

Otimização do Processo de Embriogênese Somática em Cacau

(*Theobroma cacao* L.)

Fotos e Ilustrações cedidas pelos autores

Alternativa para multiplicação de clones tolerantes à "vassoura"

Introdução

O cacau (*Theobroma cacao* L.) chegou a ser o segundo produto agrícola mais importante na pauta de exportação brasileira. Entretanto, com a chegada da "vassoura de bruxa", doença causada pelo fungo denominado *Crinipellis pernicioso*, houve uma derrocada dessa cultura, no sul da Bahia, principal região produtora do país.

A alternativa encontrada pela CE-PLAC (Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira) foi o desenvolvimento de metodologia de enxertia e

estaquia, a propagação via embriogênese somática tem sido apontada como mais uma alternativa potencialmente viável para a produção de mudas de cacau, dada a possibilidade de se obter por este processo altas taxas de multiplicação a partir de um único indivíduo. Além do mais, o desenvolvimento da metodologia de propagação via embriogênese somática é essencial para o estabelecimento do processo de transformação genética, que permitirá a obtenção de clones com genes para tolerância à "vassoura de bruxa", bem como a outras doenças importantes para a cultura do cacau.

João Batista Teixeira

Agr., PhD., Biologia Celular, Embrapa-Recursos Genéticos e Biotecnologia. E-mail: batista@cenargen.embrapa.br

Pbellippe Arthur Santos Marbach

Biólogo, M.S., Genética, Embrapa-Recursos Genéticos e Biotecnologia.

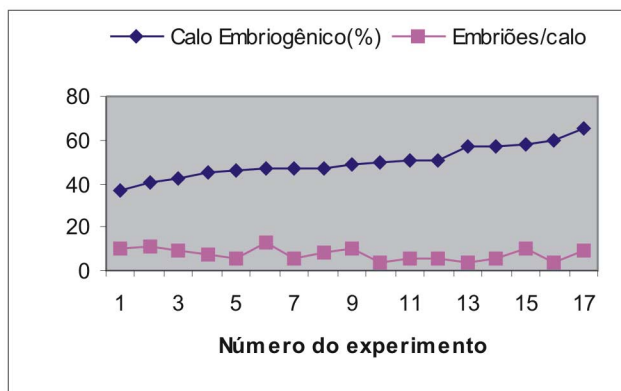


Figura 1. Taxa de regeneração de calos embriogênicos e número de embriões por calo em 17 experimentos utilizando estaminóides do genótipo Cenargen-2, cultivados de acordo com o protocolo de Li et al. (1998)

estaquia para a multiplicação dos clones tolerantes à "vassoura de bruxa", que vinham sendo desenvolvidos por essa instituição, já antevendo a possibilidade de que algum dia a doença pudesse chegar ao sul da Bahia. Dessa forma, foi possível dar início a um programa de recomposição de lavouras antigas e estabelecimento de novas lavouras, com os novos clones.

Além da propagação via enxertia e

Produção de mudas de cacau via embriogênese somática

Os primeiros estudos visando a obtenção de plantas de cacau por embriogênese somáticas foram conduzidos por Esan (1977) e Pence et al. (1979), os quais utilizaram embriões imaturos como fonte de tecidos para cultivo, mas apenas cerca de dez anos mais tarde foi possível obter plantas completas, com raiz bem desenvolvida, utilizando este mesmo tipo de explante (Nóvak et al., 1986).

Os primeiros trabalhos utilizando plantas adultas foram feitos por Söndahl e al. (1993) e Figueira & Janick (1993), os quais utilizaram tecidos nucleares. Ambos os autores obtiveram um pequeno número de mudas clonadas. Posteriormente, explantes florais foram utilizados pela primeira vez, o que permitiu a obtenção de algumas centenas de mudas (Lopez-Baez et al., 1993; Alemanno et al., 1996).

Mais recentemente, Li et al. (1998) relataram avanço substancial na metodologia de embriogênese a partir de estaminóides extraídos de botões flo-

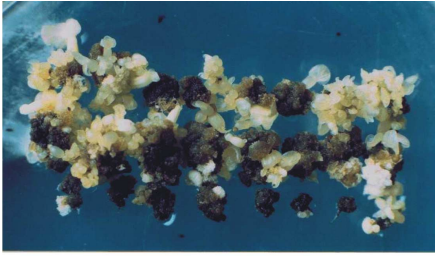


Figura 2. Calos embriogênicos de Cacau obtidos pelo protocolo descrito por Li et al. (1998)

rais fechados, por meio da qual foram avaliados 19 genótipos distintos, os quais responderam ao protocolo, numa taxa de indução de embriogênese, que variou de 0,8 a 100% dos explantes inoculados.

Durante o ano de 1999, foi feita na Embrapa-Recursos Genéticos e Biotecnologia uma comparação entre os dois protocolos mais recentes de regeneração via embriogênese somática em cacau, i.é, o de Lopez-Baez et al. (1993) e o de Li et al. (1998). Foram avaliados cinco genótipos disponíveis na Embrapa-Recursos Genéticos e Biotecnologia. Para cada genótipo, foram utilizados 100 estaminóides excisados de botões florais fechados, divididos em quatro repetições de 25 estaminóides cada. As culturas foram incubadas em câmara de crescimento tipo B.O.D., no escuro à temperatura de $25 \pm 0,5$ °C.

Ao final do processo, observou-se uma superioridade do protocolo descrito por Li et al. (1998), por meio do qual se obteve uma taxa de indução de embriogênese em 11 a 42% dos explantes,

dependendo do genótipo, ao passo que, pelo protocolo descrito por Lopez-Baez et al. (1993), a taxa de indução foi de 0,0 para três genótipos e 1,4 e 2,0% para os genótipos restantes.

O processo descrito por Li et al. (1998) consiste basicamente nas seguintes fases: a) Indução de formação de calo primário em meio PCG ("Primary callus growth"); b) Crescimento do calo primário em meio SCG ("Secondary callus growth"); c) Desenvolvimento de embrião no meio ED ("Embryo development"); d) Germinação dos embriões em meio PR ("Plant recovery"). Os explantes permanecem duas semanas no meio PCG e SCG, quatro semanas no meio ED, para o completo desenvolvimento do embrião, e mais quatro a seis semanas no meio PR para a germinação dos embriões. Mais algumas semanas de cultivo são necessárias para a transferência para casa de vegetação.

Ao longo de três anos de trabalho, 1999 a 2001, o protocolo descrito por Li et al. (1998) foi exaustivamente testado para o genótipo Cenargen-2, isto é, o que melhor respondeu à indução de embriogênese somática em experimentos anteriores. A taxa de indução de embriogênese, em 17 testes, conduzidos em diferentes anos e em diferentes épocas do ano, variou de 36,7 a 65%, com uma média de 50% dos explantes apresentando formação de calos embriogênicos

(Figura 1 e 2). Em cada estaminóide embriogênico foi possível identificar de 3,3 a 12,8 embriões, com uma média de 7,4 por explante.

A variação observada na taxa de indução de embriogênese pode ter sido devida a inúmeros fatores, os quais não foram devidamente controlados durante o processo. Visando identificar e avaliar o efeito de alguns dos possíveis fatores, foi conduzida uma série de experimentos, nos quais foram avaliados, tomando como base o genótipo Cenargen-2 e o protocolo descrito por Li et al. (1998), os seguintes aspectos:

1. Diferentes estádios de desenvolvimento do botão floral
2. Pré tratamento dos botões florais em baixa temperatura
3. Posição de excisão do estaminóide
4. Injúria mecânica do estaminóide
5. Cultivo do estaminóide no escuro e na luz

Diferentes estádios de desenvolvimento do botão floral

Diferentes tipos de explantes têm sido utilizados na embriogênese somática de cacau. Entretanto, dos tecidos somáticos que podem dar origem a clones de plantas matrizes, apenas tecido nucelar, pétalas e estaminóides têm dado resultados satisfatórios, sendo os estaminóides os que melhor respondem à embriogênese *in vitro*.

O grau de desenvolvimento de um determinado tecido ou órgão influencia a resposta embriogênica e, em geral, tecidos mais novos ou órgãos menos diferenciados respondem melhor. Desta forma, com o objetivo de verificar a influência do estágio de desenvolvimento na embriogênese somática de cacau, botões florais de, aproximadamente, 4, 6 e 8 mm de comprimento foram avaliados. Estes tamanhos foram escolhidos por serem facilmente distinguidos entre si. Além disso, os botões de 3 mm eram de difícil manipulação e os maiores que 8 mm já se encontravam no início da abertura da flor.

Observa-se, pela Figura 3, que a frequência de calos embriogênicos e número de embriões por calo aumentou com o aumento do tamanho do

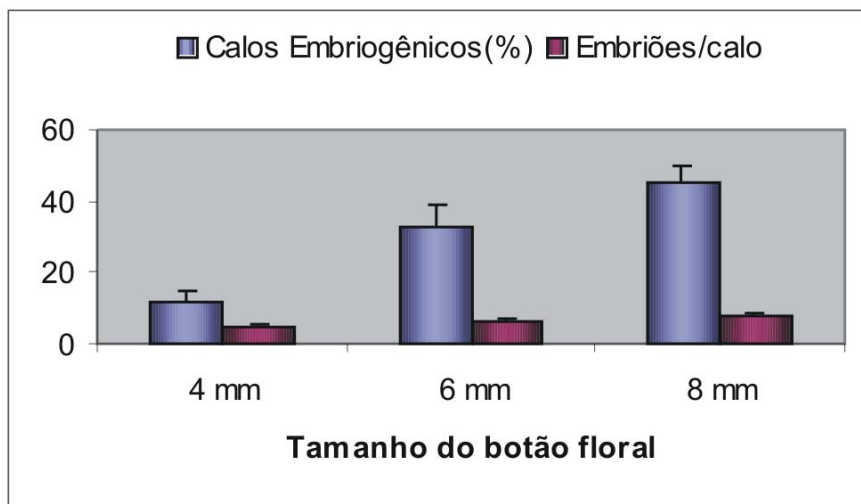


Figura 3. Influência do tamanho do botão floral na frequência embriogênica

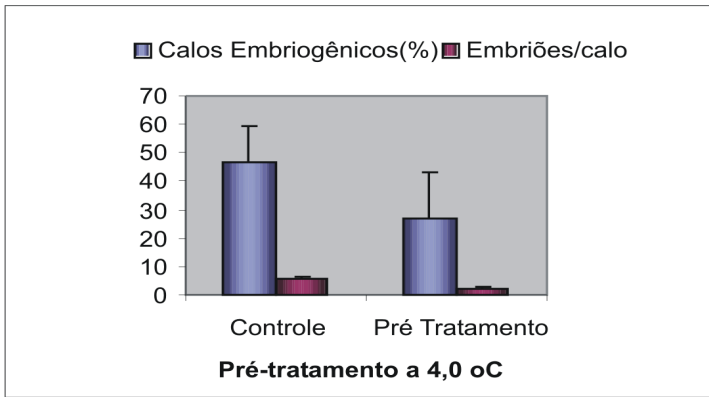


Figura 4. Influência do pré tratamento de botões florais a 4 ± 1 °C durante 24 horas na frequência embriogênica

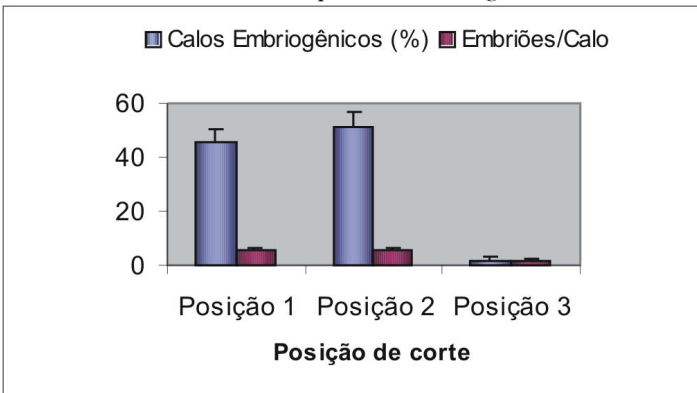


Figura 5. Influência da posição de corte do estaminóide na frequência embriogênica

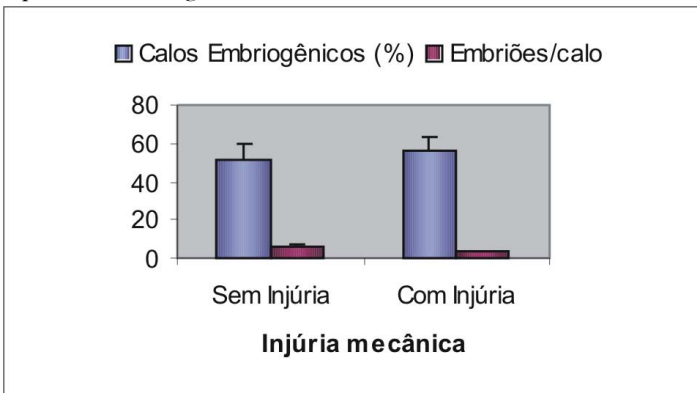


Figura 6. Influência da injúria mecânica do estaminóide na resposta embriogênica

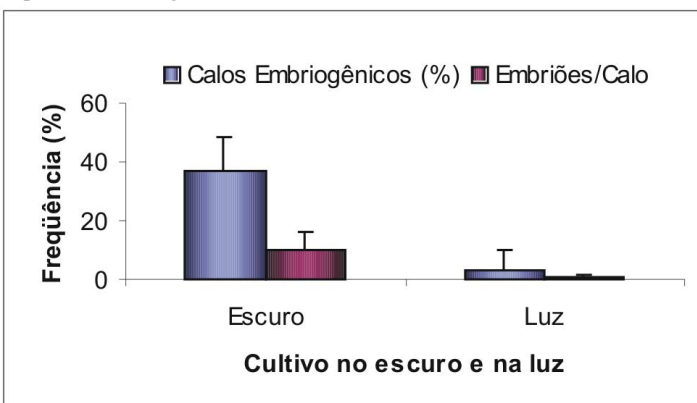


Figura 7. Influência do cultivo no escuro e da luz na resposta embriogênica

botão floral. A frequência de calos embriogênicos aumentou de 11,88% em botões florais de 4,0 mm para 45% em botões florais de 8,0 mm, com valores intermediários para botões florais de 6,0mm. Embora menos expressiva, observou-se uma mesma tendência de aumento no número de embriões por calo, passando de 4,38 para 7,5 embriões por calo, respectivamente para os botões florais de 4 e 8 mm de comprimento.

Pré tratamento dos botões florais em baixa temperatura

O tratamento de flores e inflorescências com baixa temperatura tem sido utilizado para estimular a resposta embriogênica em anteras de várias espécies. Os grãos de pólen tratados com baixas temperaturas por períodos adequados apresentam resposta embriogênica mais elevada em comparação com explantes não tratados. Os efeitos da baixa temperatura variam de espécie para espécie. Entretanto, pouco se sabe sobre os efeitos da baixa temperatura sobre a reprogramação celular, necessária para que células não embriogênicas se tornem embriogênicas durante o cultivo *in vitro*.

Para avaliar o efeito da baixa temperatura, botões florais de cacau foram mantidos a 4 ± 1 °C durante 24 horas antes da excisão dos estaminóides e inoculação no meio PCG ("Primary callus growth"; Li et al., 1998). Embora o intervalo de confiança tenha sido muito elevado, houve uma clara tendência de redução da frequência de calos embriogênicos bem como do número de embriões por explante como pode ser observado pela Figura 4.

Embora não tenha sido levado em consideração no presente experimento é possível que outros fatores tenham influenciado a redução na resposta embriogênica do estaminóide, como, por exemplo, o desencadeamento do processo de senescência do botão floral após ter sido retirado da árvore, em adição ao tratamento com baixa temperatura ou não.

Posição de excisão do estaminóide

A conexão do estaminóide com o receptáculo é uma região de transição entre este e o estaminóide. Por esta razão, a posição de corte do estaminóide pode influenciar de alguma forma a resposta embriogênica. Visando padronizar a posição de corte, os estaminóides foram excisados em três posições distintas: posição 1, na base, junto ao receptáculo, onde eles se encontram fundidos com os estames; posição 2, no ponto onde os estames e estaminóides se separam logo acima do receptáculo e posição 3, na posição mediana dos estaminóides.

Verifica-se, pela Figura 5, que tanto a frequência de calo embriogênico quanto o número médio de embriões somáticos por calo embriogênico foi substancialmente menor nos estaminóides cortados na posição 3. Entretanto, nas posições de corte 1 e 2, não houve diferenças marcantes entre si, o que



Figura 8. Embriões somáticos de cacau, ao final da fase de diferenciação, em meio ED



Figura 9. Planta de cacau obtida por embriogênese somática, em fase de aclimação

sugere que os tecidos da base dos estaminóides são os mais propensos à resposta embriogênica.

Injúria mecânica do estaminóide

Um dos problemas que pode alterar a resposta embriogênica é o relacionado ao processo de excisão do estaminóide do restante do botão floral, o que exige intensa manipulação do explante, muitas vezes conduzindo a injúrias mecânicas indesejáveis ao estaminóide. Visando testar o efeito da injúria mecânica, foram feitas, com o auxílio de bisturi, pequenas incisões ao longo dos estaminóides retirados de botões florais de 8,0 mm.

Ao contrário do esperado, não se observou influência da injúria mecânica na resposta embriogênica dos estaminóides, havendo mesmo um discreto aumento na percentagem de calos embriogênicos. Por outro lado, o efeito das incisões na redução do número de embriões por explante foi considerável, de 5,67 para 3,33 embriões (Figura 6).

Cultivo do estaminóide no escuro e na luz

O efeito da luz na indução de embriogênese somática em cacau foi avaliada expondo os estaminóides a um fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 30,0 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ durante o cultivo nos meios PCG e SCG ("Secondary callus growth"; Li et al., 1998). Posteriormente, os calos oriundos desses explantes foram cultivados no meio ED ("Embryo development"; Li et al., 1998), no escuro, para a diferenciação dos embriões.

A presença de luz durante o cultivo dos estaminóides nos meios PCG e SCG teve efeito altamente inibitório tanto na indução de calo embriogênico quanto no número de embriões por calo, uma redução superior a 90% (Figura 7).

Conclusões e considerações

□ O protocolo descrito por Li et al. (1998) apresentou, tomando como base o experimento conduzido para cinco genótipos, evidências de maior eficiência quando comparado com o descrito por Lopez-Baez et al. (1993);

□ Como foi relatado por Li et al. (1998) e Maximova et al. (2002), foi observada diferença marcante em relação ao efeito do genótipo sobre a resposta embriogênica;

□ Botões florais bem desenvolvidos, coletados logo antes da antese são as fontes de estaminóides mais propensas à indução embriogênica;

□ A excisão dos estaminóides deve ser conduzida pela base, tomando-se o cuidado de permitir a retenção de alguma parte do receptáculo floral;

□ Todas as fase do processo embriogênico devem ser conduzidas em pleno escuro, até a completa formação dos embriões;

□ Os embriões obtidos apresentaram diferenciação normal e uma taxa de germinação superior a 90% (Figura 8);

□ As plântulas obtidas foram aclimatizadas com sucesso em casa de vegetação apresentam atualmente altura aproximada de 50 cm, com dois pares de folhas bem desenvolvidas. O espec-

to fenotípico é muito similar ao observado para mudas derivadas de sementes (Figura 9).

Referência Bibliográfica

- ALEMANN, L.; BERTHOULY, M. & MICHAUX-FERRIÈRE, N. Embryogênese somatique du cacaoyer à partir de pièces florales. *Plantations, Recherches, Développement Juillet-août*:225-237, 1996;
- ESAN, E.B. Tissue culture studies on cacao (*Theobroma cacao* L.). A supplementation of current research. In: Proc. 5th Int. Cacao Res. Conf., 1875, Cacao Res. Inst. Nigeria, Ibadan, pp. 116-125, 1977;
- FIGUEIRA, A. & JANICK, J. Development of nucellar somatic embryos of *Theobroma cacao*. *Acta Horticulturae* 336:231-238, 1993;
- LI, Z.; TRAORE A.; MAXIMOVA, S. & GUILTINAN, M.J. Somatic embryogenesis and plant regeneration from floral explants of cacao (*Theobroma cacao* L.) using thidiazuron. In *VitroCell. Dev. Biol. Plant* 34:293-299, 1998.
- LOPEZ-BAEZ, O.; BOLLON, H., ESKES, A. & PETIARD, V. Embryogênese somatique de cacaoyer (*Theobroma cacao* L.) à partir de pièces florales. *C.R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la Vie/Life Sciences*, 316:579-584, 1993;
- MAXIMOVA, S.N.; ALEMANN, L.; YOUNG, A.; FERRIERE, N.; TRAORE, A. & GUILTINAN, M.J. Efficiency, genotypic variability, and cellular origin of primary and secondary somatic embryogenesis of *Theobroma cacao* L. In *Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant* 38:252-259, 2002;
- NÓVAK, F. J. DONINI, B. & OWUSU, G. Somatic embryogenesis and *in vitro* plant development of cocoa (*Theobroma cacao*). In: Proc. Int. Symp. Nuclear techniques and *in vitro* culture for plant improvement. IAEA, Vienna, pp. 443-449, 1986;
- PENCE, V.C.; HASEGAWA, P.M. & JANICK, J. Asexual embryogenesis in *Theobroma cacao* L. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 104:145-148, 1979;
- SÖNDAHL, M.R.; LIU, S.; BELLATO, C.M & BRAGIN, A. Cacao somatic embryogenesis. *Acta Horticulturae* 336:245-248, 1993;