



ISSN 0102 - 0110

Outubro, 2002

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Documentos 79

Otimização da metodologia de embriogênese somática visando a propagação clonal de genótipos elite de cacau (*Theobroma cacao* L.)

João Batista Teixeira
Phellippe Arthur Santos Marbach
Marcelo de Oliveira Santos

Brasília, DF
2002

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa - Recursos Genéticos e Biotecnologia

Serviço de Atendimento ao Cidadão

Parque Estação Biológica, Av. W5 Norte (Final) - Brasília, DF

CEP 70770-900 - Caixa Postal 02372

PABX: (61) 448-4600

Fax: (61) 340-3624

<http://www.cenargen.embrapa.br>

e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: José Manuel Cabral de Sousa Dias

Secretária-Executiva: Miraci de Arruda Camara Pontual

Membros: Antônio Costa Allem

Marcos Rodrigues de Faria

Marta Aguiar Sabo Mendes

Sueli Correa Marques de Mello

Vera Tavares Campos Carneiro

Suplentes: Edson Junqueira Leite

José Roberto de Alencar Moreira

Supervisor Editorial: Miraci de Arruda Camara Pontual

Revisor de texto: Miraci de Arruda Camara Pontual

Normalização Bibliográfica: Maria Alice Bianchi

Tratamento de Ilustrações: Alysson Messias da Silva

Editoração Eletrônica: Alysson Messias da Silva

Capa: Alysson Messias da Silva

1ª edição

1ª impressão (2002): tiragem 150

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Teixeira, João Batista.

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, 2002.

xx p. - (Documentos / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ISSN 0102-0110; n. 79)

1. Embriogênese - Cacau. 2. Propagação Clonal - Cacau. 3. *Theobroma cacao*. I. Marbach, Phellippe Arthur Santos. II. Santos, Marcelo de Oliveira. III. Título. IV. Série.

CDD 633.74 Ed. 21

© Embrapa 2002

Autores

João Batista Teixeira

Agr., PhD., Biologia Celular, Embrapa-Recursos Genéticos e Biotecnologia.

E-mail: batista@cenargen.embrapa.br

Phellippe Arthur Santos Marbach

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

Marcelo de Oliveira Santos

Biólogo, M.S., Genética, Universidade Federal de Juiz de Fora. E-mail: mosantos@icb.ufjf.br

Sumário

Introdução	7
Produção de mudas via embriogênese somática	8
Protocolo de embriogênese somática descrito por Lopez-Baez et al. (1993)	10
Protocolo de embriogênese somática descrito por Li et al. (1998)	12
Comparação entre os protocolos de Lopez Baez et al. (1993) e Li et al. (1998)	14
Otimização da metodologia de embriogênese somática	15
Avaliação da Curva de crescimento do calo primário	17
Efeito da Posição de corte do estaminóide	18
Comparação do cultivo sob iluminação e escuro	19
Influência do pré tratamento em baixa temperatura	19
Comparação de botões florais de diferentes comprimentos	20
Influência da injúria mecânica do estaminóide	22
Efeito do Nitrato de Prata, inibidor da ação do etileno, quando aplicado nos meios PCG, SCG e ED	23
Efeito do tiosulfato de prata, inibidor da ação do etileno, quando aplicado nos meios PCG, SCG e ED	23
Efeito do nitrato de prata, inibidor da ação do etileno, quando aplicado alternativamente nos meios PCG, SCG e ED	24
Efeito de aminovinilglicina (AVG), inibidor da síntese do etileno, quando aplicado nos meios PCG, SCG e ED	25
Efeito do ácido aminociclopropano (ACC), precursor imediato na rota de síntese do etileno, quando aplicado no meio PCG	27

Efeito do ácido Abscísico e sacarose, quando aplicados no meio ED	28
Avaliação de genótipos procedentes do Centro de Pesquisa do Cacau (CEPEC-CEPLAC)	30
Aclimação das plântulas obtidas	31
Conclusões Gerais e Recomendações	32
Referências Bibliográficas	33

Otimização da metodologia de embriogênese somática visando a propagação clonal de genótipos elite de cacau (*Theobroma cacao* L.)

João Batista Teixeira

Phellippe Arthur Santos Marbach

Marcelo de Oliveira Santos

Introdução

O cacau (*Theobroma cacao* L.) já foi o segundo produto mais importante na lista de exportações brasileiras, sendo o Brasil o maior produtor mundial. O sul do estado da Bahia chegou a responder por 95% da produção brasileira, com uma área de cultivo de mais de 700.000 hectares, o que representava 50% das exportações do estado da Bahia.

Entretanto, o agronegócio do cacau tem enfrentando uma crise sem precedentes desde 1989, quando foi detectado no sul do estado da Bahia a doença conhecida por vassoura de bruxa, causada pelo fungo *Crinipellis perniciosa*. Mais de 90% da área cultivada foi contaminada por este fungo, com perdas de até 100% da lavoura.

A propagação clonal de genótipos superiores tem sido apontada como a melhor estratégia para uma rápida recomposição das áreas atingidas pela vassoura de bruxa, e conseqüentemente, recuperação da produção. Contudo, esta recomposição deve ser conduzida de modo a ampliar a variabilidade genética das novas plantações, visto que a base genética estreita das plantações foi um dos fatores que contribuiu para que a vassoura de bruxa assumisse proporções desastrosas.

Variedades clonais tolerantes à vassoura de bruxa e com alta produtividade já foram desenvolvidas. Entretanto, para a manutenção desta característica, as

novas variedades precisam ser propagados clonalmente. A propagação via enxertia visando, sobretudo, a substituição de copa, vem sendo conduzida pela Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC). Da mesma forma, processos de propagação clonal utilizando o enraizamento de estacas foram desenvolvidos e estão sendo utilizados com sucesso na recomposição das lavouras cacaueiras.

Além destes dois métodos de propagação clonal, a micropropagação via embriogênese somática tem sido apontada como mais uma alternativa, visto que, por meio dela, é possível se alcançar altas taxas de propagação. Entretanto, esta metodologia encontra-se ainda em fase de desenvolvimento.

A embriogênese somática também tem sua importância no desenvolvimento de uma metodologia eficiente de transformação genética desta espécie tendo em vista a possibilidade de introduzir genes para resistência a doenças, que possam contribuir para o controle da vassoura de bruxa bem como de outras doenças que acometem a cultura do cacau.

A partir de 1999, a Embrapa-Recursos Genéticos e Biotecnologia deu início aos primeiros ensaios visando avaliar as metodologias de multiplicação clonal de cacau via embriogênese somática. Inicialmente, foram utilizadas cinco plantas matrizes existentes no campo experimental da Embrapa-Recursos Genéticos e Biotecnologia, as quais foram denominadas de Cenargen-1, Cenargen-2, Cenargen-3, Cenargen-4 e Cenargen-5. Posteriormente, após a otimização da metodologia, genótipos procedentes da CEPEC-CEPLAC foram avaliados quanto à resposta embriogênica. Os resultados de três anos de trabalho são apresentados a seguir.

Produção de mudas via embriogênese somática

A formação de embriões somáticos em cacau foi primeiramente observada em embriões zigóticos imaturos (Esan, 1977; Pence et al., 1979). A capacidade regenerativa deste tipo de explante estava relacionada à fase de desenvolvimento dos embriões (Pence et al., 1979). A máxima capacidade regenerativa foi observada em embriões com 4,5 a 10,0 mm de comprimento, equivalente a 100 a 110 dias após a polinização. Embora os embriões somáticos apresentassem desenvolvimento normal até a fase cotiledonar, a sua germinação *in vitro* não foi obtida. Posteriormente, com os trabalhos desenvolvidos por Novák et al. (1986),

foi possível desenvolver uma metodologia de germinação dos embriões somáticos.

Utilizando explantes de folhas novas obtidas a partir de estacas enraizadas, originadas de árvores adultas, Litz (1986) relatou a obtenção de embriões somáticos pela adição ao meio de cultura de altas concentrações de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) na concentração de 5 a 20 mg/L e benzilaminopurina (BAP) na concentração de 100 a 140 mg/L. Entretanto, os embriões morreram na fase inicial de desenvolvimento. Embriões somáticos derivados de tecidos de plantas adultas só foram obtidos a partir de 1988, com os trabalhos publicados por Söndahl e al. (1993) e Figueira & Janick (1993), que utilizaram tecidos nucelares como fonte de explantes. Posteriormente, embriões somáticas e plântulas completas foram obtidas a partir de tecidos florais (Lopez-Baez et al., 1993; Alemanno et al., 1996).

Mais recentemente, Li et al. (1998) relataram o desenvolvimento de um protocolo de indução de embriogênese somática de alta frequência utilizando o tidiazurón (TDZ) como fonte de citocinina. Entretanto, uma grande variação foi observada na frequência de indução de calos embriogênicos, de 0,8 a 100%, e na média dos embriões por calo embriogênico, de 1 a 45,7. As plantas derivadas de embrião somático mostraram morfologia e características de crescimento similares as das plantas derivadas de sementes.

Os protocolos descritos por Lopez-Baez et al. (1993) e Li et al. (1998) são considerados os mais eficientes em termos de resposta embriogênica. Ambos utilizam estaminóides de botões florais fechados como explante inicial. Entretanto, os procedimentos de cultivo são bem distintos. No protocolo de Lopez-Baez et al. (1993), foram utilizados, além dos estaminóides, outros tipos de explantes como estames, pétalas e base das peças florais, entretanto, com resultados inferiores aos obtidos com estaminóides.

Durante o triênio 1999/2001, foi feita, na Embrapa-Recursos Genéticos e Biotecnologia, uma revisão dos dois principais protocolos de regeneração de plantas via embriogênese somática em cacau, i.é, os de Lopez Baez et al. (1993) e Li et al. (1998).

Protocolo de embriogênese somática descrito por Lopez-Baez et al. (1993)

De acordo com o protocolo descrito por Lopez-Baez et al. (1993), estaminóides retirados de botões florais fechados são cultivados em meio de indução (MI) durante três semanas. Após este período, os explantes são transferidos para meio de expressão (ME), permanecendo neste meio por mais 6 a 8 semanas, durante o qual ocorre a formação de embriões globulares. Em seguida, os embriões são transferidos para o meio de maturação (MM), permanecendo aí por 4 a 6 semanas. Os embriões desenvolvidos são transferidos para o meio de germinação (MG), no qual são mantidos por mais 4 a 6 semanas. Finalmente, as plântulas são transferidas para o meio de crescimento (MC), onde são mantidas por 6 a 8 semanas. A maturação dos embriões é conduzida em ambiente com baixa intensidade de luz ($7\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$), a qual é elevada para $60\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ nas fases posteriores. O fotoperíodo utilizado é o de 12 horas para todas as fases e a temperatura mantida entre 26 e 27 °C (Tabela 1).

Segundo Lopez-Baez et al. (1993), os embriões somáticos foram observados após 6 a 8 semanas no meio de expressão (ME) e a taxa de embriogênese mais alta, em meio contendo 1,0 mg/L de 2,4-D combinado com 0,25 mg/L de kinetina, após três semanas, no meio de indução (MI). Em explantes mantidos por mais de três semanas neste meio, a taxa de embriogênese observada foi zero.

Este protocolo foi testado para vários genótipos resultando em taxas de embriogênese que variaram de 1,3 a 18,7%. De 419 embriões obtidos, 313 (74,7%) germinaram, dos quais 280 (89,5%) foram convertidos em plântulas completas, com bom desenvolvimento do sistema radicular.

Tabela 1. Componentes do meio básico de Murashige & Skoog (1962), acompanhado das concentrações de benzilaminopurina (BAP) e ácido naftalenoacético (ANA) dos meios de iniciação (MI), expressão (ME), maturação (MM), germinação (MG) e crescimento (MC), segundo protocolo de embriogênese somática de cacau descrito por Lopez-Baez et al (1993).

Componentes(*)	Meio MI	Meio ME	Meio MM	Meio MG	Meio MC
KNO ₃	1900	1900	1900	1900	1900
NH ₄ NO ₃	1650	1650	1650	1650	1650
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	440	440	440	440
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	370	370	370	370
KH ₂ PO ₄	170	170	170	170	170
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,3	37,3	37,3	37,3	37,3
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8	27,8	27,8	27,8	27,8
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3	22,3	22,3	22,3	22,3
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	8,6	8,6	8,6	8,6
H ₃ BO ₃	6,2	6,2	6,2	6,2	6,2
KI	0,83	0,83	0,83	0,83	0,83
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025
Tiamina	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Piridoxina	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Ácido Nicotínico	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Mio-inositol	100	100	100	100	100
Glicina	3	1,0	-	-	-
L-leucina	0,4	0,2	0,4	0,4	0,4
L-lisina	0,4	0,2	0,4	0,4	0,4
L-triptofano	0,2	0,1	0,2	0,2	0,2
L-arginina	0,4	0,2	0,4	0,4	0,4
2,4-D	1,0	-	-	-	-
Kinetina	0,25	-	-	-	-
AIA	-	-	0,05	-	-
AIB	-	-	0,05	-	-
ANA	-	-	-	0,01	-
GA ₃	-	-	0,02	0,02	-

Continua...

Continuação da Tabela 1.

Componentes(*)	Meio				
	MI	ME	MM	MG	MC
2-iP	-	-	-	0,2	-
ABA	-	-	-	1,0	-
Sulfato de Adenina	-	-	0,5	0,5	-
Água de Coco	50,0 ml/L	100ml/L	-	-	-
Carvão Ativado	-	-	-	1,0g/L	0,15g/L
Sacarose	4,0%	4,0%	-	-	-
Maltose	-	-	4,0%	8,0% ou	-
Glucose	-	-	-	4,0%	0,05%
Fitigel	0,2%	0,2%	0,2%	0,3%	0,3%
pH	5,5	5,5	5,6	5,8	5,8

(*) Concentração em mg/L, exceto quando especificado.

Protocolo de embriogênese somática descrito por Li et al. (1998)

Segundo o protocolo descrito por Li et al. (1998), os explantes, constituídos por estaminóides de botões florais fechados, são inoculados em meio de crescimento de calo primário (PCG), por um período de duas semanas, sendo em seguida transferidos para o meio secundário de crescimento de calos (SCG), por mais duas semanas. Finalmente, os explantes são transferidos para o meio de desenvolvimento de embriões (ED), onde permanecem por dois períodos de cultivo de duas semanas cada, com renovação do meio ao final das duas primeiras semanas. Embriões bem desenvolvidos são transferidos finalmente para o meio de germinação e regeneração de plantas (PR), onde permanecem até o completo desenvolvimento da plântula, havendo renovação do meio a cada duas semanas (Tabela 2). O meio básico utilizado para PCG foi o DKW (Driver & Kuniyuki, 1984), enquanto que o do SCG foi o WPM (Lloyd & McCown, 1980). O meio PR foi constituído do meio básico de DKW/5.

Foram testados, por estes autores, 19 genótipos, de três grupos genéticos distintos. A percentagem de explantes embriogênicos variou de 0,8 a 100%, sendo que a maior frequência foi de 0,8 a 45,8%, com 16 genótipos. Apenas 3 genótipos responderam acima de 85%.

Tabela 2. Componentes dos meios PCG, SCG, ED e PR, segundo protocolo de embriogênese somática de cacau, descrito por Li et al. (1998).

Componente (*)	Meio PCG	Meio SCG	Meio ED	Meio PR
KNO ₃	-	-	-	200,0
NH ₄ NO ₃	1416,0	400,0	1416,0	283,2
CaCl ₂ .2H ₂ O	112,5	-	112,5	22,5
Ca(NO ₃) ₂	1367,0	-	1367,0	273,4
CaCl ₂ anidro	-	72,5	-	-
CaNO ₃	-	386,0	-	-
MgSO ₄ .7H ₂ O	361,49	180,3	361,49	72,3
KH ₂ PO ₄	265,0	17,0	265,0	53,0
K ₂ SO ₄	1559,0	990,0	1559,0	311,8
Na ₂ EDTA	45,4	37,3	45,4	9,1
FeSO ₄ .7H ₂ O	33,8	27,8	33,8	6,76
MnSO ₄ .H ₂ O	33,5	22,3	33,5	6,7
ZnSO ₄ .6H ₂ O	17,0	8,6	17,0	3,4
H ₃ BO ₃	4,8	6,2	4,8	0,96
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,39	0,25	0,39	0,078
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,25	0,25	0,25	0,05
NiSO ₄ .5H ₂ O	0,005	-	0,005	0,001
Tiamina	2,0	10,0	2,0	2,0
Piridoxina	-	1,0	-	-
Ácido Nicotínico	1,0	1,0	1,0	1,0
Mio-inositol	200,0	100,0	100,0	100,0
Glicina	2,0	-	2,0	2,0
Glutamina	250,0	-	-	-
2,4-D	9,0 μM	9,0 μM	-	-
TDZ	22,7 nM	-	-	-
Kinetina	-	1,4 μM	-	-
Água de Coco	-	50,0 ml/L	-	-
Sacarose	-	-	3,0%	0,5%
Glucose	2,0%	2,0%	0,1%	1,0%
Fitigel	0,2%	0,22%	0,2%	0,17%
pH	5,8	5,8	5,8	5,8

(*) Concentração em mg/L, exceto quando especificado.

Comparação entre os protocolos de Lopez Baez et al. (1993) e Li et al. (1998)

Estaminóides de botões florais fechados procedentes de cinco genótipos (Cenargen-1, Cenargen-2, Cenargen-3, Cenargen-4 e Cenargen-5) foram utilizados para comparação dos dois principais protocolos de regeneração de plantas via embriogênese somática. Foram utilizados 100 estaminóides de cada genótipo por protocolo, 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.

Em ambos os protocolos, a calogênese teve início no local de corte dos estaminóides e depois, eventualmente, se estendia por todo o explante. Basicamente, formavam-se dois tipos de calo: calo tipo 1 e calo tipo 2. O calo tipo 1 era bem desenvolvido e apresentava uma aparência friável e esbranquiçada, geralmente pouco embriogênico. Por outro lado, o tipo 2 era pouco desenvolvido, com crescimento restrito ao local de corte do explante e tinha maior tendência à oxidação. Os calos tipo 2 se mostraram os mais embriogênicos, com embriões surgindo preferencialmente da porção mais oxidada do calo.

No protocolo de Lopez-Baez et al. (1993), o aparecimento de embriões foi observado, após 8 semanas de cultivo no meio de expressão ME, ao passo que, no protocolo de Li et al. (1998), a formação de embriões teve início ao final da segunda semana no meio ED, quando já podiam ser observados embriões desde a fase cordiforme até início da fase cotiledonar. Geralmente, em torno de metade dos calos potencialmente embriogênicos foram identificados nesta etapa do processo e o restante, só ao final da quarta semana no meio ED.

Dois tipos de embriões somáticos foram observados: um de aspecto leitoso e outro de aparência translúcida e coloração amarelada. O primeiro tipo assemelhava-se ao embrião zigótico e era convertido mais facilmente à planta, quando transferido para meio de germinação. O segundo tipo representava a maior parte dos embriões produzidos pelo protocolo básico de Li et al. (1998), algo em torno de 70% e geralmente apresentava uma baixa taxa de conversão à planta.

No geral, o protocolo descrito por Li et al. (1998) apresentou um desempenho muito superior ao descrito por Lopez-Baez et al. (1993), tanto na frequência de

formação de calo embriogênico (de 11 a 42,2%, dependendo do genótipo) como no número médio de embriões somáticos por calo embriogênico (de 1,6 a 14; Tabela 3). Além disso, a influência do genótipo foi menor, havendo indução de embriogênese somática em todos os genótipos testados enquanto que, no protocolo descrito por Lopez Baez et al. (1993), a indução de embriogênese foi observada em apenas dois genótipos.

O genótipo Cenargen-2 apresentou maior freqüência de calos embriogênicos em ambos os protocolos, e foi utilizado como fonte de explantes nos experimentos subseqüentes.

Tabela 3. Eficiência de regeneração de dois protocolos de embriogênese somática em cacau (Lopez-Baez et al., 1993; Li et al., 1998).

Protocolos	Genótipos	Freqüência de calo embriogênico (%)	Nº médio de embriões somáticos por calo embriogênico
Protocolo descrito por Lopez-Baez et al. (1993)	Cenargen-1	1,4	2,0
	Cenargen-2	2,0	1,5
	Cenargen-3	0,0	0,0
	Cenargen-4	0,0	0,0
	Cenargen-5	0,0	0,0
Protocolo descrito por Li et al.(1998)	Cenargen-1	26,4	14,2
	Cenargen-2	42,2	9,3
	Cenargen-3	14,0	2.0
	Cenargen-4 *	-	-
	Cenargen-5	11,0	1,6

(*)Nao apresentava botões florais na época do experimento

Otimização da metodologia de embriogênese somática

Embora o protocolo descrito por Li et al.(1998) tenha dado uma resposta muito superior a do Lopez-Baez et al. (1993), a taxa de formação de embriões translúcidos foi muito alta, próximo a 70%. Além do mais, verificou-se uma grande variação tanto na freqüência de calo embriogênico como no número de embriões somáticos por calo em todos os genótipos testados.

A possível causa desta variação ainda é desconhecida, mas poderia estar associada com algum fator relacionado ao explante, meio de cultura ou condições ambientais de cultivo, como luz e temperatura.

Visando averiguar possíveis fatores envolvidos no processo embriogênico de cacau, foi conduzida uma série de experimentos, onde foram estudados:

1. Avaliação da Curva de crescimento do calo primário
2. Efeito da Posição de corte do estaminóide
3. Comparação do cultivo sob iluminação e escuro
4. Influência do pré tratamento em baixa temperatura
5. Comparação de botões florais de diferentes comprimentos
6. Influência da injúria mecânica do estaminóide
7. Efeito do Nitrato de Prata, inibidor da ação do etileno, quando aplicado nos meios PCG, SCG e ED
8. Efeito do tiosulfato de prata, inibidor da ação do etileno, quando aplicado nos meios PCG, SCG e ED
9. Efeito do nitrato de prata, inibidor da ação do etileno, quando aplicado alternativamente nos meios PCG, SCG e ED
10. Efeito de aminovinilglicina (AVG), inibidor da síntese do etileno, quando aplicado nos meios PCG, SCG e ED
11. Efeito de ácido aminociclopropano (ACC), precursor imediato na rota de síntese do etileno, quando aplicado nos meios PCG, SCG e ED
12. Efeito do ácido Abscísico e sacarose, quando aplicado no meio ED

O protocolo descrito por Li et al. (1998) e o genótipo Cenargen-2 foram utilizados nos experimentos descritos a seguir.

Botões florais foram coletados sempre pela manhã, levados para o laboratório e mantidos em capela de fluxo laminar, onde foram desinfestados em álcool a 70% por 1 a 3 minutos seguido de tratamento com hipoclorito de sódio a 0,5% por 10 minutos, sendo em seguida lavados três vezes em água destilada estéril, em banhos que duraram, pelo menos, cinco minutos cada. Os botões foram deixados em copo de Becker tampados com uma placa de Petri estéril até o momento do uso. Em seguida, os botões foram abertos e os estaminóides, excisados com a ajuda de um bisturi. O corte para retirada dos estaminóides foram feitos invariavelmente na base, onde eles se inserem no receptáculo floral.

Os estaminóides foram inoculados no meio primário de crescimento de calos, PCG, (Tabela 2) em número de 20 por placa, em, pelo menos, quatro repetições por tratamento. As placas foram incubadas no escuro, a uma temperatura de $25 \pm 0,5$ °C. Após duas semanas no meio PCG, os explantes foram transferidos para o meio secundário de crescimento de calos, SCG, (Tabela 2), permanecendo neste meio por mais duas semanas. Ao final deste período, os explantes foram subcultivados em meio para desenvolvimento de embrião, ED (Tabela 2), onde permaneceram por quatro semanas, havendo renovação de meio ao final da segunda semana. Neste momento, foram feitas as avaliações de número de calos embriogênicos e número de embriões por calo.

Avaliação da Curva de crescimento do calo primário

A calogênese foi observada inicialmente no local de corte dos estaminóides e, eventualmente, depois, se estendia por todo o explante. A taxa de crescimento dos calos foi baixa, até a quarta ou quinta semana de cultivo. A partir da quinta semana, já no meio ED observou-se uma aceleração do crescimento. A matéria fresca dos calos aumentou em seis vezes, ao final da oitava semana de cultivo, quando comparado com o peso da matéria fresca após cinco semanas de cultivo (Fig. 1).

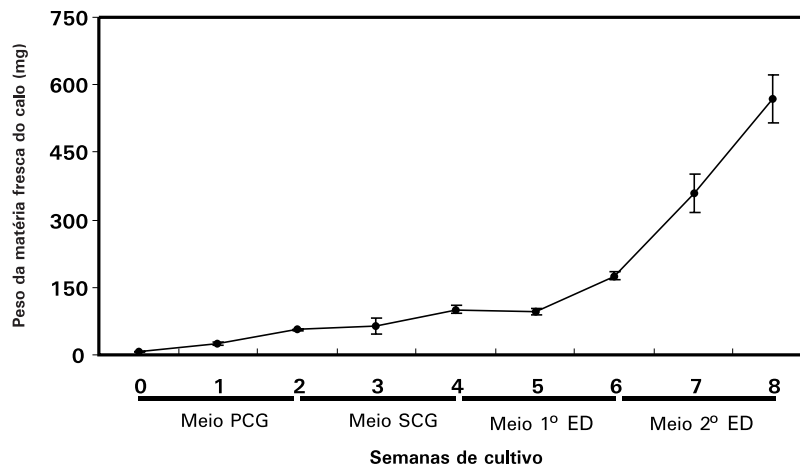


Fig. 1. Curva de crescimento do calo primário durante os dois primeiros meses de cultivo, de acordo com o protocolo descrito por Li et al. (1998).

O aumento da matéria seca seguiu um padrão muito parecido com o da matéria fresca, o que sugere que o crescimento observado se deveu não apenas a um aumento no tamanho das células, mas igualmente no número de células dos calos (Fig. 2).

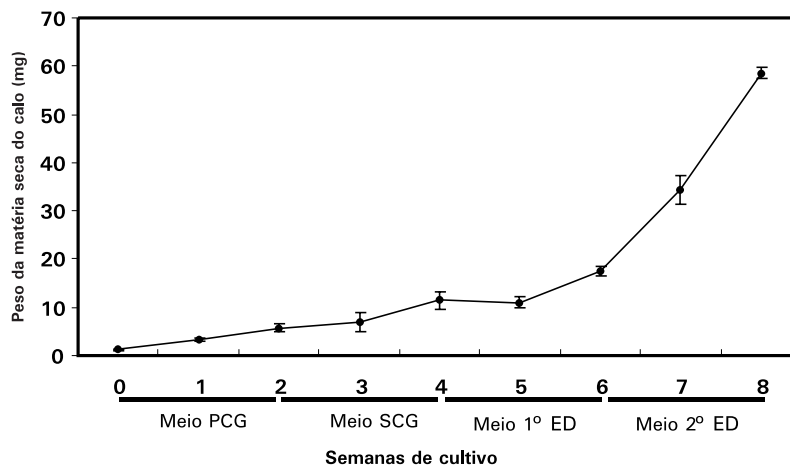


Fig. 2. Curva de crescimento do calo primário durante os dois primeiros meses de cultivo, de acordo com o protocolo descrito por Li et al. (1998).

Efeito da Posição de corte do estaminóide

A conexão do estaminóide com o receptáculo é uma região de transição entre este e o estaminóide. Por essa 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 Tabela 4, que tanto a frequência de calo embriogênico quanto o número médio de embriões somáticos por calo embriogênico foram substancialmente menores nos estaminóides cortados na posição 3. Entretanto, nas posições de corte 1 e 2, não houve diferenças marcantes entre si, o que sugere que os tecidos da base dos estaminóides são os mais propensos à resposta embriogênica.

Os calos oriundos dos estaminóides cortados na posição 3 foram predominantemente do tipo 1, i.é, bem desenvolvidos e com pouca oxidação fenólica, justamente os do tipo não embriogênicos.

Tabela 4. Influência da posição de corte do estaminóide na freqüência de formação de calos embriogênicos e número de embriões por calo.

Posição de Corte	Calo Embriogênico (%)	Número de Embriões/Calo
Posição 1	45,83 ± 4,2 ^A	5,67 ± 0,5
Posição 2	50,83 ± 6,1	5,67 ± 0,5
Posição 3	1,67 ± 1,2	1,33 ± 1,0

^(A)Intervalo de confiança a 95% de probabilidade

Comparação do cultivo sob iluminação e escuro

O efeito da luz na indução de embriogênese somática em cacau foi avaliada expondo os estaminóides a um fotoperíodo de 16 horas durante o cultivo nos meios de indução (PCG e SCG). Posteriormente, os calos oriundos destes explantes foram cultivados no meio ED, no escuro, para a diferenciação dos embriões.

A presença de luz durante o cultivo dos estaminóides nos meios de indução (PCG e SCG) teve efeito altamente inibitório na indução de calo embriogênico e no número de embriões por calo embriogênico (Tabela 5). Todos os estaminóides cultivados na presença de luz deram origem a calos do tipo 1.

Tabela 5. Influência da luz na freqüência de formação de calos embriogênicos e número de embriões por calo.

Tratamento	Calo Embriogênico (%)	Número de Embriões/Calo
Escuro	36,67 ± 4,2 ^A	10,00 ± 4,5
Luz	3,33 ± 4,6	0,33 ± 0,5

^(A)Intervalo de confiança a 95% de probabilidade.

Influência do pré tratamento em baixa temperatura

O tratamento de flores e inflorescências em 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 em torno de uma

semana apresentam uma resposta embriogênica mais elevada em comparação com explantes não tratados. Os efeitos da baixa temperatura variam de espécie para espécie, mas, em geral, leva a uma desaceleração do metabolismo celular. 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 de 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. 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 em pré tratamento com baixa temperatura (Tabela 6).

Tabela 6. Influência do pré tratamento a 4 ± 1 °C durante 24 horas na frequência de formação de calos embriogênicos e número de embriões por calo.

Tratamento	Calo Embriogênico (%)	Número de Embriões/Calo
Controle	$46,67 \pm 12,8$	$5,33 \pm 0,3$
Pré Tratamento	$26,67 \pm 16,6$	$2,33 \pm 0,7$

^(A) Intervalo de confiança a 95% de probabilidade.

Comparação de botões florais de diferentes comprimentos

Diferentes tipos de explantes tem sido utilizados em embriogênese somática de cacau. Entretanto, dos tecidos somáticos de cacau, que podem dar origem a clones de plantas matrizes apenas tecido nucelar, pétalas e estaminóides têm dado resultados satisfatórios, sendo os estaminóides os que mais 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 desenvolvidos respondem melhor. Desta forma, visando verificar a influência da idade e do grau de desenvolvimento na embriogênese somática de cacau, botões florais de 4, 6 e 8 mm foram avaliados. Estes tamanhos foram escolhidos por serem facilmente distinguidos entre si e, além disso, os botões de 3 mm eram de difícil manipulação e os maiores que 8 mm já se encontravam no início da antese, com abertura dos botões florais.

Observa-se pela Tabela 7 que a frequência de calos embriogênicos e número de embriões por calo aumentaram com o aumento do tamanho do botão floral. A frequência de calos embriogênicos variou de 11,88% para botões florais de 4,0mm para 45% em botões florais de 8,0mm, com valores intermediários para botões florais de 6,0mm. O valor máximo de frequência de calos embriogênicos encontrado pode ser considerado elevado tendo como referência os resultados apresentados por Li et al. (1998).

Não se sabe as razões pelas quais botões florais maiores tenham dado os melhores resultados, já que o esperado era que os mais novos, com menor grau de diferenciação viessem a responder com taxas mais elevadas de embriogênese.

O número de embriões somáticos por calo embriogênico foi igualmente influenciado pelo tamanho do botão floral, variando de 4,38 a 7,50. Entretanto, é possível observar que a frequência de calos embriogênicos foi mais afetada pela redução do tamanho do botão floral que o número de embriões por calo embriogênico.

Uma possível hipótese para explicar a influência do tamanho do botão floral na resposta embriogênica é a que diz respeito aos níveis endógenos de hormônios durante o desenvolvimento floral e antese. É sabido que, próximo da antese, ocorre um aumento do nível endógeno de substâncias hormonais, principalmente auxina e etileno, que regulam o processo de abertura da flor. O etileno continua agindo mesmo após a fecundação e é responsável pela queda dos restos florais. Assim, o etileno endógeno pode estar exercendo algum efeito na indução de embriogênese somática de cacau.

Tabela 7. Influência do tamanho do botão floral na frequência de formação de calos embriogênicos e número de embriões por calo.

Tamanho do Botão Floral (mm)	Calo Embriogênico (%)	Número de Embriões/Calo
4,0	11,88 ± 2,6 ^A	4,38 ± 1,2
6,0	32,50 ± 6,4	6,00 ± 1,0
8,0	45,00 ± 5,0	7,50 ± 0,9

^(A) Intervalo de confiança a 95% de probabilidade.

Influência da injúria mecânica do estaminóide

Durante o processo embriogênico somático, têm sido observadas respostas distintas ao etileno. Em alguns sistemas o etileno atua de forma a estimular a resposta embriogênica ao passo que em outros, o efeito é inibitório. Em café, verificou-se efeito estimulatório ou inibitório do etileno sobre a resposta embriogênica, o que está de acordo com as respostas verificadas normalmente para reguladores de crescimento, onde se verificam efeitos estimulatórios em concentrações ótimas e efeitos inibitórios em concentrações supra ótimas (Hatanaka et al., 1995).

Visando testar o efeito da injúria mecânica, foram feitas pequenas incisões com o auxílio de um bisturi ao longo dos estaminóides em botões florais de 8,0 mm.

Embora tenha havido um aumento de 5,84 % na freqüência de explantes com formação de calos embriogênicos, esta diferença foi pouco expressiva. Por outro lado, a redução do número de embriões por explante foi considerável, de 5,67 para 3,33 embriões (Tabela 8).

Esses resultados podem ser considerados pouco conclusivos, tendo em vista que as incisões podem ter causado outros distúrbios que não apenas o da síntese de etileno.

Tabela 8. Influência da injúria mecânica no estaminóide na freqüência de formação de calos embriogênicos e número de embriões por calo.

Tratamento	Calo Embriogênico (%)	Número de Embriões/Calo
Sem injúria	50,83 ± 7,5 ^A (89,7)	5,67 ± 0,6 (100)
Com injúria	56,67 ± 6,4 (100)	3,33 ± 0,5 (58,7)

^(A) Intervalo de confiança a 95% de probabilidade

Visando investigar mais cuidadosamente o papel do etileno na indução de embriogênese somática de cacau, foram conduzidos alguns experimentos para avaliar o efeito de inibidores da ação e síntese de etileno, como íons prata na forma de nitrato e tiosulfato de prata e acetovinilglicina (AVG), respectivamente. Por outro lado, foi avaliado o efeito da adição de aminociclopropano (ACC), substância precursora da síntese de etileno.

Efeito do Nitrato de Prata, inibidor da ação do etileno, quando aplicado nos meios PCG, SCG e ED

O íon prata é considerado um dos mais potentes inibidores da ação do etileno. Embora este efeito não seja bem compreendido, supõe-se que o íon prata se liga a um possível receptor de etileno na membrana plasmática celular, com isso impedindo que as moléculas de etileno se liguem a este receptor e conseqüentemente desencadeie a ação específica desse hormônio.

A adição do nitrato de prata em todos os meios, mesmo em concentrações baixas (1 μ M) foi suficiente para inibir completamente a indução de formação de calos embriogênicos, o que sugere algum papel do etileno no processo embriogênico de cacau (Tabela 9).

Tabela 9. Influência de nitrato de prata na freqüência de formação de calos embriogênicos e número de embriões por calo, quando adicionado nos meios PCG, SCG e ED.

Nitrato de Prata (μ M)	Calo Embriogênico (%)	Número de Embriões/Calo
0,0	59,33 \pm 3,3 ^A	3,87 \pm 0,1
1,0	0,0	0,0
5,0	0,0	0,0
10,0	0,0	0,0
20,0	0,0	0,0

^(A) Intervalo de confiança a 95% de probabilidade.

Efeito do tiosulfato de prata, inibidor da ação do etileno, quando aplicado nos meios PCG, SCG e ED

O nitrato de prata, por ser uma substância oxidante pode acarretar efeitos indesejáveis ao meio de cultura e conseqüentemente ao explante. Desta forma, foi utilizado, para fins comparativos, o tiosulfato de prata, como fonte de íons prata, considerado menos tóxico à célula.

Observa-se, pela Tabela 10, que, de forma similar ao nitrato de prata, o tiosulfato de prata foi inibitório à formação de calos embriogênicos, em concentrações equimolares. A indução de calos embriogênicos de 2,5% para 1,0 μ M correspondeu a apenas 6,0% da obtida na ausência de tiosulfato de prata. Da mesma forma, observa-se uma redução na média de embriões por calo embriogênico de 7,67 para 1,6 embriões para o mesmo tratamento.

Tabela 10. Influência do tiosulfato de prata na frequência de formação de calos embriogênicos e número de embriões por calo, quando adicionado nos meios PCG, SCG e ED.

Tiosulfato de prata (μM)	Calo Embriogênico (%)	Número de Embriões/Calo
0,0	41,67 \pm 6,0 ^A	7,67 \pm 1,6
1,0	2,50 \pm 1,5	1,50 \pm 0,8
5,0	0,00	0,00
10,0	0,00	0,00
20,0	0,00	0,00

^AIntervalo de confiança a 95% de probabilidade

Efeito do nitrato de prata, inibidor da ação do etileno, quando aplicado alternativamente nos meios PCG, SCG e ED

Como o nitrato de prata parece apresentar resultados muito parecidos com os do tiosulfato de prata, foi adicionado alternativamente nos meios PCG, SCG, ED (primeiro cultivo) e ED (segundo cultivo), com o objetivo de avaliar o efeito da prata em diferentes fases do processo embriogênico (Tabela 11).

A adição de nitrato de prata em todos os meios, como observado anteriormente, inibiu totalmente a embriogênese somática. Da mesma forma, quando adicionado no meio PCG, a inibição foi completa. A adição no meio SCG resultou numa inibição, de 52,7% em relação ao controle. Por outro lado, a adição de nitrato de prata no meio ED, seja no primeiro ou segundo subcultivo não resultou em inibição da embriogênese havendo mesmo um pequeno aumento na taxa embriogênica de 16,9 e 14,8%, respectivamente, em relação ao controle. O número de embriões por calo foi afetado de forma similar pela presença de nitrato de prata nos diferentes meios.

Os resultados do presente experimento sugerem que a inibição da ação do etileno pelos íons prata afetam negativamente a indução de embriogênese somática em estaminóides de cacau durante as primeiras semanas de cultivo, quando os explantes se encontram no meio PCG, o qual contém 2,4-D e TDZ, sabidamente estimuladores da síntese de etileno em tecidos vegetais.

Portanto, o etileno parece intermediar a resposta embriogênica em estaminóides de cacau. A presença de íons prata não tem efeito inibitório nas fases posteriores de cultivo, sobretudo, no meio ED tanto no primeiro quanto no segundo subcultivo, havendo mesmo uma pequena resposta estimulatória, o que sugere que o etileno não tem nenhum papel relevante nessas fases de cultivo. É importante ressaltar que o aparecimento dos embriões só se inicia no final do primeiro cultivo de duas semanas no meio ED.

Tabela 11. Influência de nitrato de prata na concentração de 5,0 μM na frequência de formação de calos embriogênicos e número de embriões por calo, quando adicionado alternativamente nos diferentes meios.

Adição de Nitrato de Prata	Calo Embriogênico (%)	Número de Embriões/Calo
Em nenhum dos meios	40,50 \pm 5,3 ^A	11,17 \pm 1,6
Em todos os meios	0,0	0,0
Apenas no meio PCG	0,0	0,0
Apenas no meio SCG	21,33 \pm 4,4	8,00 \pm 1,7
Apenas no meio ED (primeiro cultivo)	47,33 \pm 3,5	8,00 \pm 1,7
Apenas no meio ED (segundo cultivo)	46,50 \pm 5,2	12,83 \pm 1,5

^(A) Intervalo de confiança a 95% de probabilidade.

Efeito de aminovinilglicina (AVG), inibidor da síntese do etileno, quando aplicado nos meios PCG, SCG e ED

Aminovinilglicina (AVG) é uma substância inibidora específica da síntese de etileno. Com isso, a sua adição aos diferentes meios de cultura deveria inibir a indução de embriogênese de forma similar ao ocorrido com os íons prata tanto do nitrato quanto do tiosulfato.

Observa-se, pela Tabela 12, que a adição de AVG inibiu a indução de formação de calos embriogênicos em até 66,7% para a concentração mais elevada. Parece haver uma estabilização do nível de inibição de AVG sobre a embriogênese, o que sugere a presença endógena de etileno anteriormente à adição de AVG ou que a presença de AVG, na forma como foi aplicado, não é suficiente, mesmo na maior concentração, para inibir totalmente a síntese de etileno. Entretanto, parece

não haver dúvida de que o etileno deve estar envolvido na reprogramação das células somáticas para células embriogênicas em estaminóides de cacau.

Tabela 12. Influência de AVG na freqüência de formação de calos embriogênicos e número de embriões por calo, quando adicionado no meio PCG.

AVG (μ M)	Calo Embriogênico (%)	Número de Embriões/Calo
0,0	65,00 \pm 6,6 ^A	8,95 \pm 1,4
1,0	58,17 \pm 6,2	9,68 \pm 1,6
10,0	31,67 \pm 6,1	6,30 \pm 1,4
20,0	23,17 \pm 3,4	10,27 \pm 1,2
40,0	21,67 \pm 6,9	7,17 \pm 1,6

^(A) Intervalo de confiança a 95% de probabilidade.

Efeito de aminovinilglicina (AVG), inibidor da síntese do etileno, quando aplicado alternativamente nos meios PCG, SCG e ED. A adição de AVG alternativamente nos diferentes meios resultou numa inibição da embriogênese semelhante ao observado para íons de prata, i.é, a inibição foi maior quando aplicada nos meios PCG e SCG. Quando adicionado no meio ED, principalmente no segundo subcultivo, a inibição foi substancialmente menor. Este resultado está de acordo com o observado para íons de prata e sugere a importância da síntese e ação do etileno na fase de indução de embriogênese, i. é, nas fases iniciais de cultivo, meios PCG e SCG (Tabela 13).

Tabela 13. Influência de AVG na concentração de 40,0 μ M na freqüência de formação de calos embriogênicos e número de embriões por calo, quando adicionado alternativamente nos meio PCG, SCG e ED.

Adição de AVG	Calo Embriogênico (%)	Número de Embriões/Calo
Em nenhum dos meios	56,67 \pm 11,6 ^A	5,67 \pm 1,0
Em todos os meios	35,00 \pm 8,3	9,00 \pm 0,5
Apenas no meio PCG	26,67 \pm 7,4	7,00 \pm 2,6
Apenas no meio SCG	31,67 \pm 8,1	5,33 \pm 1,4
Apenas no meio ED (primeiro cultivo)	35,00 \pm 4,0	10,33 \pm 3,3
Apenas no meio ED (Segundo cultivo)	48,33 \pm 7,4	10,00 \pm 1,6

^(A) Intervalo de confiança a 95% de probabilidade.

Efeito do ácido aminociclopropano (ACC), precursor imediato na rota de síntese do etileno, quando aplicado no meio PCG

O aminociclopropano (ACC) é um precursor imediato na rota de síntese do etileno. Sua adição ao meio de cultura foi avaliada com o intuito de verificar o papel do 2,4-D e TDZ na síntese de etileno. Desta forma, estas duas substâncias reguladoras de crescimento foram alternativamente substituídas por ACC no meio PCG, onde foi observado maior efeito dos inibidores de síntese e ação do etileno e respectiva inibição do processo embriogênico. Observa-se que a adição de 10 e 50 μM de ACC não resultou em aumento da resposta embriogênica quando adicionado no meio PCG desprovido de 2,4-D (Tabela 14).

Entretanto, quando a adição de ACC foi conduzida em meio PCG desprovido de TDZ, observou-se um aumento significativo de 10,8 para 29,7% do controle, mostrando um claro efeito do ACC e, conseqüentemente, do etileno como um dos possíveis intermediadores do papel do TDZ na indução de embriogênese somática em cacau (Tabela 15). Possivelmente, concentrações maiores de ACC poderão acarretar em aumentos adicionais na resposta embriogênica na ausência de TDZ.

Em relação ao número de embriões por calo, não se observou nenhum padrão de resposta definido (Tabela 15).

Deve-se notar igualmente que a ausência de 2,4-D no meio PCG resultou numa completa inibição do processo embriogênico (Tabela 14). De forma semelhante, a ausência de TDZ no meio PCG acarretou uma drástica redução na taxa de formação de calos embriogênicos, de 49,33 para 5,33% (Tabela 15). Estes resultados constituem evidências de que a combinação de 2,4-D e TDZ no meio PCG tem um efeito sinérgico no desencadeamento do processo embriogênico em estaminóides de cacau.

Tabela 14. Influência de 2,4-D e ACC no meio PCG, na freqüência de formação de calos embriogênicos e número de embriões por calo.

Tratamento	Calo Embriogênico (%)	Número de Embriões/Calo
Controle	60,00 \pm 2,3 ^A	8,67 \pm 1,2
2,4-D(-)	0,00	0,00
2,4-D(-) + 10 μM ACC	0,00	0,00
2,4-D(-) + 50 μM ACC	0,00	0,00

^(A) Intervalo de confiança a 95% de probabilidade.

Tabela 15. Influência de TDZ e ACC no meio PCG, na freqüência de formação de calos embriogênicos e número de embriões por calo.

Tratamento	Calo Embriogênico (%)	Número de Embriões/Calo
Controle	49,33 ± 7,3 ^A	4,00 ± 0,6
TDZ(-)	5,33 ± 1,3	4,33 ± 2,4
TDZ(-) + 10 μ M ACC	5,33 ± 2,6	3,00 ± 2,0
TDZ(-) + 50 μ M ACC	14,67 ± 1,3	3,67 ± 0,3

^(A) Intervalo de confiança a 95% de probabilidade.

Efeito do ácido Abscísico e sacarose, quando aplicados no meio ED

Embora a taxa de indução de calos embriogênicos para o genótipo Cenargen-2 tenha sido próxima a 50%, com uma média de 8 embriões por calo embriogênico, o índice de conversão desses embriões em plântulas foi inicialmente abaixo de 20%.

Dois tipos de embriões foram observados após o cultivo no meio ED, um de aspecto branco leitoso e outro branco amarelado, de aspecto translúcido. Observou-se que a taxa de conversão de embriões translúcidos era muito baixa, próxima de zero, ao passo que os embriões leitosos apresentavam uma elevada taxa de conversão a plantas, em torno de 60%.

Visando aumentar a percentagem de formação de embriões leitosos, embriões imaturos com comprimento médio de 3,9 mm foram inoculados no meio ED, contendo diferentes concentrações de sacarose combinadas com diferentes concentrações de ácido abscísico. Após um mês de cultivo nestes meios, foi feita nova avaliação do comprimento dos embriões e verificou-se que o comprimento médio em todos os tratamentos foi de 8,9 mm.

Após 30 dias de cultivo, nos diferentes tratamentos, verificou-se uma redução da percentagem de formação de embriões translúcidos e um respectivo aumento da percentagem de formação de embriões leitosos (Tabela 16), tanto em função do aumento da concentração de ABA quanto na de sacarose. A percentagem de embriões translúcidos foi de 71,1 na presença de 3% e 0,0 μ M de ABA, contra 29,4 para 15 μ M de ABA, para a mesma concentração de sacarose. Por sua vez, a percentagem de embriões leitosos foi de 28,9 e 70,6, respectivamente,

para as mesmas concentrações. Entretanto, para o nível de ABA de 0,0 μ M, a percentagem de formação de embriões leitosos aumentou de 28,9 para o nível de sacarose de 3% para 86,1 para 10,0% de sacarose. Portanto, há evidências de que a sacarose parece ter um efeito superior ao ABA na formação de embriões leitosos, em detrimento da formação de embriões translúcidos. Observa-se, igualmente, um efeito complementar na combinações mais elevadas de ABA e sacarose.

Após os tratamentos de ABA x sacarose, apenas os embriões leitosos provenientes dos respectivos tratamentos foram transferidos para meio de germinação, em meio PR, sem ABA e com a concentração de sacarose de 3%, onde permaneceram por 60 dias até serem avaliados em termos de germinação.

A taxa de germinação após o cultivo por sessenta dias em meio PR mostrou um efeito acentuado dos tratamentos de ácido abscísico e sacarose (Tabela 16). A taxa de germinação subiu de 58,3 para 99,3 em função dos tratamentos utilizados. Em níveis baixos de sacarose, observou-se uma influência positiva do ácido abscísico. Entretanto, em níveis mais altos de sacarose, 8% e 10%, a influência do ácido abscísico foi sensivelmente menor.

De qualquer forma, pode-se concluir que, tanto a presença de ABA quanto de sacarose em concentrações mais altas que 3% contribuem para a taxa de formação de embriões translúcidos e aumento da taxa de embriões leitosos, havendo um efeito sinérgico entre estes fatores. O efeito de ABA e sacarose refletem igualmente na taxa de germinação dos embriões leitosos, i. é, mesmo para embriões leitosos, observou-se uma diferente capacidade de germinação em função do prévio tratamento com ABA e sacarose.

Tabela 16. Influência do teor de sacarose combinada com ácido abscísico no meio ED na formação de embrião translúcido e leitoso, após 30 dias de cultivo, bem como na taxa de germinação de embriões leitosos após 60 dias de cultivo em meio PR, sem ABA na presença de 3% de sacarose.

Sacarose(%)	Ácido Abscísico (μ M)	Embrião Translúcido (%)	Embrião Leitoso (%)	Taxa de Germinação leitosos (%)
3	0	71,1 \pm 16,7 ^A	28,9 \pm 16,8	58,3 \pm 6,5
	5	33,6 \pm 14,2	66,4 \pm 14,2	92,5 \pm 4,9
	10	37,1 \pm 17,6	62,9 \pm 17,6	95,0 \pm 3,9
	15	29,4 \pm 9,7	70,6 \pm 9,8	93,0 \pm 4,3
6	0	19,5 \pm 7,3	80,5 \pm 7,3	83,5 \pm 7,5
	5	14,3 \pm 6,5	85,7 \pm 6,4	95,0 \pm 5,4
	10	19,5 \pm 6,4	80,5 \pm 6,4	94,1 \pm 4,9
	15	12,8 \pm 8,4	87,2 \pm 8,4	97,3 \pm 3,4
8	0	13,2 \pm 6,4	86,8 \pm 6,4	86,4 \pm 8,2
	5	4,7 \pm 3,2	95,3 \pm 3,2	97,5 \pm 3,8
	10	8,8 \pm 8,1	91,2 \pm 8,1	98,1 \pm 2,0
	15	10,8 \pm 7,0	89,2 \pm 7,8	97,9 \pm 8,0
10	0	13,9 \pm 7,6	86,1 \pm 7,6	81,9 \pm 9,7
	5	5,0 \pm 3,1	95,0 \pm 3,1	98,8 \pm 1,9
	10	3,6 \pm 3,8	96,4 \pm 3,8	99,3 \pm 1,3
	15	6,8 \pm 4,8	93,2 \pm 4,8	97,8 \pm 3,9
Média	Geral			-

^(A) Intervalo de confiança a 95% de probabilidade.

Avaliação de genótipos procedentes do Centro de Pesquisa do Cacau (CEPEC-CEPLAC)

Após os testes de otimização do processo embriogênico em cacau, oito genótipos do campo experimental do CEPEC-CEPLAC foram avaliados quanto a resposta embriogênica.

A resposta embriogênica variou substancialmente de acordo com o genótipo, de 0,0 para o genótipo SGU-2 a 25,6 para o genótipo VB-902. O número de embriões por calo embriogênico variou de 0,0 a 7,8 dependendo do genótipo.

Tabela 17. Frequência de formação de calos embriogênicos e número de embriões por calo em estaminóides de oito genótipos procedentes da CEPLAC.

Genótipo	Calo Embriogênico(%)	Número de embriões/calos
SGU-2	0,0	0,0
CEPEC-51	0,5 ± 0,9 ^A	1,5 ± 2,7
SCAV-6	2,0 ± 2,8	0,9 ± 1,3
TSH-792	3,3 ± 3,7	0,8 ± 0,9
CCN-10	12,5 ± 4,5	3,8 ± 1,2
TSH-1188	14,0 ± 6,0	7,8 ± 3,9
VB-514	19,2 ± 15,8	6,3 ± 2,8
VB-902	25,6 ± 14,9	5,5 ± 2,2

^(A) Intervalo de confiança a 95% de probabilidade.

Aclimação das plântulas obtidas

As plântulas obtidas pela germinação dos embriões somáticos foram plantadas em tubetes contendo Plantmax® e imediatamente transferidas para casa de vegetação para aclimação, quando apresentavam 5 a 8 cm de altura e 2 ou 3 pares de folhas. A taxa de pegamento, neste novo ambiente, foi alta, embora não tenha sido feita uma avaliação criteriosa sobre este procedimento. Para propiciar uma melhor sobrevivência em casa de vegetação, tomou-se o cuidado de deixar as plantas em frascos Magenta® por algumas semanas, período durante o qual ocorreu uma substancial desidratação do meio de cultura.

As plantas encontram-se atualmente com 15 pares de folhas bem desenvolvidas e apresentam um desenvolvimento aparentemente normal.

Conclusões Gerais e Recomendações

Ao final, dos experimentos conduzidos, chegou-se às seguintes conclusões:

- A. O protocolo descrito por Li et al. (1998) foi expressivamente superior ao de Lopez-Baez et al. (1993);
- B. Houve influência marcante do genótipo sobre a resposta embriogênica;
- C. O estaminóide, em experimentos preliminares, apresentou melhor resposta embriogênica, quando comparado com outras fontes de explantes;
- D. Botões florais bem desenvolvidos, coletados, logo antes da abertura da flor foi a melhor fonte de estaminóides;
- E. O estaminóide deve ser excisado pela base, tomando-se o cuidado de permitir a retenção de alguma parte do receptáculo. Este tecido parece ser o mais embriogênico;
- F. O estaminóide deve ser cultivado no escuro e sob temperatura em torno de 25 °C;
- G. Qualquer tipo de injúria mecânica ao estaminóide pode afetar sua resposta embriogênica;
- H. A presença de 2,4-D e TDZ no meio PCG é fundamental para se obter uma alta taxa de embriogênese;
- I. Há evidências de que o etileno é um intermediador da ação do TDZ na indução de embriogênese em estaminóides de cacau e seu efeito ocorre nas primeiras duas semanas de cultivo, isto é, no meio PCG;
- J. Dois tipos de embriões foram observados ao final da quarta semana de cultivo no meio ED: leitoso e translúcido amarelado;
- K. O embrião leitoso apresentou uma taxa de germinação e conversão em plantas muito superior aos embriões translúcidos;
- L. O tratamento com altas concentrações de sacarose no meio ED resultou na formação de uma maior percentagem de embriões leitosos;
- M. Em baixas concentrações de sacarose, a presença de ABA levou ao aparecimento de uma maior percentagem de embriões leitosos;
- N. A taxa de germinação e conversão em plantas chegou a 99,3% para os embriões leitosos.
- O. As plântulas apresentaram um bom desenvolvimento na casa de vegetação com fenótipo parecido ao de plântulas derivadas de sementes.
- P. A resposta embriogênica dos genótipos procedentes da CEPLAC variou substancialmente entre si.

Referências Bibliográficas

- ALEMANNI, L.; BERTHOULY, M.; MICHAUX-FERRIÈRE, N. Embryogénese somatique du cacaoyer à partir de pièces florales. **Plantations, Recherches, Développement**, p. 225-237, Juillet-août, 1996.
- DRIVER, J. A.; KUNIYUKI, A. H. In vitro propagation of Paradox walnut rootstock. **HortScience**, Alexandria, VA, v. 19, p. 507-509, 1984;
- ESAN, E. B. Tissue culture studies on cacao (*Theobromae cacao* L.): a supplementation of current research. In: INTERNATIONAL CACAO RESEARCH CONFERENCE, 5., 1875. **Proceedings**. Ibadan, Nigeria: Cacao Research Institute, 1977. p. 116-125.
- FIGUEIRA, A.; JANICK, J. Development of nucellar somatic embryos of *Theobromae cacao*. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 336, p. 231-238, 1993.
- HATANAKA, T.; SAWABE, E.; AZUMA, T.; UCHIDA, N.; YASUDA, T. The role of ethylene in somatic embryogenesis from leaf discs of *Coffea canephora*. **Plant Science**, v. 107, p. 199-204, 1995;
- LI, Z.; TRAORE A.; MAXIMOVA, S.; GUILTINAN, M. J. Somatic embryogenesis and plant regeneration from floral explants of cacao (*Theobroma cacao* L.) using thidiazuron. **In Vitro Cellular & Developmental Biology: Plant**, Largo, MD, v. 34, p. 293-299, 1998.
- LITZ, R. E. Tissue culture studies with *Theobroma cacao*. In: DIMICK, P. S. (Ed.). **Proceedings of the Cacao Biotechnology Symposium**. Pennsylvania State: University Park, 1986. p. 111-120.
- LOPEZ-BAEZ, O.; BOLLON, H., ESKES, A.; PETIARD, V. Embryogénese somatique de cacaoyer *Theobroma cacao* L. à partir de pièces florales. **C.R. Acad. Sci.: Sciences de la Vie**, Paris, v. 316, p. 579-584, 1993.
- LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Combined Proceedings of Annual Meetings of International Plant Propagators' Society**, Seattle, WA, v. 30, p. 421-427, 1980.

Otimização da metodologia de embriogênese somática visando a propagação clonal de genótipos elite de cacau (*Theobroma cacao* L.)

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473 - 497, 1962.

NOVÁK, F. J. DONINI, B.; OWUSU, G. Somatic embryogenesis and in vitro plant development of cocoa (*Theobroma cacao*). In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON NUCLEAR TECHNIQUES AND IN VITRO CULTURE FOR PLANT IMPROVEMENT. **Proceedings**. Vienna: IAEA, 1986. p. 443-449.

PENCE, V. C.; HASEGAWA, P. M.; JANICK, J. Asexual embryogenesis in *Theobroma cacao* L. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, VA, v. 104, p.145-148, 1979.

SÖNDAHL, M. R.; LIU, S.; BELLATO, C. M.; BRAGIN, A. Cacao somatic embryogenesis. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 336, p. 245-248, 1993.