamayor JC, Schnell R, Marelli J (2016) Optimization of somatic embryogenesis procedure for commercial clones of *Theobroma cacao* L. *Afr. J. Biotechnol.* 15 (36):1936–1951. <http://dx.doi.org/10.5897/AJB2016.15513>.

- Giannopolitis CN, Ries SK (1977) Superoxide dismutases: I., occurrence in higher plants. *Plant Physiology*, Bethesda 59:309-314.
- Gill SS, Tuteja N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48:909-930. Acesso em: 15 maio 2011. doi: 10.1016/j.plaphy.2010.08.016.
- Greene R (2002) Oxidative stress and acclimation mechanisms in plants. *Arabidopsis Book*. 1:e0036. doi:10.1199/tab.0036.1
- Gupta SD, Datta S (2003/2004) Antioxidant enzyme activities during in vitro morphogenesis of gladiolus and the effect of application of antioxidant on plant regeneration. *Biol Plant* 47:179–183.
- Havir EA, Mchale NA (1987) Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiol* 84:450-455.
- ICCO (2019). ICCO Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics, Vol. XLVI, No. 3, Cocoa year 2019/2020.
- Isah T, Mujib A (2012) Studies on Antioxidant Enzymes Activity During in vitro Morphogenesis of *Caladium bicolor* Linn. *International Journal of Modern Cellular and Molecular Biology* 1(1):1-9.
- Jariteh M, Ebrahimzadeh H, Niknam V, Vahdati K, Amiri R (2011). Antioxidant enzymes activities during secondary somatic embryogenesis in Persian walnut (*Juglans regia* L.). *African Journal of Biotechnology* 10(20):4093-4099, 16 May.
- Jones J, Zhang E, Tucker D, Rietz D, Dahlbeck D, Gomez M, Garcia C, Marelli JP, Livingstone D (2020) Screening of Cultivars for Tissue Culture Response and Establishment of Genetic Transformation in a High-yielding and Disease-resistant Cultivar of *Theobroma cacao*. bioRxiv 2020.10.07.327486; doi: <https://doi.org/10.1101/2020.10.07.327486>
- Kairong C, Ji L, Gengmei X, Jianlong L, Lihong W, Yafu W (2002) Effect of hydrogen peroxide on synthesis of proteins during somatic embryogenesis in *Lycium barbarum*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 68:187–193
- Konieczny R, Libik M, Tuleja M, Niewiadomska M (2008) Oxidative events during in vitro regeneration of sunflower. *Acta physiol plant* 30:71-79.
- Kormuťák A, Salaj T, Matúšová, Vooková B (2003) Biochemistry of zygotic and somatic embryogenesis in silver fir (*Abies Alba* Mill.) *Acta biologica cracoviensia Series Botanica* 45/1:59–62.
- Laliberte B, End M (2015) Supplying New Cocoa Planting Material to Farmers: A Review of Propagation Methodologies. Rome, Italy: Bioversity International. [[Google Scholar](#)].
- Libik M, Konieczny R, Pater B, Slesak I, Miszalski Z (2005) Differences in the activities of some antioxidant enzymes and in H₂O₂ content during rhizogenesis and somatic embryogenesis in callus cultures of the ice plant. *Plant cell rep.* 23:834-841.
- Locato V, Pinto MC, Paradiso A, Gara L (2010) Reactive oxygen species and ascorbate-glutathione interplay in signaling and stress responses. In: GUPTA, S.D. *Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants*. Enfield: Science Publishers 45-64.
- López CMR, Wetten AC, Wilkinson MJ (2010) Progressive erosion of genetic and epigenetic variation in callus-derived cocoa (*Theobroma cacao*) plants. *New Phytol.* 186:856–868.
- Martin F et al (2018) Overexpression of EcGSH1 induces glutathione production and alters somatic embryogenesis and plant development in *Hevea brasiliensis*. *Ind Crops Prod* 112:803–814.
- Maximova SN, Young A, Pishak S, Miller C, Traore A, Gultinan MJ (2005) Integrated system for propagation of *Theobroma cacao* L. In: Jain SM; Gupta PK (eds) *Protocols for somatic embryogenesis in woody plants*. Springer, Dordrecht, The Netherlands 209–229.

- Mhamdi A, Noctor G, Baker A (2012) Plant catalases: peroxisomal redox guardians. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Amsterdam 525:181- 194.
- Miller G, Coutu J, Shulaev V, Mittler R (2018) Reactive oxygen signaling in plants. *Annu Plant Rev Online* 33:189–201.
- Minyaka E, Niemenak N, Ngangue LTA, Madina VBC, Bahoya JA, Omokolo, ND (2017). Atividades de peroxidase e polifenol oxidase associadas ao potencial de embriogênese somática em um genótipo híbrido de elite de *Theobroma cacao* L. *African Journal of Biotechnology* 16(49):2278-2288.
- Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* 7:405–410.
- Mittler R (2011) ROS signaling: the new wave? Department of Biological Sciences, College of Arts and Sciences, University of North Texas, 1155 Union Circle #305220, Denton, TX 76203, USA.
- Nakano Y, Asada K (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts, *Plant and Cell Physiology* 22 (5):867-880.
- Namasivayam P (2007) Acquisition of embryogenic competence during somatic embryogenesis. *Plant cell, tissue and organ culture* 90:1-8.
- Neill SJ, Desikan R, Clarke A, Hurst RD, Hancock JT (2002) Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *J Exp Bot* 53:1237–1247.
- Nunes RCA, Viana RS, Neto NBM (2015) Atividade enzimática da superóxido dismutase em resposta aos fitorreguladores em *Gerbera jamesonii*. *Comunicata Scientiae* 6(1):83-89.
- Obert B, Benson EE, Millam S, Pret'ová A, Bremner DH (2005) Moderation of morphogenetic and oxidative stress responses in flax in vitro cultures by hydroxynonenal and desferrioxamine. *Journal of Plant Physiology* 162:537-547.
- Panda SK, Choudhury S (2005) Chromium stress in plants. *Brazilian Journal Plant Physiology*, Campinas 6:95-102.
- Pastori G M, Kiddle G, Antoniow J, Bernard S, Veljovic-Jovanovic S, Verrier PJ, Noctor G, Foyer CH (2003) Leaf Vitamin C Contents Modulate Plant Defense Transcripts and Regulate Genes That Control Development through Hormone Signaling. *The Plant Cell* Apr 2003, 15 (4) 939-951; DOI: 10.1105/tpc.010538
- Prudente DO, Souza L, Paiva R (2020) Plant Somatic Embryogenesis: Modulatory Role of Oxidative Stress. *Proc. Natl. Acad. Sci., India, Sect. B Biol. Sci.* 90, 483–487. <https://doi.org/10.1007/s40011-019-01136-3>.
- Quainoo A, Wetten A, Allainguillaume J (2008) The effectiveness of somatic embryogenesis in eliminating the cocoa swollen shoot virus from infected cocoa trees. *J. Virol. Methods* 149:91–96.
- Quinga LAP, Fraga, HPF, Viera, LN, Guerra MP (2017) Epigenetics of long-term somatic embryogenesis in *Theobroma cacao* L.: DNA methylation and recovery of embryogenic potential. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 131:295–305.
- Quiroz-Figueroa FR, Rojas-Herrera R, Galaz-Avalos RM (2006) Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 86:285–301.
- Rabelo BO (2019) Desenvolvimento de massa calogênica em clones de *Theobroma cacao* L. e citogenética de calos radiculares. Dissertação (mestrado). Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, PMBq BM, Vitória da Conquista.
- Ramírez AMH, Vasquez TH, Osorio TMO, Garcés LA, Trujillo AIU (2018) Evaluation of the potential of regeneration of different Colombian and commercial genotypes of cocoa (*Theobroma cacao* L.) via somatic embryogenesis. *Scientia Horticulturae* 229:148–156.
- Resende MLV, Salgado SML, Chaves, ZM (2003) Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. *Fitopatologia Brasileira* 28:123-130.

- Saher S, Piqueras A, Hellin E, Olmos (2004) E. Hyperhydricity in micropropagated carnation shoots: the role of oxidative stress. *physiologia Plantarum* 120:152–161.
- Scotton, DC, Genômica funcional da interação cacauero (*Theobroma cacao* L.) x. *Moniliophthora perniciosa* por meio do sistema modelo Micro-Tom (*Solanum lycopersicum* L). 2012. 147 f.– Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- Sharma P, Jha AB, Dubey RS, Pessarakli M (2012) Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany*. doi: 10.1155/2012/217037.
- Tan CL, Furtak DB (2003) Development of an in vitro regeneration system for *Theobroma cacao* from mature tissues. *Plant Sci* 164:407–412 [http://doi.org/10.1016/S0168-9452\(02\)00428-4](http://doi.org/10.1016/S0168-9452(02)00428-4)
- Thomas E, Zonneveld M, Loo J, Hodgkin T, Galluzzi G, Etten J (2012) Present Spatial Diversity Patterns of *Theobroma cacao* L. in the Neotropics Reflect Genetic Differentiation in Pleistocene Refugia Followed by Human-Influenced Dispersal. *PLoS One* 7:e 47676. doi: 10.1371/journal.pone.0047676.
- Traore A, Gultinan, MJ (2006) Effects of carbon source and explant type on somatic embryogenesis of four cacao genotypes. *HortScience* 41:753–758 <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.41.3.753>
- Van Breusegem, FM, Vranova E, Dat JF, Inzé D (2001) The role of active oxygen in plant signal transduction. *Plant. Sci* 161:405-414.
- Vranova E, Inze D, Van Breusegem F (2002) Signal transduction during oxidative stress. *J Exp Bot* 53:1227–1236
- Wickramasuriya A, Dunwell J (2018) Cacao biotechnology: Current status and future prospects. *Pl Planta Biotechnol J* 16 (1): 4–17.
- Zhang S, Han S, Yang W, Wei H, Zhang M, Qi L (2010) Changes in H₂O₂ content and antioxidant enzyme gene expression during the somatic embryogenesis of *Larix leptolepis*, *Plant Cell Tiss Organ Cult* 100:21–29 DOI 10.1007/s11240-009-9612-0.
- Zhang W, Wang XM, Rong Fan, Yin GX, Ke WA, Du LP, Xiao LL, Ye XG (2015) Effects of inter-culture, arabinogalactan proteins, and hydrogen peroxide on the plant regeneration of wheat immature embryos. *J Integr Agric* 14:11–19
- Zimmermann MJ (2010) Embriogênese somática. In: CID, L. P. B. *Cultivo in vitro de plantas*. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília 67-101.
- Zugaib, ACC.; Barreto, RCS. O mercado brasileiro de cacau: perspectivas de demanda, oferta e preços. *Agrotrópica*, Ilhéus, vol. 27, n. 3, 2015.

CAPÍTULO 3 – ARTIGO 2

DETERMINAÇÃO DE PROTOCOLO PARA VISUALIZAÇÃO DE CROMOSSOMOS EM CLONES DE *Theobroma Cacao* L. CULTIVADOS *IN VITRO* E *EX VITRO*

Glecia Leolina de Souza Meira¹, Beatriz Oliveira Rabelo², Matheus Dias Santos³, Crislene Viana da Silva⁴, Bárbara Dantas Fontes Soares⁵

Resumo: O cultivo do *Theobroma cacao* L. é importante para a subsistência de mais de 40 milhões de pessoas em todo o mundo, pois seu fruto fornece a matéria-prima para a multibilionária indústria do chocolate, além de ser usado nas indústrias farmacêutica e cosmética. O déficit de produção em decorrência de fatores como estiagens, queda nos preços e o avanço da “vassoura-de-bruxa” mostra a necessidade de desenvolvimento de um método de propagação eficiente para acelerar os programas de melhoramento e evitar interrupções de produção no futuro. A técnica de embriogênese somática (ES) permite a propagação em larga escala de clones comerciais de cacau. No entanto, a ES altera o ciclo celular do material e faz uma reprogramação genética, podendo promover variações somaclonais. Assim, o uso da citogenética torna-se uma ferramenta útil para validar a eficiência do processo embriogênico ou identificar possíveis alterações genéticas. O objetivo desse trabalho foi obter cromossomos dos clones de elite BN34, CEPEC2002 e CCN51 visando avaliar o número de cromossomos de raízes obtidas durante o cultivo “*in vitro*” e compará-lo ao das raízes obtidas “*ex vitro*” oriundas das plantas não embriogênicas cultivadas por estaquia ou enxertia e das raízes originadas da germinação de sementes. Realizou-se a adaptação de um protocolo prévio para a obtenção de cromossomos. Os resultados encontrados não mostraram diferença no número de cromossomos no material embriogênico quando esse foi obtido nas primeiras repicagens no meio de desenvolvimento embrionário (ED). Conclui-se que não houve alteração no número de cromossomos, na reprodução “*in vitro*”, via embriogênese somática indireta. São necessários novos estudos para melhor observação dos cromossomos.

Palavra-chave: Citogenética, *Theobroma cacao* L., Embriogênese

INTRODUÇÃO

Theobroma cacao L. é uma planta tropical, alógama, perene, cultivada principalmente em países subdesenvolvidos, em regiões próximas à linha do Equador. Do fruto do cacauzeiro, utilizam-se principalmente as sementes, que depois de fermentadas e secas, são moídas e transformadas em manteiga, chocolate e cosméticos (Almeida, 2001).

O Brasil já foi o maior exportador de cacau e, hoje, ocupa a sétima posição na produção mundial. Na década de 1980, a produção chegou ao recorde nacional, atingindo 458,7 mil toneladas, já nos anos 2000, a produção regrediu a um patamar abaixo de 200 mil toneladas e, desde então, vem oscilando até atingir a média atual de 250 mil toneladas por ano (Brasil, 2020).

O *Theobroma cacao L.* é uma espécie arbórea eudicotiledônea e diploide ($2n=20$) (Figueira et al., 1992), com genoma relativamente pequeno, organizado em dez pares de cromossomos (Da Silva et al., 2017). A espécie apresenta autoincompatibilidade gametofítica e esporofítica. A autoincompatibilidade (AI) tem sido definida como a incapacidade de uma planta fértil hermafrodita produzir zigotos após a autopolinização (Quinga, 2013), sendo considerada um mecanismo fisiológico com base genética que favorece a alogamia, promovendo, dessa forma, a manutenção da variabilidade genética (Schifino e Dall'agnol, 2002).

O cacauzeiro é definido ainda como uma espécie que apresenta sementes recalcitrantes, ou seja, sofrem desidratação pouco tempo após a maturidade fisiológica e danos físicos decorrentes da dessecação (Timms; Stewart, 1999), não resistindo à secagem e armazenamento. Portanto, a propagação de *Theobroma cacao L.* pelo plantio das sementes torna-se limitada (Boutchouang, 2016).

Dessa forma, a biotecnologia busca alternativas para a propagação assexuada de clones com características fenotípicas desejadas de resistência a pragas e produtividade, destacando a reprodução do cacau via embriogênese somática.

Ressalta-se que a embriogênese somática é uma técnica de reprodução assexuada que, de acordo com Brasil (2018), permite a propagação em larga escala, com rendimento de hastes por matriz da embriogênese duas a três vezes superior a matrizes no campo. Nesse sentido, a embriogênese somática, por proporcionar rápida multiplicação vegetal, passou a ser aplicada como técnica de pesquisa e interesse industrial (Pinto, Silva e Loureiro, 2011).

No entanto, apesar das vantagens da embriogênese somática, alguns estudos referem que nas técnicas de cultura de tecidos existe um risco de ocorrer variações genéticas nas células ou nas plantas, conhecidas como variações somaclonais (George, 2007; Clarindo et al. 2008; Jin et al. 2008; Rival et al., 2009; Francischini, 2013).

O risco de variações genéticas é geralmente maior quando as plantas originam-se por embriogênese somática indireta que se deve ao longo período da fase de calogênese (Bairu et al., 2010). As variações somaclonais são causadas por diversos mecanismos como variações cromossômicas, a ativação de transposons, mutações em um único gene, metilações do DNA, a poliploidia e as mutações nucleares e citoplasmáticas (Srisawat et al., 2005; Rival et al., 2009).

Assim, a avaliação da estabilidade genética de plantas obtidas por cultura de tecidos é importante para verificar a fidelidade das plantas regeneradas às características da planta matriz (Freitas, 2014). De acordo com Souza e colaboradores (1992), a citogenética contribui com um grande número de informações, como número cromossômico, número de ploidia e o comportamento dos cromossomos na meiose e mitose, auxiliando na caracterização cromossômica de diversas espécies e contribuindo para a viabilidade de programas de melhoramento genético.

Diante dos aspectos supramencionados, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um protocolo de citogenética eficiente para contagem de cromossomos em clones de *Theobroma cacao L.* e observar possíveis variações no cultivo *in vitro* via embriogênese somática indireta.

MATERIAL E MÉTODOS

LOCALIZAÇÃO DO EXPERIMENTO

Os estudos foram conduzidos no Laboratório de Citogenética da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), Vitória da Conquista, Bahia, Brasil. O material vegetal foi fornecido pela Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC).

AMOSTRAS

As amostras de raízes foram obtidas “*ex vitro*” 1) oriundas das mudas dos clones não embriogênicos cultivados por estaquia plantadas em vermiculita e 2) originadas da germinação de sementes dos clones de cacau em estudo. As amostras de raízes “*in vitro*” foram oriundas de raízes das plântulas obtidas na embriogênese somática realizada de acordo com protocolo de Maximova et al (2005).

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

A embriogênese somática foi realizada no laboratório de Biotecnologia do Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC) da Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC), Itabuna- Ba. O material vegetal e os insumos da pesquisa foram fornecidos por esta instituição. O protocolo de embriogênese somática utilizado foi desenvolvido por Maximova et al. (2005) com algumas modificações. Esse protocolo é dividido em: Indução de calo primário (ICP), crescimento de calo secundário (ICS) e desenvolvimento de embriões (ED).

Foram coletados botões florais de três genótipos de cacau (CCN51, CEPEC2002 e BN34) no período matutino até às 9h da manhã. Assim que chegavam ao laboratório, os botões foram desinfetados com hipoclorito de cálcio a 2% por 20 minutos, diferente do protocolo original que usou hipoclorito de sódio e, logo após, lavados três vezes com água autoclavada. Os botões florais foram cortados com bisturi número 11 para Extração dos explantes (pétalas e estaminoides), os quais foram inoculados separadamente em placas de Petri de tamanho médio, totalizando 20 explantes por placa, garantindo um bom contato com o meio de indução de calo primário (ICP). A formação de calos foi avaliada no sétimo e décimo quarto dias nesse meio de cultura, quando foram transferidos para o meio de indução de calo secundário (ICS). Os calos foram avaliados morfológicamente em dois tipos: a) brancos e compactos: agrupamentos de células alongadas e brancas que geralmente não formam embriões; e b)

marrom e friável: consiste em células redondas, variando entre marrom claro a marrom escuro, frequentemente encontrados em associação com embriões somáticos. (Maximova et al. 2002; Scotton, 2012).

Após 14 dias em meio ICS, os calos foram transferidos para o meio de desenvolvimento de embrião (ED), e observados quanto à formação de embriões. A cada 14 dias os calos foram subcultivados em meio ED.

Para a indução da embriogênese somática secundária foram selecionados embriões primários maturados com cotilédones desenvolvidos. Os cotilédones foram cortados com um bisturi em peças de aproximadamente 4 mm² e inoculado em meio ICS por 14 dias para formação de calos, em seguida, os calos embriogênicos foram transferidos para o meio ED para a formação de embriões secundários. Os embriões foram transferidos para o meio PEC para formação de plântulas.

Tabela 1. Composição dos meios de cultura utilizados na embriogênese somática

ICP	Composto pelos sais DKW (DRIVER & KUNIYUKI, 1984). Suplementado com glicose (20g/L), 2,4- D (2ml/L), TDZ (20µl /L), vitamina DKW (1ml/L), glutamina (20g/L), myoinositol (100mg/L) e Phytigel® (2g/L).
ICS	Composto por Mc Cowns Salts (2,3g/L), suplementado com glicose (20g/L), 2,4-D (2ml/L), vitamina B5 (1ml/L), BAP (50µl /L) e Phytigel® (2,2 g/L).
ED	Composto 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.

TÉCNICA PARA OBTENÇÃO DE CROMOSSOMOS

O protocolo utilizado para obtenção de cromossomos foi uma adaptação do protocolo utilizado no laboratório onde a técnica foi realizada. As doses e tempos de tratamento de cada reagente foram observados e selecionados aqueles que forneceram melhor resultado para as amostras vegetais dos clones de *Theobroma cacao* L.

As pontas de raízes foram lavadas em água autoclavada e colocadas no antimetabólico 8-hidroxiquinolina 2 mM em tempos de exposição, que variaram de 2 a 24 horas de duração em temperatura ambiente. Posteriormente foram retiradas e fixadas em fixador carnoy (álcool etílico - ácido acético (3:1) com 3 trocas a intervalos de 15 min cada e mantidas em refrigeração por 24h. Depois da fixação, os materiais foram transferidos para álcool etílico P.A 70% e refrigerados até o uso.

Para obtenção dos cromossomos, as amostras passaram por três lavagens de 10 minutos em água destilada. Parte do material foi colocado em contato com a enzima Pectinase SIGMA® 35°C em banho maria por 3 horas para testar a efetividade dela como ferramenta de rompimento de parede celular.

Após isso, foi testado o tempo de exposição ideal ao HCl 1N a 60°C, para a realização da hidrólise, variando de 10 a 50 minutos. No fim dessa etapa, o material foi transferido para água gelada para interromper a hidrólise ácida.

O material foi corado em orceína acética a 2% aquecida por 1 min e permanecendo no tempo variando de 20 a 50min 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 colocado 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 24h a fim de promover a aderência do material à lâmina durante remoção da lamínula. O material foi transformado em permanente com a fixação de uma nova lamínula sobre a lâmina com uma gota de bálsamo do Canadá e seca em local livre de poeira até o uso.

Assim sendo, foram selecionadas as lâminas que apresentaram melhor distribuição de cromossomos e então levadas para o Microscópio fotônico Leica DMI 300B e as imagens capturadas por meio do Pacote de Aplicação Leica tiveram a verificação dos números de cromossomos realizada com o programa ImageJ. Avaliaram-se três lâminas e dez células de cada material.

RESULTADOS

DETERMINAÇÃO DE PROTOCOLO PARA OBTENÇÃO DE CROMOSSOMOS DE *THEOBROMA CACAO L.*

O protocolo utilizado no presente trabalho foi desenvolvido para *Amburana cearenses* e modificado para *Theobroma cacao L.* até a visualização de resposta. O estudo realizado observou melhor resultado com o tempo de contato do antimetabólico 8-hidroxiquinolina 0,002M de quatro horas em temperatura ambiente.

O tempo de HCl 1N a 60°C mais apropriado para hidrólise das células, possibilitando um amolecimento adequado das pontas das raízes e um esmagamento mais uniforme das próprias foi de 30 minutos.

O material não respondeu bem à utilização de enzima pectinase como ferramenta de rompimento de parede celular, ele apresenta-se constricto, não respondendo posteriormente à utilização de HCl e não sendo possível a observação de células.

Com relação ao tempo de coloração em orceína acética 2%, o tempo de melhor resposta foi de 4h e 30 minutos.

OBTENÇÃO DE CROMOSSOMOS

A morfologia dos cromossomos tanto das raízes de plantas não embriogênicas (cultivadas em vermiculita ou obtidas da germinação de sementes) quanto das raízes de calos embriogênicos não apresentaram características visuais capazes de montar o kariograma.

O número de cromossomos observado para os três clones, BN34, CCN51 e CEPEC 2002, estudados em raízes oriundas de calos e das raízes coletadas de plantas não embriogênicas (tanto das mudas quanto das germinadas nas sementes) foram de $2n=20$ cromossomos. Durante a obtenção do número de cromossomos, observou-se uma pequena variação na contagem deles, mas células com $2n=20$ foram maioria.

Ao longo do estabelecimento do protocolo, notou-se que as raízes embriogênicas que cresciam tardiamente ou permaneciam no meio de desenvolvimento embrionário (ED) por mais tempo, acima de 90 dias de cultivo embriogênico (4 repicagens no meio ED), estavam mais susceptíveis a variações no número de cromossomos quando comparados com as raízes novas (raízes que crescem mais rapidamente).

DISCUSSÃO

A recontagem de cromossomos faz-se importante mesmo em espécies com número já conhecido, devido à possível ocorrência de registros incorretos na literatura ou de variações interpopulacionais (Guerra, 1984).

A citogenética e a citotaxonomia vegetal são importantes ferramentas que permitem detectar variações estruturais e numéricas que viabilizam o estudo evolutivo das espécies, permitindo caracterizar gêneros, espécies e tribos de acordo com os padrões cariotípicos. A citogenética contribui também com a caracterização dos germoplasmas; com o objetivo de selecionar genótipos com relação à resistência a pragas e doenças, que são características especialmente desejáveis à agroindústria (Guerra, 2002).

Isso posto, o estudo de Figueiredo (2008) pontuou que apesar de toda a sua importância econômica, histórica e cultural, o cacaueteiro não apresenta um estudo citogenético bem definido, sendo que a literatura sobre citogenética em *Theobroma cacao L.* encontrada até então era bastante antiga.

Diante disso, foram analisados os cariótipos de 5 clones de *T. cacao L.* ('Cacau Rui', 'Cacau Pucala', 'Cacau Jaca', 'Cacau Sem Vidro' e 'Cacau Comum') através de pontas de raízes obtidas de estacas de ramos plagiotrópicos enraizados. As lâminas do Cacau Comum foram coradas com Giemsa a 2% durante 10 minutos, enquanto as lâminas dos mutantes espontâneos foram coradas com Giemsa a 2% durante 5 minutos ou até que obtivessem coloração adequada para visualização dos cromossomos. O número cromossômico observado foi $2n=20$ para todos os clones, no entanto, o conteúdo de DNA variou consideravelmente entre os indivíduos estudados (Figueiredo, 2008).

No presente trabalho, tanto as pontas de raízes de calos embriogênicos quanto as de raízes de estaquia ou da germinação de sementes foram coradas emorceína 2%, sendo o melhor tempo de visualização de cromossomos de 4h e 30 minutos para todas as raízes.

A Giemsa e a orceína são corantes não fluorescentes utilizados em estudos avançados na citogenética clássica e molecular. O emprego e a escolha dos diferentes corantes é de extrema importância, uma vez que permitem corar regiões distintas das células, bem como diferentes grupos celulares para posterior identificação no microscópio (Brammer, 2015).

A orceína é um corante alimentar natural, com número de registro EE121 (código referente a suplementos alimentícios com uso na União Europeia) e 1400-62-0 no Chemical Abstracts Service (CAS) (Brammer, 2015). Possui propriedades básicas e apresenta-se homocromática, produzindo uma tintura vermelho-violácea e é usado para fixar e colorir os cromossomos, podendo assim estudar seu número, forma e deformidades (Troconís, 2000). Assim, é usada geralmente associada ao ácido acético e, nessa combinação, possui ampla aplicação como contraste em microscopia como base para indicadores químicos e bioquímicos. Essa solução, por apresentar um baixo pH,

torna mais específica a coloração, tendo em vista que os ácidos nucleicos são as biomoléculas com o menor ponto isoelétrico da célula (Coutinho, 2008).

A coloração de Giemsa é comumente usada em citogenética vegetal, mais precisamente na identificação de bandas G (campo claro) para observação de cromossomos em metáfase, possibilitando a análise de repetições e genes não funcionais. O uso de Giemsa no nosso estudo não mostrou efeitos para os clones avaliados.

Com relação à análise cromossômica do material embriogênico, de acordo com Jain (2001) é de extrema relevância os estudos de citogenética do material que se encontra em cultura de tecido, já que essa técnica está relacionada com a quebra do controle do ciclo celular para que a célula possa se desdiferenciar através da ação de fitorreguladores.

As culturas embriogênicas de algumas espécies e/ou genótipos podem ser subcultivadas por um longo período, mantendo o seu potencial embriogênico, porém o cultivo prolongado aumenta a ocorrência de variação somaclonal (Von Arnold et al., 2002). 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, maior a probabilidade de variações (Casarin, 2016).

De acordo com Jain (2001), Bennici et al. (2004), Alan et al. (2007) a composição física e/ou química do meio de cultivo e o genótipo da espécie também influenciam a extensão dessa instabilidade genética. O fato da célula ter que sobreviver e adaptar-se ao meio de cultura pode ocasionar modificações no genoma e alterações fenotípicas na anatomia, fisiologia e metabolismo (Zhang et al., 2009; Phillips et al., 1994). Entre as possíveis variações genéticas e/ou epigenéticas, as alterações de ploidia são as mais comuns em culturas de tecidos (Phillips et al., 1994).

Em relação às técnicas aplicadas na cultura de tecido, a etapa de formação de calo tem maior probabilidade de desenvolvimento de variação somaclonal (Karp, 1994; Bertin & Bouharmont, 1997; Skirvin et al., 2000; Alan et al., 2007; Smýkal et al., 2007), caracterizada por uma variação fenotípica de origem genética, ou seja, uma variação cromossômica que pode se tornar herdável nas gerações seguintes, ou epigenética, que é uma variação transitória devido ao estresse fisiológico que o material sofre quando submetido ao cultivo *in vitro* (Bairu et al., 2011).

O número de cromossomos $2n = 20$ encontrado em raízes embriogênicas foi igual ao das raízes não embriogênicas avaliadas neste trabalho. Esse resultado confirma o número de cromossomos da espécie *Theobroma cacao* L. conforme descrito por Figueiredo (2008) e Pavese & Karsburg (2009).

No nosso estudo, variações relacionadas ao número de cromossomos não foram observadas em raízes embriogênicas que cresceram nas primeiras repicagens do meio ED quando comparadas às raízes obtidas de plantas e de sementes não embriogênicas. Dessa forma, pode-se inferir que o protocolo de embriogênese somática utilizado com o uso de reguladores de crescimento e o processo de transferências do material de meios de cultura não alteraram o número de cromossomos após a indução da divisão celular.

Entretanto, não é possível afirmar que repicagens contínuas não sejam capazes de promover alterações no número de cromossomos, já que as raízes que cresceram mais tardiamente ou que eram repicadas por um tempo maior no meio de cultura apresentaram algumas variações no número de cromossomos.

CONCLUSÕES

Foi possível estabelecer um protocolo para obtenção de cromossomos somáticos dos clones de elite BN34, CEPEC2002 e CCN51 e compará-lo ao das raízes obtidas “*ex vitro*”, oriundas das plantas não embriogênicas cultivadas por estaquia ou enxertia e das raízes originadas da germinação de sementes.

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 apresenta-se como sendo segura para ser utilizada, desde que não ocorra sucessivas repicagens do material quando disploidias foram encontradas.

Dessa forma, é necessário que se aperfeiçoe o protocolo da citogenética a fim de se fazer análises mais aprofundadas, verificando o cariograma e a quantidade de DNA do material embriogênico, já que a embriogênese somática é uma técnica nova e ainda há muito para se descobrir.

AGRADECIMENTOS

Agradeço o apoio das instituições de fomento Fundação de Amparo à Pesquisa - FAPESB, e às instituições que possibilitaram o desenvolvimento da pesquisa.

CONFLITOS DE INTERESSE

O presente trabalho não apresenta conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

- Alan AR, Zeng H, Assani A, Shi WL, McRae HE, Murch SJ, Saxena PK (2007) Assessment of genetic stability of the germplasm lines of medicinal plant *Scutellaria baicalensis* Georgi (Huang-qin) in long-term in vitro maintained cultures. *Plant Cell Reports*, v. 26, pp 1345-1355. <https://doi.org/10.1007/s00299-007-0332-9>.
- Almeida CMVC (2001) Ecologia de populações naturais. In: Dias, LAS. Melhoramento Genético do Cacaueiro. Viçosa, FUNAPE, UFV, pp 129- 162.
- Bairu MW, Adeyemi O, Aremu AO, Staden, JV (2010) Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Plant Growth Regulation*. v.63, pp 147-173. <https://doi.org/10.1007/s10725-010-9554-x>.
- Bennici A, Andizei M, Vendramin GG (2004) Genetic stability and uniformity of *Foeniculum vulgare* Mill. regenerated plants through organogenesis and somatic embryogenesis. *Plant Science*, v. 166, p. 221-227. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2003.09.010>.
- Bertin P, Bouharmont J (1997) Use of somaclonal variation and in vitro selection for chilling tolerance improvement in rice. *Euphytica*, v. 96, p. 135-142. <https://doi.org/10.1023/A:1002926421430>.
- Boutchouang RP, Akitio OFZ, Tchouatcheu AGN, Niemenak N (2016) Influence of the position of flowers buds on the tree on somatic embryogenesis of cocoa (*Theobroma cacao* L.). *International Journal of Plant Physiology and Biochemistry*, 8(2):7-16. <https://doi.org/10.5897/IJPPB2016.0247>.
- Brammer SP, Toniazzo, C, & Poersch, LB (2015) Corantes comumente empregados na citogenética vegetal. **Arquivos do Instituto Biológico**, 82 <https://doi.org/10.1590/1808-1657000192013>.
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2020). Brasil quer ganhar posições na produção mundial de cacau e chocolate. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/brasil-quer-retomar-protagonismo-no-cenario-global-de-cacau-e-chocolate>.
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2018b) Pereira, JM Programa de Pesquisas da Ceplac.
- Casarin T (2016) Propagação in vitro de pinhão-manso. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Pelotas.
- Clarindo WR, Carvalho CR, Araújo FS, Abreu IS, Otoni WC (2008) Recovering polyploid papaya in vitro regenerants as screened by flow cytometry. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 92, p. 207-214. <https://doi.org/10.1007/s11240-007-9325-1>.
- Coutinho AP (2008) Métodos e Técnicas em Citologia e Fisiologia - algumas notas sobre diversas técnicas utilizadas nas aulas teórico-práticas – 4ª parte. Coimbra: Universidade de Coimbra, FCTUC.
- Da Silva RA, Souza G, Lemos LSL, et al. (2017) Genome size, cytogenetic data and transferability of EST-SSRs markers in wild and cultivated species of the genus *Theobroma* L. (Byttnerioideae, Malvaceae). *PLoS ONE*, 12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170799>.
- Figueiredo GFS (2008) Análise cariotípica em *Theobroma cacao* L. em mutantes espontâneo. Dissertação, Universidade Estadual de Santa Cruz.
- Francischini JHMB (2013) Caracterização molecular de variantes somaclonais em cana-de-açúcar, Dissertação, Instituto Agrônômico.
- Freitas EO (2014) Embriogênese somática e análises morfoanatómicas e por citometria de fluxo em açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart.). Dissertação, Universidade de Brasília, DF.
- George EF, Hall MA, Klerk, GJ (2007) Plant Propagation by Tissue Culture. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3>.
- Guerra MDS (1984) New chromosome number in Rutaceae. *Pl Syst Evol* 146, pp 13–30 <https://doi.org/10.1007/BF00984051>.

- Guerra MP, Torres AC, Teixeira JB (1999) Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: Torres, AC, Caldas, LS, Buso, JA (ed) Culturas de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa-CBAB, pp 533-568.
- Guerra M, Souza, MJ (2002) Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. Ribeirão Preto: Ed. FUNPEC.
- Jain SM (2001) Tissue culture-derived variation in crop improvement. *Euphytica*, v. 118, pp 153-166. <https://doi.org/10.1023/A:1004124519479>.
- Jin S, Mushke R, Zhu H, Tu L, Lin Z, Zhang Y, Zhang X (2008) Detection of somaclonal variation of cotton (*Gossypium hirsutum*) using cytogenetics, flow cytometry and molecular markers. *Plant Cell Reports*, v. 27, pp 1303-1316. doi: 10.1007/s00299-008-0557-2.
- Karp A (1994) Origins, causes and uses of variation in plant tissue cultures. In: Plant cell tissue culture. Vasil IK, Thorpe TA (eds.), Ed. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 139-151. https://doi.org/10.1007/978-94-017-2681-8_6.
- Maximova S et al. (2002) Efficiency, genotypic variability, and cellular origin of primary and secondary somatic embryogenesis of *Theobroma cacao* L. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 38:252-259. <https://doi.org/10.1079/IVP2001257>.
- Maximova SN, Young A, Pishak S, Miller, C, Traore A, Gultinan, MJ (2005) Integrated system for propagation of *Theobroma cacao* L. In: Jain S, Mohan G and Pramod K (eds.). Forestry sciences. Protocol for somatic embryogenesis in woody plants. Springer, Dordrecht, The Netherlands, vol. 77. https://doi.org/10.1007/1-4020-2985-3_17.
- Pavese F, Karsburg IV (2009) Caracterização morfométrica dos cromossomos de quatro espécies do gênero *Theobroma* l. Universidade do Estado de Mato Grosso. 2º Jornada Científica da Unemat.
- Pinto G, Silva S, Loureiro J (2011) Acclimatization of secondary somatic approach embryos derived plants of *Eucalyptus globulus* Labill.: an ultrastructural. *Trees*, Santa Monica, v. 25, pp 383-392. <https://doi.org/10.1007/s00468-010-0513-y>.
- Phillips RL, Kaeppler SM, Olhoft P (1994) Genetic instability of plant tissue cultures: Breakdown of normal controls. *Proceedings of the National Academy Science*, v. 91, pp 5222-5226. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.12.5222>.
- Quinga, LAP (2013) 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.
- Rival A, Jaligot E, Beulé T, Tregear JW, Finnegan J (2009) The oil palm "mantled" somaclonal variation: a model for epigenetic studies in higher plants. *Acta Horticulturae*, v. 829, pp 177-182, 2009. DOI [10.17660 / ActaHortic.2009.829.25](https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2009.829.25)
- Schifino-Wittmann MT, Dall'Agnol M (2002) Autoincompatibilidade em plantas. *Ciência Rural*, Santa Maria, RS, v. 32, n. 6, pp 1083-1090. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782002000600027>.
- Scotton, DC (2012) Genômica Funcional da interação do cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.) X *Moniliophthora perniciosa* por meio do sistema modelo Micro-Tom (*Solanum Lycopersicum* L.). Doutorado, Universidade de São Paulo.
- Skirvin RM, Coyner M, Norton MA, Motoike S, Gorvin D (2000) Somaclonal variation: do we know what causes it? *AgBiotechNet*, v. 2, p. 1-4.
- Smykal P, Valledor L, Rodríguez R, Griga M (2007) Assessment of genetic and epigenetic stability in long-term in vitro shoot culture of pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Cell Reports*, v. 26, pp 1985-1998. <https://doi.org/10.1007/s00299-007-0413-9>.

Srisawat T, Kanchanapoom K, Pattanapanyasat K, Srikul S, Chuthammathat W (2005) Flow cytometric analysis of oil palm: A preliminary analysis for cultivars and genomic DNA alteration. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, v. 27, n. 3, pp 645-652.

Souza AGC, Guimarães RR, Nunes, CDM (1992) Melhoramento genético do cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum.). Manaus: EMBRAPA - CPAA. Pesquisa em Andamento, n.12.

Timms RE, Stewart I M (1999) Cocoa butter, a unique vegetable fat. *Lipid Technology Newsletter* v. 5, n. 5, p. 101–107.

Troconís, JGP (2000) El añil: historia de un cultivo olvidado en Venezuela 1767-1870. Doutorado, Universidad Autonoma de Barcelona, Barcelona, 2000.

Von Arnold S, Sabala I, Bozhkov P, Dyachok J, Filonova L (2002) Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 69, pp 233-249. <https://doi.org/10.1023/A:1015673200621>.

Zhang M, Xu C, Yan H, Zhao N, Von Wettstein D, Liu B (2009) 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, pp 666-679. DOI: [10.1111/j.1365-3113.2008.03719.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2008.03719.x).

REFERÊNCIAS

- ACKAR, D. et al. Cocoa Polyphenols: Can We Consider Cocoa and Chocolate as Potential Functional Food? **Journal of Chemistry**. Vol. 2013, Article ID 289392, 7 pages, 2013.
- ALEMANNI, L.; BERTHOULY, M. and MICHAUX-FERRIERE, N. A comparison between *Theobroma cacao* L. zygotic embryogenesis and somatic embryogenesis from floral explants. **Vitro Cell. Dev. Biol.**--Plato 33:163-/72, July-August-September 1997.
- ALMEIDA, D. S. M.; GRAMACHO, K. P.; CARDOSO, T. H. S.; MICHELI, F.; ALVIM, F. C. and PIROVANI, C. P. Cacao Phylloplane: the first battlefield against *Moniliophthora perniciosa*, which causes witches' broom disease. **Phytopathology**, 107, 864–871. 2017.
- ALVERSON, W.S. et al. Phylogeny of the Malvales: evidence from *ndhF* sequence data. **American Journal of Botany**, Lancaster, v. 86, n.10, p. 1474-1486. 1999.
- AMAL, F. M. Zein Eldin; HEMMAT A. Ibrahim. Some biochemical changes and activities of antioxidant enzymes in developing date palm somatic and zygotic embryos in vitro. **Annals of Agricultural Sciences**, 2015.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, p. 373-399, 2004.
- BAILEY, B. A. and MEINHARDT; L.W. Cacao Diseases: A History of Old Enemies and New Encounters. Switzerland: Springer International Publishing, 2016.
- BARTLEY, B. G. D. **The Genetic Diversity of Cacao and its Utilization**. Cambridge, CABI Publishing. 2005. p. 341.
- BISPO, N. B.; GRANDO, M. F.; AUGUSTIN, Lizete and SUZIN, Marilei. Indução de embriogênese somática em diferentes explantes de aveia (*Avena sativa* L.). *Cienc. Rural* [online]. 2007, vol.37, n.3, pp.890-893.
- BLAZQUEZ, S. et al. Somatic embryogenesis in saffron (*Crocus sativus* L.). Histological differentiation and implication of some components of the antioxidant enzymatic system. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 97, p. 49-57, 2009.
- BOUTCHOUANG, R. P., AKITIO, O. F. Z., TCHOUATCHEU, A. G. N., & NIEMENAK, N. Influence of the position of flowers buds on the tree on somatic embryogenesis of cocoa (*Theobroma cacao* L.). **International Journal of Plant Physiology and Biochemistry**, 8(2), 7-16, 2016.

BOUTCHOUANG, R. P., AKITIO, O. F. Z., TCHOUATCHEU, A. G. N., & NIEMENAK, N. Influence of the position of flowers buds on the tree on somatic embryogenesis of cocoa (*Theobroma cacao* L.). **International Journal of Plant Physiology and Biochemistry**, 8(2), 7-16, 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2020). **Brasil quer ganhar posições na produção mundial de cacau e chocolate**. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/brasil-quer-retomar-protagonismo-no-cenario-global-de-cacau-e-chocolate>

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Demanda por chocolates finos estimula investimentos no processo de beneficiamento do cacau**. 2020.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. PEREIRA, J. M. **Programa de Pesquisas da Ceplac – 2018b**.

BRASIL. Ministério Da Indústria, Comércio Exterior e Serviços. LEITE, L. R. C. **Estudo de Competitividade do Cacau e Chocolate no Brasil Desafios para aumentar a Produção e Participação no Comércio Global**. Brasília, dezembro de 2018.

BRAUDEAU, J. L. **Le cacaoyer Paris**. Maisonneuve Larose, p. 299, 1969.

CAOBISCO/ECA/FCC (2015) Cocoa beans: Beg, MS, Ahmad, S., Jan, K. e Bashir, K. (2017) Status, supply chain and processing of Cocoa - a review . *Trends Food Sci. Technol.* 66 , 108-116. World Cocoa Foundation (2014) Cocoa market update. <http://www.worldcocoafoundation.org/wp-content/uploads/Coc>

CARVALHO, J.M.F.C, LIMA, M.M.A, AIRES, P.S.R, VIDAL, M.S, PIMENTEL, N.W. Embriogênese somática, (Documentos 152) – Campina Grande, PB. Embrapa Algodão, p. 35, 2006

CARVALHO, J. M. F. C. Mecanismos antioxidativos associados à embriogênese somática/por Julita Maria Frota Chagas Carvalho, Marina Medeiros de Araújo Silva e Terezinha Rangel Camara. Campina Grande: Embrapa Algodão. 25p. cellular components in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 58, p. 459-481, 2009.

CARVALHO, M. A. N.; ANJOS, A.; PEREIRA, M. F. et al. 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.

CASSANO, C.R., SCHROTH, G., FARIA, D., DELABIE, J.H.C.; BEDE, L. Landscape and farm scale management to enhance biodiversity conservation in the cocoa producing region of

southern Bahia, Brazil. **Biodiversity Conservation**, v. 18, p. 577-603, 2009. doi: 10.1007/s10531-008-9526-x.

CASTRO, P.R.C; KLUGE, R.A., PERES, L.E.P. Hormônios e reguladores vegetais. In: Manual de Fisiologia Vegetal. Editora Agronômica Ceres, Piracicaba, 2005. p. 389-399.

CID, L.P.B. A propagação in vitro de plantas. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, v. 2, n.19, p.16-21, 2001.

CUI, K.; XING, G.; LIU, X.; XING, G.; WANG, Y. Effect of hydrogen peroxide on somatic embryogenesis of *Lycium barbarum* L. **Plant science**, v. 146, p. 9-16, 1999.

DA SILVA, R. A.; SOUZA, G.; LEMOS, L. S. L. et al. Genome size, cytogenetic data and transferability of EST-SSRs markers in wild and cultivated species of the genus *Theobroma* L. (Byttnerioideae, Malvaceae). **PLoS ONE**, 12, e0170799. 2017.

DEL RÍO, L. A. et al. Reactive Oxygen Species and Reactive Nitrogen Species in Peroxisomes. Production, Scavenging, and Role in Cell Signaling. **Plant Physiology**, v. 141, p. 330-335, 2006.

DIAS, L. A. S. Origem e dispersão de *Theobroma cacao* L: novo cenário. In: DIAS, L. A. S. **Melhoramento genético do cacauêiro**. FUNAPE, UFV, 2001. p. 81-127.

DIAS, L.A.S.; KAGEYAMA, P.Y. Multivariate genetic divergence and hybrid performance of cacao (*Theobroma cacao* L.). **Brazilian Journal of Genetics**, 20: 63-70, 1997.

DONATO, V. M. T. S.; ANDRADE, A. G.; CABRAL, J. B.; ALVES, G. D. Embriogênese somática in vitro em couve-comum. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n.4, p.711-718, 2000.

DUDITS, D. et al. Molecular and cellular approaches to the analysis of plant embryo development from somatic cells in vitro. **J Cell Sci**, 99:473-482, 1991.

DUDITS, D. et al. Molecular biology of somatic embryogenesis. In: THORPE, T. A. (ed) **In vitro embryogenesis in plants**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p. 267-308, 1995.

EFRAIM, P.; ALVES, A.B.; JARDIM, D.C.P. Review: Polyphenols in cocoa and derivatives: factors of variation and health effects. *Braz. J. Food Technol.*, v. 14, n. 3, p. 181-201. 2011.

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, 2003.

FIGUEIRA, A.; JANICK, J.; GOLDSBROUGH, P. Genome size and DNA polymorphism in *Theobroma cacao*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, 117: 673 – 677, 1992.

FIGUEIREDO G. S. F. Análise Cariotípica em cacauero (*Theobroma cacao* L.) e em mutantes espontâneos. Ilhéus, UESC, XX p., 2008.

FLOREZ, S. L., ERWIN, R. L., MAXIMOVA, S. N. et al. Enhanced somatic embryogenesis in *Theobroma cacao* using the homologous BABY BOOM transcription factor. **BMC. Plant Biol**, 15, 121 (2015). <https://doi.org/10.1186/s12870-015-0479-4>.

GAJ, M.D. Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Growth Regulat.* v.43, p. 27–47, 2004.

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 Rep**, v. 23, p. 181-187, 2004.

GARCIA, C. et al. Optimization of somatic embryogenesis procedure for commercial clones of *Theobroma cacao* L. **African Journal of Biotechnology**. 15, 1936-1951, 2016.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G-J. *Plant Propagation by Tissue Culture* || . , 10.1007/978-1-4020-5005-3(), -. doi:10.1007/978-1-4020-5005-3, 2007.

GUILTINAN, M. J., VERICA, J., ZHANG, D. and FIGUEIRA, A. Genomics of *Theobroma cacao*, “the Food of the Gods”. In: (MOORE, P.H.; MING, R. (eds.) **Genomics of Tropical Crop Plants**, p. 145–170. Heidelberg: Springer, 2008.

HANSEN, D. D. S. **CULTURA DO CACAU. Origem e Distribuição Geográfica.** Universidade Estadual de Santa Cruz – Uesc. Departamento De Ciências Da Educação – DCIE/ Departamento De Ciências Exatas e Tecnológicas – DCET. Pro Reitoria De Extensão – Proex / Gerência De Extensão – Gerex Rod Jorge Amado Km 16 Salobrinho – Ilhéus –Ba.

ICCO (2019). **ICCO Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics**, Vol. XLVI, No. 3, Cocoa year 2019/2020.

JARITEH, M. et al. Antioxidant enzymes activities during secondary somatic embryogenesis in Persian walnut (*Juglans regia* L.). **African Journal of Biotechnology**. Vol. 10(20), p. 4093-4099, 16 May, 2011.

KAIRONG C, Ji L, GENGMEI X, JIANLONG L, LIHONG W, YAFU W. Effect of hydrogen peroxide on synthesis of proteins during somatic embryogenesis in *Lycium barbarum*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 68:187–193, 2002.

KARAMI, O., DELJOU, A., KORDESTANI, G. K. Secondary somatic embryogenesis of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Plant Cell Tissue Organ Cult*. 2008;92(3):273-280. Doi: 10.1007/s11240-007-9332-2.

KOMAMINE, A. et al. Mechanisms of somatic embryogenesis in cell cultures: physiology, biochemistry, and molecular biology. In *In Vitro Cellular and Development Biology* – **Plant**, v.28, n.1, p.11-14, 1991.

KONIECZNY, R. et al. Oxidative events during in vitro regeneration of sunflower. **Acta physiol plant**, v. 30, p. 71-79, 2008.

KONIECZNY, R. et al. Morphohistological and flow cytometric analyses of somatic embryogenesis in *Trifolium nigrescens* Viv. **Plant Cell Tissue Organ Cult.** 109:131-141, 2012.

LALIBERTE, B.; END, M. **Supplying New Cocoa Planting Material to Farmers: A Review of Propagation Methodologies.** Rome, Italy: Bioversity International.

LI, Z.; TRAORE, A.; MAXIMOVA, S.; GUILTINAN, M. J. Somatic and plant regeneration from floral explants of cacao (*Theobroma cacao* L.) using thidiazuron in vitro Cell. **Dev. Biol. Plant.** 34:293-299, 1998.

LIBIK, M. et al. Differences in the activities of some antioxidant enzymes and in H₂O₂ content during rhizogenesis and somatic embryogenesis in callus cultures of the ice plant. **Plant Cell Rep.**, v. 23, p. 834-841, 2005.

MAXIMOVA, S. et al. Efficiency, genotypic variability, and cellular origin of primary and secondary somatic embryogenesis of *Theobroma cacao* L. In *In Vitro Cell.* **Dev. Biol. Plant.** 38:252-259, 2002.

MESNARD, F.; AZAROUAL; N., MARTY, D.; et al. Use of 15N reverse gradient two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy to follow metabolic activity in *Nicotiana plumbaginifolia* cellsuspension cultures. **Planta**, 210:446–453, 2000.

MINYAKA, E.; NIEMENAK, N.; FOTSO; SANGARÉ, A.; OMOKOLO, N. D. Effect of MgSO₄ and K₂SO₄ on somatic embryo differentiation in *Theobroma cacao* L. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 94, n. 2, p. 149-160, 2008.

MINYAKA, E.; NIEMENAK, N.; NGANGUE, L. T. A. et al. Atividades de peroxidase e polifenol oxidase associadas ao potencial de embriogênese somática em um genótipo híbrido de elite de *Theobroma cacao* L. **African Journal of Biotechnology**, 16 (49), 2278-2288, 2017.

MØLLER, I. M.; JENSEN, P. E.; HANSSON, A. Oxidative modifications to Oxidative Modifications to Cellular Components in Plants. **Annual Review of Plant Biology**. Vol. 58:459-481, 2007.

MORAES, J. N. Análise comparativa da embriogênese somática em *Citrus sinensis*, var. valência, e *Citrus limonia*, var. limão cravo. Piracicaba, São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. 77 p. 2003.

NAMASIVAYAM, P. Acquisition of embryogenic competence during somatic embryogenesis. **Plant cell, tissue and organ culture**, v. 90, p. 1-8, 2007.

OBERT, B. et al. Moderation of morphogenetic and oxidative stress responses in flax in vitro cultures by hydroxynonenal and desferrioxamine. **Journal of Plant Physiology**, v. 162, p. 537-547, 2005.

PEREIRA, A. R.; CARVALHO, S. P.; PASQUAL, M.; SANTOS, F. C. Embriogênese somática direta em explantes foliares de *Coffea arabica* L. cv. acaiá cerrado: efeito de citocinina e ácido giberélico. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v.31, n.2, p.332-336, 2007.

PINTO, G. et al. Genetic control of somatic embryogenesis in *Eucalyptus globulus* Labill. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 27, p. 1093–1101, 2008.

PINTO, G.; SILVA, S.; LOUREIRO, J. Acclimatization of secondary somatic approach embryos derived plants of *Eucalyptus globulus* Labill.: an ultrastructural. **Trees**, Santa Monica, v. 25, p. 383–392. 2011.

PREIL, W. General introduction: a personal reflection on the use of liquid media for in vitro culture. In: HVOSLEF-EIDE, A. K.; PREIL, W. (eds). **Liquid culture systems for in vitro plant propagation**. Springer, Berlin, p. 1–18, 2005.

QUINGA, L. A. P. 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. et al. Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, 86:285–301, 2006.

RIVAL, A.; JALIGOT, E.; BEULÉ, T.; TREGGAR, J. W.; FINNEGAN, J. The oil palm "mantled" somaclonal variation: a model for epigenetic studies in higher plants. **Acta**

Horticulturae, v. 829, p. 177-182, 2009.

RODRÍGUEZ LÓPEZ, C. M.; WETTEN, A. C.; WILKINSON, M. J. Progressive erosion of genetic and epigenetic variation in callus derived cocoa (*Theobroma cacao*) plants. **New Phytologist**, v. 186, p. 856-868, 2010.

ROYA KELISHADI, M. D. Cacao to cocoa to chocolate: healthy food? **ARYA Journal** (Spring); Volume 1, Issue 1, 2005.

SANTOS, A. M.; SANTOS, G. B. M. Cacau fino no Brasil: conceitos e evolução. **Revista de Difusão Agropecuária**, CEPLAC- Bahia, vol 4, n. 1, p 1-18, 2012.

SANTOS, E. S. L. Diversidade genético-molecular de cacauzeiros descendentes das primeiras introduções ocorridas na Bahia. 2014. **Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular)** - Universidade Estadual de Campinas.

SCHIFINO-WITTMANN, M. T.; DALL'AGNOL, M. Autoincompatibilidade em plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, RS, v. 32, n.6, p. 1083-1090, 2002.

SCOTTON, D. C. Genômica funcional da interação cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.) x. *Moniliophthora perniciosa* por meio do sistema modelo Micro-Tom (*Solanum lycopersicum* L). 2012. 147 f.– Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

SILVA, et al. Redescrição da sintomatologia causada por *Crinipellis perniciosa* em cacauzeiro. **Agrotropica**, 14, 1–28, 2002.

SOKOLOV, A. N. et al. Chocolate and the brain: Neurobiological impact of cocoa flavanols on cognition and behavior. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, xxx, 2013.

SONDAHL, M. R.; LIU, S.; BELLATO, C. Cacao somatic embryogenesis. **Acta Hort.** 336:245-248, 1993.

SRISAWAT, T.; KANCHANAPOOM, K.; PATTANAPANYASAT, K.; SRIKUL, S.; CHUTHAMMATHAT, W. Flow cytometric analysis of oil palm: A preliminary analysis for cultivars and genomic DNA alteration. **Songklanakarinn Journal of Science and Technology**, v. 27, n. 3, p. 645-652, 2005.

TEIXEIRA, J. B. Otimização da metodologia de embriogênese somática visando a propagação clonal de genótipos elite de cacau (*Theobroma cacao* L.). João Batista Tavares, Phellippe Arthur Santos Marbach, Marcelo Oliveira Santos. - Brasília: **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, xx p. - (Documentos / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ISSN 0102-0110; n. 79, 2002.

TEIXEIRA, J. B.; MARBACH, P. A. S.; SANTOS, M. O. Otimização da metodologia de embriogênese somática visando a propagação clonal de genótipos de elite de cacau (*Theobroma cacao* L.). **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento** - nº 29. 2003

THE ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP, An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III, Botanical Journal of the Linnean Society, Volume 161, Issue 2, October 2009, Pages 105–121, <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2009.00996.x>

THOMAS E. et al. Present Spatial Diversity Patterns of *Theobroma cacao* L. in the Neotropics Reflect Genetic Differentiation in Pleistocene Refugia Followed by Human-Influenced Dispersal. **PLoS One** 7: e 47676. doi: 10.1371/journal.pone.0047676.

TIMMS, R. E.; STEWART, I. M. Cocoa butter, a unique vegetable fat. **Lipid Technology Newsletter** v. 5, n. 5, p. 101–107, 1999.

TRAORE, A., MAXIMOVA, S., GUILTINAN, M. Micropropagation of *Theobroma cacao* using somatic embryo-derived plants. *In Vitro Cell. Dev Biol Plant*, 39:332–337, 2003.

UZELAC, B., NINKOVIĆ, S., SMIGOCKI A., BUDIMIR S. Origin and development of secondary somatic embryos in transformed embryogenic cultures of *Medicago sativa*. **Biol Plant** 2007;51(1):1-6. Doi: 10.1007/s10535-007-0001-4.

WICKRAMASURIYA, A.; DUNWELL, J. Cacao biotechnology: Current status and future prospects. **Planta Biotechnol J**. Janeiro de 2018; 16 (1): 4–17.

XAVIER, A.; WENDLING, L.; SILVA, R. L. **Sivicultura clonal: princípios e técnicas**. Viçosa, MG: Ed. UFV 272 p.

YANG, J. Y.; SCASCITELLI, M.; MOTILAL, L. A.; et al. Complex origin of Trinitario-type *Theobroma cacao* (Malvaceae) from Trinidad and Tobago revealed using plastid genomics. **Tree Genetics & Genomes**, 9: 829–840. 2013.

ZHANG D.; MOTILAL. L. Origin, dispersal, and current global distribution of cacao genetic diversity. BAILEY, B.A., MEINHARDT, L.W. (Eds.), **Cacao Diseases**, Springer, Switzerland (2016), p. 3-31, 10.1007/978-3-319-24789-2_1.

ZIMMERMANN, M. J. (2010). Embriogênese somática. In: CID, L. P. B. Cultivo *in vitro* de plantas. **Embrapa Informação Tecnológica**, Brasília. p. 67-101, 2010.

ANEXOS

Normas da Revista: In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant
Artigo 2

Instructions for Authors IVP

In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant (IVP) publishes peer-reviewed original research and reviews concerned with the latest developments and state-of-the-art research in plant cell and tissue culture and biotechnology from around the globe.

Established in 1965, IVP combines the official journals of the Society for In Vitro Biology's Plant Section (SIVB) and the International Association for Plant Biotechnology (IAPB).

There are six issues per year, containing highly relevant, original research.

Four issues - published on behalf of the SIVB cover cellular, molecular and developmental biology research using in vitro grown or maintained organs, tissues or cells derived from plants. These follow the matrix categories given below.

Two special issues - published on behalf of the IAPB (numbers 2 and 5, published March/April and September/October) include original manuscripts, feature and review articles, and IAPB official notifications. The IAPB maintains a completely separate and independent international editorial review board for these two issues, which are not divided into the matrix categories listed below. Specifically, IAPB issues are focused on publishing high impact innovative research dealing with plant tissue culture and molecular and cellular aspects of plant improvement, which employ state-of-the-art tools of plant biotechnology to demonstrate an applied application of the research. All articles are peer reviewed and must follow the format for regular original articles. Brief articles will be considered, using the same format as regular articles. Taking into consideration the number of submissions received, it is imperative that the novelty of the contribution is clearly emphasized. Articles must have significant original content including:

- Appropriate experimental design and data analysis procedures
- Understanding of a scientific problem
- Identification of gene(s), physiology or biochemistry with measurable and quantifiable impact on agriculture or the environment
- Broad applicability of knowledge to multiple species and environments

When submitting a manuscript for consideration by the SIVB editorial review board, authors should select the matrix heading below which best covers the scope of their manuscript.

Matrix Areas and Criteria for Consideration:

1. **Invited Reviews and Feature Articles** - Review and feature articles of current interest that advance our understanding of recent research on focused topics are invited by the Invited Reviews Editor in consultation with the Editors-in-Chief. Authors may submit topics with brief outlines to the Invited Reviews Editor for consideration. Criteria: *By editorial invitation or pre-approval.*
2. **Symposium and Workshop Proceedings** - Papers presented at the annual SIVB Congresses, and to other professional conferences, are encouraged to be written and submitted as Symposium or Workshop Proceedings for peer review. Collections of several papers from the same symposium or

conference are encouraged, but individual proceedings articles are also welcomed. Criteria: *Must satisfy criteria of appropriate matrix subject area below.*

3. **Biotechnology/Genetic Transformation/Functional Genomics** - Transformation methods showing recovery of confirmed transgenic plants; transgene expression/regulation; plant expression vectors; promoter/enhancer/terminator effects; transgene product structure-function; transgene combinations; field evaluation; bioinformatics. Criteria: *Significant advance in conceptual knowledge and/or technological efficiency; molecular evidence of independent transformation events (Southern analysis using restriction enzyme that cuts once within the transferred DNA region for primary transformants; PCR analysis plus phenotype analysis for progeny generations; or insertional flanking sequence information); characterization of transgene expression levels (using Real Time PCR or other appropriate technology) and/or characterization of transgene product or functionality; recovery of whole plants.*
4. **Cell Biology** - Cell cycle; cytodifferentiation and cytoskeleton; cell-cell interactions/signaling; protein targeting; organelles; structure-function relationships. Criteria: *Significant advance in conceptual knowledge; molecular characterization of system.*
5. **Medicinal Plants** - *in vitro* cell or organ culture methods, including micropropagation, where secondary products of medicinal value are discovered and/or produced *in vitro*, including from regenerated plants. The scope of Medicinal Plants will comprise both non-transgenic and transgenic *in vitro* systems which produce metabolites of medicinal significance (Transgenic medicinal plants must also follow the requirements listed in the Biotechnology/Genetic Transformation/Functional Genomics matrix). The Medicinal Plants matrix will also include *in vitro* culture to increase numbers of endangered species with secondary products comprising various medicinal compositions. Invited reviews with a medicinal plant focus will be included in this matrix.
6. **Developmental Biology/Morphogenesis** - Embryogenesis/embryogeny; gametogenesis/androgenesis; organogenesis; floral differentiation/development. Criteria: *Significant advance in conceptual knowledge and/or technological efficiency applicable to multiple genotypes; recovery and characterization of whole plants and/or progeny; histological evidence of novel developmental pathway(s). Manuscripts will NOT be accepted that report on technical improvements on a specific variety/species where previous information is available, or on formation of shoots/roots without indicating the efficiency of recovery of transplantable plants.*
7. **Micropropagation** - Automation; bioreactors; contamination control; disease indexing; scale-up; novel applications of technology; commercial production; cryogenic storage.

Criteria: Significant advance in conceptual knowledge and/or technological efficiency; recovery and characterization of whole plants; detailed molecular characterization of genetic fidelity; demonstrated application for ex situ conservation and/or restoration of endangered species when the efficiency of recovery of transplantable plants, or demonstration of no somaclonal variation through limited molecular analysis is indicated. Manuscripts will be accepted that report on technical improvements on a specific variety/species where a finished and tested protocol for culturing using common techniques of modifying growth regulator ratios and concentrations but where additional data on performance or molecular characterization of regenerants or chemical composition of regenerants is lacking **ONLY** as a short communication. The short communication format is similar to that for Articles and Reviews described above, except that the body of the text is not divided into sections or subheadings with introduction, methods results and discussion integrated into a single text.

8. **Molecular Farming/Metabolic Engineering/Secondary Metabolism** - Transgenic production of recombinant proteins and pharmaceuticals such as antibodies, edible vaccines, industrial enzymes, etc.; biotransformation; metabolic flux; bioactive/medicinal compounds; bioreactors; scale-up. Criteria: Significant advance in production efficiency for targeted metabolites; analytical characterization of intermediates, products, enzymatic activities, and/or demonstration of biological efficacy; molecular evidence of transformation when applicable.
9. **Physiology** - Plant growth regulators; primary metabolism; regulatory processes; biochemical and signal transduction pathways. Criteria: Significant advance in conceptual knowledge; appropriate molecular, biophysical and/or biochemical characterization of system.
10. **Somatic Cell Genetics** - Somaclonal variation; epigenetics; mutagenesis; somatic hybridization; haploidization; T-DNA/transposon tagging; homologous recombination. Criteria: Significant advance in conceptual knowledge and/or technological efficiency; molecular characterization of somatic hybrids, haploids, or heritability of mutation(s).

MANUSCRIPT SUBMISSION REQUIREMENTS Professional Code of Conduct

Publication Ethics: The journals *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* (both SIVB and IAPB) subscribe to the editorial standards and guidelines for editors and authors of COPE (Committee on Publication Ethics). A detailed explanation of our ethical standards can be found at <http://publicationethics.org/resources/code-conduct>. These guidelines include a code of conduct and best practice guidelines for journal editors. All authors submitting articles to this journal are expected to comply with these standards. Reviewers and Editors will use the best practice guidelines for reviewing, evaluation and editing processes of manuscripts submitted to the journal. As a result of these guidelines the journal uses originality checking

software as a tool to help identify plagiarized work. No manuscript with plagiarized verbiage will be accepted. Plagiarism refers to the inappropriate use of images or passages of text that have previously been published by the submitting authors (self-plagiarism) or by other authors that may or may not be referenced.

CHANGES TO AUTHORS

Author changes are not allowed after submission. Authors can be added at resubmission only when additional experiments are requested. No author changes are allowed after acceptance.

ETHICAL COMPLIANCE

Conflict of Interest (COI) forms with submission: As part of the submission process you must upload a completed and signed ICMJE disclosure form for each author. Manuscripts submitted without all forms will be returned for corrections. Blank ICMJE forms are available for download at <http://www.icmje.org/>.

Disclosures: Disclosures are required for each author to be included within the manuscript text. Each statement must include the author's name and declare the conflict of interest, or "no conflict of interest". All potential benefits in any form from a commercial party related directly or indirectly to the subject of the manuscript or any of the authors must be acknowledged. For each source of funds, both the funding organization (written in full) and the grant number should be given. Please note that the manuscript will be returned to the corresponding author if the disclosure statement for each author is not included in the manuscript text. Details provided in the disclosure statement must correspond with the information provided in the COI forms uploaded during submission.

CONSENSUS STATEMENT ON SUBMISSION AND PUBLICATION OF MANUSCRIPTS

Duplicate Submission and Publication: In general, if a manuscript has been peer-reviewed and published, any subsequent publication is a duplication. Exceptions to this general rule may be:

- a) Prior publication in meeting program abstract booklets or expanded abstracts such as those published by *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*. However, these must be referenced in the final manuscript.
- b) A manuscript which analyzes an original published database in a different way in order to prove or disprove a different hypothesis. Previous manuscripts reporting the original database must, however, be referenced.
- c) Manuscripts which have been published originally in non-English language journals provided that the prior publication is clearly indicated on the English language submission and referenced in the manuscript. In some circumstances, permission to publish may need to be obtained from the non-English language journal.
- d) Manuscripts derived from published Masters or Doctoral theses.

For example, any submission duplicating material previously published in full in "Proceedings" or book chapters is considered duplicate unless the exceptions in (a) above apply. Similarly, manuscripts dealing with subgroups of data (i.e., patients) that have previously been analyzed, discussed and published as a larger group are considered duplicate unless (b) above applies.

The Internet raises special concerns. If data have previously appeared on the Internet, submission of those data for publication is considered duplication. If Internet publication follows journal publication, the journal publication should be clearly referenced. Some journals may provide early Internet publication of accepted peer reviewed papers which are subsequently published in that journal. This does not constitute duplication if both manuscripts are identical and covered by the same single copyright.

Fraudulent Publication

The following activities are examples of fraudulent publication practices:

- + Willful and knowing submissions of false data for publication.
- + Submission of data from sources not the author's (or authors') own.
- + Falsely certifying that the submitted work is original and has not been submitted to, or accepted by, another journal.
- + Sponsoring or vouching for a manuscript containing data over which the sponsor has no control or knowledge.
- + Allowing one's name to appear as an author without having contributed significantly to the study.
- + Adding an author's name to a manuscript to which he/she has not contributed, or reviewed or agreed to in its current form.
- + Flagrant omission of reference to the work of other investigators which established their priority.
- + Falsification of any item on the copyright form.
- + Failure to disclose potential conflict of interest with a sponsoring agency.

While not intended as an all-inclusive document, these examples and guidelines should alert authors to potential problems that should be avoided when they are considering submission of a manuscript to a peer-reviewed journal.

A. Authorship Criteria

Individuals claiming authorship should meet all of the following 3 conditions:

- 1) Authors make large contributions to conception and design, and/or acquisition of data, and/or analysis and interpretation of data;
- 2) Authors participate in drafting the article or revising it critically for important intellectual content;
- 3) Authors give final approval of the version to be submitted and any revised version to be published.

Each author should have participated sufficiently in the work to take public responsibility for appropriate portions of the content. Allowing one's name to appear as an author without having contributed significantly to the study or adding the name of an individual who has not contributed or who has not agreed to the work in its current form is considered a breach of appropriate authorship.

An author is not an individual who allowed their experience to be included, or a person who provided purely technical help, writing assistance, funding acquisition, data collection, general group supervision, or a department Chair who provided only general guidance.

B. Order of Authors

The order of authorship on the byline should be a joint decision of the co-authors.

C. Contributors Listed in Acknowledgments

All contributors who do not meet the criteria for authorship should be listed in an acknowledgments section. Groups of persons who have contributed materially to the paper but whose contributions do not justify authorship may be listed under a heading such as "participating investigators," and their function or contribution should be described - for example, "served as scientific advisors," "critically reviewed the study proposal," "collected data." Because readers may infer their endorsement of the data and conclusions, all persons listed as contributors must give written permission to be acknowledged.

D. In Conclusion

This consensus statement is intended as the minimal criteria authors must adhere to. In the interest of promoting the highest ethics, all authors must adhere to these criteria when submitting a manuscript to a peer-reviewed journal.

ONLINE SUBMISSION

Authors must submit their articles to In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant online. A wide range of submission file formats is supported, including: Word, RTF, TIFF, GIF, JPEG, EPS, Excel and PowerPoint. PDF is NOT an acceptable file format for submission. During the submission process authors will be given the option between submitting their manuscript for publication in the regular In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant issues or in the special two IAPB issues. The manuscripts will then be assigned to the respective Editor in Chief.

Editor in Chief, SIVB issues:

David D. Songstad, Ph. D.
Songstad Consulting
San Marcos, CA
davidsonstad@aol.com

Editor in Chief, IAPB issues:

Yong Eui Choi
Kangwon National University
Division of Forest Science
College of Forest and Environmental Sciences
Chuncheon, Republic of Korea
yechoi@kangwon.ac.kr

SUBMIT ONLINE

(<http://www.editorialmanager.com/ivopl/>)

Please submit papers on animal-related materials to:
(<http://www.editorialmanager.com/ivan/default.aspx>)

MANUSCRIPT PREPARATION

Manuscripts are to be submitted in their final form. Papers must be written in English, and authors are strongly encouraged to aim for clarity, brevity, and accuracy of information and language. Authors whose first language is not English should have their papers checked for linguistic accuracy by a native English speaker. The Editors in Chief may be contacted for recommendations on a scientific editing service, if the English presentation is not to the journal standards but it is the responsibility of the corresponding author to ensure that their submission is to the highest standard. Failure to do so can lead to rejection by the Editors in Chief.

Submitted manuscripts should conform to the following format and sequence. The Reviews format is similar to that for articles described below, except that the body of the text may substitute major topic headings for Materials

and Methods, Result, and Discussion. In Reviews, the Methods are integrated into the text or legend to figures and Results and Discussion are combined. Type double-spaced, and order the elements comprising the manuscript as follows:

- Title Page
- Abstract
- Key Words
- Introduction
- Materials and Methods
- Results
- Discussion (may be combined with Results)
- Conclusions
- Appendix (if any)
- Acknowledgements
- References
- Tables
- Figure Legends
- Figures

TITLE PAGE: The title page should include

- the title of the article
- author(s)' name(s) and affiliation(s) (the department and institution from which the work originated)
- complete contact information for the one corresponding author including mailing and email address. More than one corresponding author will not be accepted.
- suggested running head (not to exceed 40 characters, including spaces) Note that the affiliation should be a footnote to the author's name.

ABSTRACT: An abstract is to be provided, preferably no longer than 250 words. Do not use abbreviations, footnotes, or references in the abstract. **NOTE:** there is no abbreviation section in submissions. Abbreviations are identified on their first use in the main text of the article.

KEY WORDS: A list of 4–5 key words is to be provided directly below the abstract. Key words should express the precise content of the manuscript, as they are used for indexing purposes.

INTRODUCTION: The introduction provides a brief review of relevant literature and contains embedded justification for the research. The introduction usually ends with a brief and general overview of key results.

MATERIALS AND METHODS: Materials and Methods should provide sufficient detail so that procedures are well understood and can be repeated. Any initial reference to equipment, kits, reagents, lights, etc must be followed by the manufacturer or supplier, city of origin, state (if in the USA) and country of origin.

RESULTS AND DISCUSSION: The Results and Discussion sections may be combined or kept separate.

ACKNOWLEDGMENTS: All acknowledgments, including those for grant, financial support, and potential conflicts of interest should be included in one separate paragraph that directly precedes the references section.

REFERENCES

The list of original references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications should only be mentioned in the text.

In the text, references should be cited by author and year (e.g. Jordan 2000; Jordan and Somers 2006; Jordan et al. 2007) and listed in alphabetical order in the reference list.

JOURNAL ARTICLES:

Name(s) and initial(s) of all authors; year; title of article; Journal title; volume number; page numbers.

Example: Abdel-Rahman MM, Widholm JM (2010) Maize tissue culture plant regeneration ability can be improved by polyethylene glycol treatment. *In Vitro Cell Dev Biol - Plant* 46:509–515

SINGLE CONTRIBUTIONS IN A BOOK:

Name(s) and initial(s) of all authors; year; title of article; editor(s); title of book; edition; volume number; publisher; place of publication; page numbers.

Example: Klein TM (2011) Particle bombardment: An established weapon in the arsenal of plant biotechnologists. In: Stewart CN, Touraev A, Citovsky V, Tzfira T (eds) *Plant transformation technologies*, Wiley-Blackwell, Ames West Sussex Oxford, pp 53–71

BOOK:

Name and initial(s) of all authors; year; title; publisher; place of publication.

Example: Wang K (2006) *Methods in Molecular Biology: Agrobacterium Protocols*, vol 1. Humana Press, Totowa New Jersey

AGENCY PUBLICATION:

Council of science editors (CSE) style guide. 7th ed. Reston, VA: Council of Science Editors; 2006.

WEB PAGES:

Article by DOI (with page numbers): Nguyen KT, Arsenault PR, Weathers PJ (2011) Trichomes + roots + ROS = artemisinin: regulating artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. *In Vitro Cell Dev Biol - Plant* 47:329-338. doi: 10.1007/s11627-011-9343-x

Article by DOI (before issue publication with page numbers): Nguyen KT, Arsenault PR, Weathers PJ (2011) Trichomes + roots + ROS = artemisinin: regulating artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. *In Vitro Cell Dev Biol - Plant* (in press). doi: 10.1007/s11627-011-9343-x

Article in electronic journal by DOI (no paginated version): Nguyen KT, Arsenault PR, Weathers PJ (2011) Trichomes + roots + ROS = artemisinin: regulating artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. *In Vitro Cell Dev Biol - Plant*. doi: 10.1007/s11627-011-9343-x

Online document: Doe J (2010) Title of subordinate document. In: The dictionary of substances and their effects. Royal Society of Chemistry. Available via DIALOG. [http://www.rsc.org/dose/title of subordinate document](http://www.rsc.org/dose/title%20of%20subordinate%20document). Cited 15 Jan 2010

Online database: Healthwise Knowledgebase (2011) US Pharmacopela, Rockville. <http://www.healthwise.org>. Cited 21 July 2011

Supplementary material/private homepage: Doe J (2010) Title of supplementary material. <http://www.privatehomepage.com>. Cited 22 Feb 2010 University site: Doe J (2008) Title of preprint. <http://www.uni-heidelberg.de/mydata.html>. Cited 25 Dec 2008

FTP site Doe J (2010) Trivial HTTP, RFC2169. <ftp://ftp.isi.edu/in-notes/rfc2169.txt>. Cited 12 Nov 2010

Organization site: ISSN International Centre (2006) Global ISSN database. <http://www.issn.org>. Cited 20 Feb 2007

NOMENCLATURE

The recommendations of the Society for In Vitro Biology Committee on Terminology should be followed. Schaeffer WJ (1990) Terminology associated with cell, tissue and organ culture, molecular biology and molecular genetics. *In Vitro Cell Dev Biol* 26:97–101.

TABLES AND FIGURES

TABLES: Each table should be numbered consecutively with Arabic numerals. Footnotes to tables should be indicated by lower-case superscript letters. If you use data from another published or unpublished source, obtain permission and acknowledge fully.

LEGENDS: Legends must be brief, self-sufficient explanations of the figures and tables in no more than four or five lines. Remarks such as "For explanation, see text" should be avoided. The figure legends should be typed double-spaced and grouped together on a separate page. When symbols, arrows, numbers or letters are used to identify parts of the illustration, identify and explain each one clearly.

FIGURES: Figures should be limited to those essential for the text. Results should not be duplicated by presentation of the same results in both a graph and table. Color is free in both online and printed versions of the journal. There are no publication charges for publishing in IVP, unless the author chooses to publish his/her paper Open Access (Open Choice). More information on Open Choice can be found on the journal homepage (<http://www.springer.com/life+sciences/plant+sciences/journal/11627>).

ALL FIGURES, whether photographs, graphs, or diagrams, should be numbered consecutively. If figures are created electronically, please see Guidelines for Electronically Produced Figures for Print. Line drawings should be supplied as clear black and white drawings suitable for reproduction. All lines should be of uniform thickness. Letters and numbers should be of professional quality and proper dimensions. All figures submitted should allow for high quality reproduction at a same size permitting direct printing (with no reduction), usually 12.7 by 17.3 cm (5 by 7 inches) but no larger than 20.3 by 25.4 cm (8 by 10 inches). The publisher reserves the right to reduce figures. Micrographs should have an internal magnification marker; the marker size should be stated in the figure legend. If photographs of persons are used, either the subjects must not be identifiable or their pictures must be accompanied by written permission to use the photograph.

Guidelines for Electronically Produced Illustrations for Print

GENERAL

- Send figures separately from the text (i.e. files should not be integrated with text files).

VECTOR (line) GRAPHICS

- Vector graphics exported from a drawing program should be stored in EPS format. High quality Excel files are also acceptable.
- Suitable drawing program: Adobe Illustrator. For simple line art the following drawing programs are also acceptable: PowerPoint, Corel Draw, Freehand, Canvas.

- No rules narrower than 0.25 pt.
- No gray screens paler than 15% or darker than 50%.
- Screens meant to be differentiated from one another must differ by at least 15%.

HALFTONE FIGURES

- Black & white and color figures should be saved in JPG, TIFF or EPS formats.
- Figures should be created using Adobe Photoshop whenever possible.

GRAPHICS FROM VIDEOS

- Separate files should be prepared for the frames from a video that are to be printed in the journal. When preparing these files you should follow the same rules as listed under Halftone Figures.

MULTIMEDIA ARTICLE AND DYNAMIC MANUSCRIPT SUBMISSION REQUIREMENTS (I.E. STREAMING VIDEOS)

Multimedia articles are papers where the heart of the article is the video and, generally, only an abstract and references are included. Dynamic articles are regular articles with video(s) included as electronic supplementary material.

Upon submission of multimedia or dynamic articles, the author(s) will be required to submit the video in the following format:

- For multimedia articles, video clips should not exceed 9 minutes. For dynamic articles, video clips should not exceed 3 minutes and each manuscript should not contain more than 3 video clips.
- Multimedia file for review and submission: MPEG-1 file with the largest frame size (usually 320 x 240 pixels) that will fit on a CD and will be playable on a Windows-based computer.
- The content of these files must be identical to that reviewed and accepted by the editors of the *In Vitro Plant and Animal Journals*.
- All narration should be in English.
- There should be a "manuscript" submitted with the video that includes a title page, abstract and key words, as well as references if needed.

DYNAMIC MANUSCRIPT

A dynamic manuscript is a print article with imbedded video material. Up to 3 (one minute maximum each) videos per manuscript submission will be accepted. Make sure to note in your manuscript the placement of the video clips. All standard instructions for manuscript and video submission should be followed for a dynamic manuscript submission.

SPRINGER OPEN CHOICE

In addition to the traditional publication process, Springer provides Springer Open Choice, which is Springer's open access model. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular article, but in addition is made freely available through Springer's online platform SpringerLink. If you wish to publish via

Springer Open Choice, you will have the opportunity to make this request after your paper enters production. At such time an e-mail will be sent to authors asking them to select an option for Springer Open Choice.

COPYRIGHT

To maintain and protect the Society's ownership and rights and to protect the original authors from misappropriations of their work, SIVB requires the corresponding author to sign a copyright transfer agreement on behalf of all of the authors. Unless this agreement is executed (without changes or addenda) and received by the Editorial Office, SIVB will not publish the manuscript either online or in print. For online submissions, this form will be sent to you electronically upon submission of your manuscript. Once signed, it can either be faxed, e-mailed as a pdf or directly mailed to: Michele Schultz, Publications Manager, Society for In Vitro Biology, 514 Daniels St., Suite 411, Raleigh, NC 27605, USA. (Fax: 910-755-5432) (e-mail: sivb@sivb.org).

If ALL authors were employed by the US government when the work was performed, the corresponding author should not sign the copyright transfer agreement, but should instead attach to the agreement a statement attesting that the manuscript was prepared as part of their official duties and, as such, is a work of the US government not subject to copyright.

If SOME of the authors were employed by the US government when the work was performed but others were not, the corresponding author should sign the copyright transfer agreement as it applies to that portion performed by the non-governmental employee authors.

Upon submitting an article to *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* for review and possible publication, authors are requested to add the following notice for the first screen of any posted electronic preprint versions of the paper. "This work has been submitted to the Society for In Vitro Biology for possible publication in *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*. Copyright may be transferred without notice, after which this version may no longer be accessible."

When the work has been accepted for publication, the author may post it, in its final accepted form, on their personal server or on their institution's server (but not on any organized preprint server) with a notice: "Accepted for publication in *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* as of (date), until it is published by the Society in print or electronic form."

After publication, authors may post their Society copyrighted material on their own server or on their institutions server without permission, provided that it includes the following notice: "This material has been published in (name of journal, issue number and date, page numbers), the only accredited archive of the content that has been certified and accepted after peer review. Copyright and all rights therein are retained by the Society for In Vitro Biology. This material may not be copied or e-posted without explicit permission of the copyright owner." Please provide a link to the reproduction page of the SIVB website with the following text: "For more information about Reproduction Permission for this article, please visit the SIVB website at www.sivb.org/pubs_reproductionPermission.asp"

Normas da Revista The Journal of Plant Growth Regulation

Artigo 3

Instructions for Authors

Types of Articles

The *Journal of Plant Growth Regulation* currently considers original research articles, reviews, and brief communications:

- **Original Article:** presents original scientific data/results which can advance the field. Original articles should ideally not exceed 10-15 printed pages.
- **Review Article:** presents a comprehensive summary of the current state of knowledge in a subject. Reviews should contain full references and present background information, as well as critical analysis of the works/studies discussed – including significance and any limitations, knowledge gaps, and future focus of the field
- **Brief Communications:** These are short reports that should not exceed 2,500 words or 4 figures/tables, and have no more than 30 references. Results and discussion should be combined into one section for this article type. New results dealing with isolation, identification, and structure of plant growth regulators will be considered as brief communications.

[Back to top ↑](#)

Manuscript Submission

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Please follow the hyperlink "Submit manuscript" on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Please ensure you provide all relevant editable source files. Failing to submit these source files might cause unnecessary delays in the review and production process.

Author Contribution Statement

Authors must include a brief statement on the contributions made by each author listed in the manuscript. This statement can be provided in free text or using CRediT taxonomy, and should be included in a separate section before the reference list.

Please see the "Authorship principles" section below for more details.

[Back to top ↑](#)

Title page

Title Page

Please make sure your title page contains the following information.

Title

The title should be concise and informative.

Author information

- The name(s) of the author(s)
- The affiliation(s) of the author(s), i.e. institution, (department), city, (state), country
- A clear indication and an active e-mail address of the corresponding author
- If available, the 16-digit ORCID of the author(s)

If address information is provided with the affiliation(s) it will also be published.

For authors that are (temporarily) unaffiliated we will only capture their city and country of residence, not their e-mail address unless specifically requested.

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

For life science journals only (when applicable)

Trial registration number and date of registration

Trial registration number, date of registration followed by "retrospectively registered"

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

Declarations

All manuscripts must contain the following sections under the heading 'Declarations'.

If any of the sections are not relevant to your manuscript, please include the heading and write 'Not applicable' for that section.

To be used for all articles, including articles with biological applications

Funding (information that explains whether and by whom the research was supported)

Funding (information that explains whether and by whom the research was supported)

Conflicts of interest/Competing interests (include appropriate disclosures)

Availability of data and material (data transparency)

Code availability (software application or custom code)

Authors' contributions (optional; please review the submission guidelines from the journal whether statements are mandatory)

Additional declarations for articles in life science journals that report the results of studies involving humans and/or animals

Ethics approval (include appropriate approvals or waivers)

Consent to participate (include appropriate statements)

Consent for publication (include appropriate statements)

Please see the relevant sections in the submission guidelines for further information as well as various examples of wording. Please revise/customize the sample statements according to your own needs.

[Back to top ↑](#)

Text

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- The text of a research paper should be divided into Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements, Conflict of Interest, and References.
- Materials and Methods must include statement of Human and Animal Rights.
- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

[LaTeX macro package \(Download zip, 168 kB\)](#) *

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments and Funding Information

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full. In addition, please provide the funding information in a separate step of the submission process in the peer review system. Funder names should preferably be selected from the standardized list you will see during submission. If the funding institution you need is not listed, it can be entered as free text. Funding information will be published as searchable metadata for the accepted article, whereas acknowledgements are published within the paper.

[Back to top ↑](#)

Scientific style

Genus and species names should be in italics.

[Back to top ↑](#)

Scientific style

Please use the standard mathematical notation for formulae, symbols etc.:

- Italic for single letters that denote mathematical constants, variables, and unknown quantities
- Roman/upright for numerals, operators, and punctuation, and commonly defined functions or abbreviations, e.g., cos, det, e or exp, lim, log, max, min, sin, tan, d (for derivative)
- Bold for vectors, tensors, and matrices.

[Back to top ↑](#)

References

Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

- Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).
- This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).
- This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995a, b; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1999, 2000).

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work. Please alphabetize according to the following rules: 1) For one author, by name of author, then chronologically; 2) For two authors, by name of author, then name of coauthor, then chronologically; 3) For more than two authors, by name of first author, then chronologically.

If available, please always include DOIs as full DOI links in your reference list (e.g. "<https://doi.org/abc>").

- Journal article
Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. <https://doi.org/10.1007/s00421-008-0955-8>

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of "et al" in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 965:325-329

- Article by DOI
Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med.* <https://doi.org/10.1007/s001090000086>
- Book
South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics.* Blackwell, London
- Book chapter
Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257
- Online document
Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007
- Dissertation
Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure.* Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

[ISSN LTWA](#)

If you are unsure, please use the full journal title.

[Back to top ↑](#)

Tables

- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.