



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

MILA CRISTINE ALMEIDA DOS SANTOS

**CRIOPRESERVAÇÃO DE CALOS E RESPOSTAS À INDUÇÃO
DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E À REGENERAÇÃO DE
PLANTAS EM MÚLTIPLOS ACESSOS DE CACAUEIRO
(*Theobroma cacao* L.)**

Brasília - DF
2024

MESTRADO EM BOTÂNICA

MILA CRISTINE ALMEIDA DOS SANTOS

**CRIOPRESERVAÇÃO DE CALOS E RESPOSTAS À INDUÇÃO DA
EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E À REGENERAÇÃO DE
PLANTAS EM MÚLTIPLOS ACESSOS DE CACAUEIRO
(*Theobroma cacao* L.)**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em Botânica,
como requisito para a obtenção do título de
Mestre em Botânica pela Universidade de
Brasília

Jonny Everson Scherwinski-Pereira
Orientador

Inaê Mariê Araújo Silva-Cardoso
Coorientadora

Brasília - DF
2024

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

Figura 1. Mapa de produção de sementes de cacauzeiros em toneladas em 2022.....21

CAPÍTULO I

Figura 1. Caracterização morfológica de flores de *Theobroma cacao* L. (cacauzeiro).....58

Figura 2. Representação dos experimentos de pré-cultivo em sacarose e de imersão em diferentes períodos nas soluções crioprotetoras para criopreservação de diferentes genótipos de *Theobroma cacao* L. (cacauzeiro). 59

Figura 3. Tipos de explantes de *Theobroma cacao* L. (cacauzeiro) utilizados no experimento.....61

Figura 4. Representação das etapas de *Vitrification* aplicadas ao genótipo não comercial 752 de *Theobroma cacao* L..... 63

Figura 5. Representação das etapas de *Droplet Vitrification* nos aplicadas ao genótipo não comercial 752 de *Theobroma cacao* L. 65

Figura 6. Representação das etapas da técnica *Droplet vitrification*, sem pré-cultivo em sacarose, aplicada ao genótipo 752 (não comercial) de *Theobroma cacao* L..... 67

Figura 7. Representação das etapas das técnicas *vitrification* e *slow cooling* aplicada aos estaminódios do genótipo 762 (não comercial) de *Theobroma cacao* L. 69

Figura 8. Equipamentos utilizados para aplicação dos tratamentos de congelamento de estaminódios com calos de *Theobroma cacao* L. (cacauzeiro).....70

- Figura 9.** Percentual de sobrevivência dos explantes (capacidade de formação de calos) de *Theobroma cacao* L. do genótipo 752, após imersão por diferentes tempos em *loading solution* e inoculação em meio de indução de calos (7, 14 e 28 dias). 73
- Figura 10.** Análise de taxa de oxidação de calos primários do genótipo comercial 752 de *Theobroma cacao* L., após imersão em *loading solution* por diferentes períodos, e avaliados durante o cultivo em meio de indução de calos (7, 14 e 28 dias). 74
- Figura 11.** Avaliação da sobrevivência (capacidade de formação de calos) dos estaminódios de *Theobroma cacao* L. do genótipo CCN-51 submetidos a diferentes tempos de imersão em *loading solution* e avaliados durante o cultivo em meio de indução de calos (7, 14 e 28 dias). 75
- Figura 12.** Reação de oxidação de calos primários no genótipo CCN-51 de *T. cacao* imersos em *loading solution* e inoculados por até 28 dias em meio MIC. 76
- Figura 13.** Efeito de diferentes tempos de imersão de estaminódios (genótipo não comercial 752) com calos (região basal) de cacaueteiro (*Theobroma cacao* L.) em solução PVS2, independentemente da imersão ou não em Nitrogênio Líquido..... 77
- Figura 14.** Efeito de diferentes tempos de imersão de estaminódios (genótipo não comercial 762) com calos (região basal) de cacaueteiro (*Theobroma cacao* L.) em solução PVS2, independentemente da imersão ou não em Nitrogênio Líquido..... 78
- Figura 15.** Aspectos morfológicos de calos de *Theobroma cacao* L. (genótipo 752) submetidos a diferentes pré-tratamentos para criopreservação, imersos ou não em nitrogênio líquido (NL+ e NL-, respectivamente)..... 79
- Figura 16.** Comparação com diferentes tratamentos de criopreservação e sua relação com os tipos de explantes de *Theobroma cacao* L. (cacaueteiro)..... 81

Figura 17. Morfologia (A-B) e anatomia (C-L) de estaminódios e calos de *Theobroma cacao* L. (genótipo 752), após criopreservação via técnicas *vitrification* -V (C-H) e *droplet*-..... 83

Figura 18. Morfologia (A-B) e anatomia (C-H) de calos de *Theobroma cacao* L. (genótipo 752), após criopreservação via técnicas *vitrification* - V e NL- (B-D, H), NL+ (G) e *droplet-vitrification*- DV e NL- (A, E-F) *vitrification*- DV (I-L). A, C-E, I-J. Calos novos ausentes. B, F-H, K-L.....86

Figura 19. Caracterização morfológica de explantes do genótipo 752 de *Theobroma cacao* L. (cacaueiro) em tratamento controle (NL-) e criopreservados (NL+); estaminódio inteiro com calo na parte basal (A, C, E, G) e parte basal do estaminódio com calo (B, D, F, H).....88

Figura 20. Efeito de diferentes tratamentos para criopreservação sobre a formação de calo (independente do tipo de calo) e de diferentes tipos de calos (%) a partir de estaminoides inteiros com calos e região basal do estaminódio com calos de *Theobroma cacao* L..... 89

Figura 21. Efeito de diferentes tratamentos para criopreservação sobre os percentuais de área do explante coberta por calos, e formação de embriões somáticos a partir de estaminódios de *Theobroma cacao* L.....91

Figura 22. Respostas de dois tipos de explantes (estaminódio inteiro e região basal com calo) de *Theobroma cacao* L., independentemente do tratamento de criopreservação utilizado, com relação aos percentuais de cobertura do explante por calos, oxidação dos calos e a formação de embriões somáticos.....92

Figura 23. Caracterização morfológica de estaminódios do genótipo 762 de *Theobroma cacao* L. (cacaueiro) em tratamento controle (NL-) e criopreservados (NL+).....94

CAPÍTULO II

- Figura 1.** Casa de vegetação com controle de temperatura e umidade com genótipos não comerciais de *Theobroma cacao* L. (cacaueiro)..... 125
- Figura 2.** Ilustração das avaliações morfométricas de botões florais e estaminódios de cacaueiro.....126
- Figura 3.** Caracterização morfológica de botões florais e estaminódios de *Theobroma cacao* L. (cacaueiro)..... 131
- Figura 4.** Histogramas, diagramas de dispersão e coeficientes de correlação entre as variáveis morfométricas (n = 5) de estruturas florais de *Theobroma cacao* L. (cacaueiro).
..... 133
- Figura 5.** Agrupamento dos genótipos de *Theobroma cacao* (L.) baseado no valor médio do comprimento dos estaminódios usando o Scott-Knott, $\alpha=5\%$ 134
- Figura 6.** Médias das variáveis analisadas conforme os genótipos não- comerciais *Theobroma cacao* L. (cacaueiro)..... 137
- Figura 7.** Fases da rota da embriogênese somática de *Theobroma cacao* L., a partir de estaminódios de cacaueiro..... 144
- Figura 8.** Percentual de formação de 11 ou mais embriões somáticos, independente do genótipo avaliado, porém dentro dos agrupamentos de percentuais de recobrimento de estaminódios com calo, após 30 dias em MDE..... 152
- Figura 9.** Médias das quantidades de embriões somáticos de cacaueiros nos estádios globular, torpedo e anormais..... 146

- Figura 10.** Médias de embriões somáticos de *Theobroma cacao* (cacaueiro) nos estádios de desenvolvimento similares ao cordiforme e cotiledonar..... 147
- Figura 11.** Estádios de desenvolvimento de embriões somáticos de *Theobroma cacao* L. (cacaueiro)..... 149
- Figura 12.** Caracterização anatômica dos estádios dos embriões somáticos de cacaueiros..... 150
- Figura 13.** Caracterização morfológica de embriões somáticos de *Theobroma cacao* L. (cacaueiro) em meio de regeneração de plantas..... 152

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Composição dos meios de cultivo de *Theobroma cacao* L. conforme protocolo de Li et al. (1998) e modificações.....62

Tabela 2. Avaliação do pré-cultivo de estaminódios dos genótipos comerciais de *Theobroma cacao* L. 72

Tabela 3. Efeito de diferentes tratamentos (com ou sem osmoproteção seguido ou não de imersão em Nitrogênio Líquido) sobre os percentuais de formação de calo, cobertura do explante com calo, oxidação e formação de calo granular, nodular e semi-friável de explantes florais de *Theobroma cacao* L. (cacaueiro). 95

CAPÍTULO II

Tabela 1. Genótipos não comerciais de *Theobroma cacao* L. (cacaueiro) para a avaliação de características fenotípicas das flores e estaminódios e do potencial de formação de embriões somáticos. 125

Tabela 2. Composição dos meios de cultivo conforme protocolo de Li et al. (1998) para a embriogênese somática de diferentes genótipos não- comerciais de *Theobroma cacao* L.....128

Tabela 3. Classificação dos genótipos de *Theobroma cacao* L. (cacaueiro) quanto à coloração de botões florais e estaminódios. 132

Tabela 4. Avaliação da diferença dos comprimentos médios dos estaminódios de *Theobroma cacao* L. (cacaueiro) entre os grupos, usando o *effect size*, à 5% de significância via teste de Scott-Knott..... 135

Tabela 5. Comparação média de comprimento entre estaminódios vermelhos e roxos de *Theobroma cacao* L. (cacaueiro), a 5% de significância, pelo teste t. 135

- Tabela 6.** Agrupamento dos 24 genótipos de *Theobroma cacao* L. (cacaueiro) com base no percentual de recobrimento de estaminódios com calos, por meio do algoritmo *k-means clustering*. 139
- Tabela 7.** Agrupamento dos genótipos não-comerciais de *Theobroma cacao* L. (cacaueiro) em relação a região de formação de calos em explantes florais (estaminódios), aos 21 dias em meio de indução de calos..... 142
- Tabela 8.** Agrupamento dos genótipos não-comerciais de *Theobroma cacao* L.(cacaueiro) em relação ao percentual de oxidação de calos oriundos de estaminódios, aos 14 dias em meio de multiplicação de calos. 143
- Tabela 9.** Agrupamento dos genótipos de *Theobroma cacao* L. (cacaueiro) em relação à formação de embriões somáticos em comparação ao percentual de oxidação dos calos aos 30 dias em meio de desenvolvimento de embriões somáticos. 145
- Tabela 10.** Número total de embriões somáticos formados nos genótipos de *Theobroma cacao* L. (cacaueiro) em diferentes estádios de desenvolvimento (n=20), após 15 dias em MDE.....143

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

2,4,5-T	2,4,5-ácido triclorofenoxiacético
2,4-D	Ácido-diclorofenoxiacético
BAP	Benzilaminopurina
DMSO	Dimetilsulfóxido
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
ES	Embriões Somáticos
FAOSTAT	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
G%	Porcentagem de Germinação
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICCO	<i>International Cocoa Organization</i>
IVG	Índice de Velocidade de Germinação
LS	<i>Loading Solution</i>
MDE	Meio de Desenvolvimento de Embriões Somáticos
MIC	Meio de Indução de Calos
MMC	Meio de Multiplicação de Calos
MRP	Meio de Regeneração de Plantas
MS	Murashige e Skoog
NaClO	Hipoclorito de Sódio
NL-	Não imersão em nitrogênio líquido
NL+	Imersão em nitrogênio líquido
PVS	<i>Plant Vitrification Solution</i>
RS	<i>Rewarming Solution</i>
TDZ	Thidiazuron

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	17
2	REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1	Informações geográficas, centro de origem e dispersão de cacauero (<i>Theobroma cacao</i> L.).....	21
2.2	Informações botânicas sobre o cacauero.....	22
2.3	Propagação do cacauero.....	24
2.3.1	Propagação por semente e vegetativa convencional.....	24
2.3.2	Cultura de tecidos	26
2.3.3	Conservação de recursos genéticos.....	29
2.3.4	Técnicas de criopreservação.....	32
3	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34

CAPÍTULO I

ESTABELECIMENTO DE PROTOCOLO PARA A CRIOPRESERVAÇÃO DE CALOS DE CACAUEIRO (*Theobroma cacao* L.)

	RESUMO.....	52
	ABSTRACT.....	54
1	INTRODUÇÃO.....	55
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	57
2.1	Material vegetal	57
2.2	Técnicas de pré-condicionamento	58
2.2.1	Pré- cultivo em sacarose.....	59
2.2.2	Imersão em <i>loading solution</i> (LS)- osmoproteção	59
2.2.3	Imersão em solução de <i>plant vitrification solution 2</i> (PVS2)- osmoproteção.....	60
2.3	Primeira tentativa de criopreservação	60
2.3.1	Criopreservação - Aplicação das técnicas <i>vitrification</i> e <i>droplet vitrification</i>	60
2.3.1.1	Controle.....	61
2.3.1.2	<i>Vitrification</i>	63
2.3.1.3	<i>Droplet Vitrification</i>	64
2.3.1	Análises anatômicas.....	65

2.4	Segunda tentativa de criopreservação	66
2.4.1	Criopreservação - Aplicação da técnica <i>droplet vitrification</i> sobre dois tipos de explantes.....	66
2.5	Criopreservação - Aplicação de diferentes tratamentos de <i>slow cooling</i> e <i>vitrification</i>	68
3	RESULTADOS	71
3.1	Estabelecimento das condições iniciais para criopreservação (pré-condicionamento).....	71
3.1.1	Pré- cultivo em sacarose	71
3.1.2	Imersão em <i>loading solution</i> (LS).....	73
3.1.3	Imersão em solução de <i>plant vitrification solution 2</i> (PVS2).....	76
3.2	Primeira tentativa de criopreservação	79
3.2.1	Efeitos da aplicação das técnicas <i>vitrification</i> e <i>droplet vitrification</i> sobre dois tipos de explantes	79
3.2.1.1	Análises morfológicas	79
3.2.1.2	<i>Vitrification</i> (estatística)	80
3.2.1.3	Comparação das técnicas <i>Vitrification</i> e <i>Droplet Vitrification</i>	81
3.2.2	Aspectos morfoanatômicos de propágulos de <i>Theobroma cacao</i> L. criopreservados.....	82
3.2.2.1	Respostas aos 45 dias em meio de indução de calos (MIC)	82
3.2.2.2	Respostas aos 90 dias em meio de desenvolvimento de embriões somáticos (MDE)	85
3.3	Segunda tentativa de criopreservação	87
3.3.1	Aplicação da técnica <i>droplet vitrification</i> sobre dois tipos de explantes	87
3.3.1.1	Respostas morfológicas	87
3.3.1.2	Respostas estatísticas.....	89
3.4	Efeitos de diferentes tratamentos de <i>slow cooling</i> e <i>vitrification</i>	93
3.4.1	Respostas morfológicas	93
3.4.2	Respostas estatísticas.....	94
4	DISCUSSÃO.....	96
4.1	Tratamentos pré-condicionamento – pré- cultivo e imersão em <i>loading solution</i> (LS) e <i>plant vitrification solution 2</i> (PVS2)	96

4.2	Primeira tentativa de criopreservação	98
4.2.1	Efeitos da aplicação das técnicas <i>vitrification</i> e <i>droplet vitrification</i> sobre dois tipos de explantes.....	98
4.2.1.1	Aspectos morfoanatômicos de propágulos de <i>T. cacao</i> criopreservados	99
4.2.1.1.1	Respostas aos 45 dias em meio de indução de calos (MIC)	99
4.2.1.1.2	Respostas aos 90 dias em meio de desenvolvimento de embriões somáticos (MDE)	101
4.3	Segunda tentativa de criopreservação	101
4.3.1	Aplicação da técnica <i>droplet vitrification</i> sobre dois tipos de explantes	101
4.4	Efeitos de diferentes tratamentos de <i>slow cooling</i> e <i>vitrification</i>	102
5	CONCLUSÕES	104
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	106

CAPÍTULO II

CARACTERIZAÇÃO DA MORFOMETRIA FLORAL E RESPOSTAS À INDUÇÃO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E REGENERAÇÃO DE PLANTAS DE MULTIPLOS ACESSOS DE CACAUEIRO (*Theobroma cacao* L.)

CARACTERIZAÇÃO DA MORFOMETRIA FLORAL E RESPOSTAS À INDUÇÃO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E À REGENERAÇÃO DE PLANTAS DE MULTIPLOS ACESSOS DE CACAUEIRO (*Theobroma cacao* L.)

RESUMO.....	119	
ABSTRACT.....	121	
1	INTRODUÇÃO.....	123
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	124
2.1	Material vegetal	124
2.2	Medições de características morfológicas de explantes florais de diferentes genótipos de cacauero	125
2.3	Embriogênese somática a partir de diferentes genótipos de cacauero	126
2.4	Regeneração de plantas de cacauero.....	129
2.5	Análises anatômicas.....	130
3	RESULTADOS	131
3.1	Caracterização fenotípica de explantes florais dos diferentes genótipos	131
3.2.1	Correlação entre as variáveis morfológicas.....	132

3.2.2	Análises relacionadas aos estaminódios	133
3.2.3	Análises descritivas para as demais variáveis.....	136
3.3	Embriogênese somática de diferentes genótipos	138
3.3.1	Percentual de recobrimento dos estaminódios com calos	138
3.3.2	Tipos de calos formados e região de formação.....	140
3.3.3	Percentual de oxidação de calos formados	142
3.3.4	Percentual de formação de embriões somáticos	143
3.4	Caracterização morfoanatômica da diferenciação de embriões somáticos de cacauero	147
3.5	Germinação de embriões somáticos do cacauero	150
4	DISCUSSÃO.....	153
4.1	Caracterização fenotípica de explantes florais de diferentes genótipos de cacauero utilizados para indução da embriogênese somática	153
4.1.1	Correlação entre as variáveis morfológicas	153
4.1.2	Análises relacionadas aos estaminódios	154
4.1.3	Análises descritivas para as demais variáveis.....	155
4.2	Embriogênese somática de diferentes genótipos	156
4.2.1	Percentual de recobrimento dos estaminódios com calos	156
4.2.2	Tipos de calos formados e região de formação.....	156
4.2.3	Percentual de oxidação de calos formados	157
4.2.4	Percentual de formação de embriões somáticos	157
4.3	Caracterização morfoanatômica da diferenciação de embriões somáticos e regeneração de plantas de cacauero	159
5	CONCLUSÃO.....	161
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	163

RESUMO GERAL

O Brasil abriga um dos maiores Bancos de Germoplasma de cacaueteiro do mundo, com mais de 4.500 acessos conservados em campo. No entanto, esses acessos estão ameaçados por condições ambientais adversas. Este estudo teve como um dos objetivos avaliar estratégias de conservação *ex situ* de cacaueteiros por meio da criopreservação de calos a partir de diferentes acessos, tipos de explantes e métodos de criopreservação. Num segundo momento, o trabalho se propôs a avaliar o efeito genotípico de 24 genótipos de cacaueteiros quanto a indução da embriogênese somática e regeneração de plantas. No primeiro experimento, acessos comerciais (CCN-51, CEPEC 2002 e PH 16) e não comerciais (752 e 762) foram estudados, utilizando explantes de estaminódios inteiros e a parte basal dos estaminódios. Analisaram-se pré-tratamentos de criopreservação, como pré-cultivo em sacarose e tempos de imersão em soluções de vitrificação (PVS2) e técnicas como vitrificação, *droplet vitrification* e *slow cooling*. O potencial embriogênico e reações adversas também foram avaliados. Os resultados mostraram que, no pré-cultivo em sacarose, os genótipos comerciais apresentaram altas taxas de sobrevivência de calos, com destaque para CCN-51 e CEPEC 2002, que atingiram 100%. Na imersão em *loading solution*, o genótipo 752 obteve 100% de formação de calos em tempos de imersão mais longos. Nos experimentos de imersão em PVS2 e nitrogênio líquido (NL), observou-se uma redução significativa na viabilidade de calos, especialmente em explantes oriundos de partes basais. Na *droplet vitrification*, foram encontrados mais calos com células embriogênicas, embora houvesse a presença de oxidação em grande parte das amostras. No segundo experimento, foram avaliados 24 genótipos quanto à embriogênese somática. A análise fenotípica revelou variações de coloração nos botões florais e estaminódios. A formação de calos variou significativamente entre os genótipos, com destaque para aqueles que apresentaram calos granulares e nodulares. Após 35 dias, observou-se formação de embriões somáticos, que se desenvolveram principalmente na base dos estaminódios. O genótipo 4025 M153 se destacou com 330 embriões formados, porém, muitos embriões apresentaram má formação, necessitando de ajustes nos protocolos. Concluiu-se que a criopreservação em ultrabaixas temperaturas manteve a viabilidade dos calos, mas futuras otimizações são necessárias. A embriogênese somática também revelou variações genotípicas, sugerindo que ajustes nos protocolos podem melhorar a regeneração de plantas completas.

Palavras-chave: Calogênese, Embriogênese somática, Germoplasma, Crioconservação.

Abstract

Brazil hosts one of the largest cacao germplasm banks in the world, with over 4,500 accessions conserved in the field. However, these accessions are threatened by adverse environmental conditions. One of the aims of this study was to evaluate *ex situ* conservation strategies for cacao through the cryopreservation of calli from different accessions, explant types, and cryopreservation methods. Additionally, the study aimed to assess the genotypic effect of 24 cacao genotypes on the induction of somatic embryogenesis and plant regeneration. In the first experiment, commercial (CCN-51, CEPEC 2002, and PH 16) and non-commercial accessions (752 and 762) were studied, using whole staminode explants and basal staminode parts. Pre-cryopreservation treatments, such as pre-culturing in sucrose and immersion times in vitrification solutions (PVS2), as well as vitrification techniques, droplet vitrification, and slow cooling, were analyzed. Embryogenic potential and adverse reactions were also evaluated. The results showed that the commercial genotypes exhibited high callus survival rates in sucrose pre-culture, with CCN-51 and CEPEC 2002 achieving 100%. Genotype 752 obtained 100% callus formation with longer immersion times in the loading solution immersion. In the PVS2 and liquid nitrogen (LN) immersion experiments, a significant reduction in callus viability was observed, especially in explants from basal parts. In droplet vitrification, more calli with embryogenic cells were found, although oxidation was present in a large portion of the samples. In the second experiment, 24 genotypes were evaluated for somatic embryogenesis. Phenotypic analysis revealed variations in the coloration of floral buds and staminodes. Callus formation varied significantly among genotypes, with granular and nodular calli standing out. After 35 days, somatic embryos were observed, primarily developing at the base of the staminodes. Genotype 4025 M153 stood out with 330 embryos formed; however, many embryos showed malformation, requiring protocol adjustments.

Keywords: Callogenesis, somatic embryogenesis, Germplasm, Cryoconservation.

1 INTRODUÇÃO GERAL

Theobroma cacao, também conhecido como cacauzeiro, faz parte da família Malvaceae (Shen et al., 2020) e possui em torno de 22 espécies em seu gênero (Souza; Venturieri, 2010). Como cultura comercial, o cacauzeiro é cultivado para a exploração dos seus frutos, em que suas sementes são usadas na fabricação de chocolate, manteiga de cacau e cosméticos (Mustiga et al., 2018), mas também pode ser inserido facilmente na alimentação na forma de cacau em pó e polpa de cacau. Ele pode ser encontrado em países com clima tropical, quente e úmido, e seus principais produtores mundiais localizam-se ao longo da linha do Equador, na África, América, Ásia e Oceania (KPMG et al., 2012).

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (2022), a produção de cacau em 2022 chegou a 273.873 toneladas em todo país. Os maiores produtores são os estados do Pará e da Bahia, correspondendo por 93% da produção nacional, com estimativas de produção de 144.200 toneladas e 106.000 toneladas, respectivamente (Sociedade Nacional de Agricultura, 2021). Atualmente, o Brasil é o sétimo maior produtor, responsável por 4,6% da produção mundial, ficando atrás da Costa do Marfim (39,0%), Gana (14,5%), Indonésia (14,0%), Nigéria (6,3%), Equador (5,1%) e Camarões (5,0%), que reúnem mais de 88% da produção mundial (FAOSTAT et al., 2020).

É crescente a demanda do mercado pela amêndoa de cacau de qualidade e com características diferenciadas de sabor e aroma, os quais surgem com as especificidades do local de ocorrência e da forma de beneficiamento (Siviero; Macedo; Moreira, 2022). No entanto, alguns fatores podem comprometer a produtividade, com a ocorrência de pragas, doenças, envelhecimento dos pomares, alto custo dos insumos, uso de produtos de baixa qualidade, material vegetal, além de técnicas agronômicas inadequadas (Daouda et al., 2021).

De acordo com *International Cocoa Organization - ICCO* (2022), no último ano, alguns desses fatores ocasionaram a diminuição mundial de produção estimada em 8,0%, totalizando mais de 4,8 milhões de toneladas, sendo a África uma das mais impactadas, com queda de 11,3% (3,594 milhões de toneladas). Já nas Américas, bem como na Ásia e Oceania, a queda da produção agrícola de cacau foi estimada em 3,2% (963.000 toneladas) e 4,7% (266.000 toneladas), respectivamente.

No cultivo do cacauzeiro, a produção de mudas é comumente realizada através da propagação por sementes seguida de enxertia. Porém, as sementes de cacau são

recalcitrantes e enfrentam desafios significativos durante o armazenamento, principalmente devido à alta vulnerabilidade à perda de água, a ataques de microrganismos e à possibilidade de germinação durante o armazenamento (Ramos, 2002).

É relevante salientar que a grande parte dos países produtores emprega como porta-enxerto mudas cultivadas a partir de sementes de polinização aberta (Sodré; Gomes, 2019). A reprodução da planta, envolve características sexuadas e também de polinização cruzada (alogamia), impedindo a obtenção homogênea do material melhorado (Daouda et al., 2019). Em consequência disso, aliado ao lançamento de novos materiais, muitos dos quais resistentes a doenças, a demanda por mudas propagadas vegetativamente tem aumentado consideravelmente (Sodré; Gomes, 2019).

A propagação assexuada se tornou uma importante alternativa para a cultura, pois apresenta muitas vantagens como: produção de mudas com características agrônômicas superiores, propagação a partir de plantas matrizes viáveis com uniformidade genotípica e fenotípica e geração de um maior número de plantas em menor tempo (Fachinello; Hoffmann; Nachtigal, 2005; Reis et al., 2008), a obtenção de plantas livres de patógenos (Silva, 2016), otimização de fatores nutricionais e ambientais controlados, além de possibilitar a conservação de genótipos selecionados (Ramírez; Hajduk; Trujillo, 2022).

Uma dessas técnicas de propagação clonal *in vitro* é a embriogênese somática. Ela, consiste em um processo pelo qual as células somáticas mudam seu caminho de desenvolvimento, tornando-se totipotentes e, a partir de uma única célula ou grupos de células, é possível que se origine uma planta completa, pela formação de embriões somáticos, por via direta ou indireta (Elhiti; Stasolla, 2011).

Em cacauero, a técnica consiste inicialmente na indução de embriões somáticos primários, geralmente, a partir de explantes florais, como pétalas e estaminódios e mediante a suplementação do meio de cultivo com a auxina ácido-diclorofenoxiacético (2,4-D) (Li et al., 1998, Maximova et al., 2002) e citocininas (Li et al., 1998) como reguladores de crescimento indutores do processo. No entanto, muitos genótipos de cacauero são recalcitrantes à embriogênese somática (Minyaka et al., 2008), sendo importante a realização de levantamentos dessa recalcitrância e desenvolvimento de novos protocolos (Daouda et al., 2021). Essa rota de propagação, além de possibilitar a multiplicação clonal em larga escala, prática já adotada por grandes empresas produtoras de cacauero, como a Nestlé (Guillou et al., 2018), também permite a geração de

materiais, como calos e embriões somáticos, que podem ser direcionados para a conservação de recursos genéticos.

A embriogênese somática desempenha também um importante papel na transformação genética, entretanto a variabilidade genotípica acaba se tornando um fator relevante para esse processo, uma vez que ela pode comprometer o sucesso da regeneração pós transformação (Fehér, 2005). Em cacauero, há alguns protocolos disponíveis de transformação genética que utilizam a rota da embriogênese somática para regeneração dos transformantes (Jones et al., 2022).

Estudos sobre a diversidade genética de acessos de cacauero, sejam eles para populações naturais, domesticadas ou geneticamente melhoradas, geram informações importantes e úteis para o planejamento, manutenção e avaliações das coleções de germoplasma ligados aos programas de melhoramento (Faleiro et al., 2004).

Vários programas de melhoramento do cacauero, em diferentes centros de pesquisa ao redor do mundo têm disponibilizado uma quantidade expressiva de genótipo melhorados (Ofori; Arthur; Padi, 2019; Duval et al., 2017). Todavia o aproveitamento desse germoplasma disponível depende de métodos eficientes de conservação e clonagem massal (Ramírez; Hajduk; Trujillo, 2022).

Para a manutenção desses genótipos por longos períodos, a conservação *in vitro* configura-se como uma alternativa, que, além de reduzir o risco de contaminação e do surgimento de variação somaclonal, permite a preservação de grandes coleções em um espaço físico reduzido (Sá et al., 2021). Esse método, reduz custos, diminui a necessidade de mão-de-obra e facilita o intercâmbio do material vegetal genética fora do ambiente controlado.

Recursos genéticos podem ser conservados *in vitro* mediante a técnica do crescimento lento, que reduz o desenvolvimento das plantas e o metabolismo do tecido vegetal, aumentando os intervalos entre os subcultivos e mantendo o alto padrão genético (Kamińska et al., 2016). Outra opção é a criopreservação (Monisha et al., 2019; Pence; Bruns, 2022) que conserva o material genético em temperatura ultrabaixa, em geral, -196° C (nitrogênio líquido).

A criopreservação possibilita a conservação por longo prazo devido à redução das atividades metabólicas e dos processos bioquímicos das células (Araújo et al., 2019), contudo requer reestabelecimento do material vegetal sob condições *in vitro*.

Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo desenvolver um protocolo para criopreservação de calos de acessos de cacaueteiro (*Theobroma cacao* L.). Em um segundo momento, buscou-se avaliar as respostas à indução da embriogênese somática e à regeneração de plantas de múltiplos acessos de cacaueteiro.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Informações geográficas, centro de origem e dispersão de cacauero (*Theobroma cacao* L.)

O cultivo de cacaueros (*Theobroma cacao* L.), motivado principalmente pelo interesse comercial em suas sementes, o tornou uma das principais *commodities* na África (69,9%), seguida pela Américas (17,3%), Ásia (12,1%) e Oceania (0,8%) (FAOSTAT, 2022) (Fig. 1). Essa espécie é comum na Amazônia Ocidental à Oriental, principalmente em florestas de terra firme e em algumas parcialmente inundadas, conhecidas como área de várzea (Neto et al., 2001; Zhang; Motilal, 2016; González-Orozco et al., 2020).

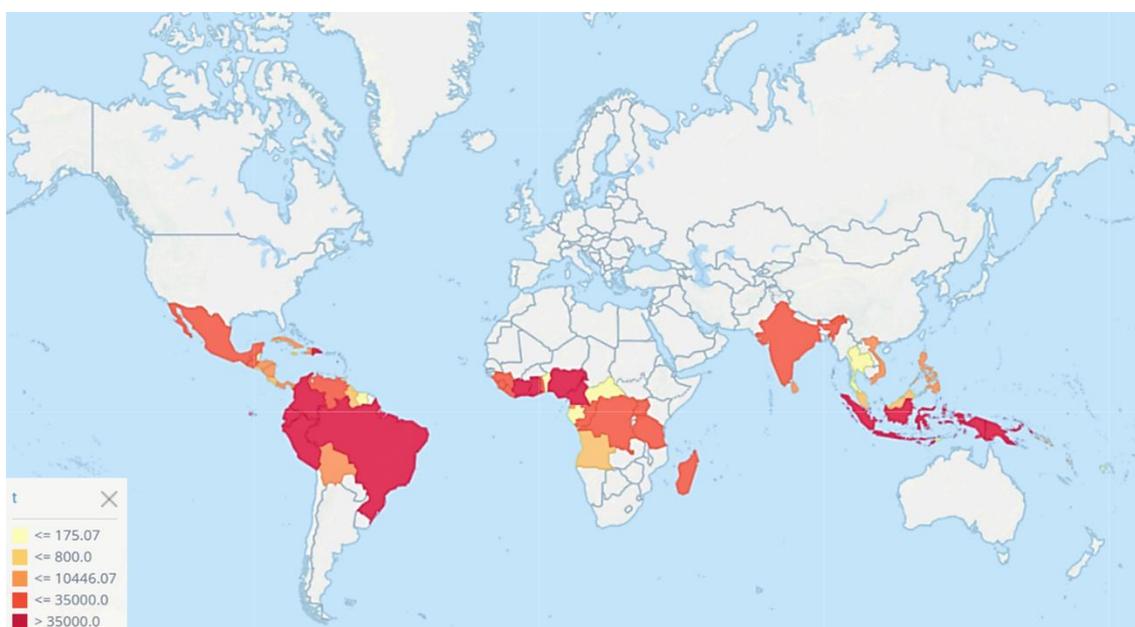


Figura 1. Mapa de produção de sementes de cacaueros em toneladas em 2022.

Fonte: FAOSTAT, 2022

A espécie é encontrada em áreas com temperaturas médias anuais de 20 °C a 30 °C, com médias de 22 °C a 28 °C consideradas ideais para garantir uma boa floração e frutificação dos cacaueros (Souza; Aguilar; Dias, 2009; Queiroga et al., 2021).

Como é uma espécie típica de clima tropical, ela é bastante sensível à baixa umidade do solo e do ar, demandando em média 1.200 mm de precipitação pluviométrica anual, com distribuição mensal em torno de 100 mm. A espécie é bem adaptada ao clima amazônico, com médias anuais variando de 1.500 mm a 1.700 mm, podendo ultrapassar 3.000 mm (Neto et al., 2001; Queiroga et al., 2021). Contudo, é possível encontrar plantas de cacaueros se desenvolvendo durante as estações secas e em áreas com problemas

naturais de déficit hídrico, quando implantados sistemas de irrigação (Alban et al., 2016; Ceccarelli et al., 2021).

As altitudes de ocorrência variam entre 600 a 900 m, sendo que as mais elevadas são encontradas em áreas próximas ao Equador (Somarriba; Lachenaud, 2013).

Com base nessas características ambientais, a produção mundial de cacau tem sido concentrada principalmente na África Ocidental desde a década de 1980, com crescimento de 2 a 3 milhões de toneladas a partir dos anos 2000, envolvendo milhões de pequenos agricultores (Wessel; Quist-Wessel, 2015). Ainda assim, foram encontrados problemas para a produção de cacauzeiros, com vantagens e desvantagens, podendo ocasionar aumento no desmatamento ou simplesmente ser uma opção de reflorestamento (Orozco-Aguilar et al., 2021).

Ao longo de 20 anos de produção, cerca de 2-3 milhões de hectares de floresta tropical foram perdidos, devido ao aumento na produção de cacau para atender à crescente demanda mundial, além do uso e manutenção inadequados das terras, contribuindo para a perda de mais áreas florestais e favorecendo a disseminação de pragas e doenças (Wessel; Quist-Wessel, 2015; Kroeger; Koenig; Thomson, 2017; Morrissey et al., 2019). Além disso, cenários de mudanças climáticas preveem um aumento de 2°C durante as estações secas até 2050, reduzindo as terras adequadas para o cultivo de cacauzeiros (Nieves-Orduña; Krutovsky; Gailing, 2023).

No entanto, levando em consideração a alta procura, a criação de agroflorestas se torna uma alternativa para o cultivo de cacau, fornecendo assim serviços ecossistêmicos como captura e armazenamento de carbono, disponibilidade de água, adaptação climática e do ambiente e a produção de madeira, a partir das árvores tolerantes à sombra, como exemplo dos cacauzeiros (Rice; Greenberg, 2000; Tschardt et al., 2011; Jezeer et al., 2017; Blaser et al., 2018). Além disso, também pode haver inserção de esquemas de certificação e reconhecimento de conservação da biodiversidade gerados pela agrofloresta constituída pela espécie (Tschardt et al., 2015).

2.2 Informações botânicas sobre o cacauzeiro

O cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.) é uma árvore de porte médio, que mede entre 5 e 8 metros de altura, apesar de que alguns espécimes podem alcançar até 10 metros de altura, crescendo naturalmente à sombra (Cruz, 2013).

O caule é ereto, de casca lisa e verde durante os dois primeiros anos, tornando-se cinza escuro e de superfície irregular na planta adulta (Lucena, 2013). As folhas são simples, inteiras e de cor verde que podem se diferenciar conforme as condições de sol e umidade, variando entre castanho claro, avermelhado ou roxo (Queiroga et al., 2021). Quando atingem a maturidade, as folhas são de coloração verde-escura, de formato oblongado e acuminado, com nervura central proeminente (Decloquement, 2018).

A inflorescência do cacaeiro é agrupada entre 40 e 60 flores no tronco central e em suas ramificações, possuindo flores hermafroditas e pentâmeras (Martins et al., 2005). Elas apresentam em média de 30 a 60 óvulos por ovário (S.A.C, 2008), o número de grãos de pólen observados nas plantas varia de 311 a 610 por antera, ou seja, chegando a 3.050 grãos de pólen por flor (Godoy et al., 2009).

A estrutura floral é constituída por cinco sépalas, cinco pétalas, um androceu com 10 filamentos, dos quais cinco são férteis (estames) e o outros cinco são inférteis (estaminódios), um gineceu (pistilo) formado pelo ovário superior com cinco lóculos fundidos desde a base, em que cada um pode conter de 5 a 15 óvulos, dependendo do genótipo (Batista, 2009).

A polinização do cacaeiro é estritamente entomófila, principalmente feita por dípteros da família Ceratopogonidae e dos gêneros *Forcipomyia*, *Dasyhelea* e *Atrichopogon* como os principais agentes polinizadores dessa cultura. Isso se deve a incompatibilidade de cruzamento gamética tanto autógena como intervietal para essa espécie (Batista, 2009; Serrano, 2011; Nakayama, 2022).

O cacaeiro produz frutos indeiscentes, do tipo bacoide, drupissarcídio, pentalocular, com ampla variação de tamanho, formato, pigmentação, rugosidade, profundidade do sulco longitudinal na superfície da casca, espessura da casca e cerosidade (Queiroga et al., 2021). Eles são de coloração verde ou roxa quando jovens, a qual passa a amarelo ou alaranjado quando maduros (Decloquement, 2018). Cada fruto abriga de 20 a 50 sementes, com 2 a 3 cm de comprimento, formato que varia de elipsoide a ovoide e recobertas por uma mucilagem açucarada, devido a presença de monossacarídeos (Neto et al., 2001).

2.3 Propagação do cacauero

2.3.1 Propagação por semente e vegetativa convencional

As sementes representam uma das principais fontes de variação genética em cacauero, pois na maioria das vezes, resultam de cruzamentos entre dois genótipos ou grupos genéticos diferentes (Modeste et al., 2017). Os grupos mais comuns são crioulo, forasteiro e trinitário, que são classificados com base na morfologia, genética e origem geográfica (Bartley, 2005). No entanto, outros fatores devem ser levados em consideração, como a competitividade entre genótipos com diferenças de hábitos de crescimento (fase juvenil prolongada e fase adulta tardia), havendo tendência de dominância dos mais vigorosos, segregação genética, a partir da escolha dos progenitores, o que causa diferença de características (porte, floração e frutificação), além dos altos custos de implantação e manutenção, dificultando assim, uma padronização das plantas (Trevizan; Moraes, 1999; Oliveira; Rincón, 2002).

Como resultado, as plantas de cacauero derivadas de sementes são altamente variáveis em termos de desempenho agrônômico (Li et al., 1998). Nesse sentido, ressalta-se a importância do desenvolvimento de sistemas de propagação que garantam a estabilidade de plantações com características de alta produtividade e resistência às principais doenças (Garate-Navarro; Arévalo-Gardini, 2017), além da obtenção de plantas por meio de polinização controlada em viveiros certificados (Gildardo et al., 2007).

Uma das alternativas é a propagação vegetativa, técnica que consiste na formação de uma planta nova, a partir, de um órgão reprodutivo específico ou na regeneração completa de um fragmento da planta (Amano et al., 2019), ou também por desdiferenciação de células somáticas com finalidade de produzir plantas clones (Grolli, 2008).

De modo geral, dentre as principais vantagens da propagação vegetativa de espécies florestais, como o cacauero, podem ser citadas a formação de clones a partir de genótipos com características superiores, fornecendo propágulos tolerantes a pragas e doenças e com precocidade de produção (Teixeira; Marbachr; Santos, 2002; Queiroga, 2021).

A propagação clonal pode ser alcançada pela macropropagação, que envolve métodos convencionais, como a estaquia e a enxertia, ou pela micropropagação, por meio da técnica da cultura de tecidos (Higashi; Silveira; Gonçalves, 2000). A propagação

vegetativa por estaquia, em cacauero, não é uma técnica nova, pois tem sido usada na América Central desde o século passado, e a primeira experiência bem-sucedida foi realizada na ilha de Trinidad, em 1931 (Sodré, 2007). Entretanto, Malavasi (1994), Cunha et al. (2009) e Lima et al. (2011) constataram que para aumentar o êxito do enraizamento das estacas, é necessário selecionar fragmentos de plantas matrizes mais jovens. Isso deve-se às altas concentrações de auxinas presentes, além de incluir a nutrição mineral necessária e a adição de hormônios vegetais.

Outra forma de propagação vegetativa convencional é a enxertia, na qual, geralmente, o genótipo produtivo é enxertado sobre um genótipo resistente a algum estressor abiótico limitante da produção. No entanto esse processo exige critérios de uniformidade e desenvolvimento mais rápido, algo dificultoso de serem encontrados nos grupos comuns aos cacaueros, exigindo que o viveirista efetue maior semeadura para obtenção de plantas com o padrão exigido (Lavanhole et al., 2019).

Algo importante a ser estudado são as escolhas do enxerto e do porta-enxerto. Marinato et al. (2013) avaliaram a sobrevivência de enxertos de *Theobroma cacao*, utilizando-se dois métodos de enxertia precoce (hipocotiledonar por garfagem de topo à inglesa e de topo em fenda cheia) com porta-enxertos que possuíam resistência à vassoura-de-bruxa e elevadas produtividades conhecidos na literatura (ESFIP 02, TSH 1188 e CCN 51) e um genótipo comum à sua região, suscetível a doenças. O ESFIP 02 exibiu uma maior taxa maior de sobrevivência em relação aos demais.

Além disso, é válido conhecer respostas quanto ao cruzamento entre progênies resistentes, como citado por Yamada et al. (2014), que obtiveram melhores respostas em relação ao RB 39 x CCN 51; CEPEC 94 x CCN 10 e CCN 10 x VB 1151. E também avaliações genéticas e de seleção de clones de cacau, com base em características morfo-agronômicas, como descrito por Guimarães et al. (2022), que obtiveram bons resultados nos clones POUND 12 e CAB 12, 228, 253, 257, 258 e 422, considerados os mais adequados para a indução de resistência.

No entanto, problemas de incompatibilidade podem ocorrer na enxertia, que podem ser resolvidos pelo método de estaquia, aliada ao uso de reguladores vegetais, sendo atualmente o método mais indicado para propagar cacaueros tolerantes à vassoura de bruxa, em virtude da produção de clones idênticos (Pereira et al., 2016). Para esse tipo de propagação, é importante conhecer os genótipos utilizados. Sanches et al. (2008) avaliaram mudas propagadas por estaquia nos clones TSH1188 e VB1151 e identificaram

um elevado nível de resistência desses clones até o 43º dia após a inoculação, podendo ser usado para essa técnica.

Apesar da propagação vegetativa por estaquia no cacauieiro não ser uma técnica nova, é pouco difundida no Brasil, devido às boas produções obtidas pelos híbridos e das variedades propagadas via seminal e principalmente pela facilidade de manejar cacauieiros originários de sementes (Sodré, 2013).

2.3.2 Cultura de tecidos

A cultura de tecidos vegetais é uma área de estudo direcionada para o cultivo de células, tecidos, órgãos e outras partes da planta sob condições assépticas *in vitro*, em um ambiente controlado e meio de cultura apropriado (Twaij; Jazar; Hasan, 2020).

Esse método está muito relacionado ao conceito de totipotência celular, que é a capacidade de células desenvolver novos órgãos e, até mesmo, plantas inteiras a partir de qualquer parte da planta-matriz (Verdeil et al., 2007), ou simplesmente o potencial de reprogramação de uma célula em resposta a sinais específicos, por meio de processos de desdiferenciação e rediferenciação (Fehér; Pasternak; Dudits, 2003).

A micropropagação pode ser feita por duas rotas: organogênese e embriogênese somática. A organogênese é uma via de desenvolvimento na qual órgãos vegetais são induzidos mediante a desdiferenciação e rediferenciação, a partir de uma ou várias células, de forma direta (sem fase intermediária de produção de calos) ou indireta (a partir de desenvolvimento de calos) (Andrade, 2002). Já a embriogênese somática depende da habilidade das células somáticas vegetais de se desdiferenciarem e se reprogramarem ao longo de um processo embrionário durante o percurso de desenvolvimento (Fehér, 2015).

Essa última rota é considerada uma abordagem alternativa para propagação clonal de cacauieiro (Li et al., 1998) comparativamente às técnicas mais tradicionais citadas anteriormente. O desenvolvimento de um sistema de regeneração por meio da embriogênese somática é importante para vários propósitos, incluindo a propagação de plantas, melhoramento genético, conservação de germoplasma e transformação genética (Ajijah; Hartati, 2019).

O melhoramento de *T. cacao* utilizando técnicas modernas pode ser facilitado, mediante a multiplicação de materiais elites usando embriogênese somática (Pancaningtyas, 2015). No entanto, a variabilidade das respostas devido ao efeito dos genótipos e à recalcitrância são restrições que devem ainda serem superadas para a

cultura. Assim, a superação da recalcitrância requer a otimização dos protocolos existentes ou, mesmo, o desenvolvimento de novos (Daouda et al., 2019). Então, espera-se que por meio dessa técnica se supere os obstáculos de propagação e acelere os programas de melhoramento genético da espécie (Ramírez; Duque; Trujillo, 2018).

Vários tipos de explantes já foram usados na propagação *in vitro* de *T. cacao*. Litz et al. (1986), utilizando folhas jovens, reportaram a obtenção de embriões somáticos quando foram utilizadas altas concentrações de ácido-diclorofenoxiacético (2,4-D) e benzilaminopurina (BAP), porém os embriões morreram na fase inicial de desenvolvimento. Lopez-Baez et al. (1993), utilizando diferentes órgãos como estames, pétalas, bases das peças florais e estaminódios, relataram resultados superiores para esse último tipo de explante.

Os estaminódios e pétalas têm sido os explantes mais comumente utilizados para a regeneração de embriões somáticos nessa espécie, com altas taxas de calogênese embriogênica inicial. Autores como González; Rojas e Rieche (2005), Salazar et al. (2006) Trujillo; Garcés e Rúa (2011) tem reportado maiores responsabilidades dos estaminódios comparativamente às pétalas, o que tem sido atribuído ao fato dos estaminódios estarem fundidos à zona meristemática do botão floral (receptáculo), o que resulta em uma quantidade significativa de calos embriogênicos com potencial de regeneração de plantas, diferentemente das pétalas que possuem uma localização mais externa. Os autores também enfatizam que, quando inoculados em meio de cultura, os estaminódios ficam em contato direto com o meio, diferindo de explantes como pétalas, os quais são inoculados curvados devido ao formato dos verticilos.

Além do tipo de explante, meios de cultura têm sido investigados, para a indução eficiente da embriogênese somática em cacauero. Os primeiros protocolos foram realizados utilizando-se meio de cultura compostos de sais de MS (Murashige; Skoog, 1962), porém, com variações no tipo e concentração de vitaminas, reguladores de crescimento e suplementos orgânicos complexos, bem como no método de preparo ou combinação dos componentes das soluções estoque do mesmo meio basal (Bajaj, 2012). Nas fases iniciais de desenvolvimento de calos primários e secundários de cacauero, geralmente, são adicionados aos meios de cultivo auxinas, como 2,4-D (Esan, 1975; Li et al, 1998; Garcia et al., 2016), 2,4,5-ácido triclorofenoxiacético - 2,4,5-T (Guillou et al., 2018; Garcia et al., 2016) e citocininas, como benzilaminopurina – BAP (Pence;

Hasegawa; Janick, 1979), thidiazuron – TDZ (Li et al, 1998) e cinetina (Pence, 1979; Garcia et al., 2016).

Após a formação de calos embriogênicos, eles são transferidos para o meio de desenvolvimento de embriões, de modo geral, composto por baixas concentrações de auxinas, que favorecem o crescimento normal de embriões, ou até mesmo, desprovido de reguladores. Sob essas condições, os proembriões são estimulados a desenvolverem até formar o embrião completo, enquanto que altas concentrações podem produzir efeito inibitório ou formações de calos (Li et al., 1998; Nunes; Filho, Rocha, 2002; Garcia et al., 2016).

Logo em seguida ao surgimento de embriões somáticos globulares, os explantes são transferidos para o meio de regeneração de plantas, desprovidos de reguladores de crescimento (Li et al, 1998; Garcia et al., 2016), variando na adição de algumas substâncias, por exemplo o nitrato de potássio (KNO_3). Essa substância citada é utilizada na micropropagação como fonte de nitrogênio e potássio, sendo esses dois elementos encontrados em maiores quantidades nas plantas e responsáveis, principalmente pelo crescimento das plantas e desenvolvimento de raízes e por regular o potencial osmótico das células vegetais, respectivamente (Ribeiro; Teixeira, 2008).

Apesar das várias décadas de estudos sobre a embriogênese somática nessa espécie lenhosa, alguns problemas são reportados em variados protocolos, como a resposta genótipo-dependente (Maximova et al., 2002; Kahia et al., 2017) e ocorrência de alta taxa de anormalidades dos embriões somáticos primários (Alemanno; Berthouly; Michaux-Ferriere, 1997; Pancaningtyas, 2013; Garcia et al., 2016; Garcia et al., 2022).

Apesar disso, alguns desses trabalhos relatam que nas primeiras 12 semanas após a formação dos calos, surgem embriões somáticos, com uma média de 13,8 embriões por estaminódio e de 7 a 10 embriões por pétala (normais e anormais), e nas semanas seguintes ocorrem aumento e estabilização na produção de embriões somáticos normais, isso se deve à embriogênese secundária, que formam embriões secundários bem maduros capazes de converter plantas com 4 a 6 folhas antes da aclimatização (Maximova et al., 2002; Garcia et al., 2016).

Para a sobreposição desse último gargalo e, conseqüente, aumento da produtividade da técnica, alguns autores têm realizado a embriogênese secundária (Maximova et al., 2002; Garcia et al., 2016) que consiste na iniciação de novos embriões somáticos a partir de embriões existentes (Karami; Deljou; Kordestani, 2008). Análises

histológicas revelaram que embriões somáticos primários possuem origem predominantemente multicelular em contraste com a origem unicelular dos embriões somáticos secundários, o que tem sido associado a maior estabilidade genética, morfológica e rendimento de plantas produzidas (Maximova et al., 2002).

Portanto, a propagação *in vitro*, por meio da embriogênese somática, é uma alternativa promissora, apresentando diversas vantagens, como a obtenção de várias plantas por meio de um único explante, produção de mudas durante o ano todo, evitando os limites da sazonalidade, produzindo plantas em um intervalo menor de tempo, com boas condições fitossanitárias, e elevado potencial produtivo em escala comercial (Singh; Singh, 2021).

2.3.3 Conservação de recursos genéticos

As discussões técnicas e científicas sobre os limites da conservação e as questões dos direitos dos países sobre seus recursos começaram a ganhar destaque em vários âmbitos, sendo a conservação de germoplasma uma oportunidade de preservar esse conhecimento sobre espécies extintas, selvagens e outras espécies vivas de uma planta cultivada ou não (Priyanka et al., 2021).

Portanto, a conservação é extremamente importante, sendo dividida em duas estratégias para esse fim: *ex situ* e *in situ*. A conservação *ex situ* é um método seguro, relevante e econômico para a preservação de espécies e da diversidade genética, que possibilita o incremento da consciência sobre a biodiversidade (Silveira et al., 2018). A conservação *ex situ* complementa a conservação *in situ*, uma vez que a *in situ* pode preservar não somente o potencial evolutivo de uma amostra da espécie alvo, mas também a população inteira, bem como de outros organismos com os quais ela interage, convive ou depende (Sebbenn, 2003).

Os métodos de conservação *ex situ* são necessários para dar suporte às ações *in situ*, prevenindo a extinção de espécies, fornecendo uma fonte de material para reintrodução ou aumentando a população de espécies individuais, além de fornecer uma fonte de material para pesquisa (Offord; Makinson, 2009). Para aplicação dessa estratégia de conservação, jardins botânicos ou bancos de germoplasma cultivam plantas em suas coleções vivas para fornecer materiais para observação, pesquisa e educação (Westwood et al., 2020).

Os bancos de sementes convencionais, em que as sementes podem ser preservadas secas e congeladas para muitas dezenas, senão centenas de anos, são considerados uma valiosa ferramenta de conservação *ex situ* para conservação integrada de plantas, tanto como arquivo quanto como fonte de variação genética (Gargiulo et al., 2019). Contudo, o armazenamento de sementes muda conforme a espécie, devido as plantas possuírem características diferentes quanto à tolerância à baixa umidade e baixas temperaturas de armazenamento (Fonseca; Freire, 2003; Berjak; Pammenter, 2013). Exemplo disso são as sementes de cacauzeiro que possuem a característica de recalcitrância, ou seja, são altamente sensíveis à dessecação (Gayatri et al., 2022) e não podem ser armazenadas usando o protocolo convencional de armazenamento de sementes (Adu-Gyamfi; Wetten, 2020).

Nesse cenário, técnicas de conservação *in vitro*, seja por meio de crescimento lento ou criopreservação, podem ser empregadas para espécies com restrições de conservação por meio do banco de sementes. Criopreservação se refere ao armazenamento de amostras biológicas, como células, tecidos e órgãos, em temperaturas extremamente baixas do nitrogênio líquido, $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, com o objetivo de interromper todas as reações químicas, processos biológicos e físicos intra e extracelulares (Barbosa et al., 2009; Wang et al., 2021).

A criopreservação bem-sucedida depende da capacidade de reduzir o gelo intracelular formado durante o armazenamento dos tecidos ou órgãos em nitrogênio líquido e descongelamento do material (Adu-Gyamfi; Wetten, 2020). Estudos nessa área resultaram em avanços técnicos, incluindo o desenvolvimento de vários métodos de criopreservação, como *vitrification*, *encapsulation-vitrification*, *droplet-vitrification*, *encapsulation-dehydration* (Wang et al., 2021). As técnicas podem ser aplicadas a materiais, como sementes e gemas dormentes, bem como a materiais *in vitro*, compreendendo suspensão de células e culturas de calos, ápices, brotos, embriões somáticos e zigóticos, além de eixos embrionários (Engelmann; Dussert, 2012).

As técnicas usadas para criopreservação impõem estresses às células e tecidos que podem causar danos consequentes da excisão, estresse osmótico, dessecação e mudanças na temperatura, o que pode resultar em crescimento reduzido ou morte do material vegetal (Uchendu et al., 2010). Por esses motivos é necessário incluir pré e pós-tratamentos que irão proteger e recuperar os explantes. Para tal fim, tratamentos com algumas soluções têm sido aplicados, dentre essas soluções mencionam-se: *loading solution* (LS), *plant*

vitriification solution (PVS) e *rewarming solution* (RS), permitindo regularizar o equilíbrio entre a produção e detoxificação de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Chen et al., 2015).

Dentre várias etapas a serem incluídas, a desidratação do material a ser criopreservado é uma delas, que pode ser obtida por evaporação de água (dessecação física) ou até mesmo por tratamentos com soluções altamente concentradas, como: dimetilsulfóxido (DMSO), etileno glicol, metanol, glicerol, propileno glicol, dentre os mais comuns (Santos; Salomão, 2023). A *loading solution* (LS) ou solução de carregamento, por exemplo, é constituída por 4,43 g/L de MS, 136,8 g/L de sacarose e 147,4 ml/L de glicerol (Vollmer et al., 2021).

Já a solução *plant vitrification solution 2* (PVS2) ou solução de vitrificação é composta por 4,43 g/L de sais de MS, 136,8 g/L de sacarose, 240 ml/L de glicerol, 136,4 ml/L de DMSO e 134,8 ml/L de etileno glicol (Sakai; Kobayashi; Oiyama, 1990). Essa solução contém substâncias penetrantes e não-penetrantes que diferem entre si de acordo com o tipo e concentração de cada componente, como relatado por Santos et al. (2015) e Panis; Lambardi, (2005). Ela possui a função de proteger o explante de condições adversas, principalmente, suas membranas, com relação à formação de cristais de gelo, pois possibilita que a célula atinja um estado vítreo.

Já a *rewarming solution* (RS) é composta por 4,43 g/L de MS e 205,2 g/L de sacarose. Essa solução é amplamente utilizada para reduzir o choque osmótico durante o reaquecimento rápido de tecidos e órgãos vegetais criopreservados, ou para diluir os crioprotetores prejudiciais após o reaquecimento em banhos de água aquecida (Wollmer, 2019).

Os primeiros protocolos de criopreservação disponíveis para o cacauero são relacionados aos embriões zigóticos imaturos. Segundo Pence (1991), essa técnica possui potencial para o armazenamento de germoplasma a longo prazo, geneticamente equivalente a um banco de sementes, mesmo que a integridade do embrião original não seja mantida por meio do congelamento, porém células regenerativas ainda sobrevivem. No entanto, devido às grandes dimensões das sementes de cacauero, a aplicação uniforme de crioprotetores e as mudanças de temperatura (congelamento) são consideradas problemáticas.

Embriões somáticos também têm sido utilizados como propágulos na criopreservação. No entanto, a obtenção desse tipo de propágulo é dependente do

genótipo e dos botões florais usados como fontes de explantes para a embriogênese somática (Li et al., 1998; Adu-Gyamfi; Wetten, 2020). A técnica *encapsulation-dehydration*, que envolve o pré-tratamento dos propágulos encapsulados com sacarose, seguido de dessecação e armazenamento em nitrogênio líquido, foi aplicada a embriões somáticos de cacauero (Fang, 2008).

2.3.4 Técnicas de criopreservação

A aplicação do congelamento em nitrogênio líquido a partir de explantes vegetais menos resistentes ou recalcitrantes, requer metodologias que protejam esses materiais, com desidratação prévia e imersões em soluções como DMSO, etileno glicol e glicose (Uragami, 1989).

Em 1990, duas novas técnicas de criopreservação de plantas foram introduzidas, levando em consideração a desidratação dos explantes e proteção com soluções osmoprotetoras, antes da imersão em nitrogênio líquido, foram essas: *vitrification* e *encapsulation-dehydration* (Sakai; Kobayashi; Oiyama, 1990; Fabre; Dereuddre, 1990).

A *vitrification* é o processo de imersão em soluções altamente concentradas de agentes crioprotetores, tornando-as extremamente viscosas e com resfriamento ocorrendo em temperaturas muito baixas, sem a formação de gelo intracelular (Sakai; Kobayashi; Oiyama, 1990).

Para aumentar a taxa de sobrevivência e adotar procedimentos mais simplificados, desenvolveu-se a *plant vitrification solution* (PVS), seguida da PVS2, que contém 30% (p/v) de glicerol, 15% (p/v) de etileno glicol, 15% (p/v) de dimetilsulfóxido e 0,4 M de sacarose em um meio Murashige-Tucker (MT) (Sakai; Kobayashi; Oiyama, 1990). Em busca de uma solução menos tóxica à base de glicerol, desenvolveu-se o PVS3, que contém 2 mg glicerol e 0,4 M de sacarose em um meio Linsmaier e Skoog (LS) (Nishizawa, 1993).

Para a técnica de *encapsulation-dehydration*, os materiais são encapsulados (formatos de esferas) em uma solução de alginato de cálcio com alta concentração de sacarose, formando o que são denominadas sementes sintéticas ou artificiais. Em seguida, as capsulas são secas em câmaras de fluxo de ar estéril ou com uso de um dessecante com sílica gel, até atingir teores de água de 20 a 30% e imersas em nitrogênio líquido. Ressalta-se que alguns problemas são frequentes, como a baixa taxa de sobrevivência, de

recuperação, além do processo de desidratação ser mais longo em comparação com a *vitrification* (Fabre; Dereuddre, 1990; Nagel et al., 2024).

A técnica de *encapsulation-vitrification* combina os procedimentos citados anteriormente de encapsulação com solução de alginato de cálcio, juntamente com o congelamento rápido e a utilização dos crioprotetores pela técnica de *vitrification* (Ciringer et al., 2018). No entanto, como são necessários vários passos, os métodos de encapsulação são aplicados com menos frequência em comparação com outras abordagens de criopreservação (Nagel et., 2024).

Atualmente, o método mais utilizado é a *droplet vitrification*, que envolve o resfriamento extremamente rápido de pequenos fragmentos dos materiais vegetais, os quais são colocados em tiras de alumínio com gotículas de solução de osmoprotetoras (Nagel et al., 2024). O sucesso dessa técnica se deve ao contato direto das amostras com o nitrogênio líquido durante o congelamento e, para o reaquecimento, as tiras de alumínio contendo as amostras são descongeladas em solução de recuperação, resultando em uma alta taxa de sobrevivência e recuperação (Haggag et al., 2018).

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADU-GYAMFI, R.; WETTEN, A. Cocoa (*Theobroma cacao* L.) Somatic Embryos Tolerate Some Ice Crystallization during Cryopreservation. **Agricultural Sciences**, v. 11, n. 3, p. 223–234, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4236/as.2020.113014>>.

AJIJAH, N.; HARTATI, R. S. Primary and Secondary Somatic Embryogenesis of Cacao: the Effect of Explant Types and Plant Growth Regulators. **Indonesian Journal of Agricultural Science**, v. 20, n. 2, p. 69-76, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.21082/ijas.v.20.n2.2019.p69-76>>.

AJIJAH, N.; HARTATI, R. S.; RUBIYO; SUKMA, D.; SUDARSONO. Effective cacao somatic embryo regeneration on kinetin supplemented DKW medium and somaclonal variation assessment using SSRs markers. **Agrivita**, v. 38, n. 1, p. 80–92, 2016. Disponível em: <<http://doi.org/10.17503/agrivita.v38i1.619>>

ALBAN, M.B.K.A.; APSHARA, S.E.; HEBBAR, K.B.; MATHIAS, T.G.; SÉVERIN, A. Morpho-physiological criteria for assessment of two month old cocoa (*Theobroma cacao* L.) genotypes for drought tolerance. **Indian Journal of Plant Physiology**, v. 21, n. 1, p. 23-30, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s40502-015-0195-y>>.

ALEMANNI, L.; BERTHOULY, M.; MICHAUX-FERRIERE, N. A comparison between *Theobroma cacao* L. Zygotic embryogenesis and somatic embryogenesis from floral explants. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 33, n. 3, p. 163–172, 1997. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11627-997-0016-8>>.

ALEMANNI, L.; BERTHOULY, M.; MICHAUX-FERRIÈRE, N. Histology of somatic embryogenesis from floral tissues cocoa. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 46, n. 3, p. 187–194, 1996. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/BF02307094>>.

AMANO, R.; NAKAYAMA, H.; MOMOI, R.; OMATA, E.; GUNJI, S.; TAKEBAYASHI, Y.; KOJIMA, M.; IKEMATSU, S.; IKEUCHI, M.; IWASE, A.; SAKAMOTO, T.; KASAHARA, H.; SAKAKIBARA, H.; FERJANI, A.; KIMURA, S. Molecular Basis for Natural Vegetative Propagation via Regeneration in North American Lake Cress, *Rorippa aquatica* (Brassicaceae). **Plant and Cell Physiology**, v. 61, n. 2, p. 353–369, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/pcp/pcz202>>.

ANDRADE, S. R. M. Princípios da Cultura de Tecidos Vegetais. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**, Planaltina, v. 58, p. 9, 2002. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/cpac-2009/24719/1/doc_58.pdf>. Acesso em: 24/08/2023.

ARAÚJO, D. S.; SOARES, F. S.; SOBRINHO, S. de P.; LUZ, P. B. Cryoprotector on cryopreservation of *Passiflora mucronata* Lam. **Iheringia - Serie Botanica**, Porto Alegre, v. 74, n. 4, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.21826/2446-82312019v74e2019008>>.

ARAÚJO, A.B.N.; OLIVEIRA, A.C.A.; GRAÇA, G.A.; SILVA, A.V.C.; LEDO, A.S. Cryopreservation techniques in genipap and mangaba: challengers and perspectives. **Observatório de la economía latinoamericana**, v. 22, n. 3, p. e3675-e3675, 2024. Disponível em: <<https://doi.org/10.55905/oelv22n3-071>>.

BARROS, C.F.C.P.; LUZ, P.B.; JÚNIOR, M.A.S.; SOBRINHO, S.P.; MEDEIROS, C.M.; SANDER, N.L. Carolina de Faria Cabral Paes et al. CRIOPRESERVAÇÃO DE SEMENTES DO PANTANAL. **Revista Acta Ambiental Catarinense**, v. 19, n. 1, p. 01-14, 2022. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.24021/raac.v19i1.5767>>.

BARTLEY, B.G.D. **The genetic diversity of cacao and its utilization**. Oxford: Oxford University Press, 2005. Disponível: <https://books.google.com.br/books?id=_I40iGVJD64C&printsec=frontcover&hl=pt-BR&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false>. Acesso em: 20/11/2023.

BATISTA, L. El cultivo de cacao. Santo Domingo: **Centro para El Desarrollo Agropecuario e Forestal -CEDAF**, v. 23, n. 2, p. 45-54, 2009. Disponível em: <<https://intranet.cedaf.org.do/publicaciones/guias/download/cacao.pdf>>. Acesso em: 24/08/2023.

BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W. Implications of the lack of desiccation tolerance in recalcitrant seeds. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, p. 1–9, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00478>>.

BENELLI, C. Plant cryopreservation: A look at the present and the future. **Plants**, v. 10, n. 12, p. 2744, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/plants10122744>>.

BENSON, E. E. Cryopreservation Theory. In: REED, B. M. (ed.). **Plant Cryopreservation – A Practical Guide**. New York: Springer, 2008, p.15-32. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/978-0-387-72276-4>>.

BLASER, Wilma J.; OPPONG, J.; HART, S.P.; LANDOLT, J.; YEBOAH, E.; SIX, J. Climate-smart sustainable agriculture in low-to-intermediate shade agroforests. **Nature Sustainability**, v. 1, n. 5, p. 234-239, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41893-018-0062-8>>.

CARNEIRO, F. D. S.; QUEIROZ, S. R. D. O. D.; PASSOS, A. R.; NASCIMENTO, M. N.; SANTOS, K. S. Embriogênese somática em *Agave sisalana* Perrine: indução, caracterização anatômica e regeneração. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 44, p. 294–303, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1983-40632014000300005>>.

CARVALHO, T. C.; AYUB, R. A.; GONÇALVES, E. C. P.; REIS, C. A. Criopreservação de embriões zigóticos de seringueira (*Hevea brasiliensis*) contendo tecido de reserva. **Ciência Florestal**, v. 31, p. 959-973, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.5902/1980509847436>>.

CECCARELLI, V.; FREMOUT, T.; ZAVALA, D.; LASTRA, S.; CORREA, S.I.; ARÉVALO-GARDINI, E.; RODRIGUEZ, C. A.; HILACONDO, W.C.; THOMAS, E. Climate change impact on cultivated and wild cacao in Peru and the search of climate change-tolerance genotypes. **Diversity and Distributions**, v. 27, n.8, p. 1462-1476, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/ddi.13294>>.

CHEN, G. qun; REN, L.; ZHANG, J.; REED, B. M.; ZHANG, D.; SHEN, X. hui. Cryopreservation affects ROS-induced oxidative stress and antioxidant response in *Arabidopsis* seedlings. **Cryobiology**, v. 70, n. 1, p. 38–47, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.11.004>>.

CIRINGER, T.; Martín, C.; Šajna, N.; Kaligarič, M.; Ambrožič-Dolinšek, J. Cryopreservation of an endangered *Hladnikia pastinacifolia* Rechb. by shoot tip encapsulation-dehydration and *encapsulation-vitrification*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 54, p. 565-575, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11627-018-9917-y>>.

CRUZ, J. F. M. Caracterização das sementes de variedades de cacau *Theobroma cacao* L. resistentes à vassoura de bruxa durante a fermentação e após a secagem. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2013. Disponível em: <https://repositoriohml.ufba.br/bitstream/ri/8794/1/Jaqueline%20Fontes%20Moreau%20Cruz.p>. Acesso em 05/12/2023.

CUNHA, A. C. M. C. M.; PAIVA, H. N. de; LEITE, H. G.; BARROS, N. F. de; LEITE, F. P. Influência do estado nutricional de minicepas no enraizamento de miniestacas de eucalipto. Viçosa: **Revista Árvore**, v. 33, n.4, p. 607–615, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-67622009000400003>>.

DAOUDA, K.; MODESTE, K. K.; OULO, N. A.; EDMOND, K. K. Induction of somatic embryos of recalcitrant genotypes of *Theobroma cacao* L. **Journal of Applied Biosciences**, v. 133, n. 1, p. 13552-13560, 2019. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.4314/jab.v133i1.7>>.

DAOUDA, K.; OULO, N.-A.; KAN, M. K.; KOUABLAN, E. K. Use of mineral salts to remove recalcitrance to somatic embryogenesis of improved genotypes of cacao (*Theobroma cacao* L.). **African Journal of Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 33–42, 2021. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.5897/AJB2020.17271>>.

DECLOQUEMENT, J. N. Y. **Caracterização morfo-molecular e patogenicidade de *Phytophthora* spp. associadas ao cacau (Theobroma cacao L.)**. 2018. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade de Brasília, Brasília, 2018. Disponível em: http://icts.br/jspui/bitstream/10482/34016/1/2018_jennifernathalieyolandedecloquement.pdf. Acesso em: 22/11/2023.

DRIVER, J. A.; KUNIYUKI, A. H. *In vitro* propagation of Paradox Walnut Rootstock. **HortScience**, v. 19, n. 4, p. 507-509, 1984. Disponível em: <<https://doi.org/10.21273/HORTSCI.19.4.507>>.

DUVAL, A.; GEZAN, S. A.; MUSTIGA, G.; STACK, C.; MARELLI, J. P.; CHAPARRO, J.; LIVINGSTONE, D.; ROYAERT, S.; MOTAMAYOR, J. C. Genetic parameters and the impact of off-types for *Theobroma cacao* L. in a breeding program in Brazil. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 1–12, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02059>>.

ELHITI, M.; STASOLLA, C. Ectopic expression of the *Brassica SHOOTMERISTEMLESS* attenuates the deleterious effects of the auxin transport inhibitor TIBA on somatic embryo number and morphology. **Plant Science**, v. 180, n. 2, p. 383–390, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.10.014>>.

ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In Vitro Cellular and Developmental Biology- Plant**, v. 47, n. 1, p. 5-16, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11627-010-9327-2>>.

ENGELMANN, F.; DUSSERT, S. Cryopreservation. *In*: NORMAH, M.N., CHIN, H.F., REED, B.M. (eds.). **Conservation of Tropical Plant Species**. New York: Springer Science & Business Media, 2012; p. 107–119. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3776-5>>.

ESAN, E. B. Tissue culture studies on cocoa (*Theobroma cacao* L.) - a supplementation of current research. *In*: Proceedings V international cacao research conference. Ibadan: **Cacao Research Institute of Nigeria**. p. 116–125, 1975. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-3-642-76422-6_5>.

FABRE, J.; DEREUDDRE, J. Encapsulation Dehydration-a new approach to cryopreservation of Solanum shoot-tips. **Cryo-lett.**, v. 11, p. 413-426, 1990. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/272784000_Encapsulation-dehydration_A_new_approach_to_cryopreservation_of_Solanum_shoot_tips_CryoLetters>. Acesso em: 03/05/2024.

FACHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. C. **Propagação de Plantas Frutíferas**. Brasília: Embrapa. p. 1–133, 2005. Disponível em: https://propagacao_de_plantas_Frutiferas%20.pdf. Acesso em: 07/05/2023

FALEIRO, F. G.; PIRES, J. L.; MONTEIRO, W. R.; LOPES, U. V.; YAMADA, M. M.; PIEDRA, A. G.; MOURA, A. D.; ARÉVALO-GARDINI, E.; MARQUES, J. R. B.; GRAMACHO, K. P.; FALEIRO, A. S. G.; SANTOS, M. C. M. Variability in cacao accessions from the Brazilian, Ecuadorian, and Peruvian Amazons based on molecular markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 4, p. 227–233, 2004. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/305903151_Variability_in_cacao_accessions_from_the_Brazilian_Ecuadorian_and_Peruvian_Amazons_based_on_molecular_markers_and_Peruvian_Amazons_based_o>. Acesso em: 07/05/2023.

FAOSTAT - Food and Agriculture Organization of the United Nations. Data Production and Trade. 2020. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/>. Acesso em: 07/01/ 2023.

- FAOSTAT - Food and Agriculture Organization of the United Nations. Crops and livestock products. 2022. Disponível em: <<https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>>. Acesso em: 16/04/2024.
- FEHÉR, A. Why somatic plant cells start to form embryos? **Plant Cell Monographs**, v. 2, p. 85–101, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1007,7089_019>.
- FEHÉR, A. Somatic embryogenesis - stress-induced remodeling of plant cell fate. **Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1849, n. 4, p. 385–402, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.07.005>>.
- FEHÉR, A.; PASTERNAK, T. P.; DUDITS, D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 74, n. 3, p. 201–228, 2003. Disponível em: <<https://doi.org/10.1023/A:1024033216561>>.
- FONSECA, S. C. L.; FREIRE, H. B. Sementes recalcitrantes: problemas na pós-colheita. Campinas: **Bragantia**, v. 62, n. 2, p. 297–303, 2003. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/s0006-87052003000200016>>.
- FONSECA, S.T.D.; COIMBRA, M.C.; CASTRO, A.H.F. Criopreservação de sementes e ápices caulinares de *Bauhinia variegata*. In: JUNIOR, J.M.B.O.; CALVÃO, L. B. (org.). **Debate e Reflexão das Novas Tendências da Biologia**. Belo Horizonte: Editora Atena, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.22533/at.ed.2591909082>>.
- GARATE-NAVARRO, M. A.; ARÉVALO-GARDINI, E. Induction of Somatic Embryogenesis from Cocoa Farmer Field Collection of ICT - Peru. **International Annals of Science**, v. 2, n. 1, p. 6–11, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.21467/ias.2.1.6-11>>.
- GARCIA, C.; CORRÊA, F.; FINDLEY, S.; ALMEIDA, A.-A.; COSTA, M.; MOTAMAYOR, J. C.; SCHNELL, R.; MARELLI, J. P. Optimization of somatic embryogenesis procedure for commercial clones of *Theobroma cacao* L. **African Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 36, p. 1936–1951, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.5897/AJB2016.15513>>.
- GARCIA, C.; ALMEIDA, A. A. F.; COSTA, M.; BRITTO, D.; CORREA, F.; MANGABEIRA, P.; SILVA, L.; SILVA, J.; ROYAERT, S.; MARELLI, J. P. Single-base resolution methylomes of somatic embryogenesis in *Theobroma cacao* L. reveal epigenome modifications associated with somatic embryo abnormalities. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 1–19, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-022-18035-9>>.
- GARGIULO, R.; SAUBIN, M.; RIZZUTO, G.; WEST, B.; FAY, M. F.; KALLOW, S.; TRIVEDI, C. Genetic diversity in British populations of *Taxus baccata* L.: Is the seedbank collection representative of the genetic variation in the wild? **Biological Conservation**, v. 233, n. October 2018, p. 289–297, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biocon.2019.01.014>>

GAYATRI, G. P.; KUMAR, K. G. A.; NAIR, P. S.; DETH, G. S. K.; BAIJU, K. V. Dynamics of Water and Abscisic Acid During Embryogeny and Embryo Drying in the Recalcitrant Seeds of *Vateria indica* L. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 41, n. 1, p. 15–22, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00344-020-10274-2>>.

GILDARDO, E.; PALENCIA, C.; GÓMEZ, R.; LUÍS, A.; MEJIA, F. Patrones de cacao. Bucaramanga: **Corpoico Bucaramanga**, 2007. Disponível em: <https://repository.agrosavia.co/bitstream/handle/20.500.12324/2222/42973_48680.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 24/03/2023.

GODOY, P. R. E.; SOUZA, M. M.; ROZA, F. A.; LAWINSCKY, P. R.; ARAÚJO, I. S.; AHNERT, D. Performance polínica em cacauzeiros (*Theobroma cacao* L.) autocompatíveis e autoincompatíveis. **Brazilian Journal of Botany**, v. 32, n. 3, p. 617–620, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-84042009000300019>>.

GONZÁLEZ, L. S. M.; ROJAS, C. Y. G.; RIECHE, A. K. S. Obtención de embriones somáticos primarios de *Theobroma cacao* en clones de interés regional para el departamento norte de Santander, Colombia. **Respuestas**, v. 10, n. 1, p. 21-29, 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.22463/0122820X.675>>.

GONZÁLEZ-OROZCO, C. E.; GALÁN, A. A. S.; RAMOS, P. E.; YOCKTENG, R. Exploring the diversity and distribution of crop wild relatives of cacao (*Theobroma cacao* L.) in Colombia. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 67, n. 8, p. 2071-2085, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10722-020-00960-1>>.

GONZAGA, T. W. C.; MATA, M.E.R.M.C.; SILVA, H.; DUARTE, M.E.M. Crioconservação de sementes de aroeira (*Astronium urundeuva* Engl.), e baraúna (*Schinopsis brasiliensis* Engl.). **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 5, n. 2, p. 145-154, 2003. Disponível em: <<https://doi.org/10.15871/1517-8595/rbpa.v5n2p145-154>>.

GROLI, P. R. Propagação de plantas ornamentais. In: PETRY, C. (org.). **Plantas ornamentais: aspectos para produção**. (2. ed.). Passo Fundo: Universidade de Passo Fundo, 2008. p. 59-69. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/314420135_Plantas_Ornamentais_Aspectos_para_a_producao_2ed>. Acesso em: 10/01/2024.

GUAN, Y.; LI, S.; FAN, X.; SU, Z. Application of Somatic Embryogenesis in Woody Plants. **Frontiers in Plant Science**. v. 7, p. 1–12, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00938>>.

GUILLOU, C.; FILLODEAU, A.; BRULARD, E.; BRETON, D.; DE FARIA MARASCHIN, S.; VERDIER, D.; SIMON, M.; DUCOS, J. P. Indirect somatic embryogenesis of *Theobroma cacao* L. in liquid medium and improvement of embryo-to-plantlet conversion rate. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 54, n. 4, p. 377–391, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11627-018-9909-y>>.

GUIMARÃES, M. E. S.; DIAS, L. A. S.; ALMEIDA, C. M. V. C. A.; SOUZA, C. A. S.; ALMEIDA, O. F.; BENJAMIN, C. S.; PEREIRA, G. R. P.; DIAS, F. J. S.; CORRÊA, T. R. Genetic evaluation and selection of cocoa tree clones. **Ciência Rural**, v. 52 p. 1–9, 2022. Disponível em: <<http://doi.org/10.1590/0103-8478cr20210433>>.

HAGGAG, A. M.; HASSAN, B.A.; HASSAN, N. A.; HUSSEIN, E.A.H. *Droplet-vitrification* cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of grapevine (*Vitis* spp.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 54, p. 590-599, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.5829/idosi.wasj.2013.28.02.13802>>.

HIGASHI, E. N.; SILVEIRA, R. L. V. A.; GONÇALVEZ, A. N. Propagação vegetativa de Eucalyptus: princípios básicos e a sua evolução no Brasil. **Circular Técnica IPEF**, v. 192, p. 1–11, 2000. Disponível em: <<https://www.ipef.br/publicacoes/ctecnica/nr192.pdf>>. Acesso em: 10/12/2023.

HUNTER, J. R. The Status of Cacao (*Theobroma cacao*, Sterculiaceae) in the Western Hemisphere. **Economy Botany**, v. 44, n. 4, p. 425–439, 1990. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/BF02859775>>.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção de cacau**. IBGE, 2022. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/cacau/br>. Acesso em 05/02/2024.

ICCO. Statistics- International Cocoa Organization. Disponível em: http://www.icco.org/about-us/international-cocoa-agreements/cat_view/30relateddocuments/37-fair-trade-organic-cocoa.html. Acesso em: 09/01/2023.

ICCO. Production of cocoa beans: Quarterly bulletin of cocoa statistic, Vol. XLVII, Nº. 4, Cocoa year 2020/2021. The International Cocoa Organization (ICCO). Disponível em: <<https://www.icco.org/novembert-2021-quarterly-bulletin-of-cocoa-statistics/>>. Acesso em: 05/05/2024.

JEZZER, R.E.; VERWEIJ, P.A.; SANTOS, M.J.; BOOT, R.G.A. Shaded coffee and cocoa- Double dividend for biodiversity and small-scale farmers. **Ecological Economics**, v. 140, p. 136-137-145, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2017.04.019>>.

JONES, J.; ZHANG, E.; TUCKER, D.; RIETZ, D.; DAHLBECK, D.; GOMEZ, M.; GARCIA, C.; MARELLI, J. P.; LIVINGSTONE, D.; SCHNELL, R.; STASKAWICZ, B.; CHO, M. J. Screening of cultivars for tissue culture response and establishment of genetic transformation in a high-yielding and disease-resistant cultivar of *Theobroma cacao*. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 58, n. 1, p. 133–145, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11627-021-10205-0>>.

KAHIA, J.; KONE, S.; DIBY, L.; NGORAN, G.; DADJO, C.; KOUAME, C. Enhanced plantlet regeneration in two cacao (*Theobroma cacao*) clones from immature inflorescence explants. **HortScience**, v. 52, n. 6, p. 892–895, 2017. Disponível em: <[10.21273/HORTSCI11844-17](https://doi.org/10.21273/HORTSCI11844-17)>.

KAMIŃSKA, M.; SKRZYPEK, E.; WILMOWICZ, E.; TRETYN, A.; TREJGELL, A. Effect of light conditions and ABA on cold storage and post-storage propagation of *Taraxacum pinnatum*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 127, n. 1, p. 25–34, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11240-016-1026-1>>.

KPMG. **Cocoa Certification: Study on the costs, advantages and disadvantages of cocoa certification commissioned by The International Cocoa Organization (ICCO)**, 2012. Disponível em: http://www.icco.org/about-us/international-cocoa-agreements/cat_view/30-relateddocuments/37-fair-trade-organic-cocoa.html. Acesso em 09/01/2023.

KARAMI, O.; DELJOU, A.; KORDESTANI, G. K. Secondary somatic embryogenesis of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 92, n. 3, p. 273–280, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11240-007-9332-2>>.

KROEGER, A.; KOENIG, S.; THOMSON, A. STRECK, C.; WEINER, P.H.; BAKHTARY, H. Forest, and climate-smart cocoa in Côte D’Ivoire and Ghana: aligning stakeholders to support smallholders in deforestation free-cocoa. **World Bank**: Washington, DC, USA 2017. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1596/29014>>.

LAVANHOLE, D. F.; ARANTES, S. D.; ARANTES, L. D. O.; ALBERTO, C.; SOUZA, S.; CRISTINA, S.; POSSE, P.; NETO, B. C.; CRASQUE, J. Ecofisiologia da germinação dos genótipos de *Theobroma cacao* L. **Iheringia, Série Botânica**, v. 74, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.21826/2446-82312019v74e2019007>>.

LI, B.; WENG, Q.; LIU, Z.; SHEN, M.; ZHANG, J.; WU, W.; LIU, H. Selection of antioxidants against ovarian oxidative stress in mouse model. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 31, n. 12, p. 1–6, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/jbt.21997>>.

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**. v. 34, p. 293-299, 1998. Disponível em: <<https://www.jstor.org/stable/20065005>>. Acesso em: 20/08/2023.

LIMA, D. M., BIASI, L. A., ZUFFELLATO-RIBAS, K. C., BONA, C. MAYER, J. L. Capacidade de enraizamento de estacas de *Maytenus muelleri* Schwacke com a aplicação de ácido indol butírico relacionada aos aspectos anatômicos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, p. 422-438, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1516-05722011000400008>>.

LITZ, P. Tissue culture studies with *Theobroma cacao*. In: DIMICK, P.S. (ed.). **Proceedings of the Cacao Biotechnology Symposium**. Pennsylvania: Department of Food Science, 1986. p. 111-120. Disponível em: <https://books.google.com.br/books/about/Proceedings_of_the_Cacao_Biotechnology_S.html?id=JydIAAAAYAAJ&redir_esc=y>. Acesso em: 16/04/2023.

LOPEZ-BAEZ, ORLANDO; BOLLON, HÉLÈNE; ESKES, ALBERTUS; PETIARD, V. Embryogenèse somatique de cacaoyer *Theobroma cacao* L. à partir de pièces florales: Somatic embryogenesis and plant regeneration from flower parts of cocoa *Theobroma cacao* L. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences**, v. 316, n. 6, p. 579-584, 1993. Disponível em:

<https://ceune.unach.mx/images/pdf_audes/publicaciones/5.pdf>. Acesso em: 02/10/2023.

LUCENA, E. A. R. M. Botânica do cacauero. In: MELLO, D. L. N.; GROSS, E. (org.). **Guia de manejo do agroecossistema cacau cabruca- ecologia da espécie, gestão, práticas e técnicas agroecológicas**. Ilheus: Instituto Cabruca, 2013. v. 1, p. 92.

Disponível em: <<https://pt.scribd.com/document/441942992/1-cartilha-agroflorestal-pdf>>. Acesso: 16/04/2023.

MALAVASI, U. C. Macropropagação vegetativa em coníferas- Perspectivas biológicas e operacionais. **Floresta e ambiente**, v. 1, n. 1, p. 131-135, 1994. Disponível em:

<<https://www.floram.org/article/588e2240e710ab87018b46e0/pdf/floram-1-único-131.pdf>>. Acesso em: 23/11/2023.

MARINATO, C. S.; ANTONIO, M.; AGUILAR, G.; SPAGIARI, C. A.; JOSÉ, F.; OLMO, V. Enxertia precoce em cacau (*Theobroma cacao* L.). **Enciclopédia Biosfera**, v. 9, n. 17, p. 1285–1292, 2013. Disponível em:

<<https://www.conhecer.org.br/enciclop/2013b/CIENCIAS%20AGRARIAS/ENXERTIA.pdf>>. Acesso em: 01/06/2023.

MARTINS, A.G.; ROSÁRIO, D. L.; BARROS, M. N.; JARDIM, M. A. G.

Levantamento etnobotânico de plantas medicinais, alimentares e tóxicas da Ilha do Combu, Município de Belém, Estado do Pará, Brasil: Etnobotanical research of medicinal, alimentary and toxic plants in Combu Island, County of Belém, Pará, Brazil. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 86, n. 1, p. 21–30, 2005. Disponível em:

<https://www.researchgate.net/publication/277216695_Levantamento_etnobotanico_de_plantas_medicinais_alimentares_e_toxicas_da_Ilha_do_Combu_Municipio_de_Belem_Estado_do_Para_Brasil>. Acesso em: 15/01/2023.

MAXIMOVA, S. N.; ALEMANNI, 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 Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 38, n. 3, p. 252–259, 2002. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1079/IVP2001257>>.

MAXIMOVA, S. N.; YOUNG, A.; PISHAK, S.; MILLER, C.; TRAORE, A.; GUILTINAN, M. J.; MOHAN, S. Integrated system for propagation of *Theobroma cacao* L. In: JAIN, S. M.; GUPTA, P. K. (eds.). **Protocol for Somatic Embryogenesis in Woody Plants**, The Netherlands: Forestry Sciences, 2005, v. 77, p. 209-227.

Disponível em: <https://doi.org/10.1007/1-4020-2985-3_17>.

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

Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11240-008-9398-5>>.

MODESTE, K. K.; ELIANE, M. T.; DAOUDA, K.; BRAHIMA, S. A.; TCHOA, K.; KOUABLAN, K. E.; MONGOMAKÉ, K. Effect of antioxidants on the callus induction and the development of somatic embryogenesis of cocoa [*Theobroma cacao* (L.)]. **Australian Journal of Crop Science**, v. 11, n. 1, p. 25–31, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.21475/ajcs.2017.11.01.pne174>>.

MONISHA, M.; SWATHI, G.; BAVITHRA, P. S.; ARUN, P. Conservation of plant materials by cryopreservation - A review. **European Journal of Biomedical**, v. 7, n. April, p. 174–190, 2019. Disponível em: <https://storage.googleapis.com/journal-uploads/ejbbs/article_issue/volume_6_march_issue_3/1551338027.pdf>. Acesso em: 18/06/2024

MORRISSEY, J. STACK, J.C.; VALLS, R.; MOTAMAYOR, J.C. Low-cost assembly of cacao crop genome is able to resolve complex heterozygous bubbles. **Horticulture research**, v.6, n.1, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41438-019-0125-7>>.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, v. 15, n.3, p. 473-497, 1962. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>>.

MUSTIGA, G. M.; GEZAN, S. A.; PHILLIPS-MORA, W.; ARCINIEGAS-LEAL, A.; MATA-QUIRÓS, A.; MOTAMAYOR, J. C. Phenotypic description of *Theobroma cacao* L. for yield and vigor traits from 34 hybrid families in Costa Rica based on the genetic basis of the parental population. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 1–17, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00808>>.

NAGEL, M.; PENCE, V.; BALLESTEROS, D.; LAMBARDI, M.; POPOVA, E.; PANIS, B. Plant Cryopreservation: Principles, Applications, and Challenges of Banking Plant Diversity At Ultralow Temperatures. **Annual Review of Plant Biology**, v. 75, p. 1–28, 2024. Disponível em: <<https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-070623-103551>>.

NAKAYAMA, K. Ventilação artificial promove polinização fértil em flor de cacauero (*Theobroma cacao* L.). Itabuna: **Agrotropica**, v. 34, n. 1, p. 29–40, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.21757/0103-3816.2022v34n1p29-40>>.

NETO, P. J. S.; MATOS, P. G. G.; MARTINS, A. C. S.; SILVA, A. P. Sistema de produção de cacau para a amazônia brasileira. **Comissão Executiva do Plano da Lavoura- CEPLAC**. v. 6, n. 11, p. 951–952, 2001. Disponível em: <<https://www.passeidireto.com/arquivo/17678381/sistema-de-producao-do-cacau>>. Acesso 15/05/2023.

NIEMENAK, N.; ROHSIUS, C.; GMBH, R.; LIEBEREI, R. Regeneration of somatic embryos in *Theobroma cacao* L. in temporary immersion bioreactor and analyses of free amino acids in different tissues. **Plant cell reports**, v. 27, p. 667-676, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00299-007-0497-2>>.

NIEVES-ORDUÑA, H. E.; KRUTOVSKY, K.V.; GAILING, O. Geographic distribution, conservation and genomic resources of cacao *Theobroma cacao* L. **Crop Science**, v. 63, n.4, p.1750-1778, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/csc2.20959>>.

NISHIZAWA, S.; SAKAI, A., AMANO, Y.; MATSUZAWA, T. Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic suspension cells and subsequent plant regeneration by *vitrification*. **Plant Science**, v. 91, n. 1, p. 67-73, 1993. Disponível em: <[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0168-9452\(93\)90189-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0168-9452(93)90189-7)>.

NUNES, R. F. de M.; FILHO, C. F. D.; ROCHA, A. M. M. R. Embriogênese Somática em Tamareira. **Embrapa Semiárido**, p. 1-5, 2002. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/201370/1/aRTIGO.pdf>>. Acesso em: 16/07/2023.

O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MCCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, v. 59, n. 2, p. 368-373, 1964. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/BF01248568>>.

OFFORD, C.A.; MAKINSON, R.O. Options and major considerations for plant germplasm conservation. *In*: OFFORD, C. A.; MEAGHER, P. F. (eds.). **Plant germplasm conservation in Australia – strategies and guidelines for developing, managing and utilising ex situ collections**. Canberra: Australian Network for Plant Conservation, 2009. p. 11–34. Disponível em: <https://www.anpc.asn.au/wp-content/uploads/2021/09/Plant_Germplasm_Conservation_in_Australia_2nd_Edn_e-version.pdf>. Acesso em: 12/03/2023.

OFORI, A.; ARTHUR, A.; PADI, F. K. Extending the cacao (*Theobroma cacao* L.) gene pool with underrepresented genotypes: growth and yield traits. **Tree Genetics & Genomes**, v. 15, n. 5, p. 1-13, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11295-019-1382-1>>.

OHSE, S. Sementes recalitrantes: Um apanhado. Curitiba: **Visão Acadêmica**, v. 23, n. 2, p. 14–48, 2022. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5380/acd.v23i2.82551>>.

OLIVEIRA, A. F.; RINCÓN, C. R. A oliveira e sua propagação. *In*: LACERDA, V. (ed.) **Produção e Certificação de Mudas de Plantas Frutíferas**. Belo Horizonte: Informe Agropecuário, v. 23, n. 216, 2002, p. 41-48. Disponível em: <<https://www.livrariaepamig.com.br/docs/ia-216-producao-e-certificacao-de-mudas-de-plantas-frutiferas/>>. Acesso em: 17/05/2023.

OROZCO-AGUILAR, L., LÓPEZ-SAMPSON, A., LENADRO-MUÑOZ, M.E.; ROBIGLIO, V.; REYES, M.; BORDEAUX, M.; SEPÚLVEDA, N.; SOMARRIBA, E. Elucidating pathways and discourses linking cocoa cultivation to deforestation, reforestation, and tree cover change in Nicaragua and Peru. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, v. 5, p. 635779, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.635779>>.

PANCANINGTYAS, S. Evaluation of Quantity and Hyperhydricity of Cocoa Somatic Embryo Obtained from Solid Culture, Liquid Culture, and Sequence Subculture. **Pelita Perkebunan (a Coffee and Cocoa Research Journal)**, v. 29, n. 1, p. 10-19, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.22302/ICCRI.JUR.PELITAPERKEBUNAN.V29I1.187>>.

PANCANINGTYAS, S. The effect of 2,4 dichlorophenoxyacetic acid on in vitro callogenesis of cocoa (*Theobroma cacao* L.). **Pelita Perkebunan (a Coffee and Cocoa Research Journal)**, v. 31, n. 2, p. 90–98, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.22302/icri.jur.pelitaperkebunan.v31i2.67>>.

PANIS, B.; LAMBARDI, M. Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees). **The role of biotechnology**, v. 5, n. 7, p. 43–54, 2005. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/237472165_Status_of_cryopreservation_technologies_in_plants_crops_and_forest_trees>. Acesso em: 15/04/2023.

PENCE, V. C.; HASEGAWA, P. M.; JANICK, J. Asexual Embryogenesis in *Theobroma cacao* L. **American Society**, v. 104, n. 2, p. 145–148, 1979. Disponível em: <<https://doi.org/10.21273/JASHS.104.2.145>>.

PENCE, V. C. Cryopreservation of immature embryos of *Theobroma cacao*. **Plant Cell Reports**, v. 10, n. 3, p. 144–147, 1991. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/BF00232046>>.

PENCE, V. C. Cacao (*Theobroma cacao* L.). In: BAJAJ, Y.P.S. (ed.). **Biotechnology in Agriculture and Forestry 5**. 5. ed. Berlin: Springer-Verlag, 2012. p. 203–221. Disponível em: <<https://www.amazon.com/Trees-Biotechnology-Agriculture-Forestry-Book-ebook/dp/B000W23L5M>>. Acesso em: 05/08/2023.

PENCE, V. C.; BRUNS, E. B. The Tip of the Iceberg: Cryopreservation Needs for Meeting the Challenge of Exceptional Plant Conservation. **Plants**, v. 11, n. 12, p. 1–15, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/plants11121528>>.

PEREIRA, M. C.; SANTOS, L. S.; MARTINS, S. S.; LIMA, M. A.; RIBEIRO, V. G. Propagação vegetativa de cacauzeiros pelo processo de estaquia, testando diferentes concentrações de ácido indolbutírico. **Revista Semiárido De Visu**, v. 3, n. 3, p. 118–124, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.31416/rsdv.v3i3.164>>.

PRIYANKA, V.; KUMAR, R.; DHALIWAL, I.; KAUSHIK, P. Germplasm conservation: Instrumental in agricultural biodiversity—a review. **Sustainability (Switzerland)**, v. 13, n. 12, p. 1–18, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/su13126743>>.

PRUDENTE, D.O; NERY, F.C.; SILVA, L.S.; PAIVA, R.; REIS, M.V.; NERY, M.C. Germinação in vitro e criopreservação de sementes de paineira-rosa. **Scientia Agraria Paranaensis**, p. 272-276, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.18188/sap.v15i3.11775>>.

QUEIROGA, V. P.; GOMES, J. P.; MELO, B.A.; ALBUQUERQUE, E. M. B. Sistema produtivo de cacau (*Theobroma cacao* L.) orgânico sobreado. In: QUEIROGA, V. P.; GOMES, J. P.; MELO, B.A.; ALBUQUERQUE, E. M. B (eds.). **Cacau (*Theobroma cacao* L.) orgânico sobreado tecnologias de plantio e produção da amêndoa fina**. Campina Grande: A Barriguda, 2021. p. 10-245. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/348522684_CACAU_Theobroma_cacao_L_ORGANICO_SOMBREADO_TECNOLOGIAS_DE_PLANTIO_E_PRODUCAO_DA_AMENDOA_FIN>. Acesso em: 15/01/2024.

- RAMÍREZ, A. M. H.; DUQUE, H. J. S.; TRUJILLO, A. I. U. Quality of cocoa (*Theobroma cacao* L.) DNA from foliar tissue at different stages of development. **Acta Agronomica**, v. 67, n. 2, p. 311–318, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.15446/acag.v67n2.63046>>.
- RAMÍREZ, A. M. H.; VASQUEZ, T. H.; OSORIO, T. M. O.; GARCÉS, L. A.; TRUJILLO, A. I. U. Evaluation of the potential of regeneration of different Colombian and commercial genotypes of cocoa (*Theobroma cacao* L.) via somatic embryogenesis. **Scientia Horticulturae**, v. 229, p. 148–156, 2018.
- RAMÍREZ, A. M. H.; HAJDUK, D. H. P.; TRUJILLO, A. I. U. Cost Analysis of Cacao (*Theobroma cacao* L.) Plant Propagation through the Somatic Embryogenesis Method. **Bionatura**, v. 7, n. 2, p. 1-13, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.21931/RB/2022.07.02.2>>.
- RAMOS, J.D.; CHALFUN, N.N.J.; PASQUAL, M.; RUFINI, J.C.M. Produção de mudas de plantas frutíferas por semente. In: LACERDA, V. (ed.) **Produção e Certificação de Mudas de Plantas Frutíferas**. Belo Horizonte: Informe Agropecuário, v. 23, n. 216, 2002, p. 64-73. Disponível em: <<https://www.livrariaepamig.com.br/docs/ia-216-producao-e-certificacao-de-mudas-de-plantas-frutiferas/>>. Acesso em: 17/05/2023.
- REIS, E.S.; PINTO, J.E.B.P.; ROSADO, L.D.S.; CORRÊA, R.M. Influência do meio de cultura na germinação de sementes in vitro e taxa de multiplicação de *Melissa officinalis* L. **Ceres**, v. 55, n. 3, p. 160–167, 2008. Disponível em: <<https://www.redalyc.org/pdf/3052/305226701014.pdf>>. Acesso em: 20/05/2023.
- RIBEIRO, J. M.; TEIXEIRA, S. L. Substituição de nitrato de potássio (PA) por salitre potássico no preparo de meio de cultura de tecidos vegetais esterilizado com hipoclorito de sódio. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 4, p. 1209–1213, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1413-70542008000400026>>.
- RICE, R. A.; GREENBERG, R. Cacao cultivation and the conservation of biological diversity. **AMBIO: A Journal of the Human Environment**, v. 29, n. 3, p. 167-173, 2000. Disponível em: <<https://repository.si.edu/bitstream/handle/10088/391/Rice2000.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 22/04/2024.
- SÁ, J. F.; SILVEIRA, D. M. S.; SANTOS, K. C. F.; SOUZA, A. S.; LEDO, C. A. S.; CARVALHO, M. J. S. Effects of different doses of paclobutrazol and sucrose in the minimum in vitro growth of wild species of *Manihot*. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 16, n. 2, p. 1–8, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.5039/agraria.v16i2a8657>>.
- S.A.C., M. & O. C. Estudio de caracterización del potencial genético del cacao en el Peru. Lima: **Empresa Consultora**, p. 5-142, 2013. Disponível em: <https://www.midagri.gob.pe/portal/download/pdf//direccionesyoficinas/dgca/estudio_caracterizacion.pdf>. Acesso em: 15/01/2023.

SAKAI, A.; KOBAYASHI, S.; OIYAMA, I. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by *vitrification*. **Plant Cell Reports**, v. 9, n. 1, p. 30-33, 1990. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/BF00232130>>.

SALAZAR, R. V.; SANDREA, Y.; BETANCOURT, C.; MATA, J.; GARCÍA, F. Embriogénesis somática en cultivares de cacao venezolanos. **Agronomía Tropical**, v. 56, n. 1, p. 61–74, 2006. Disponível em: <<https://ve.scielo.org/pdf/at/v56n1/art04.pdf>>. Acesso em: 10/04/2023.

SALLES, B. P. A.; DAVID, A. M. S. S.; FIGUEIREDO, J. C.; MAIA, V. M.; PRUDÊNCIO, JOÃO RAFAEL DOS SANTOS PEREIRA, K. K. G. Viabilidade de Sementes de Cacao e Limitações no Armazenamento Cocoa Seed viability and limitations in storage. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 42, n. 4, p. 1010–1014, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.19084/rca.18166>>.

SANCHES, C. L. G.; PINTO, L. R. M.; POMELLA, A. W. V.; SILVA, S. D. V. M.; LOGUERCIO, L. L. Assessment of resistance to *Ceratocystis cacaofunesta* in cacao genotypes. **European Journal of Plant Pathology**, v. 122, n. 4, p. 517–528, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10658-008-9319-9>>.

SANTANA, F. V. Criopreservação de espécies frutíferas tropicais. 2018. Dissertação (Mestrado em Agricultura e Biodiversidade) - Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2018. Disponível em: https://ri.ufs.br/bitstream/riufs/11713/2/FERNANDA_VIEIRA_SANTANA.pdf. Acesso em: 15/04/2024.

SANTOS, P. A. A.; PAIVA, R.; SILVA, L. C.; SOUZA, A. C.; SANTANA, M. C.; SILVA, D. P. C. Cryopreservation of the mangaba tree (*Hancornia speciosa* Gomes): A protocol for long-term storage. **Acta Scientiarum - Agronomy**, v. 37, n. 3, p. 289–296, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.4025/actasciagron.v37i3.19573>>.

SANTOS, I. R. I.; SALOMÃO, A. N. Guia prático de Criopreservação: técnicas aplicadas à conservação de germoplasma vegetal. Brasília: **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, v.1, p. 1-36, 2023. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1157590/1/DOC-385-Guia-pratico-de-criopreserva.-final.pdf>>. Acesso em: 07/07/2023.

SEBBENN, A. M. Tamanho amostral para conservação ex situ de espécies arbóreas com sistema misto de reprodução. **Revista do Instituto Florestal**, v. 15, n. 2, p. 147–162, 2003. Disponível em: <<https://doi.org/10.24278/2178-5031.2003152443>>.

SERRANO, R. M. R. **Estudio de la diversidad de insectos polinizadores en sistemas agroforestales de cacao y su relacion con la productividad y diversidad de especies del dosel**. 2011. Tese (Doutorado em Engenharia Agrônômica) - Universidad San Pedro Sula, San Pedro, 2011. Disponível em: <https://repositorio.catie.ac.cr/handle/11554/8047>. Acesso em: 10/01/2024.

SHEN, S.; ZHANG, Q.; SHI, Y.; SUN, Z.; ZHANG, Q.; HOU, S.; WU, R.; JIANG, L.; ZHAO, X.; GUO, Y. Genome-wide analysis of the NAC domain transcription factor gene family in *Theobroma cacao*. **Genes**, v. 11, n. 1, p. 1-11, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/genes11010035>>.

SILVA, F. B. B.; LEMOS, O. F.; MENDONÇA, D. P.; RAMOS, G. K. S.; RODRIGUÊS, O. M. J.; POLTRONIERI, M. C. Ácido naftaleno acético na rizogênese in vitro de pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.). p. 21–24, 2016. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/148085/1/Pibic2016-p180.pdf>>. Acesso em: 23/09/2023.

SILVEIRA, F. A. O.; TEIXIDO, A. L.; ZANETTI, M.; PÁDUA, J. G.; DE ANDRADE, A. C. S.; DA COSTA, M. L. N. Ex situ conservation of threatened plants in Brazil: A strategic plan to achieve target 8 of the global strategy for plant conservation. **Rodriguesia**, v. 69, n. 4, p. 1547–1555, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/2175-7860201869405>>.

SINGH, P. R.; SINGH, L. J. In vitro propagation for improvement of medicinal plants: A review. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 10, n. 1, p. 1484–1489, 2021. Disponível em: <<https://www.phytojournal.com/archives/2021/vol10issue1/PartU/10-1-16-385.pdf>>

SIVIERO, A.; MACEDO, P. E. F.; MOREIRA, G. T. S. Doenças Em Cacaueiro E Cupuaçuzeiro No Acre. Itabuna: **Agrotropica**, v. 34, n. 2, p. 159–164, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.21757/0103-3816.2022v34n2p159-164>>.

SOCIEDADE NACIONAL DE AGRICULTURA. **Projeto quer Brasil como maior produtor de cacau do mundo**. Sociedade Nacional de Agricultura, 2021. Disponível em: <<https://sna.agr.br/projeto-quer-brasil-como-maior-produtor-de-cacau-do-mundo/>>. Acesso em: 15/03/2023.

SODRÉ, G. A. Substratos e estaquia na produção de mudas de cacaueiro. 2007. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007. Disponível em: <<https://www.fcav.unesp.br/Home/download/pgtrabs/pv/d/2525.pdf>>. Acesso em: 10/01/2024.

SODRÉ, G. A.; GOMES, A. R. S. Cocoa propagation, technologies for production of seedlings. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 41, n. 2, p. 1–22, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/0100-29452019782>>.

SOMARRIBA, E.; LACHENAUD, P. Successional cocoa agroforests of the Amazon-Orinoco-Guiana Shield. **Forest Trees and Livelihoods**, v. 22, n.1, p.51-59, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/14728028.2013.770316>>.

SOUZA, C.A.S.; AGUILAR, M.A.G.; DIAS, L.A.S. Cacau. In: MONTEIRO, J.E.B.A (ed.). Agrometeorologia dos cultivos: O fator meteorológico na produção agrícola. Brasília: INMET, 2009, p. 333-350. Disponível em: <https://portal.inmet.gov.br/uploads/publicacoesDigitais/agrometeorologia_dos_cultivos.pdf>. Acesso em: 10/05/2024.

SOUZA, M. S.; VENTURIERI, G. A. Floral biology of cacauehy (*Theobroma speciosum*, Malvaceae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 4, p. 861-872, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1516-89132010000400016>>.

TEIXEIRA, J. B.; MARBACHR, P. A. S.; SANTOS, M. de O. Otimização da metodologia de embriogênese somática visando a propagação clonal de genótipos elite de cacau (*Theobroma cacao* L.). Brasília: **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, p. 1-33, 2002. Disponível em:

<<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CENARGEN/23221/1/doc079.pdf>>. Acesso em: 20/04/2023.

TRAORE, A.; GUILTINAN, M. J. Effects of carbon source and explant type on somatic embryogenesis of four cacao genotypes. **HortScience**, v. 41, n. 3, p. 753–758, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.21273/HORTSCI.41.3.753>>.

TREVIZAN, S. D. P.; MORAES, H. G. Perfil tecnológico e social do cacaucultor. Bahia: **Agrotropica**, v. 11, n. 3, p. 103-110, 1999. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/ceplac/publicacoes/revista-agrotropica/revista-volumes/1989-a-1999/1999/revista-agrotropica-vol-11-no-31999.pdf>>.

TRUJILLO, A. I.; GARCÉS, L. A. U.; RÚA, A. M. G. Regeneración vía embriogénesis somática de una variedad colombiana élite de *Theobroma cacao* L. **Revista Colombiana Biotecnología**, v. 13, n. 2, p. 39–50, 2011. Disponível em: <<https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/27916/28655>>. Acesso em: 12/02/2023.

TSCHARNTKE, T.; CLOUGH, Y.; BHAGWAT, S. A.; BUCHORI, D.; FAUST, H.; HERTEL, D.; HÖLSCHER, D.; JUHRBANDT, J.; KESSLER, M.; PERFECTO, I.; SCHERBER, C.; SCHROTH, G.; VELDKAMP, E.; WANGER, T. C. Multifunctional shade-tree management in tropical agroforestry landscapes- A review. *Journal of Applied Ecology*, v. 48, n. 3, p. 619-629, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2010.01939.x>>.

TSCHARNTKE, T.; MILDER, J. C.; SCHROTH, G.; CLOUGH, Y.; DECLERCK, F.; WALDRON, A.; RICE, R.; GHAZOUL, J. Conserving biodiversity through certification of tropical Agroforestry crops at local and landscape scales. *Conservation Letters*, v. 8, n. 1, p. 14-23, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/conl.12110>>.

TWAIJ, B. M.; JAZAR, Z. H.; HASAN, M. N. Trends in the use of tissue culture, applications and future aspects. **International Journal of Plant Biology**, v. 11, n. 1, p. 1–14, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4081/pb.2020.8385>>.

UCHENDU, E. E.; LEONARD, S. W.; TRABER, M. G.; REED, B. M. Vitamins C and E improve regrowth and reduce lipid peroxidation of blackberry shoot tips following cryopreservation. **Plant Cell Reports**, v. 29, n. 1, p. 25–35, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00299-009-0795-y>>.

URAGAMI, A.; SAKAI, A.; NAGAI, M.; TAKAHASHI, T. Survival of cultured cells and somatic embryos of *Asparagus officinalis* cryopreserved by *vitrification*. **Plant Cell Reports**, v. 8, p. 418-421, 1989. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/BF00270083>>.

VERDEIL, J. L.; ALEMANN, L.; NIEMENAK, N.; TRANBARGER, T. J. Pluripotent versus totipotent plant stem cells: dependence versus autonomy? **Trends in Plant Science**, v. 12, n. 6, p. 245–252, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2007.04.002>>.

VOLLMER, R.; ESPIRILLA, J.; VILLAGARAY, R.; CÁRDENAS, J.; CASTRO, M.; SÁNCHEZ, J. C.; MANRIQUE-CARPINTERO, N.; ELLIS, D.; ANGLIN, N. L. Cryopreservation of Potato Shoot Tips for Long-Term Storage. *In*: DOBNIK, D.; GRUDEN, K.; RAMSAK, Z.; COLL, A. (eds.). **Solanum tuberosum: Methods and Protocols**. New York: Humana Press Inc., 2021. p. 21–54. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1609-3_2>.

ZHANG, D.; MOTILAL, L. Origin, dispersal, and current global distribution of cacao genetic diversity. *In*: BAILEY, B.A.; MEINHARDT, L.W. (eds.). **Cacao diseases: A history of old enemies and encounters**. Switzerland: Springer International Publishing p. 3-32, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-3-319-24789-2_1>.

WANG, M. R.; BI, W.; SHUKLA, M. R.; REN, L.; HAMBORG, Z.; BLYSTAD, D. R.; SAXENA, P. K.; WANG, Q. C. Epigenetic and genetic integrity, metabolic stability, and field performance of cryopreserved plants. **Plants**, v. 10, n. 9, p. 1–19, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/plants10091889>>.

WESSEL, M. QUIST-WESSEL, P.M.F. Cocoa production in West Africa, a review and analysis of recent developments. **NJAS-Wageningen Journal of Life Sciences**, v. 74-75, p. 1-7, 2015. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1016/j.njas.2015.09.001>>

WESTWOOD, M.; CAVENDER, N.; MEYER, A.; SMITH, P. Botanic garden solutions to the plant extinction crisis. **Plants People Planet**, v. 3, n. 1, p. 22–32, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/ppp3.10134>>.

YAMADA, M. M.; PIRES, J. L.; FALEIRO, F. G.; SANTOS, R. F. Ocorrência De Vassoura-De-Bruxa Em Progênes De Cacaueiro Seleccionadas Pelo Programa De Melhoramento Na Estação Experimental Joaquim Bahiana. Itabuna: **Agrotropica**, v. 26, n. 3, p. 197–202, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.21757/0103-3816.2014v26n3p197-202>>.

CAPÍTULO I
ESTABELECIMENTO DE PROTOCOLO PARA A CRIOPRESERVAÇÃO DE
CALOS DE CACAUEIRO (*Theobroma cacao* L.)

ESTABELECIMENTO DE PROTOCOLO PARA A CRIOPRESERVAÇÃO DE CALOS DE CACAUEIRO (*Theobroma cacao* L.)

RESUMO

A conservação dos recursos genéticos do cacaueteiro (*Theobroma cacao* L.) é de grande importância devido ao valor econômico da espécie no cenário mundial. Métodos tradicionais, como a manutenção das plantas em campo, apresentam desafios como altos custos e vulnerabilidade a condições climáticas adversas. Nesse contexto, a criopreservação surge como uma alternativa promissora para a conservação de cacaueteiros, uma técnica já utilizada em outras espécies comerciais. Este estudo teve como objetivo desenvolver um protocolo de criopreservação de calos de diferentes acessos de cacaueteiro, preservando sua viabilidade e capacidade de regeneração após o congelamento. Adicionalmente, foram analisadas possíveis reações adversas por meio de técnicas anatômicas. O trabalho utilizou estaminódios de botões florais de acessos comerciais (CCN-51, CEPEC 2002 e PH 16) e não comerciais (752 e 762), submetendo-os a diferentes métodos de criopreservação, incluindo vitrificação, *droplet vitrification* e *slow cooling*. Duas abordagens foram testadas: na primeira, os estaminódios foram dessecados com sacarose e, na segunda, foram imersos diretamente em soluções crioprotetoras (LS e PVS2) antes da imersão em nitrogênio líquido (NL). Os resultados indicaram que o pré-cultivo em sacarose foi eficaz, com 100% de sobrevivência para os genótipos CCN-51 e CEPEC 2002 e 80% para o PH 16, mostrando baixa oxidação comparado ao tratamento controle. Nos experimentos de imersão em LS, o genótipo 752 teve destaque, com 100% de formação de calos após imersões mais longas, enquanto o CCN-51 apresentou baixa formação de calos e alta oxidação. Quando os materiais foram imersos em PVS2 e NL, observou-se uma redução significativa na formação de calos, especialmente no genótipo 762, e maior suscetibilidade à oxidação. Os explantes imersos em NL mostraram alterações morfológicas e anatômicas, como calos com coloração mais escura e presença de células plasmolizadas. A técnica de *droplet vitrification* destacou-se por apresentar mais células embriogênicas, embora não tenha havido formação de embriões somáticos após o tratamento com NL. Em ambas as tentativas de criopreservação, a sobrevivência dos calos foi mantida, sugerindo que a técnica tem potencial para a conservação de recursos genéticos do cacaueteiro, embora melhorias sejam necessárias para otimizar a regeneração de plantas. Conclusivamente, os resultados mostram que a criopreservação por *droplet vitrification* pode ser viável para a

conservação de calos de cacauero, mantendo a viabilidade do material após o congelamento. Contudo, ajustes no protocolo são essenciais para melhorar a formação de embriões somáticos e garantir a efetividade da técnica.

Palavras-chave: Cacau, Criogenia, Calo embriogênico, Sobrevivência

ESTABLISHMENT OF A PROTOCOL FOR THE CRYOPRESERVATION OF CACAO (*Theobroma cacao* L.) CALLI

ABSTRACT

The conservation of cacao (*Theobroma cacao* L.) genetic resources is of great importance due to the species' economic value on the global stage. Traditional methods, such as maintaining plants in the field, pose challenges such as high costs and vulnerability to adverse climatic conditions. In this context, cryopreservation emerges as a promising alternative for cacao conservation, a technique already applied to other commercial species. This study aimed to develop a cryopreservation protocol for calli from different cacao accessions, preserving their viability and regeneration capacity after freezing. Additionally, potential adverse reactions were analyzed through anatomical techniques. The study used staminodes from disinfected floral buds of commercial accessions (CCN-51, CEPEC 2002, and PH 16) and non-commercial accessions (752 and 762), subjecting them to different cryopreservation methods, including vitrification, droplet vitrification, and slow cooling. Two approaches were tested: in the first, the staminodes were desiccated with sucrose, and in the second, they were directly immersed in cryoprotectant solutions (LS and PVS2) before immersion in liquid nitrogen (LN). The results indicated that sucrose preculture was effective, with 100% survival for the CCN-51 and CEPEC 2002 genotypes and 80% for PH 16, showing lower oxidation than the control treatment. In the LS immersion experiments, the 752 genotype stood out with 100% callus formation after longer immersions, while CCN-51 showed low callus formation and high oxidation. When the materials were immersed in PVS2 and LN, a significant reduction in callus formation was observed, especially in genotype 762, along with increased susceptibility to oxidation. The explants immersed in LN showed morphological and anatomical changes, such as darker calli and the presence of plasmolyzed cells. The droplet vitrification technique produced more embryogenic cells, although no somatic embryos were formed after LN treatment. In both cryopreservation attempts, callus survival was maintained, suggesting that the technique has potential for cacao genetic resource conservation, though improvements are necessary to optimize plant regeneration. In conclusion, the results show that cryopreservation via droplet vitrification may be viable for the conservation of cacao calli, maintaining the material's viability after freezing. However, protocol adjustments are essential to improve somatic embryo formation and ensure the technique's effectiveness.

Keywords: Cacao, Cryogenics, Embryogenic Callus, Survival

1 INTRODUÇÃO

A matéria prima proveniente dos cacauzeiros possui grande importância econômica mundial, posicionando o Brasil entre os principais exportadores desse fruto. No entanto, esse destaque impõe a necessidade de aprimorar as formas de produção e, conseqüentemente, investir na conservação dessa cultura. Por esse motivo, é necessário buscar alternativas tanto tradicionais, como a propagação vegetativa (enxertia e estaquia), quanto biotecnológicas, como o uso da cultura de tecidos, para a conservação de recursos genéticos da espécie (Benelli, 2021).

A criopreservação de plantas consiste em um processo de congelamento em nitrogênio líquido (-196°C) e descongelamento sem tempo determinado mantendo a viabilidade do material vegetal. No entanto essa técnica exige etapas de proteção dos tecidos, sendo importante a remoção da água de dentro das células, por meio da dessecação osmótica ou física, com intuito de evitar formação de cristais de gelo intracelulares que podem causar a morte celular e a destruição de organelas celulares durante o processo de congelamento (Benelli, 2021).

A criopreservação pode ser aplicada a diferentes tipos de explantes, como sementes, embriões zigóticos, ápices, entre outros. Essa técnica é aplicável às sementes de espécies ameaçadas de extinção, por permitir que o metabolismo das sementes seja paralisado, podendo recuperá-las posteriormente (Gonzaga et al., 2003).

Durante o protocolo de criopreservação, são necessárias várias etapas, incluindo pré-condicionamento, congelamento a temperaturas extremamente baixas, descongelamento e recuperação do explante. O pré-condicionamento é crucial para remover a água intracelular ou equilibrar o gradiente osmótico dentro das células, prevenindo danos e lesões internas (Chen et al., 2015; Santos; Salomão, 2023). Para o congelamento o intuito é evitar a formação de cristais de gelo, que, se formados, podem romper as células após o descongelamento (Panis; Lambardi, 2005; Santos et al., 2015). Finalmente, a etapa de recuperação tem o objetivo de minimizar o choque osmótico durante o reaquecimento dos tecidos vegetais criopreservados ou minimizar os efeitos das soluções crioprotetoras e do congelamento (Vollmer, 2019).

Dentre as técnicas de congelamento conhecidas temos a *vitrification*, *droplet-vitrification*, *encapsulation-vitrification*, *encapsulation-dehydration* (Wang et al., 2021), sendo as primeiras citadas as mais utilizadas. Carvalho et al. (2021), verificaram que as imersões em soluções de *vitrification* não causaram a inviabilidade de embriões zigóticos

de seringueira (*Hevea brasiliensis* Willd. ex A.Juss.). No entanto foi observado que a criopreservação dos embriões causou o efeito contrário, o que indica a não adequabilidade das soluções ou o tempo de imersão testado. A criopreservação de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) por meio de técnica de *vitrification* e dessecação comprometeu a sobrevivência e regeneração de embriões zigóticos (Santana, 2018).

Já Fonseca, Coimbra e Castro (2019) identificaram que a criopreservação de ápices caulinares de *Bauhinia variegata* Link (pata-de-vaca) por meio da técnica *droplet vitrification* não permitiu o crescimento desses ápices após a imersão em nitrogênio líquido, o que pode ser justificado pela fitotoxicidade das soluções osmoprotetoras. Utilizando a mesma técnica, Araújo et al. (2024) comparou os tratamentos controle (sem imersão em NL-) com os tratamentos com imersão em solução crioprotetora PVS2 e congelamento a baixas temperaturas e verificaram que os ápices caulinares se mostraram viáveis para essa conservação prolongada da mangabeira.

Os protocolos de criopreservação são bastante promissores, mas ainda enfrentam algumas dificuldades, sobretudo na escolha da espécie, ligados à recalcitrância. O *Theobroma cacao*, é um exemplo disso, que devido aos diversos processos de manipulação até o congelamento, causa grande estresse ao material vegetal. Nessa espécie, os trabalhos disponíveis de criopreservação têm utilizado como explante embriões somáticos maduros, imaturos e brotos axilares (Pence, 1991; Fang; Wetten; Hadley, 2004; Adu-Gyamfi; Wetten, 2020). Utilizando principalmente da técnica *vitrification* com percentual de 74,5% sobrevivência após a criopreservação, sendo um protocolo eficaz para os genótipos testados (Adu-Gyamfi; Wetten, 2012).

No entanto, ainda esbarra em outros fatores como: genótipo-dependente (Maximova et al., 2002; Kahia et al., 2017), altas taxas de oxidação (Huq et al., 2024) dificultando respostas positivas para a criopreservação. Necessitando dessa forma, realizar mais pesquisas, relacionando-as a estudos histoanatômicos, moleculares e fisiológicos, bem como procedimentos de recuperação para os explantes criopreservados (Benelli 2021).

Diante do exposto, o objetivo deste capítulo foi desenvolver um protocolo para criopreservação de calos de acessos de cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.), mantendo a viabilidade do material após congelamento (viabilidade e potencial de regeneração), e identificar e analisar possíveis reações adversas da criopreservação por meio das técnicas de anatomia.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Foram utilizados como explantes estaminódios oriundos de botões florais fechados de *Theobroma cacao* L. (cacaueiro) (Fig. 1), retirados de diferentes genótipos comerciais (CCN-51, CEPEC 2002 e PH 16) - dentro de casa de vegetação e não comerciais (752 e 762) - ambiente externo. Os explantes foram coletados, durante o período diurno, dentro da área da Embrapa de Recursos Genéticos e Biotecnologia, situada em Brasília- DF. Após coleta, os botões florais foram conduzidos ao Laboratório de Cultura de Tecidos II, localizado na mesma unidade da Embrapa.

Os botões florais foram desinfestados dentro da câmara de fluxo laminar e colocados em imersão em álcool 70% (v/v), durante três minutos, seguida de imersão em solução de hipoclorito de sódio (NaClO) 0,5% por 10 minutos. Posteriormente, realizou-se três sucessivas lavagens (cinco minutos cada) em água destilada e autoclavada, para retirada do excesso de NaClO.

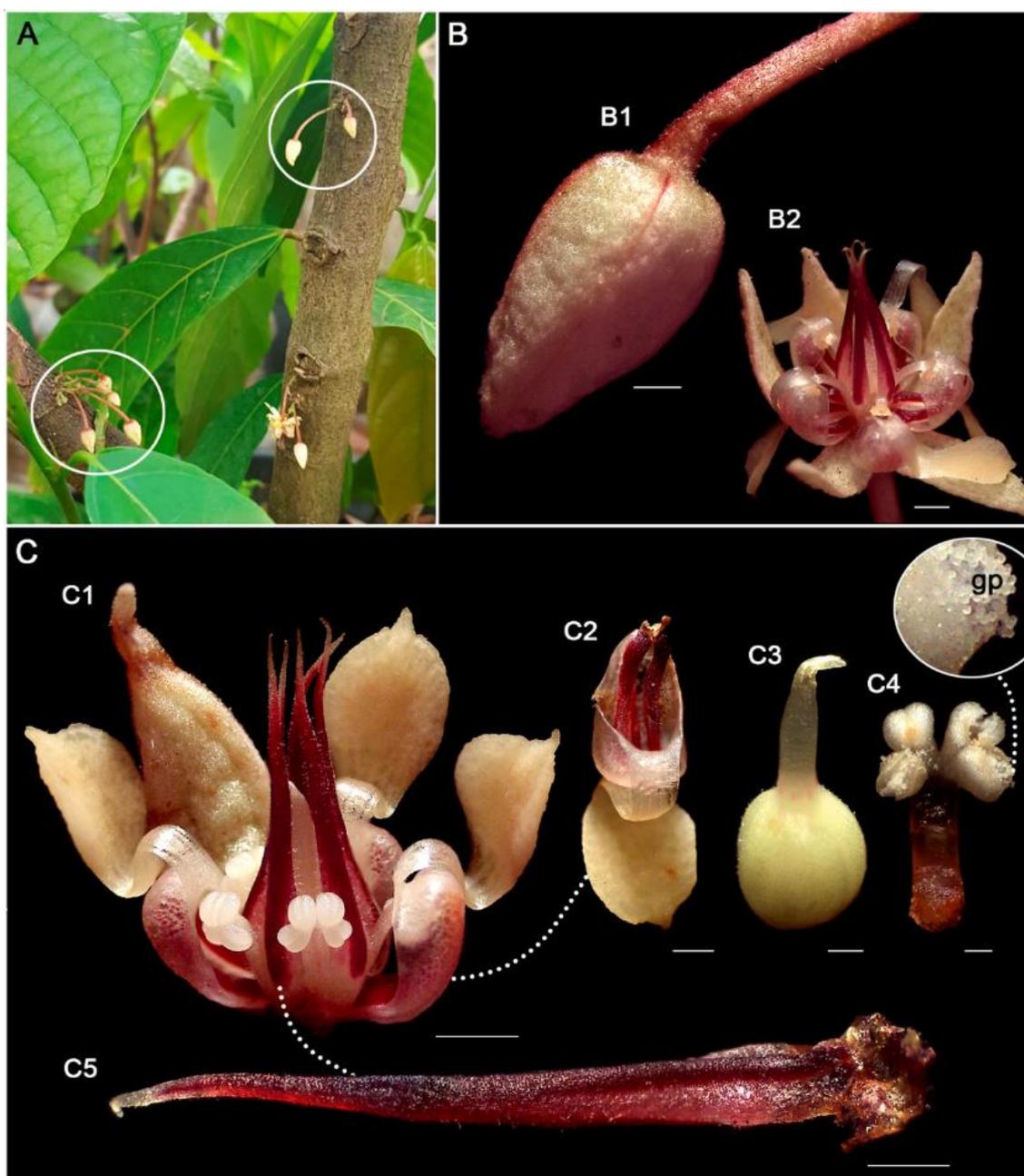


Figura 1. Caracterização morfológica de flores de *Theobroma cacao* L. (cacaueiro). **A.** Botões florais de cacaueiro fechados. **B.** Botão floral fechado (B1) e aberto (B2). **C.** Sépala (C1), pétala (C2), gineceu (C3), estame (C4) e estaminódio (C5). Abreviação: *gp*, grãos de pólen. Escalas: B1, B2 = 1 cm; C2, C5 = 0,5 cm e C3, C4 = 0,25 cm.

2.2 Técnicas de pré-condicionamento

Para avaliar a sobrevivência de estaminódios de flores de *Theobroma cacao* L. submetidos a diferentes tratamentos de pré-cultivo em sacarose, e osmoproteção seguidos

ou não de congelamento em Nitrogênio Líquido (NL), foram realizados três experimentos de pré- condicionamento (Fig. 2):

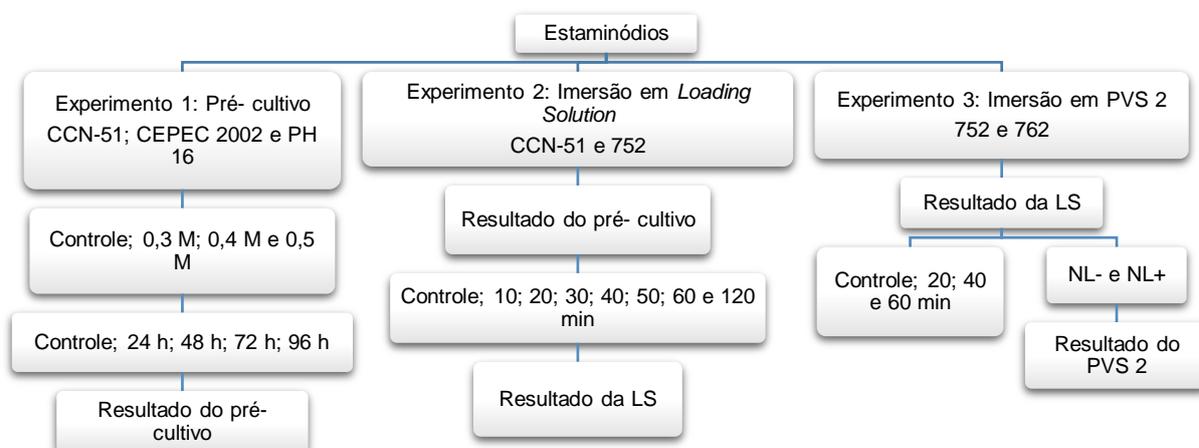


Figura 2. Representação dos experimentos de pré- cultivo e de imersão em diferentes períodos nas soluções crioprotetoras para criopreservação de diferentes genótipos de *Theobroma cacao* L. (cacaueiro).

2.2.1 Pré- cultivo em sacarose

Foram escolhidos três genótipos comerciais (CCN-51, CEPEC 2002 e PH 16) inoculados em meios contendo 0,3; 0,4 e 0,5 M de sacarose em quatro diferentes tempos, sendo eles: 24, 48, 72 e 96 horas. Avaliaram-se o percentual de sobrevivência dos explantes (caracterizada pela capacidade de formação de calos), a proporção de oxidação, a posição de surgimentos de calos primários e os tipos de calos formados, após 28 dias em meio de indução de calos (MIC) (Tabela 1) (Li et al., 1998). Adotou-se delineamento inteiramente casualizado, com 10 repetições para cada tratamento (cada repetição representada por um estaminódio).

2.2.2 Imersão em *loading solution* (LS)- osmoproteção

Os tratamentos consistiram na imersão dos estaminódios na solução crioprotetora (LS) contendo 4,43 g/L de MS (Murashige; Skoog, 1962), 136,8 g/L de sacarose, 147,4 ml/L de glicerol, diluídos em água Milli-Q, com pH da solução ajustado para $5,8 \pm 0,1$; a solução foi esterilizada por uso do filtro de nitrocelulose (tamanho do poro: 0,22 μm) por 10, 20, 30, 40, 50, 60 e 120 minutos, após a pré- cultivo em 0,3 M de sacarose (melhor resultado do experimento anterior). Utilizaram-se explantes oriundos de dois genótipos, CCN-51 (comercial) e 752 (não comercial). Foram analisadas a taxa de sobrevivência

(caracterizado pela capacidade de formação de calos), percentual de cobertura dos estaminódios com calos, a proporção de oxidação e os tipos de calos formados, após 7, 14 e 28 dias em meio MIC. Adotou-se delineamento inteiramente casualizado, com 15 repetições para cada tratamento (cada repetição representada por um estaminódio).

2.2.3 Imersão em solução de *plant vitrification solution 2* (PVS2)- osmoproteção

Para esse experimento foram utilizados os genótipos 752 e 762, após o pré- cultivo em 0,3 M sacarose e imersão em 20 min em LS, os estaminódios foram imersos em solução PVS2 composta por 4,43 g/L de sais de MS, 136,8 g/L de sacarose, 240 ml/L de glicerol, 136,4 ml/L de Dimetilsulfóxido (DMSO), 134,8 mL/L de etileno glicol, diluídas em água Milli-Q, com pH ajustado para $5,8 \pm 0,1$; a solução foi esterilizada em filtro de nitrocelulose (tamanho do poro: 0,22 μm), por 20, 40 e 60 minutos, e posterior imersão em nitrogênio líquido. Avaliaram-se o percentual de sobrevivência (caracterizado pela capacidade de formação de calos), a posição de surgimento de calos e os tipos de calos após 14 e 28 dias. Adotou-se delineamento inteiramente casualizado, com 10 repetições para cada tratamento (cada repetição representada por um estaminódio).

2.3 Primeira tentativa de criopreservação

2.3.1 Criopreservação - Aplicação das técnicas *vitrification* e *droplet vitrification*

Para a execução o experimento, utilizaram-se dois tipos de explantes: estaminódios inteiros com calo (Fig. 3A) e/ou parte basal dos estaminódios com calo (Fig. 3B). Foram utilizados estaminódios coletados do genótipo não- comercial 752, inoculados em meio de indução de calos (MIC) (Tabela 1) (Li et al., 1998) em placas de Petri estéreis (15 x 90 mm), por 14 dias para a formação inicial dos calos. Após esse período, para o pré- cultivo, os explantes foram transferidos para um novo meio de cultivo contendo 0,3 M de sacarose e os quais foram mantidos nesse meio por 48 h, conforme estabelecido previamente (tópico 2.2).

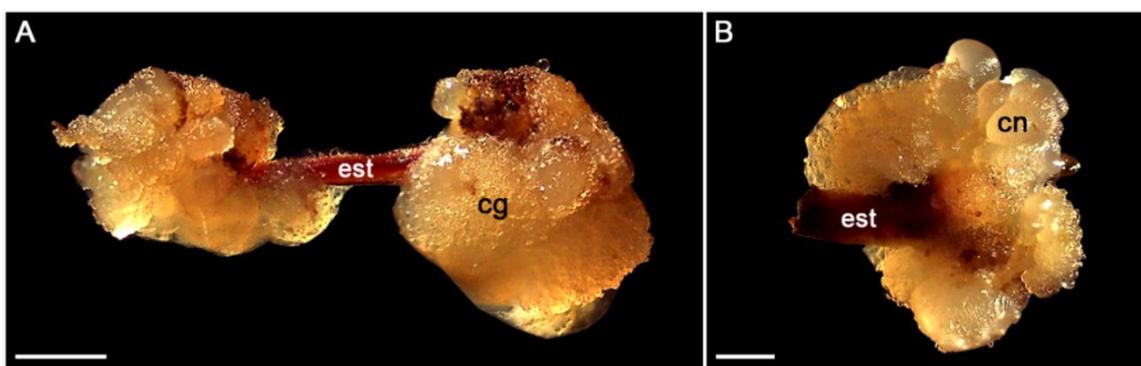


Figura 3. Tipos de explantes de *Theobroma cacao* L. (cacaueiro) utilizados no experimento. **A.** Estaminódio inteiro com calo. **B.** Parte basal do estaminódio com calo. Abreviações: cg, calo granular, cn, calo nodular, est, estaminódio. Escalas: A = 1 mm; B = 0,5 mm.

2.3.1.1 Controle

No tratamento controle (sem imersão em nitrogênio líquido), ambos os explantes foram colocados diretamente em meio de indução de calos (MIC) conforme as descrições de Li et al. (1998), por mais de 120 dias, com subcultivos a cada 14 dias. Após esse período, os explantes foram transferidos para meio de multiplicação de calos (MMC) (Tabela 1) (Li et al., 1998), onde permaneceram por 14 dias. Posteriormente, foram transferidos para o meio de desenvolvimento de embriões somáticos (MDE) (Tabela 1) (Li et al., 1998), onde foram mantidos por 90 dias, com subcultivos a cada 14 dias.

Tabela 1. Composição dos meios de cultivo de *Theobroma cacao* L. conforme protocolo de Li et al. (1998) e modificações¹. Meio de indução de calos (MIC), de multiplicação de calos (MMC) e de desenvolvimento de embriões somáticos (MDE) para experimentos de pré-condicionamento e criopreservação.

Componente	MIC	MMC	MDE
Macronutrientes (mg L.⁻¹)			
K ₂ SO ₄	1559	990	1559
NH ₄ NO ₃	1416	400	1416
Ca(NO ₃) ₂	1367	386	1367
MgSO ₄	361,49	180,7	361,49
KH ₂ PO ₄	265	170	265
CaCl ₂	112,5	72,5	112,5
Na ₂ EDTA	45,4	37,3	45,4
FeSO ₄ . 7H ₂ O	33,8	27,8	33,8
Micronutrientes			
MnSO ₄ .H ₂ O	33,5	22,3	33,5
H ₃ BO ₃	4,8	6,2	4,8
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,39	0,25	0,39
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,25	0,25	0,25
Zn(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	17	-	17
ZnSO ₄ .7H ₂ O	-	8,6	-
Vitaminas			
Mio-inositol	200	100	100
Tiamina HCl	2	10	2
Ácido nicotínico	1	1	1
Piridoxina HCl	-	1	-
Aminoácidos (mg L.⁻¹)			
Glicina	2	-	2
Glutamina	250	-	-
Reguladores de crescimento (mg L.⁻¹)			
2,4 diclorofenoxiacético (2,4 -D)	1,99; 3*	1,99	-
Tidiazuron (TDZ)	0,005	-	-
Cinetina	-	0,3	-
Gelificante (g L.⁻¹)			
Phytigel®	2	2,2	2
Outros (g L.⁻¹)			
Glicose	20	20	1
Sacarose	-	-	30

*A modificação do meio de indução de calos (MIC) ocorreu com acréscimo de 2,4 D para a criopreservação.

2.3.1.2 Vitrification

Para a aplicação da técnica de *vitrification* (Fig. 4), após o período de formação de calos e pré- cultivo em sacarose, os dois tipos de explantes (estaminódios inteiros com calo e parte basal dos estaminódios com calo) foram colocados em soluções crioprotetoras. Primeiramente, foram imersos em *loading solution* (LS) por 20 minutos. Em seguida, foram imersos em solução de PVS2 por 40 minutos. Ao final desses períodos, as amostras foram colocadas em criotubos e imersos em criotanques com nitrogênio líquido (-196°C) por 48 h. Para descongelamento e recuperação do material vegetal, os criotubos foram colocados em banho-maria (40 °C) por 120 segundos. Logo após, em câmara de fluxo laminar, foram imersos em *Rewarming Solution* (RS) contendo 4,43 g/L de MS e 205,2 g/L de sacarose, diluídos em água Milli-Q, com o pH ajustado para $5,8 \pm 0,1$ e esterilizados em filtro de nitrocelulose (tamanho do poro: $0,22 \mu\text{M}$) por 20 minutos e depois inoculados em meio MIC por mais de 120 dias, com subcultivos a cada 14 dias.

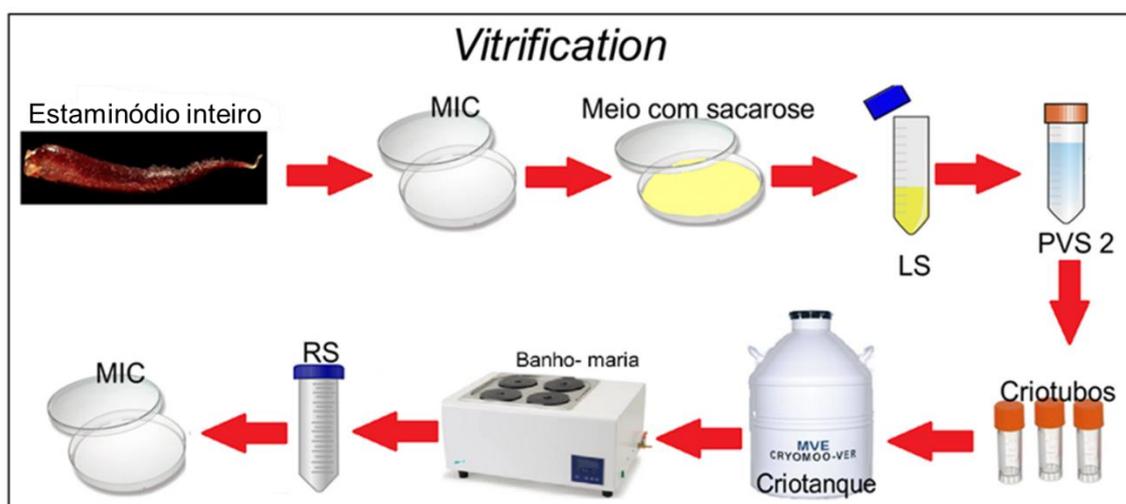


Figura 4. Representação das etapas de *vitrification* aplicadas ao genótipo não comercial 752 de *Theobroma cacao* L.

Em seguida, os explantes de todos os tratamentos (controle e NL+) foram transferidos para meio de multiplicação de calos (MMC) (Li et al., 1998), sendo mantidos nesse meio por 14 dias. Posteriormente, foram transferidos para o meio desenvolvimento de embriões somáticos (MDE) (Li et al., 1998) por 28 dias, com subcultivos a cada 14

dias. Os explantes foram mantidos em sala de crescimento, sob 25 ± 2 °C, e acondicionados no escuro.

Após 120 dias em MIC, os dois tipos de explantes (estaminódios inteiros com calo e parte basal dos estaminódios com calo) submetidos à técnica *vitrification* e imersos ou não (controle) em nitrogênio líquido (NL+, NL-, respectivamente), foram avaliados quanto ao percentual de formação de calos.

O delineamento estatístico empregado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial duplo (2x2), para a análise do efeito do tipo de explante (estaminódios inteiros com calo e parte basal dos estaminódios com calo) e imersão em nitrogênio líquido (NL+ e NL-) durante a aplicação da técnica de *vitrification*, o que totalizou quatro tratamentos, com 25 repetições cada, sendo cada repetição composta por um explante.

2.3.1.3 Droplet Vitrification

Para a aplicação da técnica *droplet vitrification* (Fig. 5), foram utilizadas apenas as partes basais dos estaminódios com calos, que após a inoculação para formação de calos e posterior pré- cultivo em sacarose, foram criopreservadas de acordo com protocolo descrito por Vollmer et al. (2021), com modificações relacionadas aos tempos de imersões nas soluções crio-protetoras. Inicialmente, eles foram imersos em LS e PVS2 pelos mesmos tempos citados anteriormente. Antes do término do período (cinco minutos antes), os explantes foram coletados, com o auxílio de uma pinça, e colocados em gotas de PVS2 (aproximadamente 20-25 μ L) adicionadas sobre uma tira de papel alumínio (5 x 20 mm, com dobra de 3 mm). As tiras contendo as gotas com os explantes imersos foram resfriadas em nitrogênio líquido e inseridas nos criotubos, os quais foram acondicionados em *canisters* e colocados dentro de *containers* (tubos de alumínio) contendo nitrogênio líquido por 48 h.

Após 48 h em nitrogênio líquido, os criotubos foram descongelados diretamente na solução *Rewarming Solution* (RS). Após 20 minutos, os explantes foram colocados sobre papéis filtro (1 x 1 cm), por 1-3 minutos, para retirada do excesso de RS. E inoculados em meio MIC por um período superior a 120 dias, com subcultivos realizados a cada 14 dias.

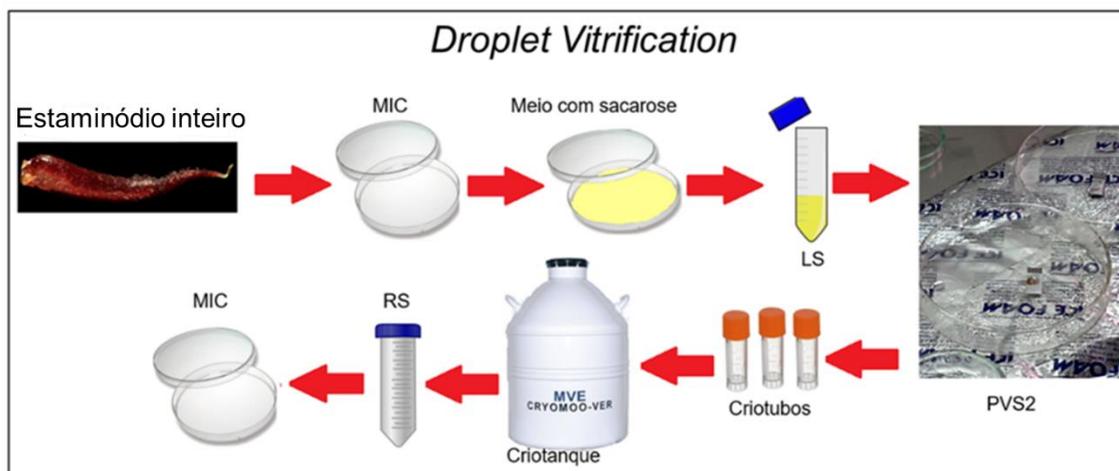


Figura 5. Representação das etapas de *Droplet Vitrification* nos aplicadas ao genótipo não comercial 752 de *Theobroma cacao* L.

Os explantes do tipo parte basal dos estaminódios com calo submetidos à *droplet vitrification*, imersos ou não (controle) em nitrogênio líquido (NL+, NL-, respectivamente), também foram avaliados quanto ao percentual de formação de calos após 120 dias em MIC modificado. Já aos 30 dias de cultivo em MDE, todos os explantes foram avaliados quanto ao percentual de oxidação (escurecimento) e a formação de embriões somáticos.

Ao final adotou-se o mesmo delineamento e esquema fatorial duplo (2x2), para a análise do efeito da técnica de criopreservação (*vitrification* e *droplet vitrification*) e imersão em nitrogênio líquido (NL+ e NL-), totalizando 4 tratamentos com 25 repetições cada, sendo cada repetição composta por um explante. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, à 5% de significância, por meio do software estatístico R (R Core Team, 2023).

2.3.1 Análises anatômicas

Para análise anatômica, foram coletados estaminódios cultivados por 14 dias em MIC, submetidos ao pré- cultivo em 0,3 M de sacarose por 48 h e, em seguida, às técnicas de *vitrification* ou *droplet vitrification* (20 min em LS; 40 min em PVS2), com e sem imersão em nitrogênio líquido (controle), conforme descrito em tópico anterior.

Após 45 dias de cultivo em meio de indução (MIC) foram coletadas amostras dos tratamentos controle, *vitrification* e *droplet vitrification*. Adicionalmente, foram coletadas amostras desses tratamentos após 90 dias em MDE.

As amostras foram submetidas às etapas fixação, desidratação, pré-infiltração, infiltração e polimerização conforme Silva-Cardoso et al. (2019). Para a fixação, as amostras de cada um dos tratamentos citados acima, com e sem formação de calos, foram coletadas e colocadas dentro de microtubos com solução de Karnovsky modificada (Karnovsky, 1965), composta por paraformaldeído 4%, glutaraldeído 2,5% e tampão cacodilato de sódio 0,05 M (pH 7,2), sob vácuo, durante uma hora e, posteriormente, por 23 h em ambiente refrigerado. Em seguida, foram realizadas imersões em solução de cacodilato de sódio (0,05 M, pH 7,2), por três vezes, por uma hora cada, sob vácuo. Após a última lavagem, o material foi mantido nessa solução por 24 h. Para a desidratação, as amostras foram submetidas a um gradiente crescente etanólico (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 100%), por uma hora cada (sob vácuo).

A etapa de pré-infiltração foi dividida em duas fases: primeiro as amostras foram imersas em etanol 100% + resina (1:1), durante 24 h, em ambiente refrigerado (primeira hora sob vácuo), acrescidas de duas imersões em resina pura, por 6 h e 24 h, respectivamente (ambas por uma hora, sob vácuo). Nas etapas de infiltração e polimerização em historesina (Leica, Heidelberg, Alemanha), seguiram-se as especificações do fabricante.

Secções longitudinais e transversais (3-7 μ m) foram obtidas em micrótomo rotativo manual (Leica®, RM212RT). Essas secções foram, então, distendidas e aderidas às lâminas microscópicas em placa aquecida à 40°C. Logo após, foram coradas com Azul de Toluidina (0,5%) para caracterização estrutural (O'Brien; Feder; McCully, 1964). A obtenção e análise de imagens foram realizadas utilizando-se microscópio Leica DM 750 e programa Leica Application Suite EZ.

2.4 Segunda tentativa de criopreservação

2.4.1 Criopreservação - Aplicação da técnica *droplet vitrification* sobre dois tipos de explantes

O tratamento *droplet vitrification* foi aplicado exatamente como descrito no tópico anterior, com e sem imersão em NL, seguindo as etapas descritas e representadas conforme Figura 6. Todavia, testaram-se dois tipos de explantes (estaminódios inteiros

com calo e parte basal dos estaminódios com calo) do genótipo não- comercial 752 e, após, aplicação dos tratamentos, os explantes foram cultivados em meio MIC modificado (3 mg/L de 2,4-D) (Tabela 1) (Li et al., 1998) e mantidos em sala escura, à 25 ± 2 °C, por 21 dias, com um único subcultivo no 14º dia. Em seguida, os explantes seguiram o protocolo de Li et al. (1998), até a etapa de desenvolvimento de embriões somáticos. Os tratamentos consistiram em um controle, caracterizado por explantes não imersos nas soluções crioprotetoras (LS, PVS2) e sem imersão em nitrogênio líquido (NL-), e um tratamento onde os explantes foram imersos nas soluções crioprotetoras (LS, PVS2) mas sem imersão em nitrogênio líquido (NL-).

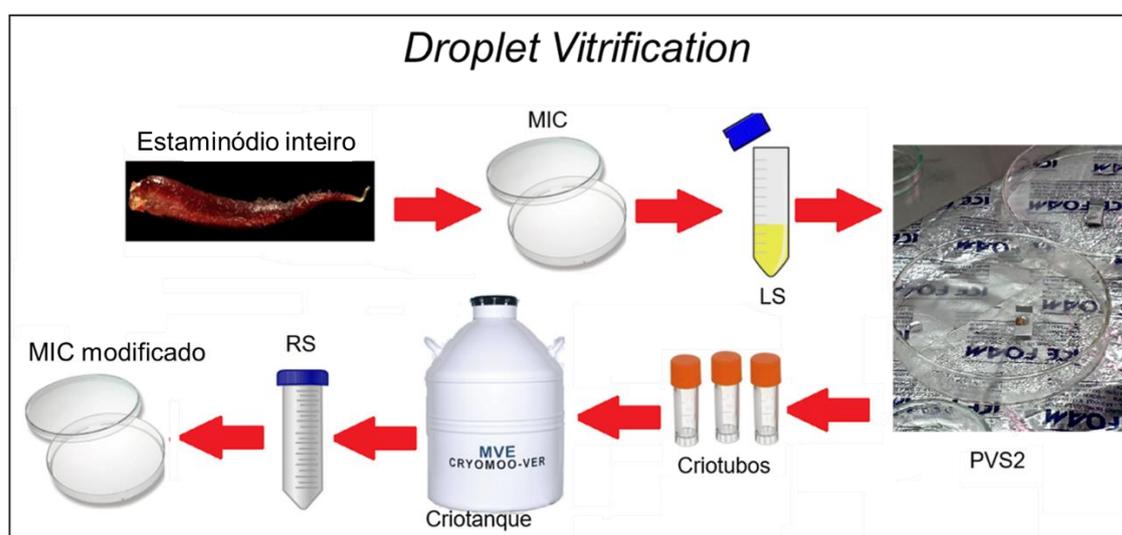


Figura 6. Representação das etapas da técnica *Droplet vitrification*, sem o pré- cultivo em sacarose, aplicada ao genótipo 752 (não comercial) de *Theobroma cacao* L.

Para este experimento, o delineamento foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial (2x2), caracterizado por dois tipos de explantes (estaminódios inteiros com calo e parte basal dos estaminódios com calo) e dois tratamentos de imersão em NL (NL+ e NL-), com um controle adicional. Cada tratamento foi composto por dez repetições, cada qual correspondente a um explante.

Avaliaram-se o percentual de oxidação, assim como os percentuais de recobrimento dos explantes com calos, os tipos de calos formados (nodular, granular e irregular- calo sem formato definido) e área do explante coberta por calos, após 21 dias em meio MIC. Após 30 dias em MDE, avaliou-se a taxa de formação de embriões somáticos formados em cada tratamento. Os dados obtidos foram submetidos à análise de

variância (ANOVA), e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, à 5% de significância, por meio do software estatístico R (R Core Team, 2023).

2.5 Criopreservação - Aplicação de diferentes tratamentos de *slow cooling* e *vitrification*

Nestes experimentos, foram utilizados estaminódios provenientes do genótipo não-comercial 762, os quais foram previamente cultivados em MIC (Li et al., 1998), durante 14 dias, para a formação inicial dos calos. Após esse período, os explantes foram destinados aos tratamentos visando à criopreservação, seguindo as etapas descritas na Figura 7.

Os tratamentos consistiram em: 1) controle (sem imersão em soluções crioprotetoras e sem exposição ao nitrogênio líquido – NL-); 2) imersão em soluções crioprotetoras e NL-; 3) técnica *slow cooling* – Mr. Frosty- Nalgene® (com imersão em soluções crioprotetoras e exposição ao nitrogênio líquido – NL+) (Fig. 7A) e 4) *vitrification* (Fig. 7B). Em todos os tratamentos, exceto no controle, os explantes (estaminódios inteiros com calos) passaram por imersões em soluções crioprotetoras (120 min em *loading solution* – LS e 50 min em *plant vitrification solution 2* – PVS 2).

Para o tratamento controle, os explantes foram inoculados diretamente em meio de indução de calos modificado - MIC (3 mg/L de 2,4 D) (Li et al. 1998). Para o tratamento apenas nas soluções crioprotetoras, os explantes foram imersos nas soluções LS e PVS2 nos períodos respectivos, porém sem imersão em nitrogênio líquido (NL-), e, logo após as imersões, foram inoculados em MIC modificado.

Para o tratamento *slow cooling*, os estaminódios com calos foram imersos em LS e posteriormente transferidos para criotubos estéreis (2 mL de capacidade) contendo solução de PVS2. Em seguida, os criotubos foram colocados em um recipiente de policarbonato (Mr. Frosty- Nalgene®) com álcool isopropílico (Fig. 8A), o qual permite um resfriamento de 1°C/min. Esse recipiente foi mantido em um ultra *freezer* vertical (Thermo SCIENTIFIC -80°C) *overnight* (Fig. 8B). Logo após, os criotubos foram imersos em NL por 48 h. Já o tratamento *vitrification* consistiu em imersão dos explantes nas soluções crioprotetoras nos períodos descritos, seguido do acondicionamento dos criotubos em *canisters*, e posterior imersão em *containers* contendo NL por 48 h.

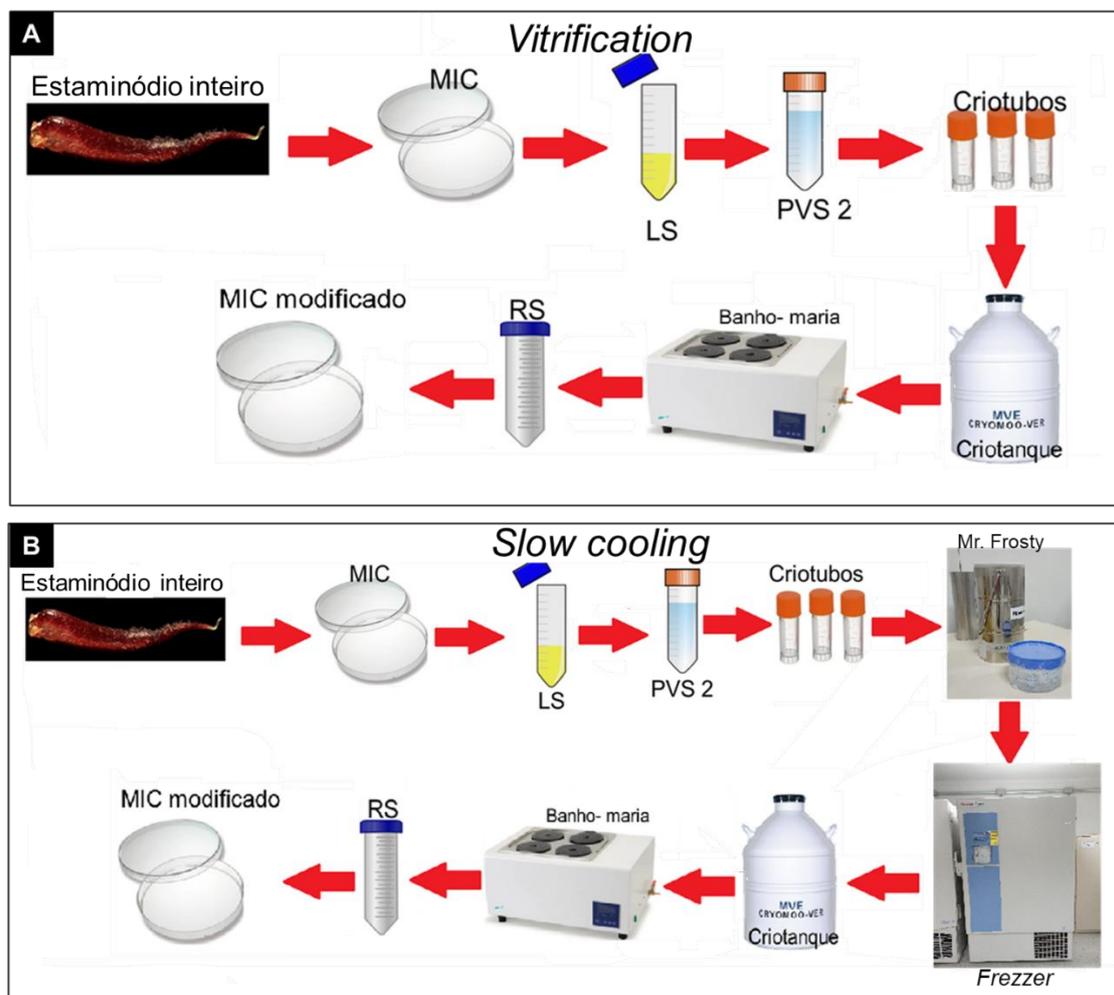


Figura 7. Representação das etapas da técnica *slow cooling* aplicada aos estaminódios do genótipo 762 (não comercial) de *Theobroma cacao* L.

Para o descongelamento, os criotubos foram retirados do NL, com auxílio de um alicate, e colocados em banho-maria (40° C), por 120 segundos. Os explantes foram retirados dos criotubos e inoculados em placas de Petri estéreis (15 x 90 mm), contendo MIC modificado (3 mg/L de 2,4-D) (Li et al., 1998) e mantidas em sala escura, à 25 ± 2 °C, por 21 dias, com um subcultivo realizado após 14 dias. Ao final desse período, avaliaram-se os percentuais de oxidação e de formação de calos primários, o local de surgimento dos calos e os tipos de calos formados. Posteriormente, foram transferidos para MMC, onde permaneceram por mais 14 dias, sendo avaliadas as mesmas variáveis acima mencionadas. Logo após, foram inoculados em MDE, por 28 dias, com subcultivos realizados a cada 14 dias. Após esse período, avaliou-se a formação de embriões somáticos.



Figura 8. Equipamentos utilizados para aplicação dos tratamentos de congelamento de estaminódios com calos de *Theobroma cacao* (cacaueiro). **A.** Recipiente de policarbonato para técnica de *slow cooling* (seta vermelha). **B.** Freezer de armazenamento à -80°C .

Adotou-se um delineamento inteiramente casualizado, sendo composto por 4 tratamentos. Cada tratamento foi formado por 10 repetições, sendo cada repetição composta por um estaminódio. Avaliaram-se percentual de recobrimento dos explantes com calos, oxidação dos calos primários durante 21 em MIC e 14 dias em meio de multiplicação de calos (MMC) e surgimento de embriões somáticos aos 30 dias em MDE. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, com auxílio do programa de análises estatísticas R (R Core Team, 2023).

3 RESULTADOS

3.1 Estabelecimento das condições iniciais para criopreservação (pré-condicionamento)

3.1.1 Pré- cultivo em sacarose

Para o tratamento controle, sem inoculação em meio de cultivo com maiores concentrações de sacarose (Tabela 2), houve um alto percentual de sobrevivência (100%) para os genótipos comerciais CCN-51 e CEPEC 2002, após 28 dias em meio de indução de calos (MIC). No entanto, para o PH 16 no mesmo período, apenas 50% de seus explantes sobreviveram, sendo capazes de formar calos e os demais somente apresentaram intumescimento.

Durante esse tempo, o percentual de recobrimento dos explantes com calos variou entre 25 e 50%, surgindo principalmente na base dos estaminódios. Verificaram-se a presença de calos nodulares e granulares e baixa proporção de oxidação na maioria dos casos. Conforme os dados apresentados na Tabela 1, verificou-se, de modo geral, que a inoculação na concentração 0,3 M por 48 h garantiu alta taxa de sobrevivência dos explantes (produção de calos), com o mínimo de oxidação.

Tabela 2. Avaliação do pré- cultivo em sacarose de estaminódios dos genótipos comerciais de *Theobroma cacao*.

Concentração (M)	Tempos (h)	Genótipos	Percentual de sobrevivência de explantes (28 dias)	Percentual de oxidação de calos primários
0	0	CCN 51	100%	0%
	24	CCN 51	70%	100%
	48	CCN 51	100%	0%
0,3	72	CCN 51	100%	0%
	96	CCN 51	100%	0%
	24	CCN 51	80%	50%
0,4	48	CCN 51	50%	50%
	72	CCN 51	90%	30%
	96	CCN 51	60%	100%
0,5	24	CCN 51	80%	50%
	48	CCN 51	0%	0%
	72	CCN 51	0%	20%
0	96	CCN 51	80%	0%
	0	CEPEC 2002	100%	0%
	24	CEPEC 2002	0%	0%
0,3	48	CEPEC 2002	100%	0%
	72	CEPEC 2002	100%	0%
	96	CEPEC 2002	80%	100%
0,4	24	CEPEC 2002	20%	0%
	48	CEPEC 2002	100%	0%
	72	CEPEC 2002	40%	100%
0,5	96	CEPEC 2002	0%	50%
	24	CEPEC 2002	20%	0%
	48	CEPEC 2002	80%	100%
0	72	CEPEC 2002	60%	50%
	96	CEPEC 2002	80%	50%
	0	PH 16	50%	100%
0,3	24	PH 16	80%	0%
	48	PH 16	80%	100%
	72	PH 16	0%	0%
0,4	96	PH 16	100%	0%
	24	PH 16	40%	0%
	48	PH 16	80%	50%
0,5	72	PH 16	0%	100%
	96	PH 16	100%	0%
	24	PH 16	0%	0%
0,5	48	PH 16	100%	0%
	72	PH 16	0%	100%
	96	PH 16	40%	100%

3.1.2 Imersão em *loading solution* (LS)

Tendo em vista o resultado do primeiro experimento, testes realizados em imersão em diferentes tempos em LS resultaram em valores bastante diferentes para às variáveis avaliadas (Figs. 9-12).

Quanto ao percentual de sobrevivência dos explantes, avaliado pela capacidade de formação de calos (Fig. 9), verificou-se que, para o genótipo 752, todos os tratamentos mostraram uma progressão contínua nas duas primeiras avaliações (7 e 14 dias) e aumentando no último período (28 dias). Quando se compara com o tratamento controle, que alcançou 100% de sobrevivência, outros tempos de imersão proporcionaram o mesmo resultado, especificamente 20, 40 e 120 minutos (Fig. 9).

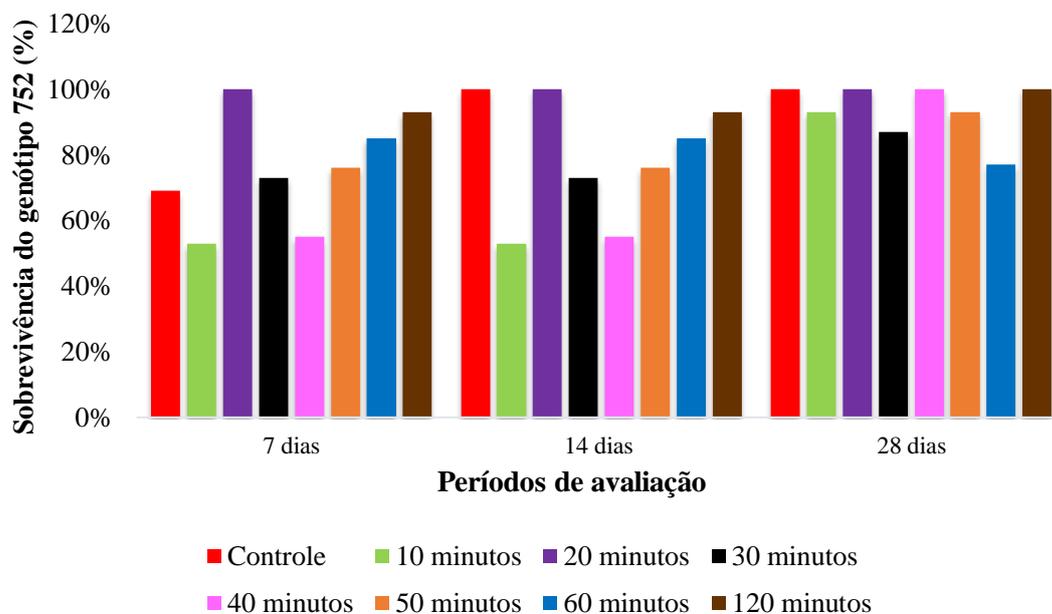


Figura 9. Percentual de sobrevivência dos explantes, avaliado pela capacidade de formação de calos, de *Theobroma cacao* L. do genótipo 752, após imersão por diferentes tempos em *loading solution* e inoculação em meio de indução de calos (7, 14 e 28 dias).

Já quanto à taxa de oxidação dos calos formados (Fig. 10), para o genótipo 752, verificou-se que os mesmos tratamentos citados anteriormente (controle, 20, 40, 120 minutos), nos primeiros tempos de avaliação (7 e 14 dias), não apresentaram oxidação dos calos, a qual somente foi constatada, aos 28 dias de cultivo. Enquanto nos demais períodos (10, 30, 50, 60 minutos), a oxidação se iniciou aos 7 dias de cultivo, atingindo valores expressivos nos tempos de imersão 10, 50 e 60 minutos, especialmente, após 28 dias de cultivo.

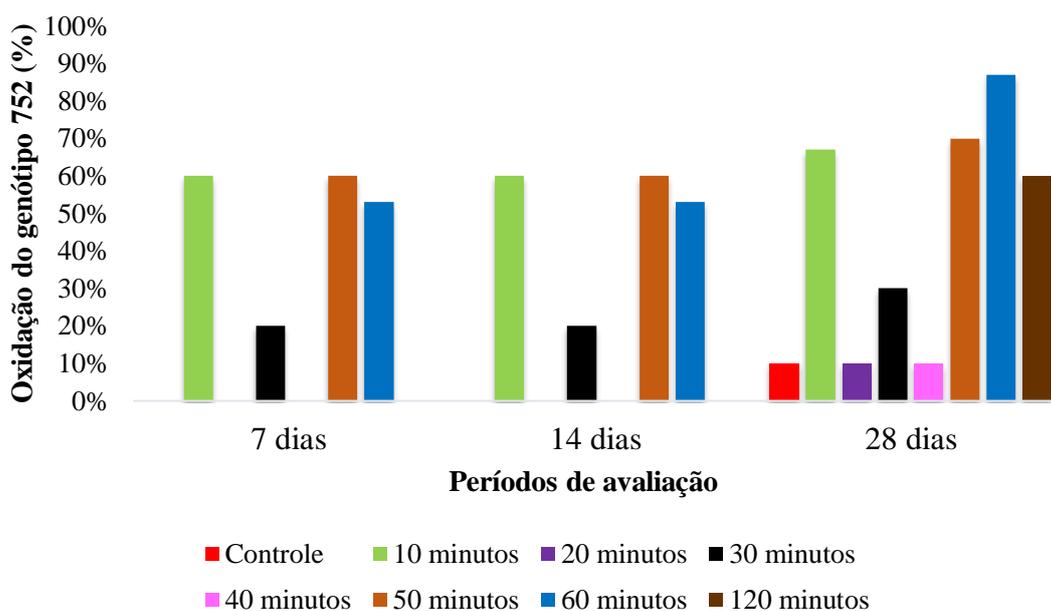


Figura 10. Análise de taxa de oxidação de calos primários do genótipo comercial 752 de *Theobroma cacao*, após imersão em *loading solution* por diferentes períodos, e avaliados durante o cultivo em meio de indução de calos (7, 14 e 28 dias).

Quanto ao percentual de sobrevivência (capacidade de formação de calos) e à taxa de oxidação dos explante (Figs. 11, 12) do genótipo CCN-51, não se verificou nem formação de calos nem oxidação após 7 e 14 dias de cultivo em meio de indução. Aos 28 dias, surgiram os primeiros calos nos estaminódios, com destaque para o tratamento controle, seguido do tratamento de imersão em LS por 20 minutos. Os demais períodos de imersão em LS proporcionaram taxa de formação de calos abaixo dos 50% (Fig. 11). Valores de taxa de oxidação superiores a 50% foram encontrados apenas nos tempos controle, 10, 60 e 120 minutos (Fig. 12).

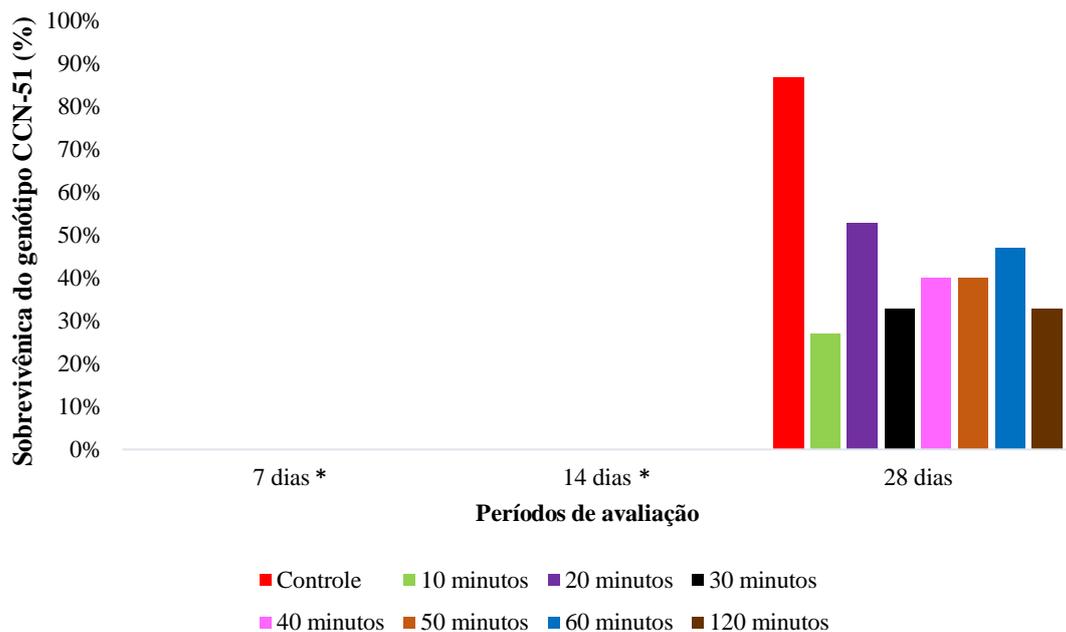


Figura 11. Avaliação da sobrevivência (capacidade de formação de calos) dos estaminódios de *Theobroma cacao* do genótipo CCN-51 submetidos a diferentes tempos de imersão em *loading solution* e avaliados durante o cultivo em meio de indução de calos (7, 14 e 28 dias). *Nos períodos iniciais de avaliação não houve formação de calos, apenas intumescimento dos estaminódios.

E quanto as análises estatísticas, a interação entre os fatores testados (genótipos x tempos de imersão em LS) não foi significativa. Dessa forma, os efeitos dos fatores simples foram investigados isoladamente. Em termos estatísticos, independentemente do tempo de imersão em LS, o genótipo 752 (não comercial) apresentou melhor desempenho com relação ao percentual de formação de calos, com valor médio de 93,8%, enquanto o genótipo CCN-51 (comercial) apresentou uma taxa de formação de 45%. Já com relação ao tempo de imersão em LS, verificou-se que, independentemente do genótipo analisado, a solução LS reduziu a formação de calos em todos os tempos analisados (valor médio de 67,0%), os quais diferiam estatisticamente do controle – não imersão em LS (valor médio de 93,3%). Diante dos resultados obtidos para ambos os genótipos, selecionou-se o tempo de 20 minutos de imersão em LS para continuação do protocolo de criopreservação.

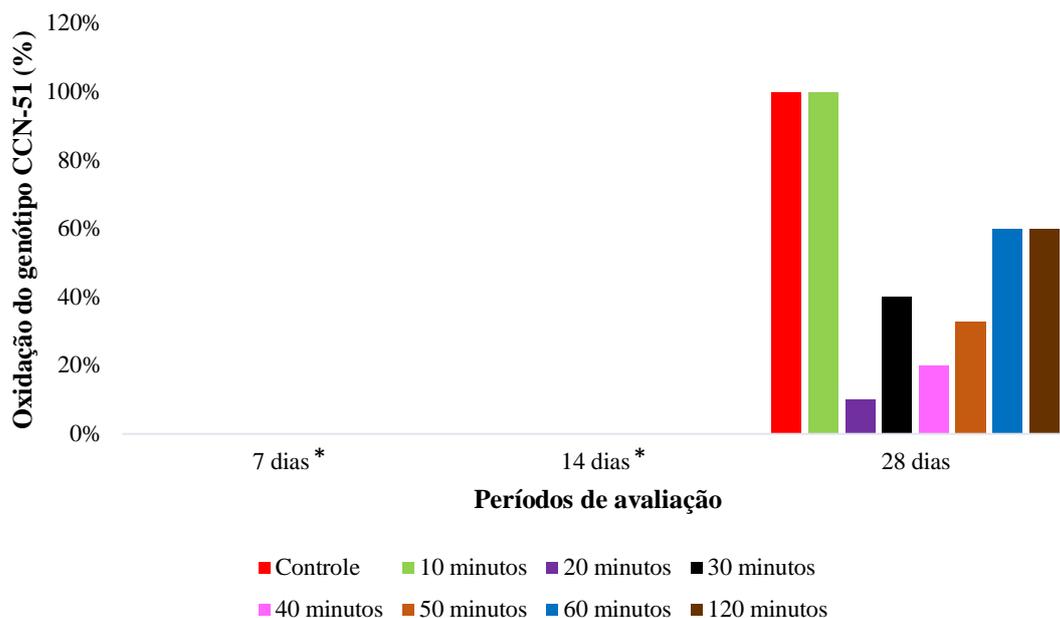


Figura 12. Reação de oxidação de calos primários no genótipo CCN-51 de *T. cacao* imersos em *loading solution* e inoculados por até 28 dias em meio MIC. *Nos períodos iniciais de avaliação não houve oxidação dos calos, apenas intumescimento dos estaminódios.

3.1.3 Imersão em solução de *plant vitrification solution 2* (PVS2)

Conforme as análises estatísticas para o genótipo 752, não houve interação entre os fatores testados, e, portanto, foram estudados isoladamente. A imersão em NL reduziu significativamente a taxa de formação de calos (NL- = 96,6%, NL+ = 34,7%). Quanto aos tempos de imersão em solução PVS2, verificou-se que 60 min proporcionou maior proteção do explante que 20 min (Fig. 13). O tempo intermediário (40 min) não diferiu estatisticamente dos demais tratamentos.

Quanto ao percentual de cobertura do explante com calos, a interação entre os fatores também não foi significativa. Constatou-se, similar ao reportado para a taxa de formação de calos, que o tratamento NL+ diminuiu significativamente a área de cobertura do estaminódio com calos, com valor médio de 20,8%, em comparação ao observado quando os explantes foram submetidos ao tratamento NL- (62,5%). Com relação ao percentual de cobertura dos explantes com calos, não foram verificadas diferenças estatísticas entre os tempos de imersão em solução crioprotetora.

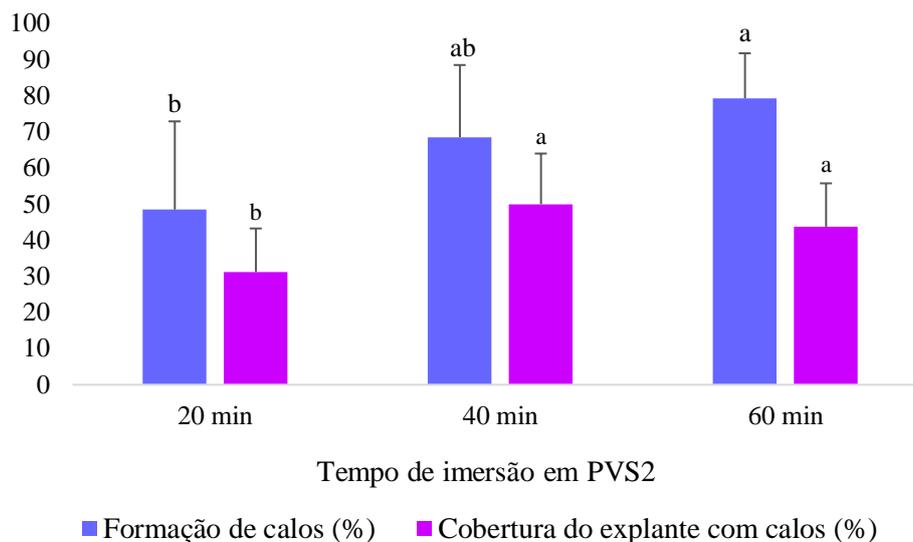


Figura 13. Efeito de diferentes tempos de imersão de estaminódios (genótipo não comercial 752) com calos (região basal) de cacauieiro (*Theobroma cacao* L.) em solução PVS2, independentemente da imersão ou não em Nitrogênio Líquido. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas pelo Teste de Tukey, a 5% de significância. Barras representam o erro padrão.

A comparação dos dados oriundos do fatorial com o tratamento controle (sem imersão em PVS e em NL), para ambas as variáveis, evidencia diferenças estatísticas entre eles. Para a taxa de formação de calos, o tratamento controle proporcionou valor médio de 100%, enquanto o fatorial proporcionou 65,4%. Para a variável cobertura do explante com calos, o tratamento controle também se destacou (100%), enquanto o fatorial resultou num decréscimo na área de cobertura (41,7%), como esperado.

Conforme as análises estatísticas, não houve interação entre os fatores testados para o genótipo 762, e, portanto, seus efeitos foram estudados isoladamente. A imersão em NL reduziu significativamente a taxa de formação de calos (NL- = 75%, NL+ = 4,9%), similar ao reportado para o genótipo 752, o que ratifica o efeito estressor do NL, independente do genótipo analisado. Quanto aos tempos de imersão em solução PVS2, não foram verificadas diferenças estatísticas entre os tempos testados (Fig. 14). Quanto ao percentual de cobertura do explante com calos, a interação entre os fatores e o efeito isolado dos fatores não foram significativos, com valores médios de 40,0% e 14,6% de taxa de formação de calos e de cobertura do explante com calos, respectivamente. Tais

valores foram consideravelmente inferiores ao verificado para o genótipo 752 e evidencia a responsividade calogênica dependente do genótipo.

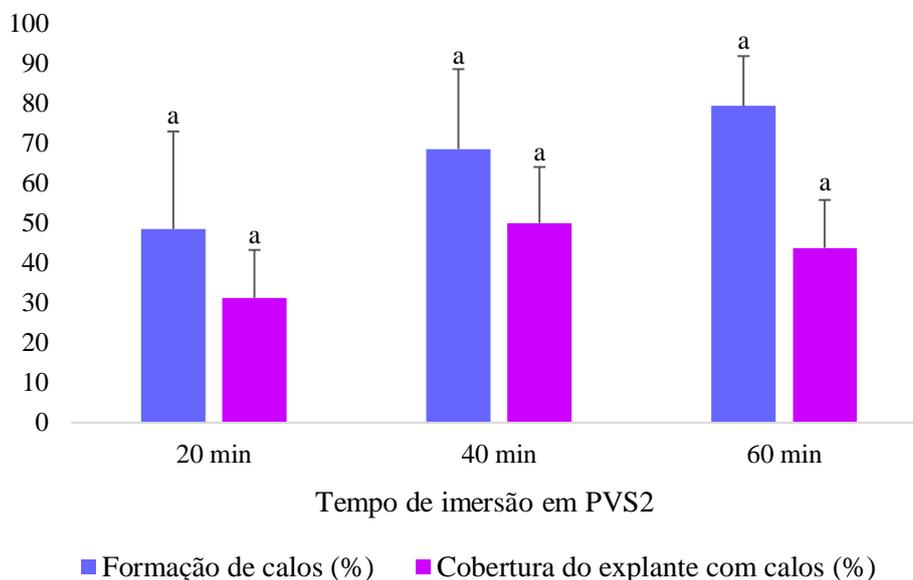


Figura 14. Efeito de diferentes tempos de imersão de estaminódios (genótipo não comercial 762) com calos (região basal) de cacauero (*Theobroma cacao* L.) em solução PVS2, independentemente da imersão ou não em Nitrogênio Líquido. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas pelo Teste de Tukey, a 5% de significância. Barras representam o erro padrão.

A comparação dos dados oriundos do fatorial com o tratamento controle (sem imersão em PVS e em NL), para ambas as variáveis, evidencia diferenças estatísticas entre eles. Para a taxa de formação de calos, o tratamento controle proporcionou valor médio de 87,5%, enquanto o fatorial proporcionou 40%. Para a variável cobertura do explante com calos, o tratamento controle também se destacou (87,5%), enquanto o fatorial resultou num decréscimo na área de cobertura (14,6%), como esperado. Diante dos resultados obtidos para ambos os genótipos, selecionou-se o tempo de imersão em PVS2 40 min para continuação do protocolo de criopreservação.

3.2 Primeira tentativa de criopreservação

3.2.1 Efeitos da aplicação das técnicas *vitrification* e *droplet vitrification* sobre dois tipos de explantes

3.2.1.1 Análises morfológicas

No intervalo de 14 a 45 dias de inoculação em meio de indução de calos, ambos os explantes (estaminódios inteiros com calo e parte basal dos estaminódios com calo) permaneceram vivos para todos os tratamentos. Aqueles oriundos dos tratamentos que passaram por imersões em nitrogênio líquido (NL+), independentemente se submetidos à *vitrification* ou *droplet vitrification*, exibiram coloração mais escura (Fig. 15A). Na maioria dos explantes submetidos ao NL, não houve o surgimento de novos calos e, quando aparentes, esses calos possuíam formato irregular e consistência hiper-hidratada (Fig. 15A, B). Já para os tratamentos controles (NL-), para ambas as técnicas à *vitrification* ou *droplet vitrification*, foram visíveis a formação e desenvolvimento de novos calos granulares e/ou nodulares (Fig. 15C).

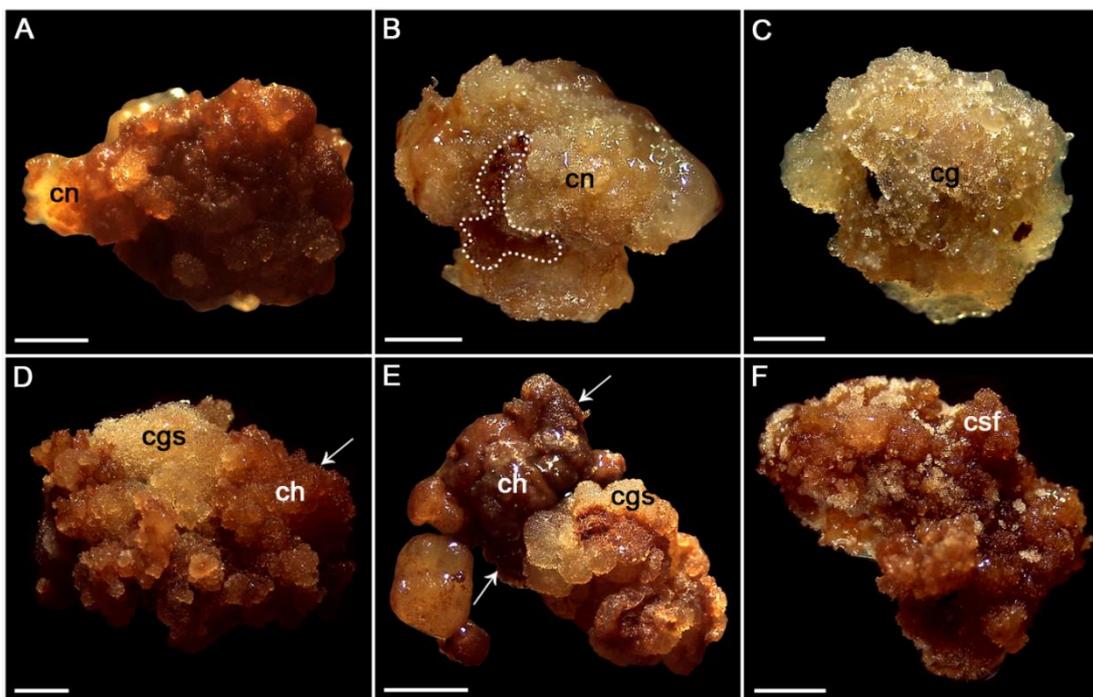


Figura 15. Aspectos morfológicos de calos de *Theobroma cacao* L. (genótipo 752) submetidos a diferentes pré-tratamentos para criopreservação, imersos ou não em nitrogênio líquido (NL+ e NL-, respectivamente). **A.** Parte basal de estaminódio com calos pré-formados, com coloração escura, e surgimento de calo novo, com coloração mais clara, após tratamento de *droplet vitrification* e NL+. **B.** Surgimento de calos, com

aspecto hiper-hidratado, sobre calos pré-formados (região pontilhada), no tratamento *droplet vitrification* e NL+. **C.** Calos granulares oriundos do tratamento *vitrification* e NL-. **D.** Massa calogênica hiper-hidratada com oxidação (regiões escuras) e calos granulares esbranquiçados secos, oriundos do tratamento *droplet vitrification* e NL-. **E.** Calos escurecidos hiper-hidratados e calos granulares esbranquiçados secos provenientes do tratamento *droplet vitrification* e NL-. **F.** Explante oriundo do tratamento *droplet vitrification* e NL- com calos semifriáveis oxidados. Setas indicam áreas oxidadas. Abreviações: *cg*, calo granular, *cgs*, calo granular seco, *ch*, calo hiper-hidratado, *cn*, calo nodular, *csf*, calo semifriável. Barras: A-C = 1 mm e D-F = 2 mm.

Por não apresentarem mudanças significativas, os materiais foram mantidos em meio de indução de calos por 120 dias, sendo possível identificar, em ambos os tratamentos, o surgimento de novos calos, geralmente de coloração mais clara (Fig. 15B), com aumento de volume (Fig. 15D), incremento dos escurecimentos (oxidação) nos calos pré-formados. Além disso, foi observado a presença de calos com características morfológicas variadas, dentre as quais mencionam-se coloração variando entre preto, marrom, branco e amarelo e consistência seca e compacta (calos granulares) ou macia e bastante hidratada (Fig. 15D, E), além de uma certa friabilidade (Fig 15F).

3.2.1.2 *Vitrification* (estatística)

Com relação ao percentual de calos novos formados, após 120 dias em meio de indução de calos, oriundos do experimento utilizando-se a técnica *vitrification*, verificou-se que a interação entre os fatores testados foi significativa (tipo de explante x imersão em NL) e, portanto, foi desdobrada (Fig. 16). Conforme o desdobramento, explantes do tipo região basal dos estaminódios com calos exibiram maior percentual de formação de novos calos (98%) do que os explantes do tipo estaminódios inteiros com calos (55%), quando não submetidos à criopreservação (NL-). Constatou-se também que a imersão em NL reduziu a formação de novos calos para ambos explantes testados (Fig. 16), similar ao verificado no experimento abordado anteriormente.

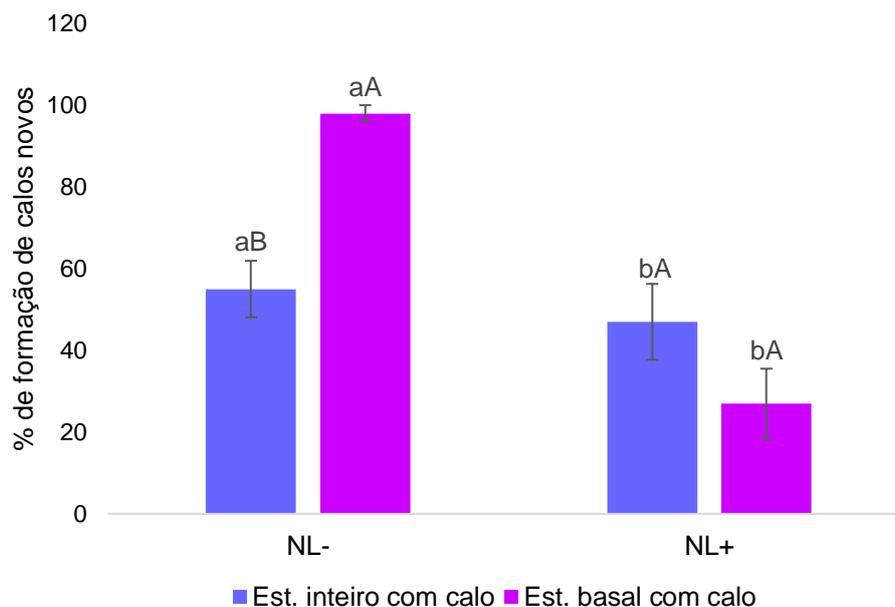


Figura 16. Comparação de criopreservação e sua relação com os tipos de explantes de *Theobroma cacao* L. (cacaueiro). Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos referentes aos tipos de explantes (estaminódio com calos ou apenas parte basal com formação de calos prévios) em cada tratamento de imersão (sem ou com imersão em Nitrogênio Líquido, NL- e NL+) e letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos de imersão, dentro de cada tipo de explante, pelo teste de Tukey a 5% de significância. Abreviação: *Est.*, estaminódio. Barras representam erro padrão.

3.2.1.3 Comparação das técnicas *Vitrification* e *Droplet Vitrification*

Quanto aos percentuais de formação de calos novos oriundos de explantes parte basal dos estaminódios com calos já formados, cultivados por 120 dias em meio de indução de calos e submetidos às técnicas de *vitrification* ou *droplet vitrification*, verificou-se que, independentemente da realização ou não da imersão em NL, não foram verificadas diferenças estatísticas entre essas técnicas, com valor médio de 62,5% de calos novos. Por outro lado, constataram-se diferenças entre os percentuais de formação de novos calos entre os tratamentos sem e com imersão em NL, com valores respectivos de 98% e 27%. Ou seja, a imersão em NL comprometeu consideravelmente a formação de novos calos.

Aos 30 dias em meio de desenvolvimento de embriões somáticos, não houve desenvolvimento de embriões em nenhum dos tratamentos, apenas a progressão da

oxidação dos calos já formados, além do surgimento de massas calogênicas semi-friáveis (Fig. 15F). Para a técnica *vitriification*, notou-se, independentemente da realização dos tratamentos de imersão em NL, uma alta taxa de explantes oxidados, com destaque para aqueles da região basal dos estaminódios com calos (83,5% de oxidação), cujo valor diferiu estatisticamente do percentual oriundo dos explantes do tipo estaminódios inteiros com formação prévia de calos (65,5%). Adicionalmente, independentemente do tipo de explante utilizado, verificou-se diferença estatística entre os tratamentos sem e com imersão em NL, com valores de 63,5% e 85,5%, respectivamente.

Quando se comparou a taxa de oxidação de explantes do tipo região basal dos estaminódios submetidos às técnicas *droplet vitriification* e *vitriification*, independentemente da realização ou não da imersão em NL, não se constatou diferença estatística entre os valores oriundos de tais técnicas, com valor médio de 83,5% de oxidação. Por outro lado, o tratamento NL+ incrementou expressivamente a taxa de oxidação dos calos, com valor médio de 92%, valor 18,47% maior que aquele oriundo do tratamento NL-, independentemente da técnica utilizada (*droplet vitriification* e *vitriification*).

3.2.2 Aspectos morfoanatômicos de propágulos de *Theobroma cacao* L. criopreservados

3.2.2.1 Respostas aos 45 dias em meio de indução de calos (MIC)

Os calos formados previamente à criopreservação (NL+), independentemente da técnica utilizada, geralmente, eram nodulares, bastante hidratados e escurecidos (alta taxa de oxidação) (Fig. 17A). Os calos formados após a criopreservação surgiam como protuberâncias sobre o explante oxidado e apresentavam coloração mais clara (Fig. 17B). As secções anatômicas dos explantes (estaminódios com calos formados antes e após a criopreservação) evidenciam, de modo geral, a natureza heterogênea da calogênese em cacaueiro.

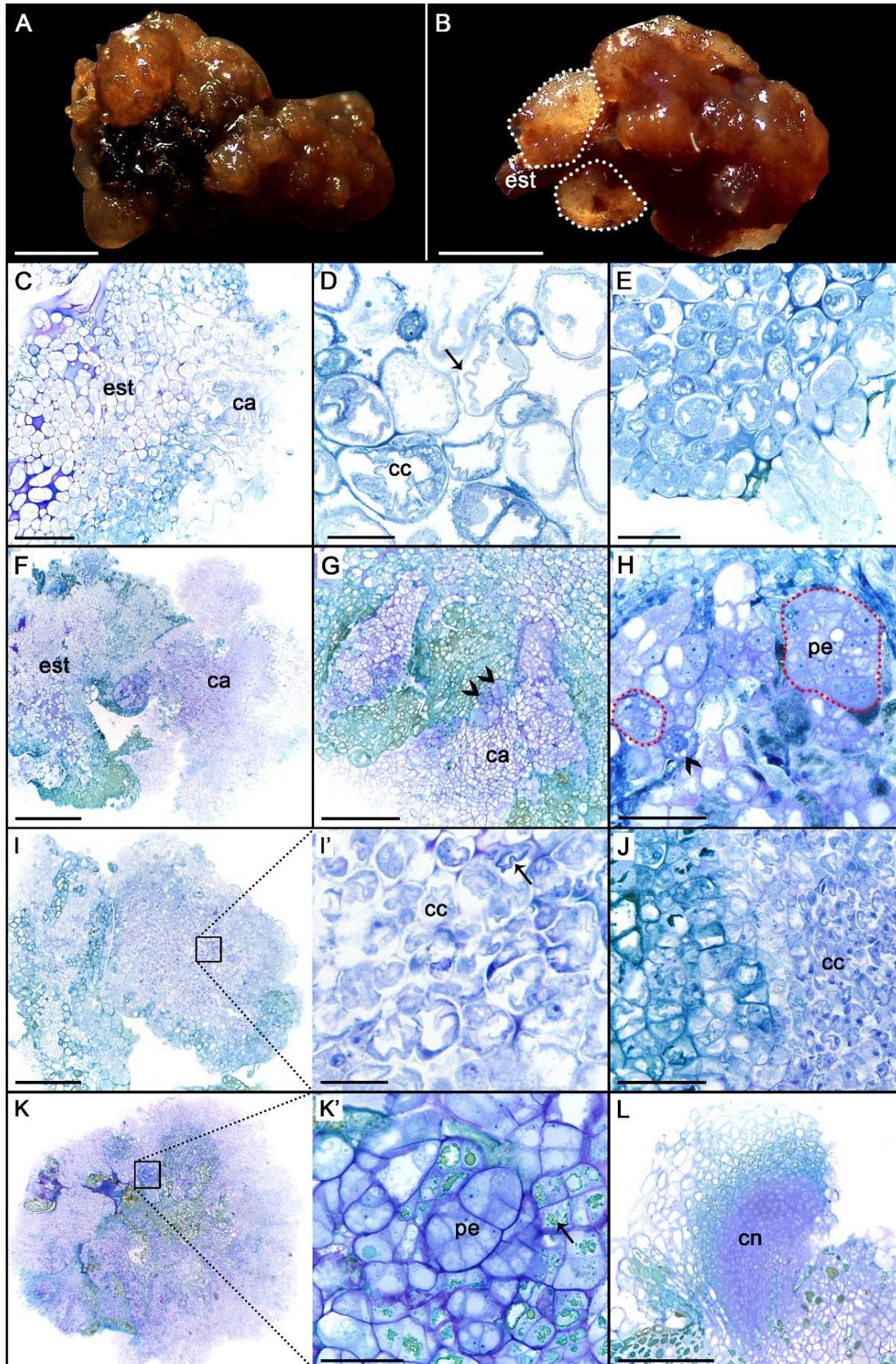


Figura 17. Morfologia (A-B) e anatomia (C-L) de estaminódios e calos de *Theobroma cacao* L. (genótipo 752), após criopreservação via técnicas *vitrification* -V (C-H) e *droplet-vitrification* -DV (I-L). **A, C-E, I-J.** Calos novos ausentes. **B, F-H, K-L.**

Calos novos presentes. **C-E**. Técnica V e tratamento em nitrogênio líquido (NL+): notar calos com células em aparente degeneração (setas). **F-H**. Técnica V e NL- (G-H, detalhe de F): notar células ricas em compostos fenólicos (setas), células embriogênicas (cabeças de seta) e proembriões (pontilhado). **I-J, L**. Técnica DV e NL+. **K'**. Técnica DV e NL-. Abreviações: *ca*, calo; *cm*, calo nodular; *est*, estaminódio; *pe*, proembrião. Escalas: A, B= 1 mm; C, F, K= 0,5 mm; G, I, L= 0,2 mm; E, H, I', J, K= 0,05 mm.

Todos os explantes já com calos presentes submetidos às técnicas de *vitrification* e *droplet vitrification*, após imersão em NL, que não produziram calos após a criopreservação, exibiram, características anatômicas similares. As regiões dos estaminoides não reagentes apresentavam células vacuoladas ricas em compostos fenólicos, mucilagem e os calos formados previamente exibiam células com sinais de plasmolização (sem compartimentalização clara entre núcleo e citoplasma e presença de paredes onduladas, com sinuosidades) (Fig. 17C-E, I-J). Como comentado anteriormente, somente alguns explantes submetidos à *droplet vitrification* conseguiram gerar novas massas de calos após a criopreservação (Fig. 17L).

Os calos novos formados após aplicação da técnica *droplet vitrification* sem imersão em NL (um dos tratamentos controle) apresentavam células com características embriogênicas, algumas isoladas, outras em grupos, formando proembriões com variados números de células (Fig. 17K, K'). Além do mais, esses calos foram caracterizados pela abundância de compostos fenólicos (Fig. 17K'). Esses calos novos assemelham-se histologicamente àqueles formados no tratamento controle (*vitrification*, sem imersão em NL) (Fig. 17F-H). Já os calos novos que surgiram de explantes submetidos à técnica *droplet vitrification*, com imersão em NL, foram caracterizados anatomicamente pela presença de grupos de células com características meristemáticas (alta relação núcleo: citoplasma, com dimensões reduzidas, sem vacúolos) envolvidas por uma camada de células parenquimáticas ricas em compostos fenólicos e por uma camada mais externa de células parenquimáticas desprovidas desses compostos (Fig. 17L).

3.2.2.2 Respostas aos 90 dias em meio de desenvolvimento de embriões somáticos (MDE)

Aos 90 dias em meio de desenvolvimento de embriões, alguns explantes aumentaram seu volume em seus respectivos tratamentos, controle (sem imersão em nitrogênio líquido) e com imersão em NL+, ocorrendo dois processos oxidação parcial com formação de calos semi-friáveis (Fig. 18A) ou oxidação completa de seus calos (Fig. 18B).

Os cortes anatômicos de calos escurecidos (oxidados) após 90 dias em meio MDE exibiram alta concentração de compostos fenólicos- coloração esverdeada (Fig. 18C, E, F, H) para ambos os tratamentos testados, além de mucilagem mais arroxeadada (Fig. 18B) mais arroxeadada. Além disso, foram encontradas poucas células com núcleo e nucléolos visíveis, a maioria delas eram vacuoladas.

Os calos semifriáveis oriundos da técnica de *vitrification* (Fig. 18D), nos tratamentos controle e NL+, apresentavam predominância de células vacuoladas, com baixa densidade de células com características embriogênicas. Salienta-se que, nesse tempo de avaliação verificaram-se sinais de plasmolização (Fig. 18G), como mencionado anteriormente, apenas para o tratamento com imersão em NL+.

Para os calos semifriáveis provenientes da técnica de *droplet vitrification*, verificou-se a predominância de células vacuoladas, algumas poucas com perfil embriogênico (com núcleos e nucléolos evidentes, sinais de isolamento) (Fig. 18E). No tratamento NL- visualizaram-se uma maior quantidade de células características embriogênicas se comparado ao mesmo tratamento para a *vitrification* (Fig. 18F). Já no tratamento NL+, essas células quase eram inexistentes, sendo evidente apenas células vacuoladas (Fig. 18H), compostos fenólicos e mucilagem.

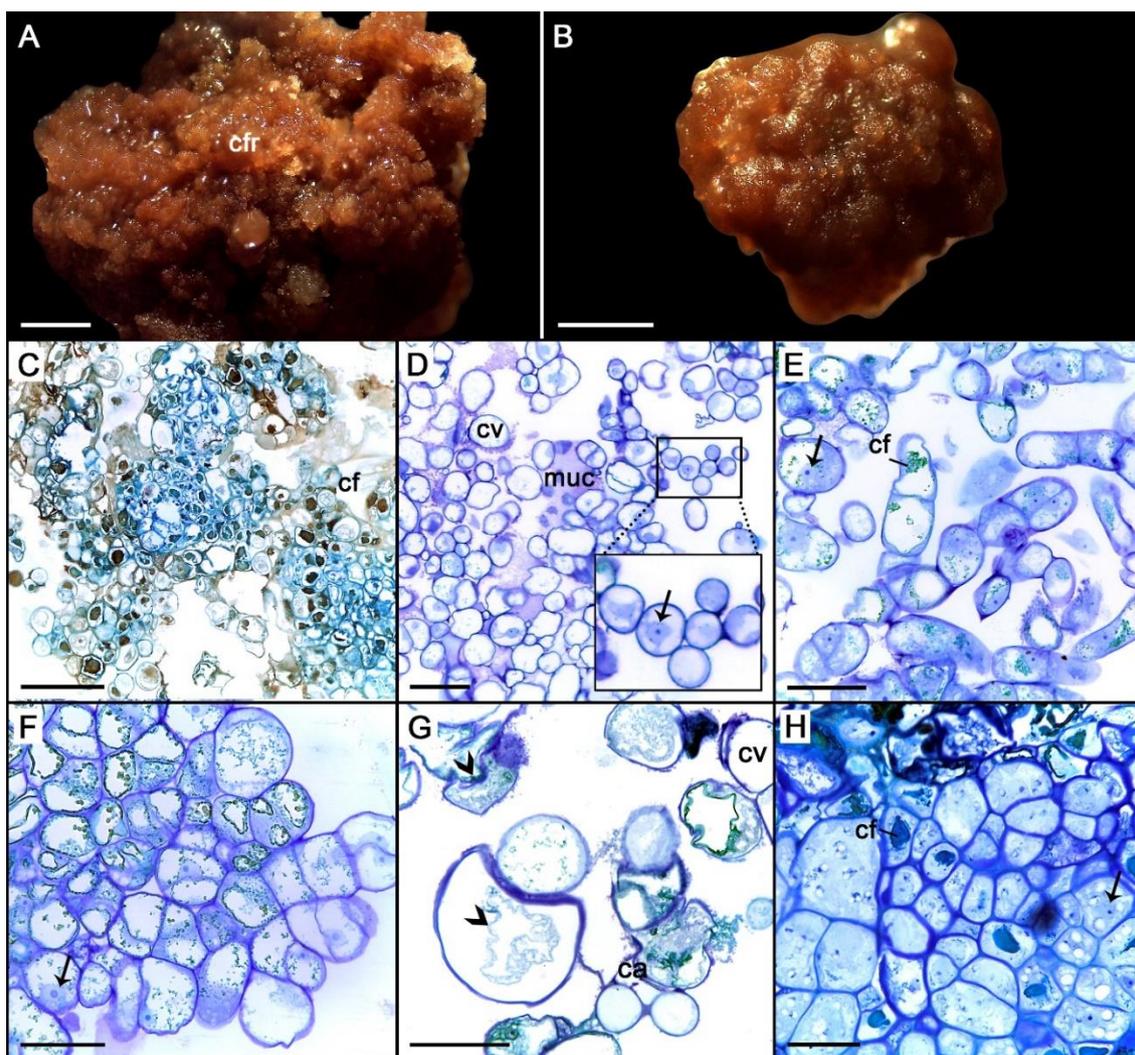


Figura 18. Morfologia (A-B) e anatomia (C-H) de calos de *Theobroma cacao* L. (genótipo 752), após criopreservação via técnicas *vitrication* - V e NL- (B-D, H), NL+ (G) e *droplet-vitrication*- DV e NL- (A, E-F). **A.** Calos semi-friáveis. **B.** Calos com oxidação completa evidenciando alta concentração de compostos fenólicos. **D.** Calos semi-friáveis com células vacuoladas e células com características embriogênicas isoladas e envolvidas por mucilagem (retângulo). **E, F.** Células vacuoladas e células embriogênicas com núcleo e nucléolo evidentes (seta) e proembriões. **G.** Células com sinais de plasmolização (cabeça de seta apontam citoplasma degenerado). **H.** Células com vacúolos visíveis e pró-embriões. Abreviações: *ca*: calo; *cf*: calo semifriável; *cv*: célula vacuolada; *muc*: mucilagem. Escalas: A = 2 cm, B = 1 cm, C, E-G = 200 μ M, D = 100 μ M, H = 50 μ M.

3.3 Segunda tentativa de criopreservação

3.3.1 Aplicação da técnica *droplet vitrification* sobre dois tipos de explantes

3.3.1.1 Respostas morfológicas

Quanto ao genótipo 752, no tratamento controle caracterizado por explantes não imersos nas soluções crioprotetoras (LS, PVS2) e sem imersão em nitrogênio líquido (NL-), os explantes permaneceram se desenvolvendo, com contínuo crescimento de massas de calos com formatos granulares e/ou nodulares e coloração que variou de translúcida à rosada. Além disso, observou-se o início de escurecimento (oxidação) dos calos primários (Fig. 19A, B). Para ambos os explantes, o resultado foi similar, mostrando que o seccionamento do estaminódio não interfere na formação e desenvolvimento de calos.

Para o tratamento, no qual os explantes foram imersos nas soluções LS, PVS2 e NL-, percebeu-se que os calos primários pré-formados em ambos explantes exibiram oxidação, com coloração marrom claro. Todavia, esse escurecimento, não atrapalhou o surgimento de novos calos, translúcidos e bastante hidratados e, com formatos irregulares (Fig. 19C, D).

Para o tratamento com a técnica *droplet vitrification* (DV) ambos os explantes, responderam de diferentes formas. Alguns apresentaram apenas escurecimento dos calos pré-formados, os quais exibiam coloração marrom e aspecto aquoso (Fig. 19E, F) e outros explantes desenvolveram novos calos com coloração avermelhada ou branca, com formato arredondado e superfície lisa (Fig. 19G, H).

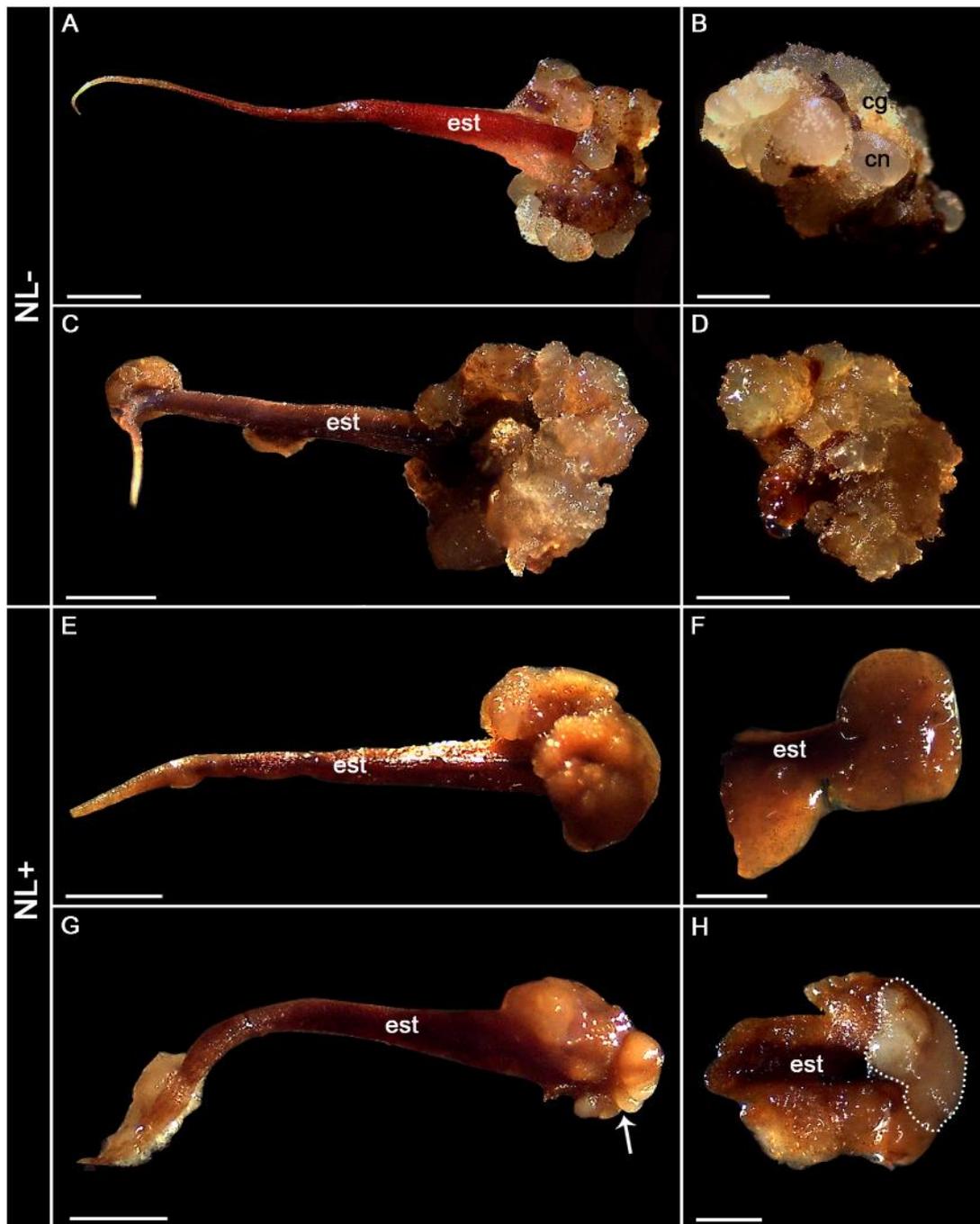


Figura 19. Caracterização morfológica de explantes do genótipo 752 de *Theobroma cacao* L. (cacaueiro) em tratamento controle (NL-) e criopreservados (NL+); estaminódio inteiro com calo na parte basal (A, C, E, G) e parte basal do estaminódio com calo (B, D, F, H). **A, B.**, Explantes oriundos do tratamento controle sem imersão em LS, PVS2 e NL. **C, D.** Explantes oriundos do tratamento imersão em LS, PVS2 e NL-.

E, F. Explantes provenientes do tratamento *droplet vitrification* e NL+ apresentando calos pré-formados escurecidos. **G-H.** Explantes advindos do tratamento *droplet vitrification* e NL+ com surgimento de calos; seta e linha pontilhada indicam formação de calo novo. Abreviações: *cn*, calo novo, *est*, estaminódio. Escalas: A, C, D, E, F = 2 mm; B, F, H= 1,0 mm.

3.3.1.2 Respostas estatísticas

As análises estatísticas para a formação de calos (Fig. 20A) mostraram interação entre os fatores testados, sendo necessário, portanto, realizar o desdobramento. A imersão em nitrogênio líquido (NL+) promoveu uma redução significativa na formação de calos para ambos os explantes, principalmente para o explante do tipo parte basal com calo – 30% (Fig. 20A).

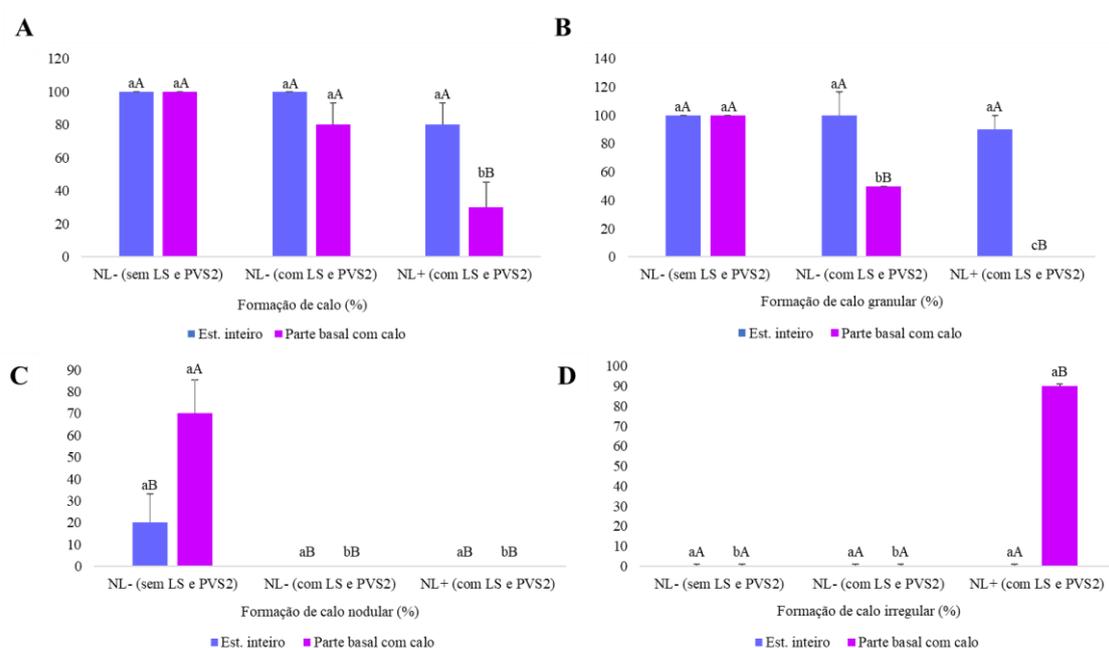


Figura 20. Efeito de diferentes tratamentos para criopreservação sobre a formação de calo (independente do tipo de calo) e de diferentes tipos de calos (%) a partir de estaminoides inteiros com calos e região basal do estaminódio com calos de *Theobroma cacao* L. Abreviações: NL- (sem imersão em Nitrogênio Líquido), NL+ (com imersão em Nitrogênio Líquido), LS (*loading solution*) e PVS2 (*plant vitrification solution 2*). Letras minúsculas indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos para criopreservação considerando cada tipo de explante e letras maiúsculas indicam diferenças estatísticas

entre os tipos de explantes considerando cada tratamento para criopreservação, conforme Teste de *Tukey*, a 5% de significância. Barras representam o erro padrão.

Ao analisar apenas a formação de calos granulares (Fig. 20B), constatou-se interação significativa entre os tratamentos, sendo esses fatores desdobrados. Observou-se uma diminuição expressiva na formação deste tipo de calo a partir do explante do tipo parte basal do estaminódio, logo após as imersões em soluções crioprotetoras. Verificou-se ainda que o explante do tipo estaminódio inteiro apresentou formação desse tipo de calo mesmo após a imersão em NL, o que não foi constatado para o explante do tipo parte basal do explante.

Para a formação de calos nodulares (Fig. 20C), houve interação significativa entre os fatores. A parte basal dos estaminódios se destacou com 100% de formação desse tipo de calo no tratamento NL-, enquanto os estaminódios inteiros tiveram apenas 20% de formação para o mesmo tratamento.

A formação de calos irregulares (Fig. 20D), por sua vez, só foi visualizada no tratamento sem imersão nas soluções crioprotetoras e no NL, com destaque em termos de formação para estaminódios do tipo a parte basal desse explante (90%).

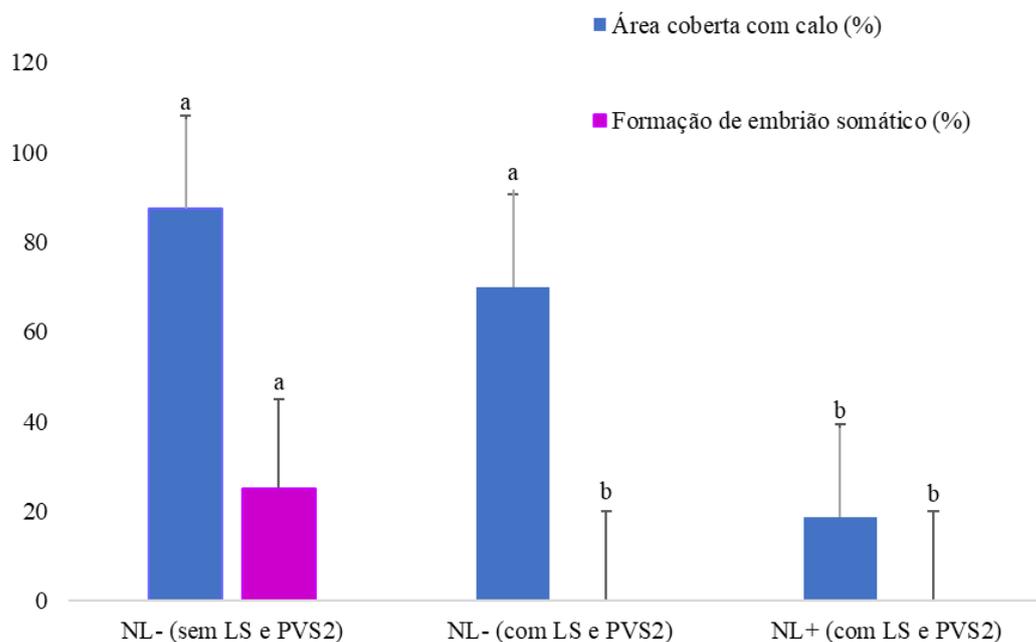


Figura 21. Efeito de diferentes tratamentos para criopreservação sobre os percentuais de área do explante coberta por calos, e formação de embriões somáticos a partir de estaminódios de *Theobroma cacao* L. Abreviações: NL- (sem imersão em Nitrogênio Líquido), NL+ (com imersão em Nitrogênio Líquido), LS (*loading solution*) e PVS2 (*plant vitrification solution 2*). Média seguidas de letras iguais, para cada variável analisada, indicam diferenças estatísticas conforme Teste de Tukey, a 5% de significância. Barras representam o erro padrão.

Ao avaliar a área do explante coberta por calos e a taxa de formação de embriões somáticos quando transferidos para o MDE, foi constatada diferenças estatísticas entre os tratamentos de criopreservação avaliados, independente do tipo de explante utilizado (Fig. 21). Conforme observado na Figura 21, o tratamento sem imersão em soluções crioprotetoras e em NL proporcionou uma maior área de cobertura com calos (87,5%). Já embriões somáticos foram observados no tratamento controle (NL- = 25% de formação) (Fig. 21).

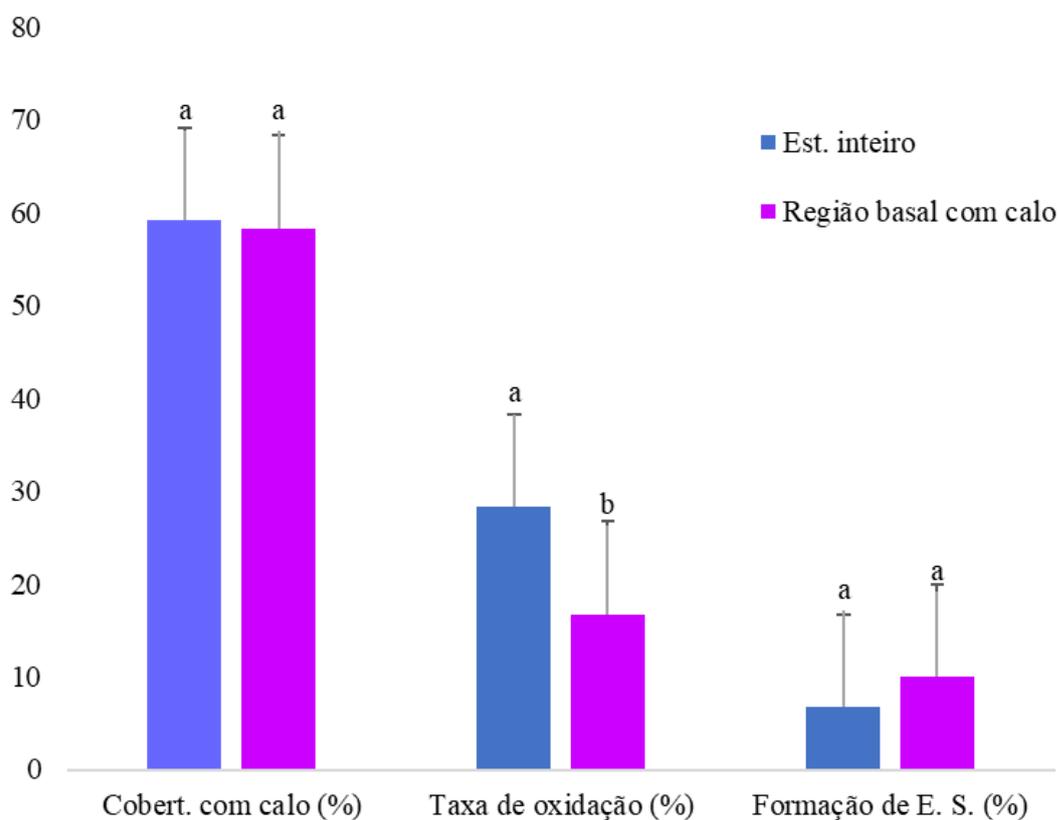


Figura 22. Respostas de dois tipos de explantes (estaminódio inteiro e região basal com calo) de *Theobroma cacao* L., independentemente do tratamento de criopreservação utilizado, com relação aos percentuais de cobertura do explante por calos, oxidação dos calos e a formação de embriões somáticos. Médias seguidas por letras iguais, para cada variável analisada, indicam diferenças estatísticas, conforme Teste de Tukey, a 5% de significância. Barras representam o erro padrão.

Independentemente do tratamento de criopreservação, não se constataram diferenças entre os tipos de explantes usados quanto à área de cobertura do calo (valor médio 58,75%) e à taxa de formação de embriões somáticos (valor médio de 8,35%) (Fig. 22). No entanto, a parte basal dos estaminódios apresentou uma menor taxa de oxidação (16,7%) em relação ao estaminódio inteiro.

3.4 Efeitos de diferentes tratamentos de *slow cooling* e *vitrification*

3.4.1 Respostas morfológicas

Para o genótipo 762, os explantes submetidos ao tratamento controle (sem imersão em soluções crioprotetoras e NL-) apresentaram o desenvolvimento de calos granulares, com distribuição por todo o estaminódio. Para o tratamento com imersão em soluções crioprotetoras e NL-, observou-se um ligeiro escurecimento de alguns calos pré-formados e na parte mediana do estaminódio. Apesar disso, verificou-se a formação de novos calos nodulares e alguns granulares, com coloração amarelada e translúcida (Fig. 23A).

No tratamento de *vitrification*, identificaram-se estaminódios com coloração marrom claro à escuro, bem como a formação de calos arredondados, com coloração mais clara e consistência hiper-hidratada (Fig. 23B, C). Esse mesmo tipo de calo foi observado nos explantes submetidos ao tratamento com *slow cooling* (Mr. Frosty- Nalgene®) (Fig. 23D).

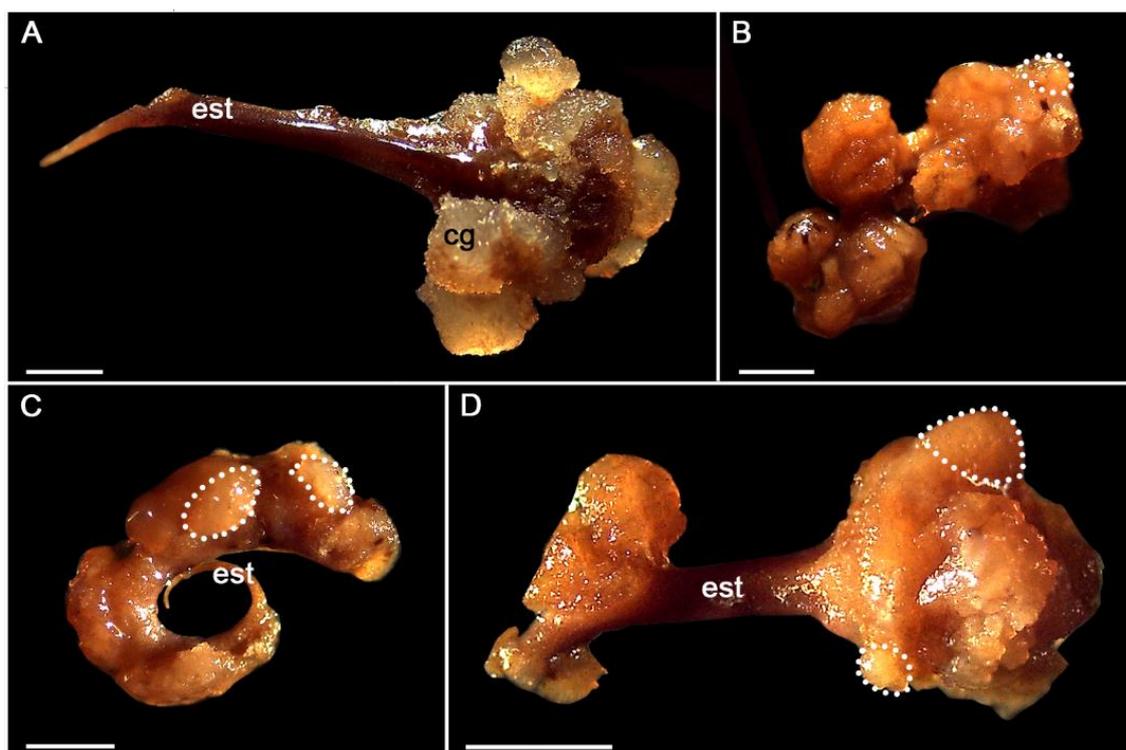


Figura 23. Caracterização morfológica de estaminódios do genótipo 762 de *Theobroma cacao* L. (cacaueiro) em tratamento controle (NL-) e criopreservados (NL+). **A.** Tratamento com imersão em LS, PVS2 e NL-. **B-C.** Estaminódio submetido à *vitrification* e NL+ com surgimento de novos calos (regiões pontilhadas). **D.** Estaminódio submetido ao *slow cooling* (-80° C) e NL+ com surgimento de calos (pontilhados). Abreviações: *cg*, calo granular, *est*, estaminódio. Escalas: A, B, C = 2 mm; B, B= 1,0 mm.

3.4.2 Respostas estatísticas

A taxa de formação de calo e a área de cobertura do explante com calo diminuíram significativamente com a imersão em NL (Tabela 2). Já a taxa de oxidação foi mais expressiva quando os explantes foram imersos em LS e PVS2, seguido de imersão em NL. Quanto aos tipos de calos observados, verificou-se que a não imersão em NL proporcionou a formação de calos granulares e nodulares, enquanto a imersão em NL induziu a formação de calos semi-friáveis (Tabela 2).

Conforme os dados apresentados na Tabela 2, verifica-se que embora os tratamentos *slow cooling* e *vitrification* não tenha diferido estatisticamente entre si com relação à taxa de formação de calos e cobertura do explante com calos, em termos numéricos, a *vitrification* destacou-se com 30% e 8,7%, respectivamente. Por outro lado,

a *vitrification* proporcionou uma maior taxa de oxidação comparativamente à *slow cooling*. Salienta-se que nesse experimento não foi observada a formação de embriões somáticos.

Tabela 1. Efeito de diferentes tratamentos (com ou sem osmoproteção seguido ou não de imersão em Nitrogênio Líquido) sobre os percentuais de formação de calo, cobertura do explante com calo, oxidação e formação de calo granular, nodular e semi-friável de explantes florais de *Theobroma cacao* L. (cacaueiro).

Tratamentos	Form. de calo (%)	Cobertura calo (%)	Oxidação (%)	Form. de calo granular (%)	Form. calo nodular (%)	Form. calo semi-friável (%)
NL- (sem LS e PVS2)	100,0 ± 0,0 a	88,6 ± 3,4 b	11,3 ± 2,9 b	100 ± 0,0 a	80,0 ± 9,2 a	0,0 ± 0,0 b
NL- (com LS e PVS2)	100,0 ± 0,0 a	98,8 ± 1,3 a	8,75 ± 2,7 b	100 ± 0,0 a	35,0 ± 10,9 b	0,0 ± 0,0 b
NL+ (com LS e PVS2)	30,0 ± 10,5 b	8,7 ± 3,3 c	70,0 ± 10,5 a	25,0 ± 9,9 b	0,0 ± 0,0 c	35,0 ± 10,9 a
MR e NL+ (com LS e PVS2)	10,0 ± 6,9 b	2,5 ± 1,7 c	26,25 ± 9,8 b	0,0 ± 0,0 c	0,0 ± 0,0 c	20,0 ± 9,2 ab

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Médias ± erro padrão. Abreviações: NL- (sem imersão em Nitrogênio Líquido), NL+ (com imersão em Nitrogênio Líquido), MR (Mr. Frosty), LS (*loading solution*), PVS2 (*plant vitrification solution* 2).

4 DISCUSSÃO

4.1 Tratamentos pré-condicionamento – pré- cultivo e imersão em *loading solution* (LS) e *plant vitrification solution 2* (PVS2)

O pré- cultivo em sacarose em concentrações adequadas para a espécie é crucial para promover uma maior taxa de sobrevivência de explantes submetidos à criopreservação, estimulando a formação de calos que regenerarão plantas. Contudo, é crucial reconhecer que a variação genotípica ainda exerce uma influência significativa nessas respostas (Ofori et al., 2015; Lahive; Hadley; Daymond, 2019; Bhavishya et al., 2024), destacando a necessidade de estudos voltados para a utilização e conservação de acessos genótipos específicos.

Nas análises dos períodos de imersão em *loading solution*, foram observadas diferenças nas respostas entre os genótipos comerciais e não-comerciais. Embora os genótipos não-comerciais tenham demonstrado uma taxa de sobrevivência (capacidade de formação de calos) maior, após exposição a condições de osmoproteção e NL, é importante considerar que, para fins de conservação, os genótipos selvagens desempenham um papel crucial na preservação da diversidade genética e no avanço da pesquisa para programas de melhoramento genético (Duval et al., 2017; Rodriguez-Medina et al., 2019; Ceccarelli et al., 2022; Daymond; Bekele, 2022).

Já estudos com genótipos comerciais têm sido focados na produção em larga escala e rentabilidade de seus recursos (Lins et al., 2016; Junior et al., 2017; Jaimez et al., 2022), mediante o cultivo *in vitro*, com estudos direcionados para genótipos, como o CCN-51 (Ramírez et al., 2018), EET95 (Guillou et al., 2018) e IMC67 (Montoya et al., 2022).

Nesse estudo, verificou-se que a imersão na concentração 0,3 M por 48 h garantiu alta taxa de sobrevivência dos explantes (produção de calos), com o mínimo de oxidação. O pré- cultivo em sacarose é aplicada para evitar danos celulares, removendo ou reduzindo a quantidade de água dentro das células, o que previne a formação de cristais de gelo durante o congelamento e protegendo as células da morte (Kaya et al., 2020; Van Der Walt; Burritt; Nadarajan, 2022).

Além do uso de sacarose, os protocolos de criopreservação apresentam uma etapa de imersão prévia em LS, que tem como função penetrar nas células com substâncias crioprotetores mantendo sua viabilidade e função durante o congelamento e descongelamento, prevenindo a formação de cristais de gelo e gerenciando

adequadamente a produção de EROS para proteger contra danos oxidativos (Chen et al., 2015; Tanaka et al., 2018; Nagel et al., 2024).

Neste trabalho, o tempo de 20 minutos de imersão foi selecionado para continuação do protocolo de criopreservação por, de modo geral, garantir a maior capacidade de formação de calos, com menores taxas de oxidação dos explantes. Observou-se também a ocorrência de oxidação dos explantes em alguns períodos de imersão em LS, um processo comum devido à natureza lenhosa da espécie e a abundância de compostos fenólicos (Andrade; Segura; Somarriba, 2022; Galvis et al., 2023; Santacruz; Medrano, 2021; Tavares et al., 2022; Huq et al., 2024).

Posteriormente, os explantes foram ao PVS2, semelhante à *loading solution*, mas desenvolvido para atender às demandas específicas dos tecidos vegetais, ao contrário da LS usado em diferentes tipos celulares, incluindo animais, proporciona uma proteção eficaz contra danos causados pelo congelamento (formação de cristais de gelo) devido à sua composição bioquímica adequada (Panis; Lambardi, 2005; Benson, 2008; Santos et al., 2015; Zamecnik; Faltus; Bilavcik, 2021).

Conforme os resultados obtidos, recomenda-se a imersão de estaminódios de cacauero por 40 min em PVS. Experimentos voltados para verificar o tempo mais apropriado de exposição ao PVS2 também têm sido realizados em outras espécies lenhosas (O'Brien et al., 2021; Liu et al., 2023). Nos protocolos de cacauero, tem sido utilizado soluções LS e PVS2 por meio da técnica *vitrification* (Adu-Gyamfi; Wetten, 2012, 2020), *encapsulation-dehydration* com apenas dessecação em sílico em gel (Fang; Wetten; Hadley, 2004). A realização desse tipo de análise tem um papel relevante na manutenção da sobrevivência dos explantes, uma vez que, o PVS2, a depender do tempo de exposição, tipo de explante e espécie, pode causar efeitos fitotóxicos, como o mencionado por (Volk; Walters, 2006; Kim, 2023).

Além disso, analisar o comportamento dos genótipos não-comerciais durante as imersões em solução PVS2, observou-se uma variabilidade em suas respostas, com taxas de sobrevivência maiores em períodos de imersão prolongados, o que proporciona uma maior proteção dos explantes, evitando a formação de cristais de gelo intracelulares (Prudente et al., 2019; Bekheet; Sota; Rady, 2023; Nagel et al., 2024).

4.2 Primeira tentativa de criopreservação

4.2.1 Efeitos da aplicação das técnicas *vitrification* e *droplet vitrification* sobre dois tipos de explantes

No tratamento controle, que não foi submetido à imersão em nitrogênio líquido e, portanto, não sofreu estresse inerente à ultrabaixa temperatura, o processo de desenvolvimento calogênico continuou. Houve um aumento no volume da massa calogênica, o que é positivo, já que é a partir dessa fase intermediária que ocorre a formação de embriões somáticos (Maximova et al. 2002; Traore; Maximova; Guiltinan 2003; Garcia et al., 2016; Daouda et al., 2019). Salienta-se, contudo, que tais calos, bem como àqueles expostos ao NL, foram incapazes de gerar embriões somáticos. Isso pode ser atribuído ao genótipo utilizado, ao estresse consequente da exposição às soluções crioprotetoras (Volk; Walter et al., 2006) e/ou aos períodos de troca dos meios de cultivo (Georges et al., 2023).

Quando se compararam dois tipos de explantes (estaminódio inteiro e parte basal do estaminódio com calos) submetidos à técnica *vitrification*, verificou-se que explantes do tipo região basal dos estaminódios com calos apresentaram maior percentual de formação de novos calos (98%) do que os explantes do tipo estaminódios inteiros com calos (55%), quando não submetidos à criopreservação (NL-).

Alguns autores afirmam que o estresse do seccionamento pode favorecer a formação de calos, mediante ativação da rota do gene associadas à totipotência ou pluripotência celular possibilitando que, em casos de danos ou lesões nos tecidos, essas células se dividam e se diferenciem em tipos celulares necessários para o reparo tecidual e de regeneração (Birnbaum; Alvarado, 2008; Sugimoto; Jiao; Meyerowitz, 2010). Essa abordagem é uma alternativa muito viável em condições *in vitro*, pois permitem modificações nas composições dos meios de cultivo de crescimento de plantas, ajustando as proporções hormonais de auxinas e citocininas (Chen et al., 2024).

Contudo, tais explantes apresentaram maiores percentuais de oxidação (83,5% de oxidação). Essa maior taxa de oxidação dos explantes do tipo região basal dos estaminódios provavelmente é consequência da maior liberação de fenólicos devido ao seccionamento prévio do explante, esse corte físico rompeu as células dessa região, liberando esses compostos que, normalmente estão armazenados em vacúolos, oxidam na presença de oxigênio e enzimas como a polifenoloxidase, causando o escurecimento do

material vegetal, um indicativo comum de danos celulares (Alvira et al., 2010; Kang et al., 2017; Lim et al., 2020; Huq et al., 2024).

A oxidação geralmente traz efeitos negativos sobre o crescimento do explante, embora haja alguns relatos dos seus possíveis papéis positivos nas respostas morfogênicas, funcionando como mecanismos de defesa, para síntese de antioxidantes e ativação de genes para os processos regenerativos (Vijendra et al., 2017; Liang et al., 2018; Kudelko; Gaj, 2019).

No entanto, independentemente da técnica de criopreservação empregada, verificou-se formação de calos novos e alta taxa de oxidação após a imersão em NL, o que provavelmente está relacionado ao efeito estressor durante os processos. E apenas poucos explantes submetidos ao NL apresentaram calos novos, os quais apresentaram alterações morfológicas similar ao verificado por outros autores (Streczynski et al., 2019; Villalobos-Olivera et al., 2022), como hiper-hidratação (Padilla et al., 2009), além de um crescimento celular mais lento.

Essas respostas podem ter sido desencadeadas pelo estresse durante a desidratação por sacarose, ou podem ter origem térmica devido às mudanças extremas e rápidas de temperatura durante o congelamento em condições criogênicas (-196°C) (González-Arno et al. 2009; Di et al., 2018).

Durante a desidratação, a remoção de água intracelular pode ter resultado na retração celular (diminuição de volume) e acarretando danos às estruturas internas das células (González-Arno et al. 2009; Silva; Kim; Engelmann, 2015). Enquanto no congelamento, podem ter ocorrido a formação de cristais de gelo que danificaram as membranas celulares e levaram à ruptura das células (Ninagawa et al., 2016; Monisha et al., 2019; Nagel et al., 2024).

4.2.1.1 Aspectos morfoanatômicos de propágulos de *T. cacao* criopreservados

4.2.1.1.1 Respostas aos 45 dias em meio de indução de calos (MIC)

A espécie *T. cacao* já é conhecida por sua heterogeneidade calogênica (Guillou et al., 2018; Bustami; Werbrouck, 2024), que abrange desde calos com células não embriogênicas, caracterizados por uma aparência mais vacuolada (Fehér, 2005; Guillou et al., 2018) até calos embriogênicos com células com núcleos, nucléolos, vacúolos distribuídos e menores e citoplasma denso (Pancaningtyas, 2021; Guillou; Verdier, 2022). Além disso, a planta possui compostos fenólicos associados à sua origem lenhosa, bem

como a presença de mucilagem, cujas funções na planta podem ser diversas e desempenhar papéis importantes em processos fisiológicos e de defesa.

Entretanto, após a criopreservação utilizando a técnica de *vitrification*, foram observadas células apresentando sinais de plasmolização, isso pode ter sido causado pelas baixas temperaturas de congelamento, levando a danos celulares, ou devido à presença de altas concentrações de solutos (efeito tóxico) ou à desidratação excessiva (Nagel et al., 2024). A plasmólise ocorre devido ao estresse osmótico causado pelo congelamento da solução extracelular, levando ao aumento das concentrações de solutos (Liu et al., 2021). Sinais semelhantes de plasmólise celular foram observados por Simão et al. (2018) em células radiculares de *Passiflora pohlii*.

Ao comparar as duas técnicas, a *droplet vitrification* diferencia-se da *vitrification* no que se refere aos modos de congelamento e descongelamento (Roque-Borda et al., 2021) e é considerado o método mais amplamente utilizado atualmente (Nagel et al., 2024). O principal diferencial desse método consiste na possibilidade de obtenção de taxas mais elevadas de congelamento e/ou reaquecimento devido a dois fatores, ao baixo volume de crioprotetores utilizados, no qual os explantes são colocados, e à condutividade térmica favorável do alumínio (Roque-Borda et al., 2021). Além disso, segundo El Merzougui et al. (2023), a *droplet vitrification* tem como vantagens o contato específico entre o crioprotetor e o explante no interior das gotas e a utilização de folha de alumínio, que por ser um metal com eficiente condutividade térmica, possibilita um resfriamento homogêneo mediante dispersão uniforme de temperatura.

Consequentemente, nessa técnica, observou-se a formação de novos calos nas avaliações iniciais, com características anatômicas que indicavam potencial embriogênico (Maximova et al., 2002). Esses resultados reforçam a superioridade desse método para cacauero em comparação à *vitrification*.

Nas avaliações subsequentes, não foram observadas mudanças em relação às primeiras análises anatômicas. Foram notadas apenas algumas características, como a formação de novos calos, o aumento do volume dos calos e a oxidação devido aos compostos fenólicos.

4.2.1.1.2 Respostas aos 90 dias em meio de desenvolvimento de embriões somáticos (MDE)

Após 90 dias em meio de desenvolvimento de embriões somáticos, verificaram-se alguns calos com alta taxa de oxidação e aumento de volume, assim como semifriabilidade, o que poderia indicar a formação de células embriogênicas (Hasbullah; Saleh; Taha, 2011; Utsumi et al., 2017). Esse tipo de calo é apropriado para o estabelecimento de suspensões celulares, as quais podem favorecer, devido ao maior contato dos explantes com o meio de cultivo e à dissolução de compostos tóxicos, podem favorecer às respostas morfogênicas (Ribeiro et al., 2021), o que deverá ser investigado em estudos futuros.

Embora tenham sido encontradas células com potencial embriogênico, especialmente na técnica de *droplet vitrification*, os calos semifriáveis obtidos apresentavam uma predominância de células vacuoladas. Além disso, nos calos que foram submetidos à imersão em nitrogênio líquido, os sinais de plasmólise continuaram presentes.

4.3 Segunda tentativa de criopreservação

4.3.1 Aplicação da técnica *droplet vitrification* sobre dois tipos de explantes

Verificou-se que o seccionamento do estaminódio não interfere na formação e no desenvolvimento de calos, isso se deve ao fato da formação acontecer em toda a extensão do explante (Georges et al., 2023; Bustami; Werbrouck, 2024). Inclusive, como já discutido, seccionamento pode ser um fator indutor de calos.

Foram encontradas respostas semelhantes às mencionadas anteriormente, como a oxidação dos calos pré-formados após as imersões em LS e PVS2, bem como após a imersão em NL+. Resultados similares têm sido reportado em outras espécies (Figueiredo et al., 2021; González-Arno et al., 2022). Tais resultados podem ser sobrepostos com a utilização de pré-tratamentos com antioxidantes ou mudança do crioprotetor, e, dessa forma, o sucesso na regeneração de plantas de cacauero a partir de embriões somáticos oriundo de calos criopreservados seja alcançada (Folgado et al., 2015; Zhang et al., 2015).

No entanto, calos novos foram obtidos em todos os tratamentos testados, inclusive, após a exposição ao NL, embora, nesse tratamento, tenha sido atingida uma taxa de formação calogênica inferior, principalmente, quando se utilizou explantes do tipo parte basal do estaminódio. A *droplet vitrification* tem sido bastante aplicada com

regeneração de muitas espécies de plantas (Benelli, 2021; Rantala et al., 2021; Nagel et al. 2024) , como *Rosa canina* L., *Lilium* spp. e *Vitis* spp. Assim, ressalta-se a necessidade de mais testes em relação aos tempos de imersão nas soluções crioprotetoras para garantir o sucesso da aplicação da *droplet vitrification* a partir de explantes florais de cacauero, com regeneração posterior de plantas.

Com relação aos tipos de calos formados, os calos nodulares foram exclusivamente identificados nos tratamentos controle (Pancaningtyas, 2021b), sendo mais comuns na porção basal do estaminódio. Em contrapartida, a ocorrência de calos irregulares só foi observada após a imersão em nitrogênio líquido, sendo que a maioria foi localizada na parte basal. Os calos do tipo nodular têm sido reportados a partir de explantes florais de cacauero (Rúa et al., 2016; Ajijah et al., 2016) e, segundo Oliveira (2023) possuem potencial embriogênico.

Já durante o período de avaliação em meio MDE, observou-se a formação de mais novos calos em todos os tratamentos, porém, com um desenvolvimento significativamente mais evidente nos tratamentos controle, onde também houve a formação de embriões somáticos, o que não foi observado nos demais tratamentos.

A formação de embriões somáticos a partir de explantes não submetidos às soluções crioprotetoras e ao NL, indicam o impacto negativo desses tratamentos na reprogramação genético, o que pode estar relacionado à alta carga de estresse a que os explantes foram submetidos e/ou a eventos epigenéticos, inclusive, consequentes do contexto estressor, o que requer investigações futuras. Em relação aos tipos de explantes, notou-se que o estaminódio inteiro apresentou o maior percentual de formação e oxidação de calos, porém, com uma menor capacidade de formação de embriões somáticos quando comparado à parte basal do estaminódio.

4.4 Efeitos de diferentes tratamentos de *slow cooling* e *vitrification*

Na abordagem de *slow cooling* e *vitrification*, a diversidade genotípica foi observada mais uma vez. É notável que a formação e o volume de calos granulares foram mais proeminentes no genótipo 762 quando submetidos a essas técnicas. No entanto, é importante ressaltar que, embora esses calos tenham exibido um maior desenvolvimento, não houve progressão para a formação de embriões somáticos.

Com a utilização do estaminódio inteiro como explante, houve uma distribuição dos calos em torno do estaminódio como citado no tópico anterior, no entanto partes não

cobertas por calos quando expostas às soluções crioprotetoras responderam com maior escurecimento (Zamecnik; Faltus; Bilavcik, 2021), fato observado para ambas as técnicas aplicadas.

A análise de dados evidenciou a redução na produção de calos após a exposição dos explantes ao NL, independentemente da técnica utilizada, o que ratifica os resultados obtidos nos experimentos anteriores. Para a técnica de *slow cooling*, as imersões não impediram a formação de calos nodulares e granulares, podendo ser mais uma alternativa para conservação de plantas (Yu et al., 2022; Nagel et al., 2024), entretanto, após o congelamento, houve uma redução percentual na formação, resultando apenas em calos irregulares.

Vários trabalhos têm mostrado a viabilidade da utilização da *vitrification* em outras espécies (Bettoni et al., 2019; Juan-Vicedo et al., 2021), devido as vantagens como tempo de congelamento rápido e prático, reduzindo custos (equipamentos, manutenção e mão de obra), além disso, utilizam de altas concentrações de crioprotetores que protegem eficazmente as células em um período mais curto, equilibrando a eficácia com a redução da toxicidade (Chen et al., 2022). Nesse trabalho, embora não tenha sido estatisticamente diferente do observado para a *slow cooling*- com relação à taxa de formação de calos, ela proporcionou 30%, enquanto esta última proporcionou 10% de formação de calos.

Interessantemente, o tratamento com imersão em NL+ resultou em formação de calos semifriáveis, que para algumas espécies pode possuir células embriogênicas (Utsumi et al., 2017; Sherif et al., 2018), além de ter potencial para o estabelecimento de sistemas líquidos que têm como vantagens a redução de custos e maior potencial de regeneração de plantas (Goyal et al., 2023; Uma et al., 2023). Assim como reportado no experimento anterior, nesse experimento, não houve a formação de embriões somáticos, o que requer investigações futuras sobre os possíveis fatores envolvidos com essa não responsividade, como acima discutido.

5 CONCLUSÕES

Com base nos experimentos realizados com a espécie *Theobroma cacao* L., pode-se concluir que a propagação e a conservação deste cacauzeiro apresentam desafios devido à sua natureza recalcitrante. No entanto, avanços importantes foram alcançados na busca por técnicas mais eficazes de criopreservação.

Os genótipos estudados, tanto comerciais (CCN-51, CEPEC 2002 e PH16) quanto não comerciais (752 e 762), responderam de maneira variada aos diferentes tratamentos aplicados. O pré-cultivo em sacarose demonstrou ser uma etapa importante para a sobrevivência dos explantes, onde os genótipos CCN-51 e CEPEC 2002 alcançaram 100% de sobrevivência e o PH 16, 80%, em meio com 0,3 M de sacarose, indicando ser eficiente para resultados de maior percentual de sobrevivência, conforme o maior percentual de formação de calos.

Na avaliação dos períodos de imersão em *loading solution* revelou resultados promissores, com o genótipo 752 apresentando 100% de formação de calos nos tempos de 20, 40 e 120 minutos, enquanto o CCN-51 demonstrou baixa formação, especialmente após 10 minutos de imersão, o que indica a necessidade de otimização dos tempos de imersão conforme o genótipo. A seleção do tempo de 20 minutos para a continuação do protocolo de criopreservação foi justificada pela combinação de alta taxa de calos e baixa oxidação.

As imersões em solução PVS2 mostraram que também ocorre influência nos explantes nessa etapa, observando redução de taxa de formação de calos de 65,4% no genótipo 752 e 40% no 762. A comparação entre o tratamento controle e os imersos em PVS2 e NL+ indicou uma queda acentuada para as variáveis formação e cobertura de calos, de 34,7% no 752 e 4,9% no 762.

Mudanças morfológicas também foram observadas, no qual foram observadas baixas formações de calos novos após a imersão em nitrogênio líquido, independente da técnica utilizada, para ambas as tentativas, quando evidentes essas formações possuíam características calos irregulares e hiper-hidratados. Anatomicamente foram encontrados heterogeneidade dos calos, com a presença de calos embriogênicos, não embriogênicos e nos explantes imersos em NL+, com sinais de plasmolização, provavelmente devido ao estresse induzido pela criopreservação afetando a capacidade de desenvolvimento dos explantes.

Em comparação as técnicas utilizadas, a *droplet-vitrification* se destacou, promovendo uma maior formação de calos após a imersão em nitrogênio líquido. Além disso, anatomicamente apresentar maior quantidade de células com potencial embriogênico em comparação à *vitrification* e *slow cooling*, embora os métodos não tenham gerado embriões somáticos em nenhum dos tratamentos.

Portanto, embora sejam necessários mais estudos para aperfeiçoar cada uma das técnicas de conservação aplicadas ao cacauero, os resultados obtidos com a *droplet-vitrification* representam um avanço para essa espécie. Mostrando-se como uma opção promissora para a criopreservação de *Theobroma cacao* L., proporcionando uma base para futuras pesquisas e aplicações na conservação e manejo dos recursos genéticos dessa espécie.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADU-GYAMFI, R.; WETTEN, A. Cocoa (*Theobroma cacao* L.) Somatic Embryos Tolerate Some Ice Crystallization during Cryopreservation. **Agricultural Sciences**, v. 11, n. 3, p. 223–234, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4236/as.2020.113014>>.

ADU-GYAMFI, R.; WETTEN, A. Cryopreservation of cocoa (*Theobroma cacao* L.) somatic embryos by *vitrification*. **Cryo-Letters**, v. 33, n. 6, p. 494–505, 2012. Disponível em: <<https://www.ingentaconnect.com/content/cryo/cryo/2012/00000033/00000006/art00010?crawler=true>>. Acesso em: 10/06/2024.

ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M. J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4851–4861, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.093>>.

AJIJAH, N.; HARTATI, R. S. Primary and Secondary Somatic Embryogenesis of Cacao: the Effect of Explant Types and Plant Growth Regulators. **Indonesian Journal of Agricultural Science**, v. 20, n. 2, p. 69-76, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.21082/ijas.v.20.n2.2019.p69-76>>.

ANDRADE, H. J.; SEGURA, M.; SOMARRIBA, E. Above-ground biomass models for dominant trees species in cacao agroforestry systems in Talamanca, Costa Rica. **Agroforestry Systems**, v. 96, n. 4, p. 787–797, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10457-022-00741-y>>.

ARAÚJO, A. B. N. de; OLIVEIRA, A. C. A. de; GRAÇA, G. A. da; SILVA, A. V. C.; LÉDO, A. S. Cryopreservation techniques in genipap and mangaba: challengers and perspectives. **Observatório De La Economía Latinoamericana**, v. 22, n. 3, p. e3675, 2024. Disponível em: <<https://doi.org/10.55905/oelv22n3-071>>.

BEKHEET, S.; SOTA, V.; IBRAHIM, M.; RADY, M. Effect of proline in comparison to pvs2 in cryopreservation of somatic embryo and callus cultures of date palm. **Nucl. Phys.**, v. 13, n. 1, p. 104–116, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.3329/jbcbm.v9i2.70033>>.

BENELLI, C. Plant cryopreservation: A look at the present and the future. **Plants**, v. 10, n. 12, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/plants10122744>>.

BENSON, E. E. Cryopreservation Theory. In: REED, B. M. (ed.). **Plant Cryopreservation – A Practical Guide**. New York: Springer, 2008, p.15-32. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/978-0-387-72276-4>>.

BEKHEET, S., V. SOTA, M. IBRAHIM RADY, M. Effect of proline in comparison to pvs2 in cryopreservation of somatic embryo and callus cultures of date palm. **Nucl. Phys.**, v. 13, n. 1, p. 104–116, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.3329/jbcbm.v9i2.70033>>

BETTONI, J. C.; KRETZSCHMAR, A. A.; BONNART, R.; SHEPHERD, A.; VOLK, G. M. Cryopreservation of 12 *Vitis* species using apical shoot tips derived from plants grown in vitro. **HortScience**, v. 54, n. 6, p. 976–981, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.21273/HORTSCI13958-19>>.

BHAVISHYA; BHAT, R.; APSHARA, S. E.; PUSHPA, T. N.; PRASAD, D. S.; NAYANA, H.; THUBE, S. H.; PANDIAN, R. T. P.; RAMESH, S. V. Genotypic variation in flowering, fruit set, and cherelle wilt, and their relationship with leaf nutrient status in cocoa (*Theobroma cacao* L.) grown in humid tropics of India. **Innovations in Agriculture**, v. 7, p. 1–5, 2024. Disponível em: <<https://doi.org/10.3897/ia.2024.124253>>.

BIRNBAUM, K. D.; ALVARADO, A. S. Slicing across Kingdoms: Regeneration in Plants and Animals. **Cell**, v. 132, n. 4, p. 697–710, 2008. Disponível em: <[10.1016/j.cell.2008.01.040](https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.040)>

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**, v. 8, n. 2, p. 7–16, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.5897/IJPPB2016.0247>>.

BUSTAMI, M. U.; WERBROUCK, S. P. O. Cyclic Somatic Embryogenesis in Indonesian Elite *Theobroma cacao* L. Clones. **Horticulturae**, v. 10, n. 1, 2024. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/horticulturae10010024>>.

CARVALHO. Cryopreservation of zygotic embryos of syringe (*Hevea brasiliensis*) containing reserve fabric. **Ciencia Florestal**, v. 31, n. 2, p. 959–973, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.5902/1980509847436>>.

CECCARELLI, V.; LASTRA, S.; LOOR SOLÓRZANO, R. G.; CHACÓN, W. W.; NOLASCO, M.; SOTOMAYOR CANTOS, I. A.; PLAZA AVELLÁN, L. F.; LÓPEZ, D. A.; FERNÁNDEZ ANCHUNDIA, F. M.; DESSAUW, D.; OROZCO-AGUILAR, L.; THOMAS, E. Conservation and use of genetic resources of cacao (*Theobroma cacao* L.) by gene banks and nurseries in six Latin American countries. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 69, n. 3, p. 1283–1302, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10722-021-01304-3>>.

CHEN, C.; HU, Y.; IKEUCHI, M.; JIAO, Y.; PRASAD, K.; SU, Y. H.; XIAO, J.; XU, L.; YANG, W.; ZHAO, Z.; ZHOU, W.; ZHOU, Y.; GAO, J.; WANG, J. W. Plant regeneration in the new era: from molecular mechanisms to biotechnology applications. **Science China Life Sciences**, v. 67, n. 7, p. 1338–1367, 2024. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11427-024-2581-2>>.

CHEN, G.; REN, L.; ZHANG, J.; REED, B. M.; ZHANG, D.; SHEN, X. hui. Cryopreservation affects ROS-induced oxidative stress and antioxidant response in *Arabidopsis* seedlings. **Cryobiology**, v. 70, n. 1, p. 38–47, 2015. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.11.004>>.

CHEN, H.; ZHANG, L.; MENG, L.; LIANG, L.; ZHANG, C. Advantages of *vitrification* preservation in assisted reproduction and potential influences on imprinted genes. **Clinical Epigenetics**, v. 14, n. 1, p. 1–11, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13148-022-01355-y>>.

DAOUDA, K.; MODESTE, K. K.; OULO, N. A.; EDMOND, K. K. Induction of somatic embryos of recalcitrant genotypes of *Theobroma cacao* L. **Journal of Applied Biosciences**, v. 133, n. 1, p. 13552, 2019. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.4314/jab.v133i1.7>>.

DAYMOND, A.; BEKELE, F. Cacao. In: PRIYADARSHAN, P.M.; JAIN, S.M. (eds.) **Cash Crops: Genetic Diversity, Erosion, Conservation and Utilization**. Cham: Springer International Publishing, 2022, pp. 23–53. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-3-030-74926-2_2>.

DI, W.; JIANG, X.; XU, J.; JIA, M.; LI, B.; LIU, Y. Stress and damage mechanisms in *Dendrobium nobile* Lindl. protocorm-like bodies during pre- and post-liquid nitrogen exposure in cryopreservation revealed by iTRAQ proteomic analysis. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 54, n. 3, p. 253–272, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11627-018-9898-x>>.

DUVAL, A.; GEZAN, S. A.; MUSTIGA, G.; STACK, C.; MARELLI, J. P.; CHAPARRO, J.; LIVINGSTONE, D.; ROYAERT, S.; MOTAMAYOR, J. C. Genetic parameters and the impact of off-types for *Theobroma cacao* L. In a breeding program in Brazil. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. December, p. 1–12, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02059>>.

EL MERZOUGUI, S.; BENELLI, C.; EL BOULLANI, R.; SERGHINI, M. A. The Cryopreservation of Medicinal and Ornamental Geophytes: Application and Challenges. **Plants**, v. 12, n. 11, p. 1–31, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/plants12112143>>.

FANG, J. Y.; WETTEN, A.; HADLEY, P. Cryopreservation of cocoa (*Theobroma cacao* L.) somatic embryos for long-term germplasm storage. **Plant Science**, v. 166, n. 3, p. 669–675, 2004. Disponível em: <<http://doi.org/10.1016/j.plantsci.2003.11.002>>.

FEHÉR, A. Why somatic plant cells start to form embryos? **Plant Cell Monographs**, v. 2, n. December 2005, p. 85–101, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/7089_019>.

FIGUEIREDO, J. R. M.; PAIVA, P. D. de O.; DA SILVA, D. P. C.; PAIVA, R.; MESQUITA, R.; SOUZA, R. R.; DOS REIS, M. V. Anatomical changes and cytogenetic stability in bird of paradise plants after zygotic embryo cryopreservation by desiccation method. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 57, n. 2, p. 272–280, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11627-020-10149-x>>.

FOLGADO, R.; PANIS, B.; SERGEANT, K.; RENAUT, J.; SWENNEN, R.; HAUSMAN, J. F. Unravelling the effect of sucrose and cold pretreatment on cryopreservation of potato through sugar analysis and proteomics. **Cryobiology**, v. 71, n. 3, p. 432–441, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2015.09.006>>.

FONSECA, S. T. D.; COIMBRA, M. C.; CASTRO, A. H. F. Criopreservação de sementes e ápices caulinares de *Bauhinia variegata*. In: JUNIOR, J. M. B. O.; CALVÃO, L. B. (orgs.). **Debate e Reflexão das Novas Tendências da Biologia**. Ponta Grossa, PR: Atena Editora, 2019, pp. 9-20. Disponível em: <<https://doi.org/10.22533/at.ed.2591909082>>.

GALVIS, D. A.; JAIMES-SUÁREZ, Y. Y.; ROJAS MOLINA, J.; RUIZ, R.; CARVALHO, F. E. L. Cadmium up Taking and Allocation in Wood Species Associated to Cacao Agroforestry Systems and Its Potential Role for Phytoextraction. **Plants**, v. 12, n. 16, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/plants12162930>>.

GARCIA, C.; CORRÊA, F.; FINDLEY, S.; ALMEIDA, A. A.; COSTA, M.; MOTAMAYOR, J. C.; SCHNELL, R.; MARELLI, J.-P. Optimization of somatic embryogenesis procedure for commercial clones of *Theobroma cacao* L. **African Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 36, p. 1936–1951, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.5897/AJB2016.15513>>.

GEORGES, N. G. P. K.; EMILE, M.; MODESTE, K. K.; SIAKA, K.; THEODORE, D. N.; CHRISTOPHE, K.; JEAN-CLAUDE, N. Preferential expression of somatic embryogenesis in five elite genotypes of *Theobroma cacao* (L.) associated with explant type and protocols used. **African Journal of Biotechnology**, v. 22, n. 12, p. 347–359, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.5897/AJB2023.17568>>.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, n. 12, p. 909–930, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016>>.

GONZAGA, T.W.C.; MATA, M.E.R.M.C.; SILVA, H.; DUARTE, M.E.M. Criopreservação de sementes de aroeira (*Astronium urundeuva* Engl.), e baraúna (*Schinopsis brasiliensis* Engl.). *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, v.5, n.2, p.145-154, 2003. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.15871/1517-8595/rbpa.v5n2p145-154>>.

GONZALEZ-ARNAO, M. T.; LAZARO-VALLEJO, C. E.; ENGELMANN, F.; GAMEZ-PASTRANA, R.; MARTINEZ-OCAMPO, Y. M.; PASTELIN-SOLANO, M. C.; DIAZ-RAMOS, C. Multiplication and cryopreservation of vanilla (*Vanilla planifolia* 'Andrews'). **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 45, n. 5, p. 574–582, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11627-009-9242-6>>.

GONZÁLEZ-ARNAO, M. T.; CRUZ-CRUZ, C. A.; HERNÁNDEZ-RAMÍREZ, F.; ALEJANDRE-ROSAS, J. A.; HERNÁNDEZ-ROMERO, A. C. Assessment of vegetative growth and genetic integrity of *Vanilla planifolia* regenerants after cryopreservation. **Plants**, v. 11, n. 13, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/plants11131630>>.

GOYAL, S.; CHATTERJEE, V.; KULKARNI, V. M.; BHAT, V. Plant regeneration through somatic embryogenesis in cell suspensions of *Cenchrus ciliaris* L. **Plant Methods**, v. 19, n. 1, p. 1–15, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13007-023-01081-3>>.

GROSS, B. L.; HENK, A. D.; BONNART, R.; VOLK, G. M. Changes in transcript expression patterns as a result of cryoprotectant treatment and liquid nitrogen exposure in *Arabidopsis* shoot tips. **Plant Cell Reports**, v. 36, n. 3, p. 459–470, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00299-016-2095-7>>.

GUILLOU, C.; FILLODEAU, A.; BRULARD, E.; BRETON, D.; DE FARIA MARASCHIN, S.; VERDIER, D.; SIMON, M.; DUCOS, J. P. Indirect somatic embryogenesis of *Theobroma cacao* L. in liquid medium and improvement of embryo-to-plantlet conversion rate. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 54, n. 4, p. 377–391, 1 ago. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11627-018-9909-y>>.

GUILLOU, C.; VERDIER, D. *Theobroma cacao*: Somatic Embryogenesis. In: RAMIREZ-MOSQUEDA, M. A. (ed.). **Somatic Embryogenesis: Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology**. Humana Press Inc: Nova York, 2022. v. 2527, p. 69–81. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2485-2_6>.

HASBULLAH, N. A.; SALEH, A.; TAHA, R. M. Establishment of somatic embryogenesis from *Gerbera jamesonii* Bolus EX. Hook F. through suspension culture. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 63, p. 13762–13768, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.5897/AJB11.1653>>.

HUQ, A. K. M. M.; RONEY, M.; DUBEY, A.; NASIR, M. H.; TUFAIL, A.; ALUWI, M. F. F. M.; ISHAK, W. M. W.; ISLAM, M. R.; TAJUDDIN, S. N. Phenolic compounds of *Theobroma cacao* L. show potential against dengue RdRp protease enzyme inhibition by In-silico docking, DFT study, MD simulation and MMGBSA calculation. **PLoS ONE**, v. 19, n. 3, 2024. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0299238>>.

JAIMEZ, R. E.; BARRAGAN, L.; FERNÁNDEZ-NIÑO, M.; WESSJOHANN, L. A.; CEDEÑO-GARCIA, G.; CANTOS, I. S.; ARTEAGA, F. *Theobroma cacao* L. cultivar CCN 51: a comprehensive review on origin, genetics, sensory properties, production dynamics, and physiological aspects. **PeerJ**, v. 9, p. 1–23, 2022. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.7717/peerj.12676>>.

JUAN-VICEDO, J.; RAMÍREZ-LUNA, J. E.; PIQUERAS, A.; CASAS, J. L. Micropropagation and cryopreservation by *vitrification* of the Spanish endemic medicinal plant *Sideritis leucantha* Cav. subsp. *leucantha* (Lamiaceae). **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 57, n. 6, p. 1057–1065, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11627-021-10173-5>>.

JUNIOR, E. E. E.; GUSUA, C. R.; TCHAPDA, T. D.; ANDRE, O. N. P. Vegetative propagation of selected clones of cocoa (*Theobroma cacao* L.) by stem cuttings. **Journal of Horticulture and Forestry**, v. 9, n. 9, p. 80–90, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.5897/JHF2017.0502>>.

- KANG, C.; YANG, J. W.; CHO, W.; KWAK, S.; PARK, S.; LIM, Y.; CHOE, J. W.; KIM, H. S. Oxidative biodegradation of 4-chlorophenol by using recombinant monooxygenase cloned and overexpressed from *Arthrobacter chlorophenolicus* A6. **Bioresource Technology**, v. 240, p. 123–129, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.078>>.
- KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal cell biology**, v. 27, p. 137–138, 1965. Disponível em: <<https://www.jstor.org/stable/1604673>>. Acesso em: 20/05/2023.
- KAHIA, J.; KONE, S.; DIBY, L.; NGORAN, G.; DADJO, C.; KOUAME, C. Enhanced plantlet regeneration in two cacao (*Theobroma cacao*) clones from immature inflorescence explants. **HortScience**, v. 52, n. 6, p. 892–895, 2017. Disponível em: <[10.21273/HORTSCI11844-17](https://doi.org/10.21273/HORTSCI11844-17)>.
- KAYA, E.; SOUZA, F. V. D.; DOS SANTOS-SEREJO, J. A.; GALATALI, S. Influence of dehydration on cryopreservation of *Musa* spp. germplasm. **Acta Botanica Croatica**, v. 79, n. 2, p. 99–104, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.37427/botcro-2020-024>>.
- KIM, H. Optimizing the *Droplet-Vitrification* Procedure by Balancing the Cryoprotection and Cytotoxicity of Alternative *Plant Vitrification Solutions* Based on the Nature of Donor Plant Vigor. **Plants**, v. 12, n. 23, p. 1–22, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/plants12234040>>.
- KONÉ, D.; N'NAN-ALLA, O.; KOUASSI, K. M.; KOFFI, K. E. Use of mineral salts to remove recalcitrance to somatic embryogenesis of improved genotypes of cacao (*Theobroma cacao* L.). **African Journal of Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 33–42, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.5897/AJB2020.17271>>.
- KUDEŁKO, K.; GAJ, M. D. Glutathione (GSH) induces embryogenic response in in vitro cultured explants of *Arabidopsis thaliana* via auxin-related mechanism. **Plant Growth Regulation**, v. 89, n. 1, p. 25–36, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10725-019-00514-1>>.
- LAHIVE, F.; HADLEY, P.; DAYMOND, A. J. The physiological responses of cacao to the environment and the implications for climate change resilience. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 39, n. 1, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13593-018-0552-0>>.
- 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**, v. 34, p. 293–299, 1998. Disponível em: <<https://www.jstor.org/stable/20065005>>. Acesso em: 20/08/2023.
- LIANG, Mingcai et al. l-Arginine induces antioxidant response to prevent oxidative stress via stimulation of glutathione synthesis and activation of Nrf2 pathway. **Food and chemical toxicology**, v. 115, p. 315–328, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.03.029>>.

- LIM, W. Y.; CHENG, Y. W.; LIAN, L. Bin; CHAN, E. W. C.; WONG, C. W. Inhibitory effect of Malaysian coastal plants on banana (*Musa acuminata* Colla “Lakatan”), ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) and sweet potato (*Ipomoea batatas*) polyphenol oxidase. **Journal of Food Science and Technology**, v. 58, n. 11, p. 4178–4184, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13197-020-04886-5>>.
- LINS, A. B.; LAWINSCKY, P. R.; BARBOSA, A. M. M.; GAIOTTO, F. A.; CORRÊA, R. X. Molecular genetic diversity in a core of cocoa (*Theobroma cacao* L.) clones with potential for selection of disease resistance, plant height and fruit production. **African Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 44, p. 2517–2523, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.5897/AJB2015.15188>>.
- LIU, X.; LIU, Y.; YU, X.; TRETYAKOVA, I. N.; NOSOV, A. M.; SHEN, H.; YANG, L. Improved Method for Cryopreservation of Embryogenic Callus of *Fraxinus mandshurica* Pupr. by *Vitrification*. **Forests**, v. 14, n. 1, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/f14010028>>.
- MAXIMOVA, S. N.; ALEMANNI, 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 Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 38, n. 3, p. 252–259, 2002. Disponível em: <<https://doi.org/10.1079/IVP2001257>>.
- MITTLER, R. **ROS Are Good**. Denton-Texas: Trends in Plant Science, 2017. v. 22, n. 1, p. 11–19. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2016.08.002>>.
- MONISHA, M.; SWATHI, G.; BAVITHRA, P. S.; ARUN, P. Conservation of plant materials by cryopreservation - a review. **European Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences**, v. 7, n. 3, p. 174–190, 2019. Disponível em: <https://storage.googleapis.com/journal-uploads/ejbps/article_issue/volume_6_march_issue_3/1551338027.pdf> Acesso em: 04/06/2024.
- MONTOYA, T. O.; RAMÍREZ, A. M. H.; VASQUEZ, T. L. H.; TRUJILLO, A. I. U. Propagation of IMC67 Plants, Universal Cacao (*Theobroma cacao* L.) Rootstock via Somatic Embryogenesis. **International Journal of Fruit Science**, v. 22, n. 1, p. 78–94, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/15538362.2021.2023067>>.
- HUQ, A. K. M. M.; RONEY, M.; DUBEY, A.; NASIR, M. H.; TUFAIL, A.; ALUWI, M. F. F. M.; ISHAK, W. M. W.; ISLAM, M. R.; TAJUDDIN, S. N. Phenolic compounds of *Theobroma cacao* L. show potential against dengue RdRp protease enzyme inhibition by In-silico docking, DFT study, MD simulation and MMGBSA calculation. **PLoS ONE**, v. 19, n. 3, 2024. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0299238>>.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, v. 15, n.3, p. 473-497, 1962. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>>.

NAGEL, MANUELA; PENCE, VALERIE; BALLESTEROS, DANIEL; LAMBARDI, MAURIZIO; POPOVA, ELENA; PANIS, B. Plant Cryopreservation: Principles, Applications, and Challenges of Banking Plant Diversity At Ultralow Temperatures. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, p. 1–28, 2024. Disponível em: <<https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-070623-103551>>.

NINAGAWA, T.; EGUCHI, A.; KAWAMURA, Y.; KONISHI, T.; NARUMI, A. A study on ice crystal formation behavior at intracellular freezing of plant cells using a high-speed camera. **Cryobiology**, v. 73, n. 1, p. 20–29, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.06.003>>.

O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MCCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, v. 59, n. 2, p. 368-373, 1964. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/BF01248568>>.

OFORI, A.; PADI, F. K.; ACHEAMPONG, K.; LOWOR, S. Genetic variation and relationship of traits related to drought tolerance in cocoa (*Theobroma cacao* L.) under shade and no-shade conditions in Ghana. **Euphytica**, v. 201, n. 3, p. 411–421, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10681-014-1228-8>>.

OLIVEIRA, L. P. L. Embriogênese somática em variedades de cacau (*Theobroma cacao* L.). 2023. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade de Brasília, Brasília, 2023. Disponível em: file:///C:/Users/milac/Downloads/Disserta%20C3%A7%C3%A3o%20-%20Leny%20Paula%20(01.11.2023).pdf. Acesso em: 07/05/2024

PADILLA, G.; MOON, P.; PEREA, I.; LITZ, R. E. Cryopreservation of embryogenic cultures of “brewster” litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) and its effect on hyperhydric embryogenic cultures. **Cryo-Letters**, v. 30, n. 1, p. 55–63, 2009. Disponível em: <<https://www.ingentaconnect.com/contentone/cryo/cryo/2009/00000030/00000001/art00007#>>. Acesso em: 10/06/2024.

PANCANINGTYAS, S. Callogenesis and Embryogenic Potential of New Superior Cocoa (*Theobroma cacao* L.) Genotypes Treated with Ascorbic Acid. **Pelita Perkebunan (a Coffee and Cocoa Research Journal)**, v. 37, n. 3, p. 184–196, 2021a. Disponível em: <<https://doi.org/10.22302/icri.jur.pelitaperkebunan.v37i3.472>>.

PANCANINGTYAS, S. The evaluation of java fine flavor cocoa propagation through somatic embryogenesis technique for germplasm preservation. **E3S Web of Conferences**, v. 306, p. 1–11, 2021b. Disponível em: <<https://doi.org/10.1051/e3sconf/202130601056>>.

PANIS, B.; LAMBARDI, M. Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees). **The role of biotechnology**, v. 5, n. 7, p. 43–54, 2005. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/237472165_Status_of_cryopreservation_technologies_in_plants_crops_and_forest_trees>. Acesso em: 15/04/2023.

PENCE, V. C. Cryopreservation of immature embryos of *Theobroma cacao*. **Plant Cell Reports**, v. 10, n. 3, p. 144–147, 1991. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/BF00232046>>.

PRUDENTE, D. de O.; PAIVA, R.; DOMICIANO, D.; SOUZA, L. B. de; CARPENTIER, S.; SWENNEN, R.; SILVA, L. C.; NERY, F. C.; MÁXIMO, W. P. F.; PANIS, B. The cryoprotectant PVS2 plays a crucial role in germinating *Passiflora ligularis* embryos after cryopreservation by influencing the mobilization of lipids and the antioxidant metabolism. **Journal of Plant Physiology**, v. 239, n. May, p. 71–82, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2019.05.014>>.

R. CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria., 2015. Disponível em: <<https://www.r-project.org>>. Acesso em: 15/01/2023.

RAMÍREZ, A. M. H.; VASQUEZ, T. L. H; OSORIO, T. M. O.; GARCÉS, L. A.; TRUJILLO, A. I. U. Evaluation of the potential of regeneration of different Colombian and commercial genotypes of cocoa (*Theobroma cacao* L.) via somatic embryogenesis. **Scientia Horticulturae**, v. 229, n. November 2017, p. 148–156, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2017.10.040>>.

RANTALA, S.; KASEVA, J.; NUKARI, A.; LAAMANEN, J.; TUOHIMETSÄ, S.; KARHU, S.; VETELÄINEN, M.; HÄGGMAN, H. *Droplet vitrification* technique for cryopreservation of a large diversity of blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) cultivars. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 144, n. 1, p. 79–90, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11240-020-01841-2>>.

REN, L.; WANG, M. R.; WANG, Q. C. ROS-induced oxidative stress in plant cryopreservation: occurrence and alleviation. **Planta**, v. 254, n. 6, p. 1–18, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00425-021-03784-0>>.

RIBEIRO, I. G.; CASTRO, T. C. De; GARCIA, M.; COELHO, P. Effects of different factors on friable callus induction and establishment of cell suspension culture of *Hovenia dulcis* (Rhamnaceae). **Rodriguésia**, v. 27, p. e00102020, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/2175-7860202172105>>.

RODRIGUEZ-MEDINA, C.; ARANA, A. C.; SOUNIGO, O.; ARGOUT, X.; ALVARADO, G. A.; YOCKTENG, R. Cacao breeding in Colombia, past, present and future. **Breeding Science**, v. 69, n. 3, p. 373–382, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1270/jsbbs.19011>>.

ROQUE-BORDA, C. A.; KULUS, D.; DE SOUZA, A. V.; KAVIANI, B.; VICENTE, E. F. Cryopreservation of agronomic plant germplasm using *vitrification*-based methods: An overview of selected case studies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 11, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/ijms22116157>>.

RÚA, A. M. G.; RAMÍREZ, A. M. H.; TRUJILLO, A. I. U.; GARCÉS, L. A.. Análisis de distribución de polifenoles y sustancias de reserva en embriogénesis somática de cacao. **Acta Biologica Colombiana**, v. 21, n. 2, p. 335–346, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.15446/abc.v21n2.50196>>.

SANTACRUZ, S.; MEDRANO, P. Uso de compuestos fenólicos de la cáscara de la mazorca de cacao (*Theobroma cacao* L.) como inhibidores de *Salmonella* spp. en queso fresco producido en Manabí, Ecuador. **Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín**, v. 74, n. 0304–2847, p. 2248–7026, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.15446/rfnam.v74n3.90287>>.

SANTOS, I. R. I.; SALOMÃO, A. N. Guia prático de Criopreservação: técnicas aplicadas à conservação de germoplasma vegetal. Brasília: **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, v.1, p. 1-36, 2023. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1157590/1/DOC-385-Guia-pratico-de-criopreserva.-final.pdf>>. Acesso em: 07/07/2023.

SANTOS, P. A. A.; PAIVA, R.; SILVA, L. C.; SOUZA, A. C.; SANTANA, M. C.; SILVA, D. P. C. Cryopreservation of the mangaba tree (*Hancornia speciosa* Gomes): A protocol for long-term storage. **Acta Scientiarum - Agronomy**, v. 37, n. 3, p. 289–296, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.4025/actasciagron.v37i3.19573>>.

SHERIF, N. A.; FRANKLIN BENJAMIN, J. H.; SENTHIL KUMAR, T.; RAO, M. V. Somatic embryogenesis, acclimatization and genetic homogeneity assessment of regenerated plantlets of *Anoectochilus elatus* Lindl., an endangered terrestrial jewel orchid. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 132, n. 2, p. 303–316, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11240-017-1330-4>>.

SILVA, J. A. T.; KIM, H.; ENGELMANN, F. Chrysanthemum low-temperature storage and cryopreservation: a review. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 120, n. 2, p. 423–440, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180736>>.

SILVA-CARDOSO, I. M. A.; MEIRA, F. S.; GOMES, A. C. M. M.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Anatomical and histochemical studies of the somatic embryogenesis of *Syagrus oleracea* from immature inflorescences. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 19, n. 4, p. 444–450, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/1984-70332019v19n4n62>>.

SILVA, J. A. T.; KIM, H.; ENGELMANN, F. Chrysanthemum low-temperature storage and cryopreservation: a review. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 120, n. 2, p. 423–440, 2015. Disponível em: <<<http://doi.org/10.1007/s11240-014-0641-y>>>.

SIMÃO, M. J.; COLLIN, M.; GARCIA, R. O.; MANSUR, E.; PACHECO, G.; ENGELMANN, F. Histological characterization of *Passiflora pohlii* Mast. root tips cryopreserved using the V-Cryo-plate technique. **Protoplasma**, v. 255, n. 3, p. 741–750, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00709-017-1182-0>>.

STRECZYNSKI, R.; CLARK, H.; WHELEHAN, L. M.; ANG, S. T.; HARDSTAFF, L. K.; FUNNEKOTTER, B.; BUNN, E.; OFFORD, C. A.; SOMMERVILLE, K. D.; MANCERA, R. L. Current issues in plant cryopreservation and importance for ex situ conservation of threatened Australian native species. **Australian Journal of Botany**, v. 67, n. 1, p. 1–15, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1071/BT18147>>.

SUGIMOTO, K.; JIAO, Y.; MEYEROWITZ, E. M. Arabidopsis Regeneration from Multiple Tissues Occurs via a Root Development Pathway. **Developmental Cell**, v. 18, n. 3, p. 463–471, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2010.02.004>>.

TANAKA, D.; NIINO, T.; FUJIKAWA, S.; UEMURA, M. Freeze-substitution transmission electron microscopy of gentian shoot tips cryopreserved at ultra low temperatures. **Plant Biotechnology**, v. 35, n. 4, p. 335–340, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5511/plantbiotechnology.18.0718a>>

TAVARES, I. R. G.; RAMOS JUNIOR, O. J. F.; SOUZA, M. V. G. de; OLIVEIRA, G. V. de; ALVARES, T. da S. Development of a microencapsulated cocoa (*Theobroma cacao*) - based product and evaluation of total phenolic compounds and antioxidant capacity. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 9, p. e2011931140, 2022. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i9.31140>>.

TRAORE, A.; MAXIMOVA, S. N.; GUILTINAN, M. J. Micropropagation of *Theobroma cacao* L. using somatic embryo-derived plants. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 39, n. 3, p. 332–337, 2003. Disponível em: <<http://doi.org/10.1079/IVP2002409>>.

UMA, S.; KARTHIC, R.; KALPANA, S.; BACKIYARANI, S.; KUMARAVEL, M.; SARANYA, S.; SARASWATHI, M. S.; DURAI, P. An efficient embryogenic cell suspension culture system through secondary somatic embryogenesis and regeneration of true-to-type plants in banana cv. Sabri (silk subgroup AAB). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 155, n. 1, p. 313–322, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11240-023-02570-y>>.

UTSUMI, Y.; UTSUMI, C.; TANAKA, M.; HA, V. T.; MATSUI, A.; TAKAHASHI, S.; SEKI, M. Formation of friable embryogenic callus in cassava is enhanced under conditions of reduced nitrate, potassium and phosphate. **PLoS ONE**, v. 12, n. 8, p. 1–21, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180736>>.

VAN DER WALT, K.; BURRITT, D. J.; NADARAJAN, J. Impacts of Rapid Desiccation on Oxidative Status, Ultrastructure and Physiological Functions of *Syzygium maire* (Myrtaceae) Zygotic Embryos in Preparation for Cryopreservation. **Plants**, v. 11, n. 8, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/plants11081056>>.

VIJENDRA, P. D. Antioxidant Status during In vitro Plant Regeneration in *Lucas aspera* Spreng. **International Journal of Pure & Applied Bioscience**, v. 5, n. 5, p. 1529–1537, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.18782/2320-7051.5133>>.

VILLALOBOS-OLIVERA, A.; ENTENSA, Y.; MARTÍNEZ, J.; ESCALANTE, D.; QUINTANA, N.; SOUZA, F. V.D.; MARTÍNEZ-MONTERO, M. E.; HAJARI, E.; LORENZO, J. C. Storage of pineapple shoot tips in liquid nitrogen for three years does not modify field performance and fruit quality of recovered plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 44, n. 6, p. 1–11, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-389806/v1>>.

VOLLMER, R.; ESPIRILLA, J.; VILLAGARAY, R.; CÁRDENAS, J.; CASTRO, M.; SÁNCHEZ, J. C.; MANRIQUE-CARPINTERO, N.; ELLIS, D.; ANGLIN, N. L. Cryopreservation of Potato Shoot Tips for Long-Term Storage. *In*: DOBNIK, D.; GRUDEN, K.; RAMSAK, Z.; COLL, A. (eds.). ***Solanum tuberosum: Methods and Protocols***. New York: Humana Press Inc., 2021. p. 21–54. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1609-3_2>.

VOLK, G. M.; WALTERS, C. *Plant vitrification solution 2* lowers water content and alters freezing behavior in shoot tips during cryoprotection. ***Cryobiology***, v. 52, n. 1, p. 48–61, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2005.09.004>>.

WANG, M. R.; BI, W.; SHUKLA, M. R.; REN, L.; HAMBORG, Z.; BLYSTAD, D. R.; SAXENA, P. K.; WANG, Q. C. Epigenetic and genetic integrity, metabolic stability, and field performance of cryopreserved plants. ***Plants***, v. 10, n. 9, p. 1–19, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/plants10091889>>.

ZHANG, D.; REN, L.; CHEN, G. qun; ZHANG, J.; REED, B. M.; SHEN, X. hui. ROS-induced oxidative stress and apoptosis-like event directly affect the cell viability of cryopreserved embryogenic callus in *Agapanthus praecox*. ***Plant Cell Reports***, v. 34, n. 9, p. 1499–1513, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00299-015-1802-0>>.

ZAMECNIK, J.; FALTUS, M.; BILAVCIK, A. *Vitrification Solutions for Plant Cryopreservation: Modification and Properties*. *In*: BENELLI, C. (ed.). ***Plant Cryopreservation***. Switzerland: Plants, 2021. p. 123-140. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/plants10122623>>.

YU, X.; LIU, Y.; LIU, X.; TRETYAKOVA, I. N.; NOSOV, A. M.; SHEN, H.; YANG, L. Cryopreservation of *Fraxinus mandshurica* Rupr. by Using the *Slow Cooling* Method. ***Forests***, v. 13, n. 5, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/f13050773>>.

CAPÍTULO II
CARACTERIZAÇÃO DA MORFOMETRIA FLORAL E RESPOSTAS À
INDUÇÃO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E REGENERAÇÃO DE
PLANTAS DE MÚLTIPLOS ACESSOS DE CACAUEIRO (*Theobroma cacao* L.)

CARACTERIZAÇÃO DA MORFOMETRIA FLORAL E RESPOSTAS À INDUÇÃO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E À REGENERAÇÃO DE PLANTAS DE MÚLTIPLOS ACESSOS DE CACAUEIRO (*Theobroma cacao* L.)

RESUMO

A embriogênese somática de *Theobroma cacao* L. é uma técnica de grande importância para a propagação vegetativa *in vitro*, permitindo a produção de plantas com características superiores. No entanto, a diversidade genética dos acessos de cacaueteiro, especialmente no Brasil, apresenta desafios, já que muitos ainda não têm protocolos definidos para embriogênese somática. Além disso, a dependência do genótipo pode afetar significativamente os resultados. Este estudo objetivou avaliar as respostas à indução da embriogênese somática em múltiplos acessos de cacaueteiro, buscando identificar marcadores morfológicos que ajudem a distinguir entre acessos responsivos e recalcitrantes. Botões florais de 24 genótipos de cacaueteiro foram coletados para avaliações morfométricas, que incluíram análise de coloração dos botões florais e estaminódios, diâmetro polar e equatorial, tamanho do pedúnculo, comprimento dos estaminódios e comprimento basal dos estaminódios. Os estaminódios foram inoculados em meio de indução de calos por 21 dias, seguidos por 14 dias em meio de multiplicação de calos, antes de serem transferidos para o meio de desenvolvimento de embriões somáticos por 28 dias. Ao final de cada fase, a responsividade dos genótipos à embriogênese somática foi avaliada, considerando formação de calos, tipos de calos, taxa de formação e número de embriões. Os resultados mostraram três colorações distintas nos botões florais: arroxeadas (menos comum), esverdeadas e avermelhadas. Apenas três genótipos apresentaram coloração arroxeadas, enquanto nove foram esverdeados e 12 avermelhados. Nos estaminódios, 13 genótipos eram arroxeados e 11 avermelhados. As análises estatísticas mostraram correlações significativas entre o diâmetro polar e equatorial dos botões florais, assim como entre comprimento e comprimento basal dos estaminódios. A média dos estaminódios variou entre os genótipos, com grupos apresentando estaminódios com comprimento médio de cinco mm. Os grupos de genótipos foram classificados com base nas características morfológicas dos botões florais, revelando diâmetros equatoriais e polares distintos. Na indução da embriogênese somática, após 35 dias, os grupos de genótipos mostraram diferentes taxas de recobrimento, com a maioria apresentando diferentes tipos de calos, como granulares e

nodulares. Embora sinais de oxidação tenham sido observados, não impediram a formação de embriões somáticos, que ocorreram principalmente na base dos estaminódios. Após 30 dias em meio de desenvolvimento de embriões, uma alta taxa de formação de embriões somáticos foi observada, com os genótipos apresentando uma grande variedade de estágios de desenvolvimento. O genótipo 4025 M153 destacou-se com a formação de 330 embriões somáticos, mas anormalidades, como fusões, foram observadas em alguns genótipos. Em contrapartida, outros genótipos formaram calos que resultaram apenas em raízes. Após 90 dias em meio de regeneração de plantas, a maioria dos embriões somáticos apresentou coloração esverdeada, mas com alguns sinais de má formação. Aqueles com embriões normais progrediram para plantas completas, mostrando crescimento e desenvolvimento de raízes, enquanto outros apresentaram problemas de desenvolvimento. Conclui-se que a pesquisa evidencia que, apesar da alta responsividade de alguns genótipos na formação de embriões somáticos, mais estudos são necessários para otimizar os protocolos de embriogênese somática e identificar marcadores morfológicos que possam facilitar a regeneração de plantas completas.

Palavras-chave: Embriões somáticos, marcadores morfométricos, anormalidades.

**CHARACTERIZATION OF FLORAL MORPHOMETRY AND RESPONSES
TO SOMATIC EMBRYOGENESIS INDUCTION AND PLANT
REGENERATION IN MULTIPLE ACCESSIONS OF CACAO (*Theobroma cacao*
L.)**

ABSTRACT

Somatic embryogenesis of *Theobroma cacao* L. is a technique of great importance for *in vitro* vegetative propagation, enabling the production of plants with superior characteristics. However, the genetic diversity of cacao accessions, particularly in Brazil, presents challenges, as many still lack defined protocols for somatic embryogenesis. Furthermore, genotype dependency can significantly affect results. This study aimed to evaluate the responses to the induction of somatic embryogenesis in multiple cacao accessions, seeking to identify morphological markers that help distinguish between responsive and recalcitrant accessions. Floral buds from 24 cacao genotypes were collected for morphometric evaluations, which included analysis of floral bud and staminode coloration, polar and equatorial diameter, peduncle length, staminode length, and basal length of the staminodes. The staminodes were inoculated in callus induction medium for 21 days, followed by 14 days in callus multiplication medium, before being transferred to a somatic embryo development medium for 28 days. At the end of each phase, the responsiveness of the genotypes to somatic embryogenesis was evaluated, considering callus formation, types of callus, formation rate, and number of embryos. The results showed three distinct colors in the floral buds: purplish (less common), greenish, and reddish. Only three genotypes exhibited purplish coloration, while nine were greenish and 12 reddish. Among the staminodes, 13 genotypes were purplish and 11 reddish. Statistical analyses showed significant correlations between the polar and equatorial diameter of the floral buds and between the length and basal length of the staminodes. The average length of the staminodes varied among the genotypes, with groups presenting staminodes with an average length of five mm. The groups of genotypes were classified based on the morphological characteristics of the floral buds, revealing distinct equatorial and polar diameters. In the induction of somatic embryogenesis, after 35 days, the groups of genotypes showed different coverage rates, with most exhibiting different types of callus, such as granular and nodular. Although signs of oxidation were observed, they did not prevent the formation of somatic embryos, which primarily occurred at the base of the staminodes. After 30 days in embryo development medium, a high rate of somatic

embryo formation was observed, with genotypes displaying a wide variety of developmental stages. The genotype 4025 M153 stood out with the formation of 330 somatic embryos, although abnormalities such as fusions were noted in some genotypes. Conversely, other genotypes formed calluses that resulted only in roots. After 90 days in the plant regeneration medium, most somatic embryos exhibited a green coloration, although some showed signs of malformation. Those with normal embryos progressed to complete plants, demonstrating growth and root development, while others exhibited developmental problems. In conclusion, the research highlights that, despite the high responsiveness of some genotypes in somatic embryo formation, further studies are needed to optimize somatic embryogenesis protocols and identify morphological markers that may facilitate the regeneration of complete plants.

Keywords: Somatic embryos, morphometric markers, abnormalities.

1 INTRODUÇÃO

A embriogênese somática é um processo que se assemelha à embriogênese zigótica, porém ocorre a partir de células somáticas, sem a necessidade da fusão de gametas (Carneiro et al., 2014). A técnica tem sido reconhecida como uma abordagem ideal para propagação clonal, melhoramento genético, especialmente de espécies lenhosas que apresentam um ciclo de vida muito longo (Guan et al., 2016). Essa rota de regeneração *in vitro* é considerada um sistema de propagação técnica e economicamente viável para muitas espécies permitindo altas taxas de multiplicação e a obtenção de embriões capazes de se converter em plantas saudáveis (Traore; Guiltinan, 2006). Ademais, pode fornecer materiais embriogênicos passíveis de serem conservados via criopreservação (Nagel et al., 2024), o que é bastante significativo, principalmente, para espécies como a *Theobroma cacao* L. -(cacaueiro), cujas sementes são recalcitrantes e não podem ser armazenadas por metodologias tradicionais, como os bancos de sementes (Salles et al., 2019; Ohse, 2022).

A embriogênese somática pode ocorrer de duas maneiras: de forma direta, quando os embriões somáticos se originam diretamente dos tecidos, sem a proliferação prévia de calos, ou de forma indireta, que envolve a formação de calos e o subsequente desenvolvimento dos embriões a partir deles. Em ambos os casos, o meio de cultura é um fator determinante, em que a presença de auxinas, em concentrações variadas, funciona como o indutor da formação dos embriões somáticos (Nunes; Filho; Rocha, 2002).

Estudos buscando desenvolver protocolos práticos e eficientes a partir da embriogênese somática em cacaueiro foram inicialmente realizados por Esan (1975) e Pence; Hasegawa; Janick (1979), no entanto, tais trabalhos não reportaram a obtenção de plantas, mesmo com a obtenção de embriões somáticos com desenvolvimento normal até a fase cotiledonar. A formação de plantas completas a partir de tecidos florais foi alcançada com sucesso por Lopez-Baez et al. (1993), Alemanno, Berthouly e Michaux-Ferrière (1996) e Li et al., (1998), e baseado nesses trabalhos, outros autores, como Maximova et al. (2002), Maximova et al. (2005), Traore e Guiltinan (2006), Minyaka et al. (2008) e Niemenak et al. (2008) continuaram a pesquisa visando à otimização da embriogênese somática nessa espécie. No entanto, um aspecto relevante a ser estudado no cacaueiro, é a alta variabilidade nas respostas a essa rota, que pode variar significativamente em função do genótipo de interesse.

Dada a diversidade genotípica de cacauzeiros disponibilizados pela Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira - CEPLAC, que inclui clones com tolerância a pragas e doenças e, cultivares ou cruzamentos com características agronomicamente superiores (Mustiga et al., 2018), é necessário distinguir esses acessos em termos de potencial de regeneração via embriogênese somática. Isso permitirá a propagação clonal desses genótipos, além da geração de propágulos, como estaminódios com calos embriogênicos, calos embriogênicos e embriões somáticos, que podem ser direcionados para programas de conservação por criopreservação. Tais genótipos, na maioria das vezes, são descritos somente por suas características fenotípicas de frutos e sementes, o que acaba permitindo uma razoável distinção entre os acessos (Hunter, 1990).

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar respostas à indução da embriogênese somática e à regeneração de plantas de múltiplos acessos de cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.), com intuito de identificar marcadores morfológicos que indiquem o potencial embriogênico e permitam a distinção entre acessos recalcitrantes e responsivos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Foram coletados botões florais de 24 genótipos não comerciais (Tabela 1) de *Theobroma cacao* L. (cacauzeiro), provenientes da casa de vegetação- quarentenário, no período diurno, cultivados em casa de vegetação com controle de temperatura e umidade, da Embrapa de Recursos Genéticos e Biotecnologia, situada em Brasília- DF (Fig. 1). Em seguida, os botões florais foram conduzidos ao Laboratório de Cultura de Tecidos II, localizado na Embrapa, para a realização de medições de características morfológicas dos botões florais e estaminódios e indução da embriogênese somática.



Figura 1. Genótipos não- comerciais de *Theobroma cacao* L. (cacaueiro) cultivados em casa de vegetação com controle de temperatura e umidade.

Tabela 1. Genótipos não comerciais de *Theobroma cacao* L. (cacaueiro) para a avaliação de características fenotípicas das flores e estaminódios e do potencial de formação de embriões somáticos.

Genótipos de cacaueiro					
05 M536	37 M257	95 M400	4020 M152	4035 M065	4055 M062
10 M489	39 M481	4004 M051	4021 M035	4038 M059	4083 M199
23 M537	61 M525	4008 M155	4025 M153	4039 M061	4111 M475
29 M576	68 M210	4019 M181	4029 M031	4040 M130	4120 M543

2.2 Medições de características morfológicas de explantes florais de diferentes genótipos de cacaueiro

Foram avaliadas diferentes características morfológicas de botões florais e estaminódios dos genótipos mencionados na Tabela 1, sendo elas: coloração do botão floral e estaminódios, diâmetro polar e equatorial, tamanho do pedúnculo, comprimento do estaminódio e largura basal dos estaminódios (Figs. 2A- C). Três botões florais de

cada genótipo foram analisados. Para a realização das medições dos estaminódios e botões florais, utilizou-se o estereomicroscópio Leica EZ4 e programa Leica Application Suite EZ.

Nas análises estatísticas, foram aplicados diferentes testes conforme cada variável. Os dados obtidos das variáveis morfométricas foram submetidos à análise de variância (ANOVA), coeficiente de correlação de Pearson, testes de médias de Tukey e Scott-Knott (com 95% de confiança) e tabelas descritivas, por meio do software estatístico R (R Core Team, 2023) e Excel® Microsoft 2019.

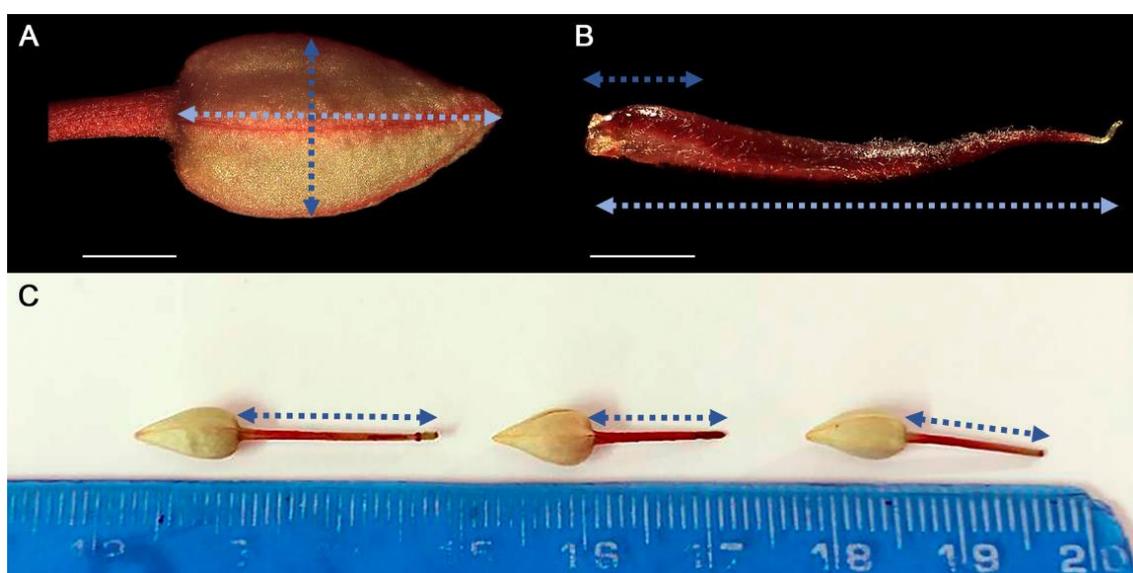


Figura 2. Ilustração das avaliações morfométricas de botões florais e estaminódios de cacauero. A. Medição equatorial (seta pontilhada azul claro) e medição polar (seta pontilhada azul escuro) de botão floral avermelhado. B. Comprimento de estaminódio arroxeadado (seta pontilhada azul claro) e comprimento basal (seta pontilhada azul escuro). C. Comprimento dos pedúnculos de botões florais (setas pontilhadas indicando estrutura). Escalas: A, B = 2 mm; C, D = 1,0 mm.

2.3 Embriogênese somática a partir de diferentes genótipos de cacauero

Os botões florais oriundos dos 24 genótipos anteriormente mencionados foram desinfestados, dentro da câmara de fluxo laminar, mediante imersão em álcool 70% (v/v) durante três minutos, seguida em hipoclorito de sódio (NaClO) 0,5% por 10 minutos e três lavagens de cinco minutos cada, com água destilada autoclavada, com intuito de retirar o excesso de NaClO.

Após essas etapas os estaminódios foram extraídos e inoculados em meio de indução de calos (MIC), sendo cultivados por 21 dias nesse meio, com subcultivo realizado no 14º dia. Todos os meios utilizados seguiram o protocolo de Li et al. (1998) (Tabela 2) com alterações somente nos tempos de cultivo em cada fase do processo. Após 21 dias, os explantes foram transferidos para o meio de multiplicação de calos (MMC), onde permaneceram por mais 14 dias. Em seguida, foram transferidos para os meios de desenvolvimento de embriões somáticos (MDE), onde foram mantidos por 30 dias, com subcultivos a cada 14 dias. Em todas essas fases, utilizaram-se placas de Petri (15 x 90 mm), com cerca de 25 ml de meio cada, as quais foram seladas com policloreto de polivinila (PVC) transparente e armazenadas em sala de crescimento escura, a $25^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Ao final do período de cultivo em MDE, os explantes contendo *clusters* de embriões somáticos em diferentes estádios de desenvolvimento) foram transferidos para o meio de regeneração de plantas (MRP) constituído de 1/5 dos sais do meio de DKW (Driver; Kuniyuki, 1984), acrescido de $100,0\text{ mg L}^{-1}$ de mio-inositol, $2,0\text{ mg L}^{-1}$ de tiamina-HCL, $1,0\text{ mg L}^{-1}$ de ácido nicotínico, $2,0\text{ mg L}^{-1}$ de glicina, $5,0\text{ g L}^{-1}$ de sacarose, $10,0\text{ g L}^{-1}$ de glicose, $0,2\text{ g L}^{-1}$ de nitrato de potássio (KNO_3) e $1,7\text{ g L}^{-1}$ de Phytigel, onde permaneceram por 30 dias em placas de Petri.

Após esse período, os embriões somáticos foram transferidos para tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo 10 mL de meio MRP e mantidos em sala de crescimento a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16 h de luz, com intensidade de $100\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ permanecendo até a formação de plantas (parte aérea e raízes bem definidas), com subcultivos a cada 30 dias.

Tabela 2. Composição dos meios de cultivo conforme protocolo de Li et al. (1998) para a embriogênese somática de diferentes genótipos não- comerciais de *Theobroma cacao* L. Meio de indução de calos (MIC), de multiplicação de calos (MMC), de desenvolvimento de embriões somáticos (MDE) e de regeneração de plantas (MRP).

Componente	MIC	MMC	MDE	MRP
Macronutrientes (mg L⁻¹)				
K ₂ SO ₄	1559	990	1559	311,8
NH ₄ NO ₃	1416	400	1416	283,2
Ca(NO ₃) ₂	1367	386	1367	273,4
MgSO ₄	361,49	180,7	361,49	72,3
KH ₂ PO ₄	265	170	265	53
CaCl ₂	112,5	72,5	112,5	22,5
Na ₂ EDTA	45,4	37,3	45,4	9,08
FeSO ₄ . 7H ₂ O	33,8	27,8	33,8	6,76
KNO ₃	-	-	-	200
Micronutrientes				
MnSO ₄ .H ₂ O	33,5	22,3	33,5	6,7
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
Zn(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	17	-	17	3,4
ZnSO ₄ .7H ₂ O	-	8,6	-	-
Vitaminas				
Mio-inositol	200	100	100	100
Tiamina HCl	2	10	2	2
Ácido nicotínico	1	1	1	1
Piridoxina HCl	-	1	-	-
Aminoácidos (mg L⁻¹)				
Glicina	2	-	2	2
Glutamina	250	-	-	-
Reguladores de crescimento (mg L⁻¹)				
2,4 diclorofenoxiacético (2,4 -D)	1,99	1,99	-	-
Tidiazuron (TDZ)	0,005	-	-	-
Cinetina	-	0,3	-	-
Gelificante (g L⁻¹)				
Phytigel®	2	2,2	2	1,7
Outros (g L⁻¹)				
Glicose	20	20	1	10
Sacarose	-	-	30	5

As avaliações foram realizadas em diferentes etapas: Após 21 dias em meio MIC, foram analisados a taxa de formação de calos por explante, o percentual de recobrimento do explante com massas calogênicas, a região de formação de calos e o tipo de calo formado. Após 14 dias em meio de multiplicação de calos (MMC), analisaram-se as taxas de formação de calos por explante e de oxidação tanto dos estaminódios quanto dos calos. Aos 28 dias em meio de desenvolvimento de embriões somáticos (MDE), foram avaliados percentual de formação de embriões somáticos e o número de embriões somáticos por calo embriogênico, nesse trabalho considerou-se somente calos com formação de 11 ou mais embriões somáticos.

Para este experimento, o delineamento foi o inteiramente casualizado, com cada tratamento (genótipo) composto por 20 repetições e cada repetição representada por um explante (um estaminódio). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, à 5% de significância, por meio do software estatístico R (R Core Team, 2023).

Além disso foram realizados agrupamentos por meio do K-mean clustering (programa Phyton), testes de hipóteses com correção Holm e agrupamentos descritivos com auxílio do Excel® Microsoft 2019.

2.4 Regeneração de plantas de cacauero

Aos 30 dias em meio de regeneração de plantas (MRP) os embriões somáticos foram avaliados conforme a quantidade de embrião somático em cada estágio de desenvolvimento, assim como a ocorrência de aparentemente anormalidades e assincronias para cada genótipo. A avaliação ocorreu de forma descritiva por meio do estereomicroscópio Leica EZ4 e programa Leica Application Suite EZ. Os dados obtidos foram analisados por meio de análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, com um nível de significância de 5%, utilizando o software estatístico R (R Core Team, 2023).

Já no período de 90 dias no meio MRP, todos os embriões somáticos foram avaliados quanto à coloração (esverdeada ou ausência de cor), aparência (normais ou hiperídricos), formação de raízes, expansão dos cotilédones, surgimento das primeiras folhas e murchamento dos cotilédones. Após essa avaliação, os embriões foram transferidos para recipientes Magenta (43,3 x 43 cm), contendo 10 mL de meio MRP, e mantidos em uma sala de crescimento a $25\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$, com um fotoperíodo de 16 horas

de luz e intensidade luminosa de $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, permanecendo o crescimento das plantas.

As avaliações foram realizadas de forma descritiva e as fotografias registradas usando um estereomicroscópio Leica EZ4 e uma câmera de smartphone Xiaomi Redmi 10. Os dados obtidos foram analisados por meio de análise de variância (ANOVA), e as médias foram comparadas utilizando o teste de Tukey com um nível de significância de 5%, empregando o software estatístico R (R Core Team, 2023).

2.5 Análises anatômicas

No mesmo período das avaliações anteriores, foram coletadas amostras dos diferentes estádios dos embriões somáticos: globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar para realização da análise anatômica.

As amostras foram submetidas às etapas de fixação, desidratação, pré-infiltração, infiltração e polimerização, conforme descrito por Silva-Cardoso et al. (2020). Para a fixação, amostras de cada um dos estádios mencionados, foram coletadas e colocadas em microtubos com solução de Karnovsky modificada (Karnovsky, 1965), que consiste de 4% de paraformaldeído, 2,5% de glutaraldeído e tampão cacodilato de sódio 0,05 M (pH 7,2). As amostras foram mantidas sob vácuo por uma hora e, em seguida, refrigeradas por 23 horas. Posteriormente, as amostras foram imersas três vezes em solução de cacodilato de sódio (0,05 M, pH 7,2) por uma hora cada, sob vácuo. Após a última lavagem, o material foi mantido na solução por 24 horas. Para a desidratação, as amostras foram submetidas a um gradiente crescente de etanol (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 100%), com imersões de uma hora cada, sob vácuo.

A etapa de pré-infiltração foi dividida em duas fases: inicialmente, as amostras foram imersas em uma mistura de etanol 100% e resina (1:1) por 24 horas em ambiente refrigerado, sendo a primeira hora sob vácuo. Em seguida, as amostras passaram por duas imersões em resina pura, durando 6 horas e 24 horas, respectivamente, ambas com uma hora sob vácuo. As etapas de infiltração e polimerização em historesina (Leica, Heidelberg, Alemanha) foram realizadas conforme as especificações do fabricante.

Secções longitudinais e transversais (3-7 μm) foram obtidas utilizando um micrótomo rotativo manual (Leica®, RM212RT). Em seguida, essas secções foram distendidas e fixadas em lâminas microscópicas aquecidas a 40°C . Posteriormente, as secções foram coradas com Azul de Toluidina (0,5%) para caracterização estrutural,

conforme descrito por O'Brien, Feder e McCully (1964). A obtenção e análise das imagens foram realizadas com um microscópio Leica DM 750 e o software Leica Application Suite EZ.

3 RESULTADOS

3.1 Caracterização fenotípica de explantes florais dos diferentes genótipos

Os botões florais dos genótipos avaliados apresentaram três diferentes colorações: avermelhada, esverdeada e arroxeadada (Fig. 3A-C) e os respectivos genótipos foram descritos na Tabela 3. Dessas, a arroxeadada foi a menos comum, sendo típica apenas de três genótipos, sendo um deles o 23 M537 (Fig. 3A). Já botões com coloração esverdeada foram descritos em 9 genótipos, como 95 M400 (Fig. 3B). E os últimos 12 genótipos, possuíam coloração avermelhada como o genótipo 4111 M475 (Fig. 3C).

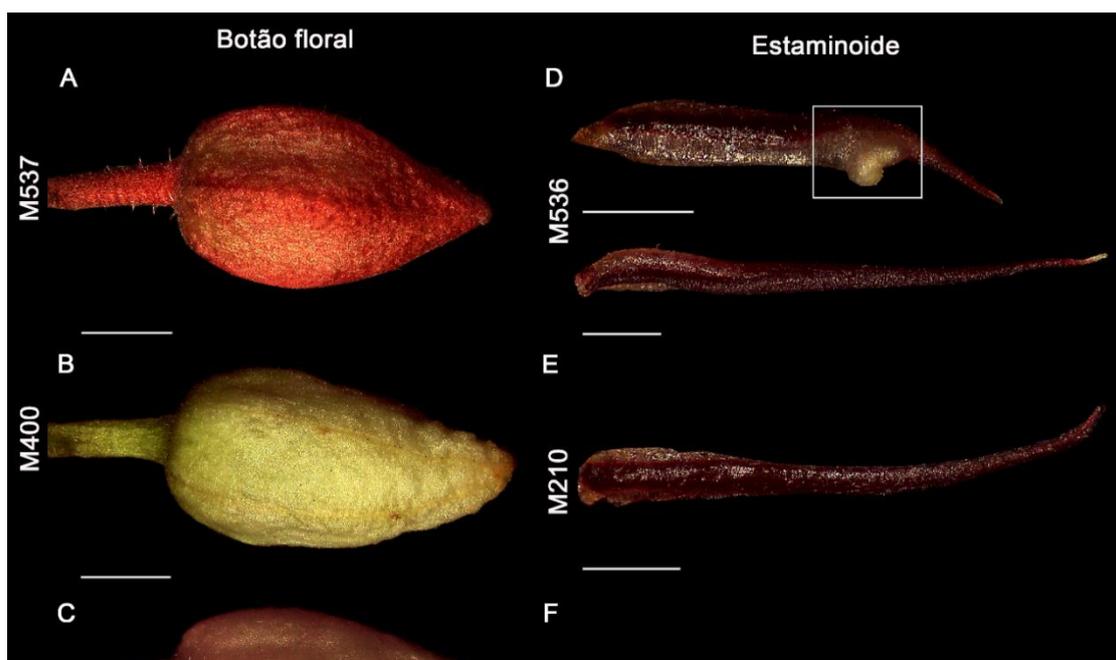


Figura 3. Caracterização morfológica de botões florais e estaminódios de *Theobroma cacao* L. (cacaueiro). **A.** Botão floral com coloração arroxeadada do genótipo 23 M537. **B.** Botão floral com coloração esverdeada do genótipo 95 M400. **C.** Botão floral com coloração avermelhada do genótipo 4111 M475. **D.** Estaminódios de diferentes tamanhos do genótipo 05 M536, oriundos do mesmo botão floral, com coloração arroxeadada; retângulo indica estrutura incomum. **E.** Estaminódio com coloração arroxeadada do genótipo 68 M210. **F.** Estaminódio com coloração arroxeadada do genótipo 4025 M153. Escalas: A, B, C= 2 mm; D, E, F= 1,0 mm.

Quanto à coloração dos estaminódios, 13 genótipos estudados apresentavam-se arroxeados, como os genótipos 05 M536 (Fig. 3D) e 68 M210 (Fig. 3E). Salienta-se que o genótipo 05 M536 apresentou estaminódios, dentro de um mesmo botão floral, com diferentes tamanhos. Já os demais 11 genótipos, possuíam estaminódios com coloração avermelhada, como o genótipo 95 M400 (Fig. 3F).

Tabela 3. Classificação dos genótipos de *Theobroma cacao* L. (cacaueiro) quanto à coloração de botões florais e estaminódios.

Botões florais			Estaminódios	
Avermelhada	Esverdeada	Arroxeadas	Arroxeados	Avermelhados
05 M536	10 M489	05 M536	05 M536	29 M576
23 M537	68 M210	29 M576	10 M489	37 M257
39 M481	95 M400	37 M257	23 M537	61 M525
	4008 M155	61 M525	39 M481	95 M400
	4021 M035	4004 M051	68 M210	4004 M051
	4025 M153	4019 M181	4019 M181	4008 M155
	4035 M065	4020 M152	4020 M152	4021 M035
	4055 M062	4029 M031	4035 M065	4025 M153
	4083 M199	4038 M059	4038 M059	4029 M031
		4039 M061	4039 M061	4040 M130
		4040 M130	4083 M199	4055 M062
		4111 M475	4011 M475	
		4120 M543	4120 M543	

3.2 Análises estatísticas

3.2.1 Correlação entre as variáveis morfológicas

Na análise de correlação das variáveis relacionadas ao botão floral, verificou-se que o diâmetro polar do botão floral apresentou, na maioria das vezes, uma correlação fraca e positiva com as demais variáveis, exceto para o diâmetro equatorial do botão, que exibiu uma correlação forte e positiva de 0,73% com essa variável (Fig. 4). A comparação do diâmetro equatorial do botão floral com as variáveis avaliadas revelou correlações fracas e positivas: 0,37% com o comprimento dos estaminódios, 0,17% com o comprimento basal dos estaminódios e 0,43% com o tamanho do pedúnculo.

Já nas análises dos estaminódios, observou-se uma correlação forte e positiva de 0,73% entre o comprimento dos estaminódios e o comprimento basal dos estaminódios, como esperado. Em relação ao tamanho do pedúnculo, a correlação foi positiva, mas

fraca, com 0,54%, superando a correlação fraca e positiva de 0,36% entre o comprimento basal dos estaminódios e o tamanho do pedúnculo (Fig. 4).

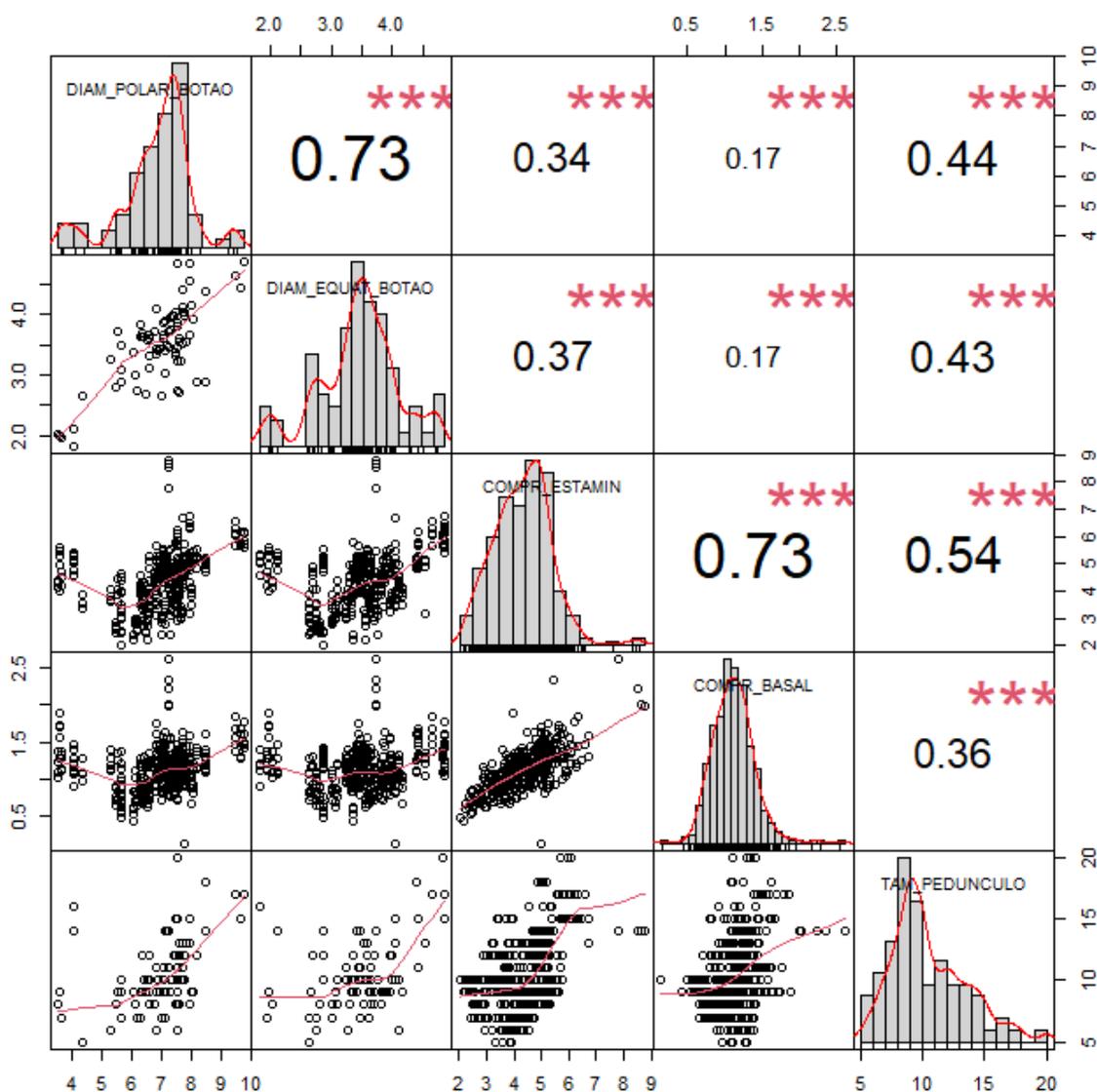


Figura 4. Histogramas, diagramas de dispersão e coeficientes de correlação entre as variáveis morfométricas ($n = 5$) de estruturas florais de *Theobroma cacao* L. (cacaueiro).

3.2.2 Análises relacionadas aos estaminódios

Para as análises de comparação da variável comprimento dos estaminódios em relação aos seus respectivos genótipos (Fig. 5), utilizou-se o método de Scott-Knott, sendo estatisticamente significativo no intervalo de 95% de confiança.

Como resultado, verificou-se a distribuição dos acessos em grupos devido à semelhança entre suas médias, sendo eles: grupo “a” formado por três genótipos (68

M210, 4040 M130 e 4019 M181), “b” por sete genótipos (4004 M051, 05 M536, 10 M489, 95 M400, 4039 M061, 4083 M199 e 4120 M543), “c” composto por cinco acessos (4029 M031, 29 M576, 4111 M475, 39 M481 e 23 M537), grupo “d” incluindo seis genótipos (4008 M155, 61 M525, 4020 M152, 4021 M035, 4035 M065 e 4055 M062), o grupo “e” foi representado por apenas um acesso (4038 M059) e o F por dois genótipos (37 M257 e 4025 M153).

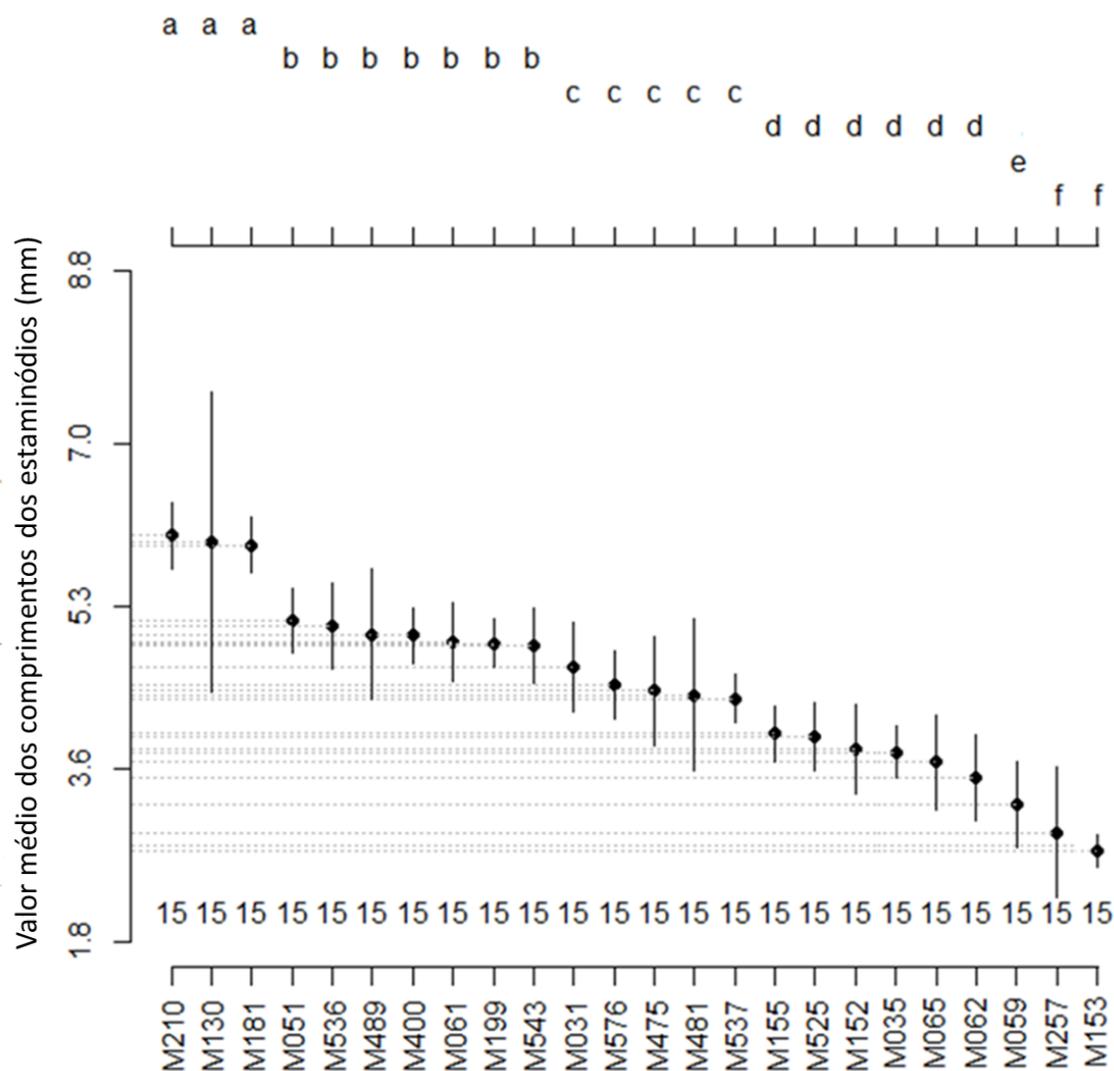


Figura 5. Agrupamento dos genótipos de *Theobroma cacao* (L.) baseado no valor médio do comprimento dos estaminódios usando o Scott-Knott, $\alpha=5\%$.

Conforme a análise do comprimento dos estaminódios por meio do *effect size* comparando-se a diferença entre os grupos, é perceptível que alguns grupos se destacaram apresentando maiores diferenças de comprimento dos estaminódios (Tabela 4), como o

grupo a-f (~3,15) e a-e (~2,75). Dois aspectos importantes a serem considerados são a presença do grupo “a” em ambos os grupos citados e o impacto desses comprimentos na formação de massas calogênicas e embriões somáticos (a ser tratado em tópico posterior).

No entanto, ao se trabalhar com grupos mais homogêneos, é mais prudente incluir grupos com menores variações, como os grupos a-b (~0,98), b-c (~0,54) e c-d (~0,68), que apresentam resultados superiores no comprimento dos estaminódios e uma maior variedade de genótipos.

Tabela 4. Avaliação da diferença dos comprimentos médios dos estaminódios de *Theobroma cacao* L. (cacaueiro) entre os grupos, usando o *effect size*, à 5% de significância via teste de Scott-Knott.

Grupos comparados	Diferença média
e - f	0,40
d - f	0,95
c - f	1,62
b - f	2,16
a - f	3,15
d - e	0,54
c - e	1,22
b - e	1,76
a - e	2,75
c - d	0,68
b - d	1,22
a - d	2,20
b - c	0,54
a - c	1,52
a - b	0,98

A análise da mesma variável em comparação à coloração dos estaminódios via teste t revelou uma diferença estatística significativa. O teste t mostrou que os estaminódios vermelhos apresentavam uma média de -0,52 mm de diferença em relação aos estaminoides roxos (Tabela 5).

Tabela 5. Comparação média de comprimento entre estaminódios vermelhos e roxos de *Theobroma cacao* L. (cacaueiro), a 5% de significância, pelo teste t.

Tratamentos comparados	Diferença média	Limite inferior (estaminódios vermelhos)	Limite superior (estaminódios roxos)
vermelho - roxo	-0,5227	-0,7297	-0,3157

3.2.3 Análises descritivas para as demais variáveis

Para as demais variáveis não houve interação entre os genótipos, e os dados foram agrupados de forma descritiva, conforme apresentado na Figura 6. Ao comparar os diâmetros equatorial e polar de acordo com os genótipos, verificou-se um diâmetro menor para o tipo equatorial (4 a 6 mm) e polar (2 a 4 mm). Os acessos 05 M536, 23 M537, 37 M257, 61 M525 e 95 M400 estão no mesmo grupo. Os acessos 10 M489, 68 M210 e 4111 M475 estão no grupo dois, com diâmetros maiores, onde o equatorial representava de 6 a 8 mm e o polar de 4 a 6 mm.

Ao analisar o comprimento basal dos estaminódios e o tamanho do pedúnculo (Fig. 6), verificou-se uma grande variação em relação aos estaminódios. O grupo “1” apresentou valores que variavam de 0,70 a 1,20 mm (estaminódio parte basal) e 6 a 10 cm (tamanho do pedúnculo) e englobava os seguintes genótipos: 39 M481, 4004 M051, 4020 M152, 4021 M035, 4025 M153 e 4038 M059. Para comprimentos maiores (grupo 2), com a parte basal dos estaminódios variando de 1,21 a 1,70 mm e tamanho do pedúnculo até 16,67 cm, os genótipos 05 M536, 68 M210, 4019 M181, 4039 M061, 4040 M130 e 4120 M543 se destacaram.

Grupos	Genótipos	Diâmetros equatorial (mm)	Grupos	Genótipos	Diâmetros polar (mm)
1	05 M536, 23 M537, 37 M257, 61 M525 e 95 M400 10 M489, 29 M576, 39 M481, 68 M210, 4004 M051, 4008 M155, 4020 M152, 4021 M035, 4025 M153, 4029 M031, 4035 M065, 4038 M059, 4039 M061, 4040 M130, 4055 M062, 4083 M199 e 4111 M475.	Diâmetros menores variando entre 4 a 6 mm foram encontrados em cinco genótipos. Diâmetros entre 6 a 8 mm foram encontrados na maior parte dos genótipos.	1	05 M536, 23 M537, 29 M576, 37 M257, 39 M481, 61 M525, 95 M400, 4004 M051, 4008 M155, 4020 M152, 4021 M035, 4025 M153, 4029 M031, 4035 M065, 4038 M059, 4039 M061, 4040 M130, 4055 M062, 4083 M199 e 4120 M543	A maioria dos genótipos possuíam diâmetros menores variando entre 2 a 4 mm.
2	4019 M181 e 4120 M543	Os maiores diâmetros (8 a 10 mm) foram encontrados em apenas dois genótipos.	2	10 M489, 68 M210, 4019 M181 e 4111 M475.	Os maiores diâmetros (4 a 6 mm) foram encontrados em apenas quatro genótipos.
3	4019 M181 e 4120 M543	Os maiores diâmetros (8 a 10 mm) foram encontrados em apenas dois genótipos.	2	10 M489, 68 M210, 4019 M181 e 4111 M475.	Os maiores diâmetros (4 a 6 mm) foram encontrados em apenas quatro genótipos.
Grupos	Genótipos	Comprimento basal (mm)	Grupos	Genótipos	Tamanho do pedúnculo (cm)
1	37 M257, 4004 M051, 4008 M155, 4020 M152, 4021 M035, 4025 M153, 4038 M059, 4055 M062, 10 M489, 29 M576, 39 M481, 61 M525, 95 M400, 4029 M031 e 4035 M065	A maioria dos genótipos (oito acessos) possuíam os menores comprimentos basais variando entre 0,70 a 1,20 mm	1	23 M537, 39 M481, 61 M525, 4004 M051, 4020 M152, 4021 M035, 4025 M153, 4038 M059, 4083 M199 e 4111 M475	Dez genótipos possuíam o comprimento do pedúnculo variando entre 6 a 10 cm
3	23 M537, 68 M210, 4039 M061, 4083 M199 e 4120 M543, 05 M536, 4019 M181, 4040 M130 e 4111 M475	Em cinco acessos foram encontrados de 1,21 a 1,70 mm.	2	05 M536, 10 M489, 29 M576, 37 M257, 68 M210, 95 M400, 4008 M155, 4019 M181, 4029 M031, 4035 M065, 4039 M061, 4040 M130, 4055 M062 e 4120 M543	Os demais acessos possuíam comprimentos maiores até 16,67 cm

Figura 6. Médias das variáveis analisadas conforme os genótipos não-comerciais *Theobroma cacao* L. (cacaueiro).

A análise dos diâmetros dos botões florais (polar e equatorial) e do comprimento basal dos estaminódios revelou algumas semelhanças entre os genótipos (Fig. 6). No primeiro grupo, três acessos se interrelacionaram: 37 M257, 61 M525 e 95 M400. No segundo grupo, apenas dois acessos apresentavam semelhanças (68 M210 e 4111 M475).

Em termos de diâmetro dos botões florais e tamanho dos pedúnculos, os dois grupos apresentavam pouca similaridade entre si. Os acessos 23 M537 e 61 M525 ficaram no grupo (grupo 1), e os acessos 10 M489 e 68 M210 no segundo grupo (Fig. 6).

3.3 Embriogênese somática de diferentes genótipos

3.3.1 Percentual de recobrimento dos estaminódios com calos

Após 35 dias em meio de formação de calos, constatou-se, uma grande variação no percentual de recobrimento dos estaminódios com calos entre os genótipos, conforme mostrado na Tabela 6.

Nessa mesma Tabela, os resultados referentes a esses percentuais para os respectivos genótipos, foram divididos em grupos, conforme as semelhanças dos percentuais entre os acessos. Foram divididos em seis classes, sendo o grupo um composto por sete genótipos apresentando média 36,4 estaminódios correspondendo a 25% de recobrimento, porém esse valor foi menor que o grupo 3 (66,7 estaminódios) que compreendia apenas três acessos (Fig. 7B). Com 50% de recobrimento, os grupos 4 e 6 exibiram as maiores médias com 38,8 e 55,0 estaminódios, respectivamente. Em relação ao percentual de 75%, os grupos 4 (42,5 estaminódios) e 5 (55,0 estaminódios) se destacaram. A ausência de recobrimento com calo e total recobrimento do explante com calo (100%), para a maioria dos grupos mostraram-se baixos, variando de 3,3 a 5,7 estaminódios, em alguns casos específicos ocorreu valores como 50,0 estaminódios (ausência de recobrimento do grupo 2) e 25,0 estaminódios (100% de recobrimento no grupo 5).

Tabela 6. Agrupamento dos 24 genótipos de *Theobroma cacao* L. (cacaueiro) com base no percentual de recobrimento de estaminódios com calos, por meio do algoritmo *k-means clustering*.

		Percentual de recobrimento do estaminódio com calo					
		0%	25%	50%	75%	100%	
GRUPOS	GENÓTIPOS	Estaminódios recobertos com calo do total inoculado dentro de cada genótipo avaliado (%)*					TOTAL
1	M031	5,0	40,0	15,0	35,0	5,0	100,0
1	M059	0,0	35,0	20,0	20,0	25,0	100,0
1	M155	10,0	45,0	10,0	30,0	5,0	100,0
1	M210	15,0	30,0	30,0	25,0	0,0	100,0
1	M400	5,0	40,0	25,0	30,0	0,0	100,0
1	M475	5,0	35,0	30,0	30,0	0,0	100,0
1	M576	0,0	30,0	35,0	30,0	5,0	100,0
	Média	5,7	36,4	23,6	28,6	5,7	100,0
2	M061	50,0	10,0	5,0	35,0	0,0	100,0
	Média	50,0	10,0	5,0	35,0	0,0	100,0
3	M130	0,0	70,0	5,0	25,0	0,0	100,0
3	M199	10,0	65,0	10,0	15,0	0,0	100,0
3	M489	0,0	65,0	20,0	15,0	0,0	100,0
	Média	3,3	66,7	11,7	18,3	0,0	100,0
4	M051	0,0	20,0	45,0	30,0	5,0	100,0
4	M065	0,0	0,0	40,0	40,0	20,0	100,0
4	M481	0,0	15,0	30,0	55,0	0,0	100,0
4	M543	0,0	15,0	40,0	45,0	0,0	100,0
	Média	0,0	12,5	38,8	42,5	6,3	100,0
5	M035	0,0	0,0	20,0	55,0	25,0	100,0
5	M062	0,0	5,0	15,0	45,0	35,0	100,0
5	M152	0,0	0,0	10,0	50,0	40,0	100,0
5	M153	0,0	20,0	15,0	45,0	20,0	100,0
5	M181	5,0	10,0	5,0	55,0	25,0	100,0
5	M525	0,0	0,0	15,0	80,0	5,0	100,0
	Média	0,8	5,8	13,3	55,0	25,0	100,0
6	M257	0,0	20,0	70,0	10,0	0,0	100,0
6	M536	0,0	25,0	50,0	25,0	0,0	100,0
6	M537	0,0	55,0	45,0	0,0	0,0	100,0
	Média	0,0	33,0	55,0	12,0	0,0	100,0

*Foram inoculados 20 estaminódios por genótipo (n=20).

3.3.2 Tipos de calos formados e região de formação

Devido aos percentuais de recobrimento dos estaminódios, foram observados diferentes tipos de calos e inclusive estaminódios desprovidos de calos, a exemplo daqueles oriundos do genótipo 10 M489 (Fig. 7A).

Quanto ao aspecto morfológico dos calos formados, foram observados calos granulares (Fig. 7C- H) e nodulares (Fig. 7C- F). Em quatro genótipos, 05 M536, 39 M481, 61 M525 e 4120 M543, foram visualizados somente calos granulares e, nos demais, foram visualizados apenas calos nodulares isolados ou a presença de ambos os tipos de calos no mesmo estaminódio. Ao final dos 14 dias em meio de multiplicação de calos, já é possível observar sinais de oxidação, parcial (Fig. 7F, G) ou total (Fig. 7I) dos calos primários.

Salienta-se que 3 genótipos se destacaram (4019 M181, 4029 M031 e 4083 M199) por uma alta taxa de oxidação ao final do período de inoculação em MDE e pela formação de embriões somáticos. Em meio de desenvolvimento de embriões somáticos também foi notado o recobrimento total de todos os explantes ou da metade deles, com calos esbranquiçados, granulares e volumosos (Fig. 7H).

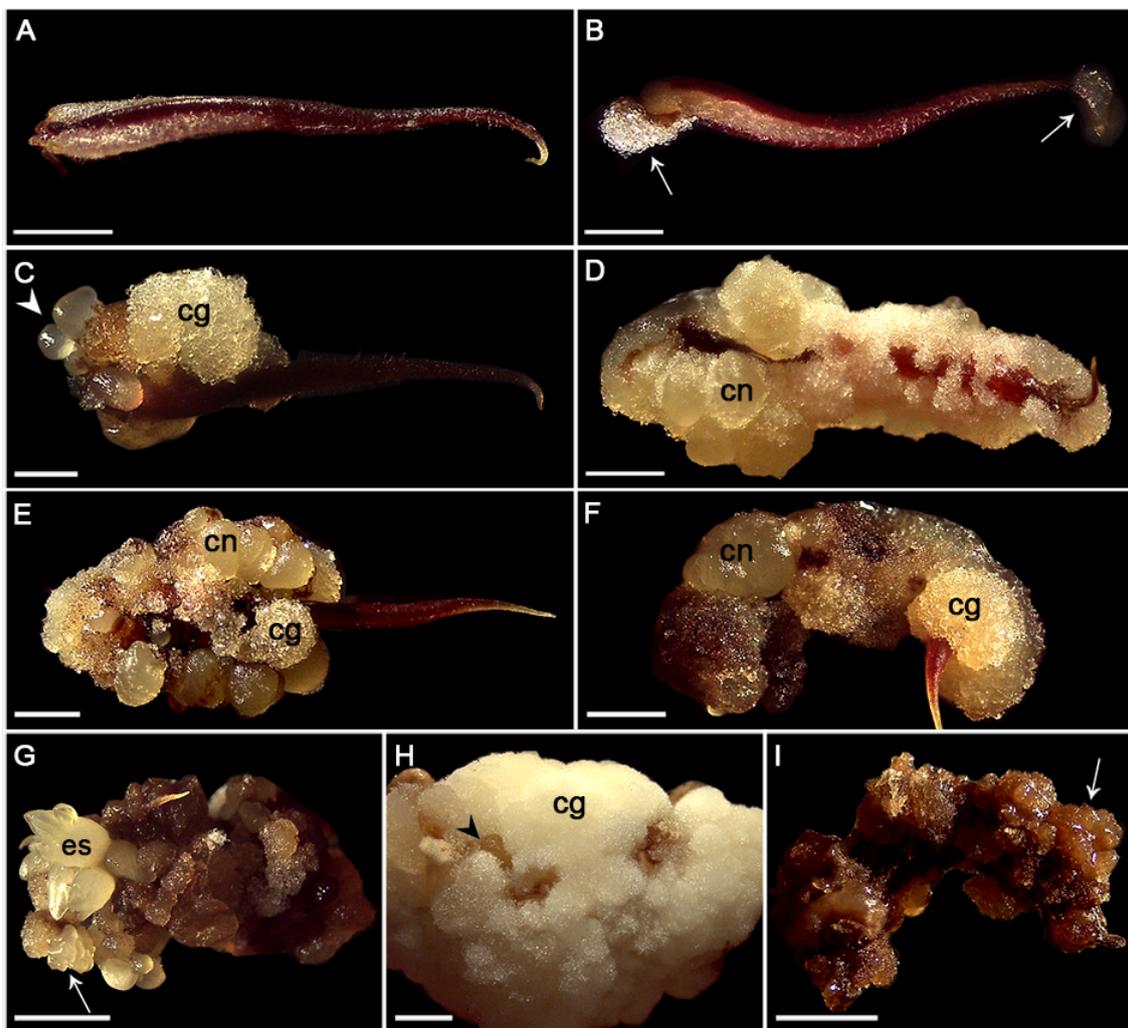


Figura 7. Fases da rota da embriogênese somática de *Theobroma cacao* L., a partir de estaminódios de cacauero. **A.** Estaminódio do genótipo 10 M489 túrgido sem formação de calos primários. **B.** Início de formação de calos primários nas porções basal e apical (setas) de estaminódio do genótipo 10 M489 aos 21 dias, em meio de indução de calos (MIC). **C.** Presença de calos nodulares (seta) e granulares em estaminódio do genótipo 68 M210. **D.** Estaminódio do genótipo 95 M400 com alta taxa de recobrimento com calos granulares. **E.** Explante do genótipo 4025 M153 aos 21 dias, em MIC, com 50% de recobrimento com calos com início de oxidação. **F.** Explante do genótipo 4025 M153 aos 14 dias, em meio de multiplicação de calos, com 75% de recobrimento calos e com algumas áreas oxidadas. **G.** Explante do genótipo 4025 M153 aos 30 dias, em meio de desenvolvimento de embriões, com oxidação e surgimento de embriões somáticos (seta). **H.** Recobrimento total com calos granulares de estaminódio do genótipo 68 M210; notar calos nodulares diminutos (seta). **I.** Oxidação total de calos do genótipo 4035 M065 e natureza hiper-hidratada do calo (seta). Escalas: A, C = 1,0 mm; B, D, E, F, G, H, I = 2 mm.

Em relação ao local de surgimento dos calos primários (Tabela 7), observou-se que, na maioria dos genótipos, a formação ocorreu na base (Fig. 7C, E), variando entre 65 e 100% dos estaminódios, em cada acesso. Outros dois genótipos apresentaram formação completa de calo por toda a extensão do estaminódio (grupo 2), com 60 a 65% de seus estaminódios. As outras áreas, ápice e mediana, a formação de calos ocorreu de maneira isolada dentro dos acessos, mas em conjunto com a base.

Tabela 7. Agrupamento dos genótipos não-comerciais de *Theobroma cacao* L. (cacaueiro) em relação a região de formação de calos em explantes florais (estaminódios), aos 21 dias em meio de indução de calos.

Grupos	Genótipos com formação de calos	Região de formação de calos
1	05 M536; 10 M489; 23 M537; 29 M576; 37 M257; 39 M481; 61 M525; 68 M210; 95 M400; 4004 M051; 4008 M155; 4019 M181; 4020 M152; 4025 M153; 4029 M031; 4035 M065; 4039 M061; 4040 M130; 4055 M543	base
2	4021 M035 e 4038 M059	inteiro

3.3.3 Percentual de oxidação de calos formados

No período de 14 dias em meio de multiplicação de calos com a oxidação dos calos primários, constataram-se, que na maioria dos genótipos avaliados, houve ausência de oxidação (grupo 1) ou baixo percentual de oxidação (25%). Taxas de 25-75% de oxidação, foram verificadas apenas para 3 acessos dos grupos 3 e 4 e, em alguns casos isolados, não exclusivo de um genótipo, houve oxidação completa (Tabela 8).

Tabela 8. Agrupamento dos genótipos não-comerciais de *Theobroma cacao* L.(cacaueiro) em relação ao percentual de oxidação de calos oriundos de estaminódios, aos 14 dias em meio de multiplicação de calos.

Grupos	Genótipos	Percentual de oxidação
1	05 M536, 10 M489; 29 M576; 37 M257; 39 M481; 61 M525; 68 M210; 95 M400; 4008 M155; 4037 M156; 4039 M061; 4040 M130; 4111 M475 e 4120 M543	ausência
2	4004 M051; 4020 M152; 4025 M153; 4029 M031; 4035 M065; 4055 M062 e 4083 M199;	25%
3	4019 M181 e 4038 M059	25-50%
4	4021 M035;	50-75%

Quanto à relação entre a ocorrência concomitante de oxidação e formação de embriões somáticos (Tabela 9) verificou-se que 16 genótipos exibiram oxidação e formação de embriões somáticos, ao passo que em 6 acessos apresentaram oxidação sem ocorrência de embriogênese (grupo 4) (Fig. 7I). Em alguns casos, houve oxidação, sem a formação de embriões somáticos, e em outros dois (grupo 5).

Tabela 9. Agrupamento dos genótipos de *Theobroma cacao* L. (cacaueiro) em relação à formação de embriões somáticos em comparação ao percentual de oxidação dos calos aos 30 dias em meio de desenvolvimento de embriões somáticos.

Grupos	Genótipos	Oxidação e formação de embriões somáticos
1	10 M489, 29 M576, 4004 M051, 4008 M155, 4019 M181, 4020 M152, 4025 M153, 4029 M031, 4035 M065, 4038 M059, 4039 M061, 4040 M130, 4055 M062, 4083 M199, 4111 M475 e 4120 M543.	oxidação com formação de embriões somáticos
2	37 M257 e 68 M210	casos isolados de oxidação, sem formação de embriões somáticos
3	05 M536, 23 M537, 39 M481, 61 M525, 95 M400 e 4021 M035	oxidação sem formação de embriões somáticos

3.3.4 Percentual de formação de embriões somáticos

Quanto ao potencial de formação de embriões somáticos para os respectivos genótipos, no período de 30 dias em meio de desenvolvimento de embriões (MDE),

comparando com os agrupamentos dos percentuais de recobrimento dos estaminódios com calos (Fig. 8), observou-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos 4 e 5 quanto à quantidade de estaminódios com formação de embriões somáticos. Nos demais grupos, não foi observada interação significativa entre eles. Além disso, registrou-se um baixo percentual de estaminódios com formação de 11 ou mais embriões somáticos: 18% no grupo 3, 14% no grupo 1 e apenas 5% no grupo 6. E o grupo 2 não foi contabilizado devido ser o um único genótipo.

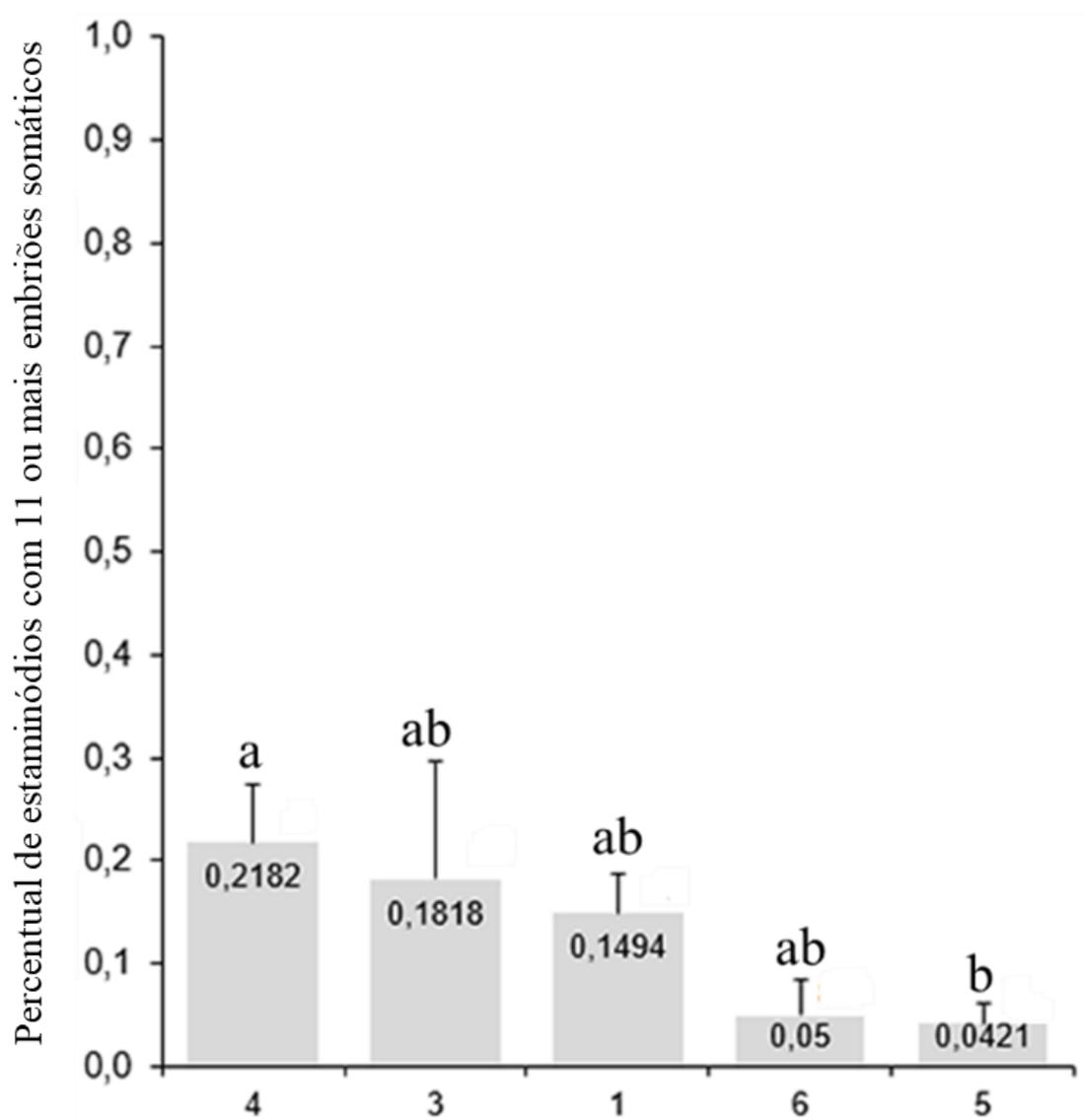


Figura 8. Percentual de formação de 11 ou mais embriões somáticos, independente do genótipo avaliado, porém dentro dos agrupamentos de percentuais de recobrimento de estaminódios com calo, após 30 dias em MDE.

O processo de embriogênese somática, de maneira geral, foi assincrônica, com formação de embriões somáticos em diferentes estádios de desenvolvimento em um mesmo *cluster* (Fig. 8A-D). Quanto ao número total de embriões somáticos formados, o genótipo 4025 M153 destacou-se, como observado na Tabela 10, com 165 globulares, 64 cordiformes, 19 torpedos e 82 cotiledonares, o que totaliza 330 embriões somáticos. Alguns genótipos como 4035 M065 e o próprio 4025 M153 apresentaram a formação de embriões somáticos com aparentemente anormalidades, geralmente fusionados, com difícil individualização (Fig. 8E), embora não tenham sido avaliados até a fase de aclimatização.

Durante o período de avaliação, os genótipos 95 M400 e 4020 M152 apresentaram estaminódios com calos que formaram apenas raízes, sem a formação de embriões somáticos.

Tabela 10. Número total de embriões somáticos formados nos genótipos de *Theobroma cacao* L. (cacaueiro) em diferentes estádios de desenvolvimento (n=20), após 15 dias em MDE.

Genótipos	Estádio de desenvolvimento				Total
	Globular	Cordiforme	Torpedo	Cotiledonar	
10 M536	8	1	0	17	26
29 M576	141	26	1	64	232
4004 M051	10	3	1	13	27
4008 M155	0	0	0	2	2
4020 M152	18	4	4	12	38
4025 M153	165	64	19	82	330
4029 M031	4	2	0	0	6
4035 M065	77	44	21	43	185
4038 M059	81	39	5	23	148
4039 M061	4	4	3	4	15
4040 M130	2	2	0	6	10
4055 M062	22	2	0	0	24
4083 M199	14	7	0	7	28
4111 M137	7	10	0	23	40
4120 M543	23	1	5	13	42

Ao aplicar o teste de hipóteses em cada um dos grupos identificados (conforme Tabela 5), constatou-se que, independentemente do percentual de oxidação, a chance de formação de embriões somáticos (11 ou mais E.S. por grupo) em calos oxidados é 9,72% maior em comparação com calos não oxidados.

Com relação ao número de embriões somáticos em cada estágio de desenvolvimento, considerando os acessos avaliados (Figs. 9, 10), verificou-se o genótipo 4038 M059 destacou-se com relação ao número de embriões somáticos globulares (13,3), quando comparado aos genótipos 10 M489, 4011 M137, 4025 M153, 4035 M065 e 4120 M543, mas não se diferenciou dos outros acessos, com médias menores (Fig. 9A).

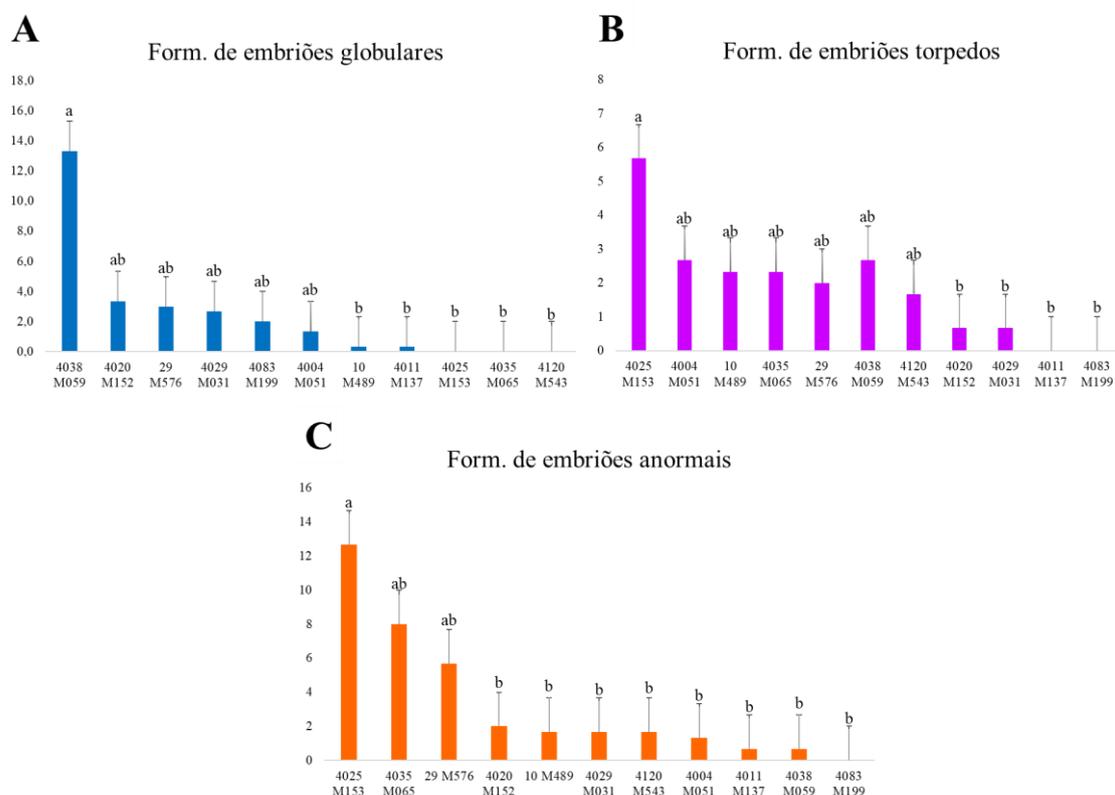


Figura 9. Médias das quantidades de embriões somáticos de cacaveiros nos estádios globular, torpedo e anormais. Letras diferentes indicam interação estatística significativa entre os genótipos, conforme Teste de Tukey, a 5% de significância. Barras representam o erro padrão.

No estágio torpedo, o acesso 4025 M153 foi o que apresentou a maior média, com 5,67 embriões. Este acesso não se diferenciou estatisticamente de seis genótipos, conforme mostrado na Figura 9B.

Quanto ao número de embriões somáticos anormais (Fig. 9C), os genótipos 4025 M153, 4035 M065 e 29 M576 não apresentaram diferença significativa entre si, com médias de 12,67, 8,00 e 5,67 embriões, respectivamente. De modo geral, verificou-se que a maioria dos genótipos tiveram formação e desenvolvimento de embriões somáticos normais.

Para os estádios cordiformes e cotiledonares, não houve diferença estatística significativa entre os genótipos investigados (Fig. 10). Para a fase cordiforme, as maiores médias foram encontradas nos acessos 4038 M059, 4035 M065 e 29 M576 (Fig. 10A). Já em relação ao estágio cotiledonar, o valor médio foi inferior a 5,0 embriões somáticos, com destaque para os genótipos 29 M576 e 4004 M051 (Fig. 10B).

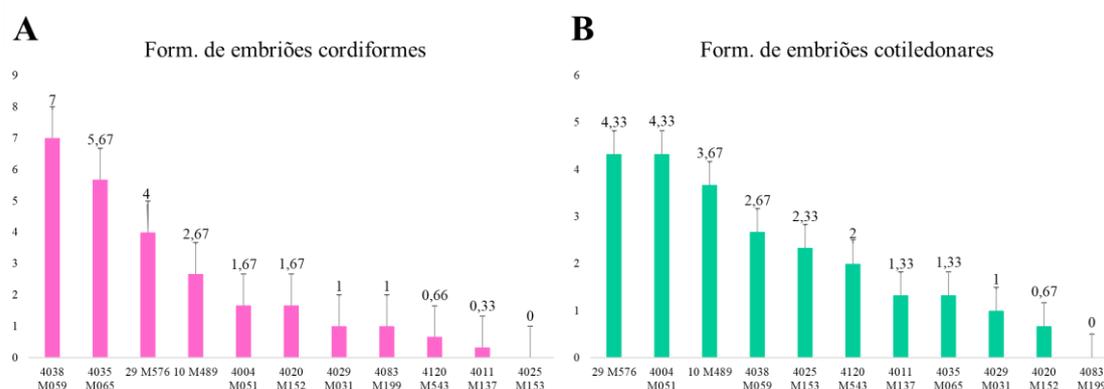


Figura 10. Médias de embriões somáticos de *Theobroma cacao* L. (cacaueiro) nos estádios de desenvolvimento similares ao cordiforme e cotiledonar. Barras representam o erro padrão.

3.4 Caracterização morfoanatômica da diferenciação de embriões somáticos de cacaueiro

Os embriões somáticos surgiram, ao final do período em meio de desenvolvimento de embriões somáticos (MDE), apresentando formato globular (Fig. 11A, B) coloração esbranquiçada translúcida e tamanho reduzido, isolados ou em grupos. Tais embriões evoluíram para estruturas similares a embriões cordiformes (Fig. 11B) com início do apontamento dos cotilédones (Figs. 11B, 12A, B). Anatomicamente, eles eram caracterizados pela presença de protoderme definida (Fig. 12B), meristema fundamental com células parenquimáticas vacuoladas e cordões procambiais formados por células alongadas, com núcleos evidentes (Fig. 12B, B”). Constatou-se também, a presença de

compostos fenólicos (coloração esverdeada) em áreas próximas à protoderme em direção anticlinal (Fig. 12B, B'') e, sobretudo, em regiões com diferenciação dos cotilédones e de surgimento de raízes.

Posteriormente verificou-se uma fase intermediária, conhecida como torpedo (Figs. 11B, 12C-D), em que foi possível visualizar o alongamento do eixo hipocótilo-radícula do embrião. Os cortes anatômicos evidenciaram o início de formação do meristema apical caulinar, além dos meristemas previamente mencionados e diferenciação de elementos de vasos (Figs. 12D, E). Constatou-se também embriões em fase similar à cotiledonar, caracterizada por cotilédones definidos com coloração esbranquiçada (que posteriormente originarão as folhas) e espessamento do hipocótilo, com coloração amarelada.

Foi possível notar assincronias e aparentemente anormalidades (Fig. 11E) nos estádios de formação de embriões somáticos. Alguns genótipos exibiram formação de raízes com diâmetros variados (Fig. 11F).

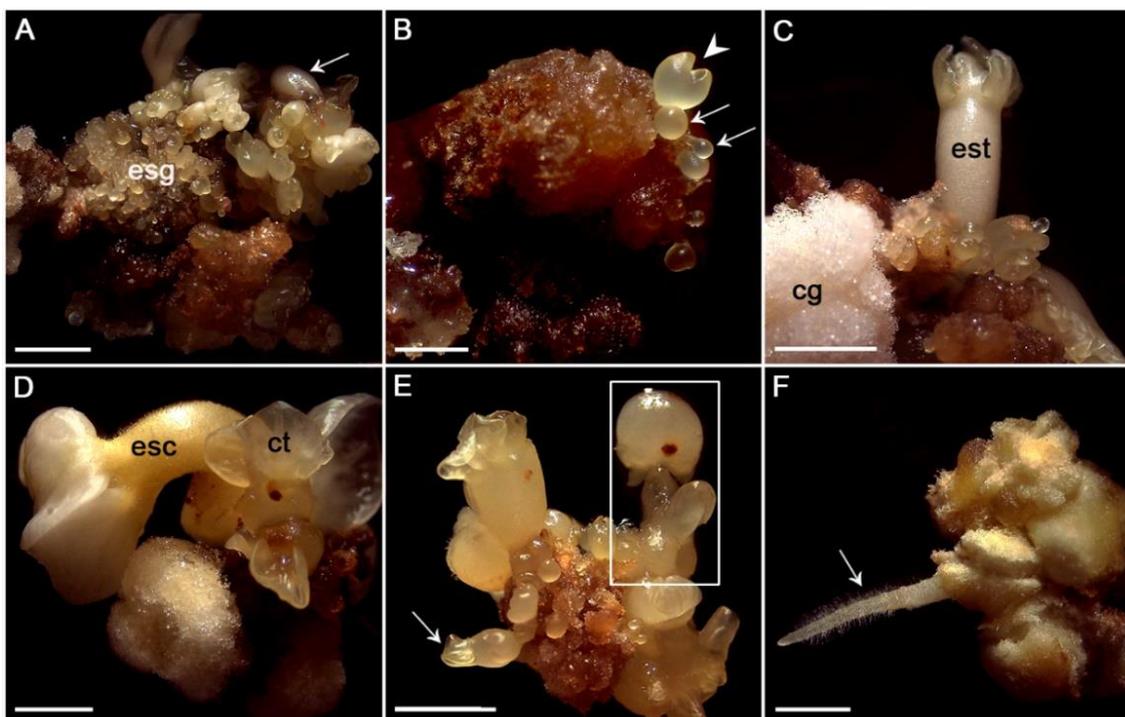


Figura 11. Estádios de desenvolvimento de embriões somáticos de *Theobroma cacao* L. (cacaueiro). Genótipos: 4025 M153 (A, C); 4083 M199 (B); 4040 M130 (D); 10 M489 (E); 95 M400 (F). **A.** Embriões globulares individualizados e agrupados; embriões em fase de desenvolvimento posterior (seta). **B.** Embriões globulares (setas) e cordiforme (cabeça de seta). **C.** Embrião em fase similar a torpedado. **D.** Caracterização de embrião na fase similar a cotiledonar. **E.** Ocorrência de aparentemente anormalidade (retângulo), juntamente com embrião cotiledonar (seta). **F.** Organogênese (seta evidenciando raiz). Abreviação: *cg*: calos granulares; *ct*: cotilédone; *esc*: embrião somático cotiledonar; *esg*, embriões somáticos granulares; *est*: embrião somático torpedado. Escalas: A-F = 2 mm.

Aos 30 dias em meio de desenvolvimento de embriões somáticos, observou-se embriões somáticos em diferentes estádios de desenvolvimento havendo uma evolução de suas células para formação de tecidos específicos. Nas primeiras fases de formação (Fig. 12A, B), é possível notar uma maior densidade de células próximas ao meristema fundamental de tamanho reduzido, o que indica uma região meristemática, enquanto as outras células são mais espaçadas.

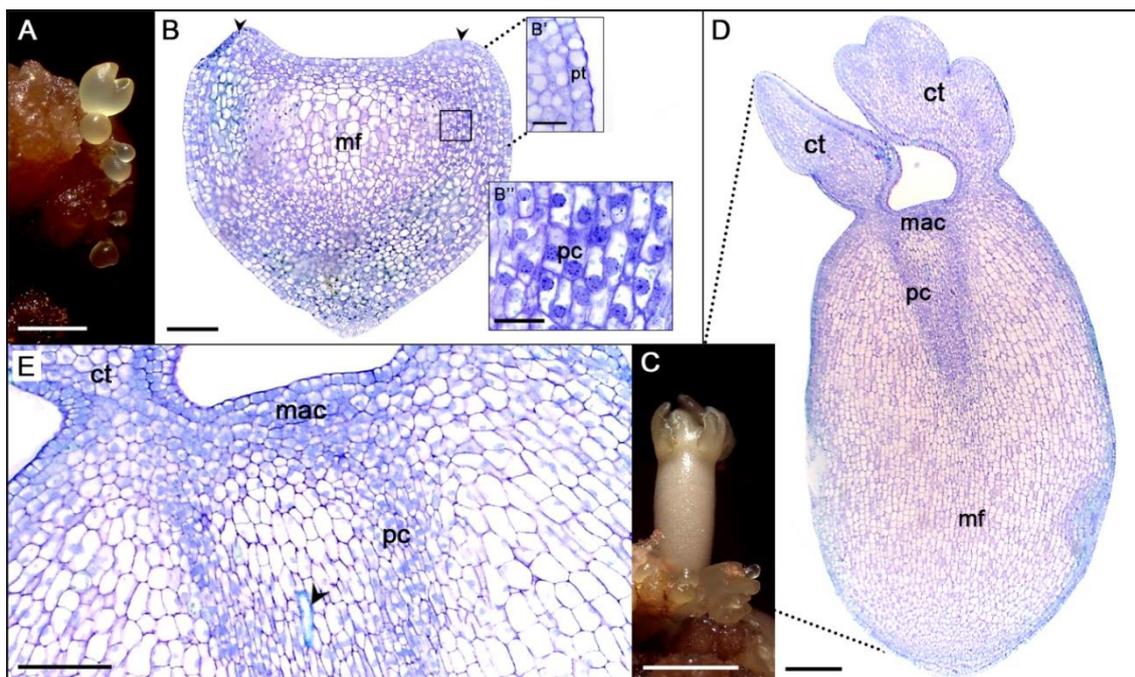


Figura 12. Caracterização anatômica dos estádios dos embriões somáticos de cacauzeiros. Genótipos: 4040 M130 (A); 29 M576 (B); 4025 M153 (C, D, E). A. Embriões globulares e cordiformes. B. Anatomia da fase cordiforme (cabeça de seta: compostos fenólicos). B'. Tecido da protoderme. B''. Meristema primário procâmbio. C. Estádio de torpedo. D. Anatomia da fase de torpedo. E. Ampliação de células de formação de tecidos na fase torpedo (cabeça de seta: mucilagem). Abreviação: *ct*: cotilédones; *mac*: meristema apical caulinar; *mf*: meristema fundamental; *pc*: procâmbio; *pt*: protoderme. Escalas: A e C= 2 mm; B', B'' = 25 μ M; E = 100 μ M; B, D = 200 μ M.

3.5 Germinação de embriões somáticos do cacauzeiro

Após 90 dias em meio de regeneração de plantas, a maioria dos embriões somáticos apresentava coloração esverdeada e, inicialmente, com indícios de má formação, como fuscionamento e/ou hiperidricidade. Entre os 24 genótipos estudados, alguns se destacaram pela quantidade significativa de embriões somáticos, conforme indicado na Tabela 10 e nas Figuras 13A-C, tanto normais quanto anormais (Fig. 13D), além do surgimento de novas raízes adventícias.

Nos acessos com embriões normais, foi perceptível o desenvolvimento progressivo para a formação de plantas maduras, com alongamento e expansão das primeiras folhas, como observado no genótipo 4025 M153 (Fig. 13E). Além disso, alguns acessos demonstraram surgimento de raízes principais e secundárias, como o 4083 M199

(Fig. 13F), com desenvolvimento das folhas e amarelamento e murchamento dos cotilédones (Fig. 13F).

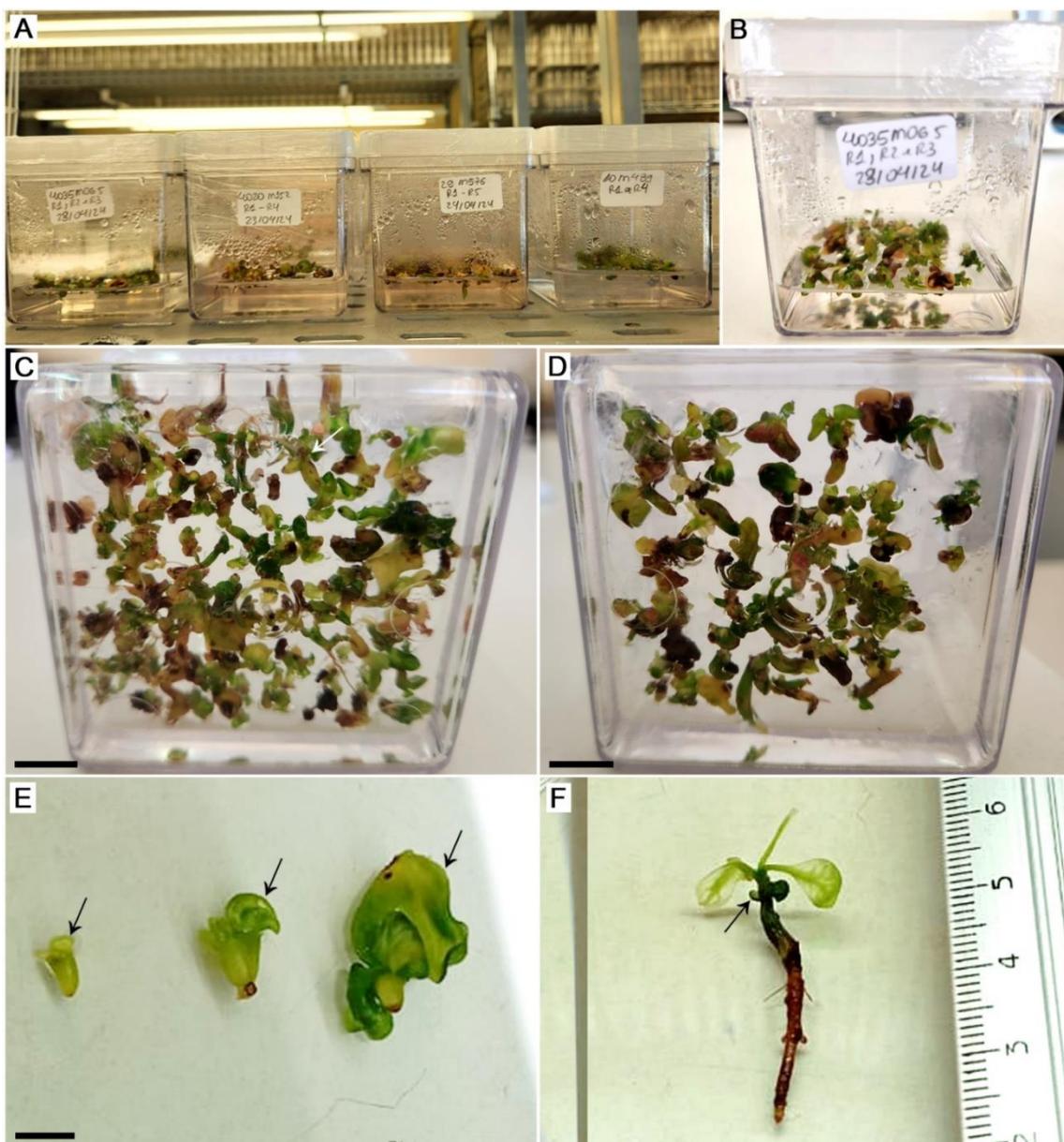


Figura 13. Caracterização morfológica de embriões somáticos de *Theobroma cacao* L. (cacaueiro) em meio de regeneração de plantas. Genótipos: 10 M489; 29 M576; 4020 M152 (A, D); 4025 M153 (E); 4035 M065(A-C); 4038 M199 (F). **A.** Embriões somáticos em meio de regeneração de plantas. **B- D.** Acessos com embriões com expressivo desenvolvimento; notar embriões somáticos anormais e normais. **E.** Evolução no desenvolvimento de embriões. **F.** Planta madura com raízes e folhas individualizadas. Setas = cotilédones. Escalas: A-D = 1,1 cm; E = 0,5 cm.

4 DISCUSSÃO

4.1 Caracterização fenotípica de explantes florais de diferentes genótipos de cacaueteiro utilizados para indução da embriogênese somática

Observaram-se, no presente trabalho botões florais com diferentes colorações variando do avermelhado, arroxeadado e esverdeado e estaminódios avermelhados e arroxeados. Isso se deve principalmente a variabilidade exibida pelos cacaueteiros de colorações tanto em seus frutos (Jean-Marie et al., 2022; Vasquez-García et al., 2022) quanto em suas flores (Martínez et al., 2017). Isso é resultado dos cruzamentos entre grupos tradicionais crioulo, forasteiro e trinitário (Bartley, 2005), e a influência também dos acessos selvagens.

Embora não haja uma proporção definida para a quantidade de flores e estaminódios com determinada coloração, sabe-se que os acessos influenciam significativamente produção de flores, assim como a estação e bioma (Nieves-Orduña et al., 2023) e, na cultura de tecidos, promovendo uma maior ou menor taxa de regeneração de plantas *in vitro* (Daouda et al., 2019; Bustami; Werbrouck, 2024).

4.1.1 Correlação entre as variáveis morfológicas

Adentrando as variáveis morfométricas, constataram-se respostas variadas entre os acessos, indicando relações distintas entre si. Alguns genótipos possuem características únicas e de interesse representativo. Apesar de algumas correlações, como aquelas entre o diâmetro polar e equatorial do botão floral e o comprimento dos estaminódios com o comprimento basal dos estaminódios, serem fortes e positivas, com uma correlação de 0,73% em ambas as comparações, não se observou o mesmo padrão nas demais variáveis. Isso evidencia que variáveis mais próximas tendem a produzir resultados mais precisos do que aquelas mais distantes.

Nas análises das relações entre genótipos e características morfométricas mostraram alguns resultados correlacionados. No entanto, não foi possível afirmar que botões florais com diâmetros polares e equatoriais maiores resultem em estaminódios com comprimentos correspondentes.

4.1.2 Análises relacionadas aos estaminódios

Diante do exposto acima, a abordagem mais lógica foi agrupar os genótipos com base nas semelhanças no comprimento médio dos estaminódios, explante esse, amplamente utilizado para a formação de embriões somáticos de *T. cacao* (Li et al., 1998; Maximova et al., 2022; Ramírez; Hajduk; Trujillo, 2022). Os agrupamentos com maiores números de acessos (grupos B e D) apresentavam, em média, estaminódios com cinco mm de comprimento, o que é positivo ao considerar uma maior área de formação de calos que, posteriormente, poderão formar embriões somáticos (Montoya et al., 2022; Georges et al., 2023).

Ao comparar os diâmetros equatorial e polar dos botões florais, observou-se que os maiores valores do diâmetro equatorial foram encontrados em mais genótipos, enquanto os menores diâmetros apareceram com mais frequência em relação ao diâmetro polar. Isso sugere que a maioria dos genótipos prioriza a produção de botões florais mais extensos (Ha et al., 2016; Ramasamy et al., 2022), o que pode ser vantajoso para a formação de calos, devido à produção de estaminódios maiores.

Os grupos com a maior quantidade de genótipos foram os B, C e D, contendo 7, 5 e 6 genótipos, respectivamente. O comprimento do estaminódio oscilou entre 3,5 e 5,3 mm, e apenas alguns acessos mostraram resultados diferentes dos mencionados. Isso indica que a maioria dos acessos possui a vantagem de uma área mais extensa para a formação de calos e embriões somáticos.

Os estaminódios de coloração arroxeadas, entre os genótipos utilizados, apresentaram os maiores comprimentos. Essa característica é atribuída à presença de antocianinas específicas e outros pigmentos flavonoides (Alemanno et al., 2003; Vasquez-García et al., 2022). Essas substâncias definem coloração que variam do vermelho, roxo e azul, que acumulam nos vacúolos das células para coloração de órgãos vegetativos e reprodutivos como atrativo para polinizadores e dispersores (Hatier; Gould, 2009). Além disso, podem estar relacionadas a outras características químicas, biológicas e ambientais (Landia; Tattinib; Gould, 2015), além de influenciar a formação e desenvolvimento na cultura *in vitro*, embora esses aspectos ainda necessitem de estudos adicionais.

4.1.3 Análises descritivas para as demais variáveis

Nesse estudo, os diâmetros dos botões florais variaram entre 4 a 6 mm em ambas as dimensões (equatorial e polar). Quanto ao comprimento basal dos estaminódios em relação ao tamanho do pedúnculo, foram divididos em duas categorias (dimensões menores e maiores). Os estaminódios apresentaram comprimento variando de 0,70 a 1,70 mm, enquanto o tamanho do pedúnculo variou de 6 a 16,67 mm. No entanto, essas variáveis não têm impacto direto no tamanho das estruturas internas do botão floral e propriamente o botão floral, estando mais relacionadas à maturidade da inflorescência e à influência genotípica (Akoa et al., 2021; Bhavishya et al., 2024).

Na análise dos diâmetros dos botões florais em relação ao comprimento basal dos estaminódios, os genótipos mostraram pouca dependência, sendo apenas três acessos com valores menores e dois com valores maiores. Da mesma forma, ao comparar essa variável com o tamanho dos pedúnculos, apenas dois acessos demonstraram semelhança em ambos os aspectos, dessa forma essas variáveis não possuíam dependência entre si.

Isso ocorre porque, apesar de fazerem parte da mesma flor de cacaueteiro, fatores genéticos e ambientais podem influenciar os estaminódios, botões florais e pedúnculo de maneiras diferentes, uma vez que possuem funções distintas. Os estaminódios, apesar de inférteis, têm um papel originalmente reprodutivo, enquanto os botões florais e pedúnculo, mais expostos, são mais suscetíveis às condições ambientais (León, 2000; Swanson; Carlson; Guiltinan, 2008; Queiroga et al., 2021).

Em relação à proximidade do pedúnculo dos estaminódios, esse proporciona benefícios, pois facilita a transferência de nutrientes para o desenvolvimento dos estaminódios, sendo eles dessa forma, mais responsivos para formação de calos embriogênicos com potencial de regeneração de planta (González; Rojas; Rieche, 2005; Salazar et al., 2006; Trujillo; Garcés; Rua, 2011; Borghi; Fernie, 2017; Silva; Amado; Delgado, 2022). Assim, optou-se por compará-los (tamanho do pedúnculo e comprimento dos estaminódios). Porém esses agrupamentos possuíam a mesma quantidade de acessos tanto para tamanhos menores (tamanho do pedúnculo- 6 a 10 cm e comprimento dos estaminódios- 2 a 4 mm) quanto maiores (tamanho do pedúnculo- até 16,67 cm e comprimento dos estaminódios- 4 a 6 mm) para ambas as variáveis (6 genótipos), sendo eles: 05 M536, 68 M210, 4019 M181, 4039 M061, 4040 M130 e 4120 M543, não havendo uma vantagem morfológica.

4.2 Embriogênese somática de diferentes genótipos

4.2.1 Percentual de recobrimento dos estaminódios com calos

Após 35 dias em meio de formação de calos, foi possível visualizar respostas morfológicas mais evidentes nos genótipos estudados. Diante disso, os genótipos foram agrupados conforme as características do processo de embriogênese somática do cacauero.

Uma das primeiras respostas foi a formação de calos específicos dessa espécie - granulares e nodulares (Ramamy et al., 2022; Martínez-Hernández et al., 2024), avaliando-se o percentual de recobrimento dos estaminódios para cada genótipo. A maioria dos genótipos formaram calos com proporções que variaram de 25% a 100% de recobrimento, e poucos com ausência de calos.

Ao analisar as distribuições em grupos, buscou-se agrupá-los com base nas semelhanças nos percentuais de formação de calos (ausência, 25%, 50%, 75% e 100%), visando selecionar genótipos com maior potencial para a formação de embriões somáticos em maiores áreas (Daouda et al., 2019; Bustami; Werbrouck, 2024). Os dados obtidos indicam que a escolha do grupo 4 (4004 M051, 4035 M065, 39 M481, 4120 M543) seria mais vantajosa, pois apresenta maiores valores de recobrimento dos estaminódios com calos, 50% (0,39) e 75% (0,43), em comparação aos outros grupos.

4.2.2 Tipos de calos formados e região de formação

Na maioria dos genótipos não comerciais de cacauero estudados, foram identificados os dois tipos comuns de calos, os granulares e os nodulares, os quais podem possuir potencial embriogênico ou consistir apenas de células vacuoladas (Rúa et al., 2016; Ajjah et al., 2016). Em alguns explantes, esses tipos de calos foram observados de forma isolada.

O local de surgimento desses calos é crucial ao considerar a utilização de regiões específicas dos explantes, objetivando a otimização da calogênese. Notou-se que a maioria dos calos se formava na base dos estaminódios (entre 65 a 100% dos estaminódios em cada acesso), o que é interessante devido à presença evidente do sistema vascular, além da ocorrência de mucilagem e compostos fenólicos nessa região (Alemanno et al., 2003; Gárate-Navarro; Arévalo-Gardin, 2017; Rosabal et al., 2022).

4.2.3 Percentual de oxidação de calos formados

Ao final dos 14 dias em meio de multiplicação de calos, evidenciou o início da oxidação dos calos de cacaueteiro, seja parcial ou total. A oxidação (escurecimento) é atribuída à expressiva liberação de compostos fenólicos nesta espécie, os quais podem influenciar ou não na viabilidade do explante dependendo do procedimento utilizado (Huq et al., 2024).

A oxidação dos calos dos explantes demonstrou ser benéfica para a formação de embriões somáticos em espécies como *Piper hispidinervum* C. DC. e *Arenga pinnata* Wurm Merr (Muda; Awal, 2017; Souza et al., 2022) Por outro lado, em espécies como *Hevea brasiliensis* L., *Eucalyptus grandis* W.Hill ex Maiden e *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake, esse processo é essencial como um pré-requisito para a ocorrência da formação de embriões somáticos (Leclercq et al., 2012; Moura et al., 2019).

Autores que estudam cultivo *in vitro* oferecem diferentes explicações positivas para a presença de calos oxidados em culturas embriogênicas, tais como: morte celular programada (Liu; Yang; Shen, 2015), aumento do estresse celular que induz a reprogramação da expressão gênica (Ikeuchi et al., 2018; Su et al., 2020), e a possibilidade de que esses exsudatos tenham um papel na proteção contra condições ambientais desfavoráveis durante o cultivo (Corredoira et al., 2015; Silva-Cardoso et al., 2019).

4.2.4 Percentual de formação de embriões somáticos

Nesse estudo, ao comparar os grupos formados quanto ao potencial de formação de embriões somáticos (11 ou mais embriões), destaca-se novamente o grupo 4 (21%), que apresenta uma maior quantidade de formação de embriões somáticos, diferenciando-se estatisticamente de outro grupo com mais acessos, o grupo 5 (4%).

Além disso, conseguimos identificar que em 16 genótipos, notou-se o avanço da oxidação de seus calos, porém sem impedir a formação de embriões somáticos (9,72% maior de formação). Ou seja, o processo de escurecimento não prejudicou a embriogênese somática, podendo ter envolvimento em outros processos como: proteção dos explantes às condições estressantes *in vitro* ou auxílio no metabolismo do hormônio vegetal- auxina (Silva- Cardoso et al., 2019).

Aos 30 dias de desenvolvimento dos embriões somáticos, foi observado uma expressiva formação de embriões somáticos, na maioria dos genótipos. O processo foi assíncrono, com embriões em diferentes estádios de desenvolvimento, geralmente em

agrupamentos. Os dados também evidenciaram a ocorrência de genótipo dependência, o que é comumente reportado em cacaueteiro (Maximova et al., 2002; Kahia et al., 2017) e em várias outras espécies lenhosas, como *Cupressus sempervirens* L. (Barberini; Danti; Lambardi, 2016), *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze (Peng et al., 2022) e *Hevea brasiliensis* L. (Wang et al., 2023).

A elevada capacidade de formação de embriões somáticos observada em alguns genótipos, como 4025 M153 e 4035 M065, indica uma predisposição genética favorável, envolvendo genes específicos para uma eficiente e larga escala de regeneração de plantas que precisam ser melhor investigado, assim como reportado nos trabalhos de Elhiti, Stasolla e Wang (2013) e Garcia et al. (2022). Contudo, o surgimento de embriões somáticos com aparentemente anormalidades e a dificuldade de individualização representam um problema que requer mais investigações (Garcia et al., 2022; Henao; Osorio; Urrea, 2024). Nesse caso, torna-se necessário realizar estudos mais aprofundados sobre a espécie, os genes responsáveis e as manipulações da cultura *in vitro* que influenciam a embriogênese somática, visando sobrepor tais limitações.

Garcia et al. (2022), por exemplo, associaram a ocorrência de embriões anormais em cacaueteiro com o etileno e alterações epigenéticas. Isso se deve a utilização do regulador de crescimento 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) nos meios de cultivo de cacaueteiro levando ao aumento da produção de 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC), um precursor do etileno (Garcia et al., 2022). Resultando em ambientes hipóxicos (com insuficiência de oxigênio) em condições *in vitro*, afetando o desenvolvimento normal das células (Loreti; Perata, 2020; Weits; Dongen; Licausi, 2021).

Essa hipóxia interfere na comunicação entre as proteínas transportadoras de etileno e de efluxo de auxina, influenciando diretamente na polaridade celular, determinante para a orientação do crescimento e desenvolvimento das células vegetais, importantes para a adaptação das plantas a diferentes condições ambientais e para o desenvolvimento coordenado de seus tecidos e órgãos (Loreti; Striker, 2020; Garcia et al., 2022)

Para os embriões somáticos que apresentam formação e desenvolvimento normais, foram identificados diferentes estádios, como globulares, cordiformes, torpedos e cotiledonares (Vale et al., 2018; Botini et al., 2021). Essa classificação não apenas se aplica aos embriões zigóticos, mas também aos embriões somáticos, evidenciando a similaridade nos processos de desenvolvimento entre essas duas formas de embriogênese.

A análise estatística revelou, diferenças significativas entre os estádios globulares, torpedos e os embriões somáticos anormais. Alguns genótipos mostraram médias mais altas de formação de embriões somáticos em cada uma dessas fases: o genótipo 4038 M059 destacou-se no estágio globular, enquanto o acesso 4025 M153 foi notável tanto no estágio torpedo quanto com relação ao número de embriões somáticos anormais.

Nos estádios cordiforme e cotiledonar, onde não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os acessos avaliados, as médias mais altas foram observadas nos genótipos 4038 M059, 4035 M065 e 29 M576 para o cordiforme, enquanto os genótipos 29 M576 e 4004 M051 se destacaram com maiores médias na fase cotiledonar. Esses resultados estão diretamente ligados às características genéticas desses genótipos e podem oferecer opções promissoras para a seleção de acessos mais adequados à produção e manipulação em culturas *in vitro* (Jones et al., 2022; Bhavishya et al., 2024).

Em alguns genótipos observou-se a ocorrência da organogênese, sendo eles: 95 M400, 4020 M152. Os processos de embriogênese somática e organogênese podem ocorrer simultaneamente devido à superexpressão, ou seja, ao aumento considerável da produção de certas proteínas (fatores de transcrição) que regulam a expressão de genes (Stone et al., 2001; Boutilier et al., 2002; Gallois et al., 2004; Ikeuchi; Sugimoto; Iwase, 2013; Horstman; Bemer; Boutilier, 2017). Embora esses processos sigam rotas diferentes, eles compartilham as mesmas vias de crescimento e diferenciação celular que levam à formação de calos, órgãos adventícios e embriões somáticos, todos envolvidos na regeneração e desenvolvimento das plantas (Elhiti; Stasolla, 2022).

4.3 Caracterização morfoanatômica da diferenciação de embriões somáticos e regeneração de plantas de cacauero

Após 15 dias de cultivo em meio de regeneração de plantas, observou-se um avanço nos estádios de desenvolvimento dos embriões somáticos. No estágio globular dos embriões, assim como na fase cordiforme, a protoderme, que constitui a parte mais externa, é altamente meristemática, com uma densidade celular maior e núcleo e nucléolo visíveis (Borji et al., 2018; Márquez-López et al., 2018). A fase cordiforme se distingue pela presença de uma abertura na parte superior, onde os cotilédones começam a se formar, acompanhada por um aumento na presença de compostos fenólicos (Yan et al., 2020; Botini et al., 2021).

No estágio seguinte, conhecido como torpedo, os embriões se alongam e expandem até alcançar o estágio cotiledonar, onde ocorre uma clara diferenciação dos cotilédones para formar as primeiras folhas, acompanhada do amadurecimento de seus feixes vasculares (García-González et al., 2021; Yu et al., 2024).

Após 90 dias em meio de regeneração de plantas, observou-se uma mudança na pigmentação dos embriões somáticos para uma tonalidade esverdeada. Alguns genótipos apresentaram embriões anormais que não progrediram para estádios diferenciados, além de exibirem sinais de hiperidricidade (Nikam et al., 2019; Yılmaz; Khawar, 2024). Por outro lado, os genótipos com embriões normais mostraram desenvolvimento com formação de raízes, expansão de folhas verdes e murchamento dos cotilédones (Bustami; Werbrouck, 2024; Paisic-Ramirez et al., 2024).

5 CONCLUSÃO

A embriogênese somática é uma técnica essencial para a propagação *in vitro* do cacaueteiro, apesar das distintas respostas devido à diversidade morfológica e genética das plantas. Apesar disso, este estudo conseguiu investigar a variabilidade fenotípica e a eficácia da embriogênese somática em diferentes genótipos, revelando resultados significativos que contribuem para o entendimento das características morfológicas e seu impacto na regeneração de plantas.

Nesse estudo envolvendo 24 genótipos não-comerciais de cacaueteiro, observou-se a formação de botões florais com diferentes colorações (vermelho, roxo e verde), assim como estaminódios de diferentes cores (vermelho e roxo). A caracterização dos botões florais e estaminódios demonstrou 3 genótipos apresentando coloração arroxeadada, 9 esverdeada e 12 avermelhada.

Medições detalhadas foram realizadas quanto os diâmetros equatorial e polar dos botões florais, comprimento e comprimento basal dos estaminódios e tamanho do pedúnculo, agrupadas em categorias para correlacionar suas respostas à embriogênese somática. Observando que para análise de correlação variáveis próximas, tendem a ter resultados mais precisos, revelou-se uma correlação forte e positiva entre o diâmetro polar e equatorial dos botões florais e o comprimento e comprimento basal dos estaminódios (0,73%), indicando a importância dessas variáveis na seleção de genótipos. Para essa mesma variável, verificou-se que os estaminódios de alguns grupos como, B e D, com maior número de acessos, se desenvolvem para ter uma maior área (média de 5 mm), provavelmente relacionada a ocorrência de mais formações de calos e conseqüentemente de embriões somáticos.

Durante os processos de embriogênese somática, identificou-se se genótipos com alta taxa de formação e recobrimento com calos (4029 M031; 4038 M059; 4008 M155; 68 M210; 95 M400; 4111 M475 e 29 M576), além de taxas expressivas de oxidação (4019 M181; 4038; 4021 M035). A formação de calos predominou na base dos estaminódios, com tipos nodulares e granulares sendo os mais comuns no cacaueteiro. A formação de embriões somáticos foi assíncrona, com embriões globulares, cordiformes, torpedos e cotiledonares observados em diferentes estádios.

Alguns genótipos se destacaram por sua eficiência em todos os estádios de formação, como os acessos 29 M576, 4025 M153, 4035 M065 e 4038 M059, sugerindo sua promissora capacidade para a propagação da espécie. No entanto, apesar do alto

percentual de formação, também foram observados casos de formação de embriões somáticos anormais, o que pode dificultar a regeneração de plantas viáveis e normais. No entanto, anormalidades na formação dos embriões e a ocorrência de hiperidricidade indicam que, apesar do potencial promissor de alguns genótipos, são necessários mais estudos específicos para esses genótipos ou até mesmo ampliação para a embriogênese secundária.

Portanto, os resultados deste trabalho não apenas confirmam a variabilidade genética entre os genótipos estudados, mais também que são necessários estudos mais aprofundados que correlacionem variáveis morfométricas e processos de desenvolvimento, com atenção especial para a oxidação de calos e formação de embriões somáticos. Enfatizando a busca por marcadores morfológicos embriogênicos cruciais para otimizar as técnicas de embriogênese somática e melhorar a eficiência da propagação do cacauero, fornecendo uma base sólida para futuras investigações, visando contribuir para o sucesso na regeneração de plantas completas da espécie.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AJIJAH, N.; HARTATI, R. S.; RUBIYO; SUKMA, D.; SUDARSONO. Effective cacao somatic embryo regeneration on kinetin supplemented DKW medium and somaclonal variation assessment using SSRs markers. **Agrivita**, v. 38, n. 1, p. 80–92, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.17503/agrivita.v38i1.619>>.
- AKOA, S. P.; ONOMO, P. E.; NDJAGA, J. M.; ONDOBO, M. L.; DJOCGOUE, P. F. Impact of pollen genetic origin on compatibility, agronomic traits, and physicochemical quality of cocoa (*Theobroma cacao* L.) beans. **Scientia Horticulturae**, v. 287, n. February 2020, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110278>>.
- ALEMANNI, L.; BERTHOULY, M.; MICHAUX-FERRIÈRE, N. Histology of somatic embryogenesis from floral tissues cocoa. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 46, n. 3, p. 187–194, 1996. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/BF02307094>>. Acesso em: 05/06/2024.
- ALEMANNI, L.; RAMOS, T.; GARGADENEC, A.; ANDARY, C.; FERRIERE, N. Localization and identification of phenolic compounds in *Theobroma cacao* L. somatic embryogenesis. **Annals of Botany**, v. 92, n. 4, p. 613–623, 2003. Disponível em: <<http://doi.org/10.1093/aob/mcg177>>.
- BARBERINI, S.; DANTI, R.; LAMBARDI, M. Somatic plant regeneration from selected common cypress (*Cupressus sempervirens* L.) clones resistant to the bark canker disease. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 124, n. 2, p. 393–403, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11240-015-0902-4>>.
- BARTLEY, B.G.D. **The genetic diversity of cacao and its utilization**. Oxford: Oxford University Press, 2005. Disponível: <https://books.google.com.br/books?id=_I40iGVJD64C&printsec=frontcover&hl=pt-BR&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false>. Acesso em: 20/10/2024.
- BHAVISHYA; BHAT, R.; APSHARA, S. E.; PUSHPA, T. N.; PRASAD, D. S.; NAYANA, H.; THUBE, S. H.; PANDIAN, R. T. P.; RAMESH, S. V. Genotypic variation in flowering, fruit set, and cherelle wilt, and their relationship with leaf nutrient status in cocoa (*Theobroma cacao* L.) grown in humid tropics of India. **Innovations in Agriculture**, v. 7, p. 1–5, 2024. Disponível em: <<https://doi.org/10.3897/ia.2024.124253>>.
- BORGHI, M.; FERNIE, A. R. Floral metabolism of sugars and amino acids: Implications for pollinators' preferences and seed and fruit set. **Plant Physiology**, v. 175, n. 4, p. 1510–1524, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1104/pp.17.01164>>.
- BORJI, M.; BOUAMAMA-GZARA, B.; CHIBANI, F.; TEYSSIER, C.; AMMAR, A. B.; MLIKI, A.; ZEKRI, S.; GHORBEL, A. Micromorphology, structural and ultrastructural changes during somatic embryogenesis of a Tunisian oat variety (*Avena sativa* L. var 'Meliane'). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 132, n. 2, p. 329–342, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11240-017-1333-1>>.

BOUTILIER, K.; OFFRINGA, R.; SHARMA, V. K.; KIEFT, H.; OUELLET, T.; ZHANG, L.; HATTORI, J.; LIU, C. M.; VAN LAMMEREN, A. A. M.; MIKI, B. L. A.; CUSTERS, J. B. M.; VAN LOOKEREN CAMPAGNE, M. M. Ectopic expression of BABY BOOM triggers a conversion from vegetative to embryonic growth. **Plant Cell**, v. 14, n. 8, p. 1737–1749, 2002. Disponível em: <www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.001941>.

BUSTAMI, M. U.; WERBROUCK, S. P. O. Cyclic Somatic Embryogenesis in Indonesian Elite *Theobroma cacao* L. Clones. **Horticulturae**, v. 10, n. 1, 2024. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/horticulturae10010024>>.

CARNEIRO, F. D. S.; QUEIROZ, S. R. D. O. D.; PASSOS, A. R.; NASCIMENTO, M. N.; SANTOS, K. S. Embriogênese somática em *Agave sisalana* Perrine: indução, caracterização anatômica e regeneração. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 44, p. 294–303, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1983-40632014000300005>>.

CORREDOIRA, E.; BALLESTER, A.; IBARRA, M.; VIEITEZ, A. M. Induction of somatic embryogenesis in explants of shoot cultures established from adult *Eucalyptus globulus* and *E. saligna* × *E. maidenii* trees. **Tree Physiology**, v. 35, n. 6, p. 678–690, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/treephys/tpv028>>.

DAOUDA, K.; MODESTE, K. K.; OULO, N. A.; EDMOND, K. K. Induction of somatic embryos of recalcitrant genotypes of *Theobroma cacao* L. **Journal of Applied Biosciences**, v. 133, n. 1, p. 13552-13560, 2019. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.4314/jab.v133i1.7>>.

DRIVER, J. A.; KUNIYUKI, A. H. *In vitro* propagation of Paradox Walnut Rootstock. **HortScience**, v. 19, n. 4, p. 507-509, 1984. Disponível em: <<https://doi.org/10.21273/HORTSCI.19.4.507>>.

ELHITI, M.; STASOLLA, C.; WANG, A. Molecular regulation of plant somatic embryogenesis. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 49, n. 6, p. 631–642, 2013. Disponível em: <<http://doi.org/10.1007/s11627-013-9547-3>>.

ELHITI, M.; STASOLLA, C. Transduction of Signals during Somatic Embryogenesis. **Plants**, v. 11, n. 2, p. 1–16, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/plants11020178>>.

ESAN, E. B. Tissue culture studies on cocoa (*Theobroma cacao* L.) - a supplementation of current research. In: Proceedings V international cacao research conference. Ibadan: **Cacao Research Institute of Nigeria**. p. 116–125, 1975. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-3-642-76422-6_5>

GALLOIS, J. L.; NORA, F. R.; MIZUKAMI, Y.; SABLONSKI, R. WUSCHEL induces shoot stem cell activity and developmental plasticity in the root meristem. **Genes and Development**, v. 18, n. 4, p. 375–380, 2004. Disponível em: <<http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.291204>>.

GARCIA, C.; ALMEIDA, A. A. F.; COSTA, M.; BRITTO, D.; CORREA, F.; MANGABEIRA, P.; SILVA, L.; SILVA, J.; ROYAERT, S.; MARELLI, J. P. Single-base resolution methylomes of somatic embryogenesis in *Theobroma cacao* L. reveal epigenome modifications associated with somatic embryo abnormalities. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 1–19, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-022-18035-9>>.

GARATE-NAVARRO, M. A.; ARÉVALO-GARDINI, E. Induction of Somatic Embryogenesis from Cocoa Farmer Field Collection of ICT - Peru. **International Annals of Science**, v. 2, n. 1, p. 6–11, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.21467/ias.2.1.6-11>>.

GARCIA, C.; ALMEIDA, A. A. F.; COSTA, M.; BRITTO, D.; CORREA, F.; MANGABEIRA, P.; SILVA, L.; SILVA, J.; ROYAERT, S.; MARELLI, J. P. Single-base resolution methylomes of somatic embryogenesis in *Theobroma cacao* L. reveal epigenome modifications associated with somatic embryo abnormalities. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 1–19, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-18035-9>>.

GARCÍA-GONZÁLEZ, D. A.; DEL SOCORRO SANTOS-DÍAZ, M.; FLORES-MARGEZ, J. P.; OSUNA-ÁVILA, P. Effects of the growth regulators for the induction of somatic embryos from different explants of *Echinocactus parryi* Engelm., an endemic and endangered species. **Revista Chapingo, Serie Ciencias Forestales y del Ambiente**, v. 27, n. 3, p. 431–447, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2020.08.053>>

GEORGES, N. G. P. K.; EMILE, M.; MODESTE, K. K.; SIAKA, K.; THEODORE, D. N.; CHRISTOPHE, K.; JEAN-CLAUDE, N. Preferential expression of somatic embryogenesis in five elite genotypes of *Theobroma cacao* (L.) associated with explant type and protocols used. **African Journal of Biotechnology**, v. 22, n. 12, p. 347–359, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.5897/AJB2023.17568>>.

GONZÁLEZ, L. S. M.; ROJAS, C. Y. G.; RIECHE, A. K. S. Obtención de embriones somáticos primarios de *Theobroma cacao* en clones de interés regional para el departamento norte de Santander, Colombia. **Respuestas**, v. 10, n. 1, p. 21-29, 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.22463/0122820X.675>>.

GUAN, Y.; LI, S.; FAN, X.; SU, Z. Application of Somatic Embryogenesis in Woody Plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1–12, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00938>>.

HA, L. T. V.; HANG, P. T.; EVERAERT, H.; ROTTIERS, H.; ANH, L. P. T.; DUNG, T. N.; PHUOC, P. H. D.; TOAN, H. T.; DEWETTINCK, K.; MESSENS, K. Characterization of leaf, flower, and pod morphology among vietnamese cocoa varieties (*Theobroma cacao* L.). **Pakistan Journal of Botany**, v. 48, n. 6, p. 2375–2383, 2016. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/312040661_Characterization_of_leaf_flower_and_pod_morphology_among_vietnamese_cocoa_varieties_Theobroma_cacao_L>. Acesso em 22/06/2024.

HENAO, A. M.; OSORIO, T.; URREA, A. I. Tissue Culture of Cacao (*Theobroma cacao* L.): Between Somaclonal Variation and Mass Propagation. In: SÁNCHEZ-ROMERO, C. (ed.) **Somaclonal Variation: Basic and Practical Aspects**. Malaga-Spain: Springer, 2023. p. 143-168. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/978-3-031-51626-9>>.

HORSTMAN, A.; BEMER, M.; BOUTILIER, K. A transcriptional view on somatic embryogenesis. **Regeneration**, v. 4, n. 4, p. 201–216, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/reg2.91>>.

HUNTER, J. R. The Status of Cacao (*Theobroma cacao*, Sterculiaceae) in the Western Hemisphere. **Economy Botany**, v. 44, n. 4, p. 425–439, 1990. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/BF02859775>>.

HUQ, A. K. M. M.; RONEY, M.; DUBEY, A.; NASIR, M. H.; TUFAIL, A.; ALUWI, M. F. F. M.; ISHAK, W. M. W.; ISLAM, M. R.; TAJUDDIN, S. N. Phenolic compounds of *Theobroma cacao* L. show potential against dengue RdRp protease enzyme inhibition by In-silico docking, DFT study, MD simulation and MMGBSA calculation. **PLoS ONE**, v. 19, n. 3, 2024. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0299238>>.

IKEUCHI, M.; SHIBATA, M.; RYMEN, B.; IWASE, A.; BGMAN, A. M.; WATT, L.; COLEMAN, D.; FAVERO, D. S.; TAKAHASHI, T.; AHNERT, S. E.; BRADY, S. M.; SUGIMOTO, K. A Gene Regulatory Network for Cellular Reprogramming in Plant Regeneration. **Plant and Cell Physiology**, v. 59, n. 4, p. 765–777, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/pcp/pcy013>>.

IKEUCHI, M.; SUGIMOTO, K.; IWASE, A. Plant callus: Mechanisms of induction and repression. **Plant Cell**, v. 25, n. 9, p. 3159–3173, 2013. Disponível em: <www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.113.116053>.

KAHIA, J.; KONE, S.; DIBY, L.; NGORAN, G.; DADJO, C.; KOUAME, C. Enhanced plantlet regeneration in two cacao (*Theobroma cacao*) clones from immature inflorescence explants. **HortScience**, v. 52, n. 6, p. 892–895, 2017. Disponível em: <10.21273/HORTSCI11844-17>.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal cell biology**, v. 27, p. 137–138, 1965. Disponível em: <<https://www.jstor.org/stable/1604673>>. Acesso em: 20/08/2023.

JEAN-MARIE, E.; JIANG, W.; BEREAU, D.; ROBINSON, J. C. *Theobroma cacao* and *Theobroma grandiflorum*: Botany, Composition and Pharmacological Activities of Pods and Seeds. **Foods**, v. 11, n. 24, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/foods11243966>>.

JONES, J.; ZHANG, E.; TUCKER, D.; RIETZ, D.; DAHLBECK, D.; GOMEZ, M.; GARCIA, C.; MARELLI, J. P.; LIVINGSTONE, D.; SCHNELL, R.; STASKAWICZ, B.; CHO, M. J. Screening of cultivars for tissue culture response and establishment of genetic transformation in a high-yielding and disease-resistant cultivar of *Theobroma cacao*. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 58, n. 1, p. 133–145, 1 fev. 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11627-021-10205-0>>.

LEÓN, J. **Botánica de los cultivos tropicales**. San José- Costa Rica: Agroamérica, 2000. 3 ed. p. 104-109. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?id=NBtu79LJ4h4C&printsec=frontcover&hl=pt-BR&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q=theobroma&f=false>. Acesso em: 20/06/2024.

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**, v. 34, p. 293-299, 1998. Disponível em: <<https://www.jstor.org/stable/20065005>>. Acesso em: 20/08/2023.

LOPEZ-BAEZ, ORLANDO; BOLLON, HÉLÈNE; ESKES, ALBERTUS; PETIARD, V. Embryogénese somatique de cacaoyer *Theobroma cacao* L. à partir de pièces florales: Somatic embryogenesis and plant regeneration from flower parts of cocoa *Theobroma cacao* L. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences**, v. 316, n. 6, p. 579-584, 1993. Disponível em: <https://ceune.unach.mx/images/pdf_audes/publicaciones/5.pdf>. Acesso em: 02/03/2023.

LORETI, E.; STRIKER, G. G. Plant responses to hypoxia: Signaling and adaptation. **Plants**, v. 9, n. 12, p. 1–4, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/plants9121704>>.

LORETI, E.; PERATA, P. The many facets of hypoxia in plants. **Plants**, v. 9, n. 6, p. 1–14, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/plants9060745>>.

MÁRQUEZ-LÓPEZ, R. E.; PÉREZ-HERNÁNDEZ, C.; KU-GONZÁLEZ, Á.; GALAZ-ÁVALOS, R. M.; LOYOLA-VARGAS, V. M. Localization and transport of indole-3-acetic acid during somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. **Protoplasma**, v. 255, n. 2, p. 695–708, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00709-017-1181-1>>.

MARTÍNEZ, I. B.; CRUZ, M. V.; NELSON, M. R.; BERTIN, P. Morphological characterization of traditional cacao (*Theobroma cacao* L.) plants in Cuba. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 64, n. 1, p. 73–99, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10722-015-0333-4>>.

MAXIMOVA, S. N.; ALEMANNI, 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 Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 38, n. 3, p. 252–259, 2002. Disponível em: <<https://doi.org/10.1079/IVP2001257>>.

MAXIMOVA, S. N.; YOUNG, A.; PISHAK, S.; MILLER, C.; TRAORE, A.; GUILTINAN, M. J.; MOHAN, S. Integrated system for propagation of *Theobroma cacao* L. In: JAIN, S. M.; GUPTA, P. K. (eds.). **Protocol for Somatic Embryogenesis in Woody Plants**, The Netherlands: Forestry Sciences, 2005, v. 77, p. 209-227. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/1-4020-2985-3_17>.

MINYAKA, E.; NIEMENAK, N.; FOTSO; SANGARE, A.; NDOUMOU OMOKOLO, D. Effect of MgSO₄ and K₂SO₄ on somatic embryo differentiation in *Theobroma cacao* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 94, n. 2, p. 149–160, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11240-008-9398-5>>.

MONTOYA, T. O.; RAMÍREZ, A. M. H.; VASQUEZ, T. L. H.; TRUJILLO, A. I. U. Propagation of IMC67 Plants, Universal Cacao (*Theobroma cacao* L.) Rootstock via Somatic Embryogenesis. **International Journal of Fruit Science**, v. 22, n. 1, p. 78–94, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/15538362.2021.2023067>>.

MUDA, N. A.; AWAL, A. Somatic embryogenesis in sugar palm (*Arenga pinnata* wurmb merr.) from zygotic embryo explants. **Pertanika Journal of Science and Technology**, v. 25, n. S7, p. 133–144, 2017. Disponível em: <<http://mymedr.afpm.org.my/publications/59558>>. Acesso em: 20/06/2024.

MUSTIGA, G. M.; GEZAN, S. A.; PHILLIPS-MORA, W.; ARCINIEGAS-LEAL, A.; MATA-QUIRÓS, A.; MOTAMAYOR, J. C. Phenotypic description of *Theobroma cacao* L. for yield and vigor traits from 34 hybrid families in Costa Rica based on the genetic basis of the parental population. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 1–17, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00808>>.

NAGEL, M.; PENCE, V.; BALLESTEROS, D.; LAMBARDI, M.; POPOVA, E.; PANIS, B. Plant Cryopreservation: Principles, Applications, and Challenges of Banking Plant Diversity At Ultralow Temperatures. **Annual Review of Plant Biology**, v. 75, p. 1–28, 2024. Disponível em: <<https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-070623-103551>>.

NIEMENAK, N.; ROHSIUS, C.; GMBH, R.; LIEBEREI, R. Regeneration of somatic embryos in *Theobroma cacao* L. in temporary immersion bioreactor and analyses of free amino acids in different tissues. **Plant cell reports**, v. 27, p. 667-676, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00299-007-0497-2>>.

NIEVES-ORDUÑA, H. E.; KRUTOVSKY, K.V.; GAILING, O. Geographic distribution, conservation and genomic resources of cacao *Theobroma cacao* L. **Crop Science**, v. 63, n.4, p.1750-1778, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/csc2.20959>>.

NIKAM, T. D.; MULYE, K. V.; CHAMBHARE, M. R.; NIKULE, H. A.; AHIRE, M. L. Reduction in hyperhydricity and improvement in in vitro propagation of commercial hard fibre and medicinal glycoside yielding *Agave sisalana* Perr. ex Engelm by NaCl and polyethylene glycol. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 138, n. 1, p. 67–78, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11240-019-01603-9>>.

NUNES, R. F. de M.; FILHO, C. F. D.; ROCHA, A. M. M. R. Embriogênese Somática em Tamareira. **Embrapa Semiárido**, p. 1-5, 2002. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/201370/1/aRTIGO.pdf>>. Acesso em: 16/07/2023.

O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MCCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, v. 59, n. 2, p. 368-373, 1964. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/BF01248568>>.

OHSE, S. Sementes recalitrantes: Um apanhado. Curitiba: **Visão Acadêmica**, v. 23, n. 2, p. 14–48, 2022. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5380/acd.v23i2.82551>>.

PAISIC-RAMIREZ, R.; HERNÁNDEZ-AMASIFUEN, A. D.; SÁNCHEZ-AGUILAR, W. D.; CORAZON-GUIVIN, M. A.; BOBADILLA, L. G.; MANSILLA-CÓRDOVA, P. J.; CAETANO, A. C.; ZUTA, M. Z. S.; GUERRERO-ABAD, J. C. Effect of osmoregulatory on the secondary somatic embryogenesis of cocoa (*Theobroma cacao* L.). **Journal of Applied Biology and Biotechnology**, v. 12, n. 4, p. 177–183, 2024. Disponível em: <<https://doi.org/10.7324/JABB.2024.180092>>.

PENCE, V. C.; HASEGAWA, P. M.; JANICK, J. Asexual Embryogenesis in *Theobroma cacao* L. **American Society**, v. 104, n. 2, p. 145–148, 1979.

PENG, C.; GAO, F.; WANG, H.; TRETYAKOVA, I. N.; NOSOV, A. M.; SHEN, H.; YANG, L. Morphological and Physiological Indicators for Screening Cell Lines with High Potential for Somatic Embryo Maturation at an Early Stage of Somatic Embryogenesis in *Pinus Koraiensis*. **Plants**, v. 11, n. 14, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/plants11141867>>.

R. CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria., 2015. Disponível em: <<https://www.r-project.org>>. Acesso em: 15/04/2024.

QUEIROGA, V. P.; GOMES, J. P.; MELO, B.A.; ALBUQUERQUE, E. M. B. Sistema produtivo de cacau (*Theobroma cacao* L.) orgânico sobreado. In: QUEIROGA, V. P.; GOMES, J. P.; MELO, B.A.; ALBUQUERQUE, E. M. B (eds.). **Cacau (*Theobroma cacao* L.) orgânico sobreado tecnologias de plantio e produção da amêndoa fina**. Campina Grande: A Barriguda, 2021. p. 10-245. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/348522684_CACAU_Theobroma_cacao_L_ORGANICO_SOMBREADO_TECNOLOGIAS_DE_PLANTIO_E_PRODUCAO_DA_AMENDO_A_FIN_A>. Acesso em: 15/01/2024.

RAMASAMY, G.; RAMASAMY, S.; RAVI, N. S.; KRISHNAN, R.; SUBRAMANIAN, R.; RAMAN, R.; DURAIALAGURAJA, S.; MUTHURAJAN, R.; VELLAICHAMY, J. Haploid embryogenesis and molecular detection of somatic embryogenesis receptor-like kinase (TcSERK) genes in sliced ovary cultures of cocoa (*Theobroma cacao* L.). **Plant Biotechnology Reports**, v. 16, n. 3, p. 283–297, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11816-022-00756-y>>.

RAMÍREZ, A. M. H.; VASQUEZ, T. H.; OSORIO, T. M. O.; GARCÉS, L. A.; TRUJILLO, A. I. U. Evaluation of the potential of regeneration of different Colombian and commercial genotypes of cocoa (*Theobroma cacao* L.) via somatic embryogenesis. **Scientia Horticulturae**, v. 229, p. 148–156, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2017.10.040>>.

RAMÍREZ, A. M. H.; HAJDUK, D. H. P.; TRUJILLO, A. I. U. Cost Analysis of Cacao (*Theobroma cacao* L.) Plant Propagation through the Somatic Embryogenesis Method. **Bionatura**, v. 7, n. 2, p. 1-13, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.21931/RB/2022.07.02.2>>.

- ROSABAL, L. F.; PUEBLA, Y. G.; PÉREZ, S. R.; CORDOVÍ, U. M. R.; PUPO, J. J. S.; WERBROUCK, S. P. O. Effects of salicylic acid on the production of polyphenols and the reducing power of *Theobroma cacao* calli. **Current Research in Biotechnology**, v. 4, n. September 2021, p. 47–57, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.crbiot.2021.12.005>>.
- SALAZAR, R. V.; SANDREA, Y.; BETANCOURT, C.; MATA, J.; GARCÍA, F. Embriogénesis somática en cultivares de cacao venezolanos. **Agronomía Tropical**, v. 56, n. 1, p. 61–74, 2006. Disponível em: <<https://ve.scielo.org/pdf/at/v56n1/art04.pdf>>. Acesso em: 10/04/2023.
- SALLES, B. P. A.; DAVID, A. M. S. S.; FIGUEIREDO, J. C.; MAIA, V. M.; PRUDÊNCIO, J. R. S.; PEREIRA, K. K. G. Viabilidade de Sementes de Cacau e Limitações no Armazenamento. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 42, n. 4, p. 1010–1014, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.19084/rca.18166>>.
- SILVA-CARDOSO, I. M. A.; MEIRA, F. S.; GOMES, A. C. M. M.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Anatomical and histochemical studies of the somatic embryogenesis of *Syagrus oleracea* from immature inflorescences. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 19, n. 4, p. 444–450, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/1984-70332019v19n4n62>>.
- SILVA, E. A.; AMADO, G. F.; DELGADO, M. N. Confecção e uso didático de guia de morfologia vegetal com espécies do cerrado, 2022. v. 11, n. 1, p. 16-28. Disponível em: <<https://arquivorevistaeixo.ifb.edu.br/index.php/RevistaEixo/article/view/886/593>>. Acesso em: 10/06/2024.
- SU, Y. H.; TANG, L. P.; ZHAO, X. Y.; ZHANG, X. S. Plant cell totipotency: Insights into cellular reprogramming. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 63, n. 1, p. 228–243, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/jipb.12972>>.
- STONE, S. L.; KWONG, L. W.; YEE, K. M.; PELLETIER, J.; LEPINIEC, L.; FISCHER, R. L.; GOLDBERG, R. B.; HARADA, J. J. LEAFY COTYLEDON2 encodes a B3 domain transcription factor that induces embryo development. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 20, p. 11806–11811, 2001. Disponível em: <www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.201413498>.
- SWANSON, J. D.; CARLSON, J. E.; GUILTINAN, M. J. Comparative flower development in *Theobroma cacao* based on temporal morphological indicators. **International Journal of Plant Sciences**, v. 169, n. 9, p. 1187–1199, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1086/591986>>.
- TRAORE, A.; GUILTINAN, M. J. Effects of carbon source and explant type on somatic embryogenesis of four cacao genotypes. **HortScience**, v. 41, n. 3, p. 753–758, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.21273/HORTSCI.41.3.753>>

TRUJILLO, A. I.; GARCÉS, L. A. U.; RÚA, A. M. G. Regeneración vía embriogénesis somática de una variedad colombiana élite de *Theobroma cacao* L. **Revista Colombiana Biotecnología**, v. 13, n. 2, p. 39–50, 2011. Disponível em: <<https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/27916/28655>>. Acesso em: 12/02/2023.

VALE, E. M.; REIS, R. S.; PASSAMANI, L. Z.; SANTA-CATARINA, C.; SILVEIRA, V. Morphological analyses and variation in carbohydrate content during the maturation of somatic embryos of *Carica papaya*. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 24, n. 2, p. 295–305, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12298-017-0501-4>>.

VÁSQUEZ-GARCÍA, J.; SANTOS-PELAEZ, J. C.; MALQUI-RAMOS, R.; VIGO, C. N.; ALVARADO C., W.; BOBADILLA, L. G. Agromorphological characterization of cacao (*Theobroma cacao* L.) accessions from the germplasm bank of the National Institute of Agrarian Innovation, Peru. **Heliyon**, v. 8, n. 10, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e10888>>.

WANG, X.; GU, X.; XU, Z.; YIN, Z.; YANG, X.; LIN, R.; ZHOU, Q.; HUANG, H.; HUANG, T. Current Achievements and Future Challenges of Genotype-Dependent Somatic Embryogenesis Techniques in *Hevea brasiliensis*. **Forests**, v. 14, n. 9, p. 1–17, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/f14091891>>.

WEITS, D. A.; VAN DONGEN, J. T.; LICAUSI, F. Molecular oxygen as a signaling component in plant development. **New Phytologist**, v. 229, n. 1, p. 24–35, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/nph.16424>>.

YAN, R.; WANG, C.; WANG, J.; NIE, R.; SUN, H. High-efficiency somatic embryogenesis techniques for different hybrids of cut lilies. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 143, n. 1, p. 145–157, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11240-020-01904-4>>.

YILMAZ, S. S.; KHAWAR, K. M. The Effect of H₃ BO₃ and 2,4-D on in vitro Callus and Somatic Embryo Formation of Bitter Melon (*Momordica charantia* L.). **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 33, n. 2, p. 1421–1427, 2024. Disponível em: <<https://doi.org/10.15244/pjoes/173443>>.

YU, Y.; YANG, B.; MA, D.; GUO, S.; LIAO, F.; LI, Z. Study on the induction of somatic embryogenesis and morphological structural changes during the development of *Handeliidendron bodinieri* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 156, n. 2, p. 1–14, 2024. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11240-023-02668-3>>.