

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS
GENÉTICOS VEGETAIS**

Liliana Alexandra Pila Quinga

**EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA, METILAÇÃO DO DNA E
PROTEÔMICA EM QUATRO GENÓTIPOS DE *Theobroma cacao*
L. DO EQUADOR**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Ciências, área de concentração em Recursos Genéticos Vegetais. Orientador: Prof. Miguel Pedro Guerra. Co-orientador. Dr. Douglas Steinmacher.

**Florianópolis
2013**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Pila, Liliana Alexandra

Embriogênese somática, metilação do DNA e proteômica em quatro genótipos de *Theobroma cacao* L. do Equador / Liliana Alexandra Pila ; orientador, Miguel Pedro Guerra ; co-orientador, Douglas André Steinmacher. - Florianópolis, SC, 2013.

121 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais.

Inclui referências

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. Embriogênese somática. 3. *Theobroma cacao*. 4. Proteômica. 5. Metilação do DNA. I. , Miguel Pedro Guerra. II. Steinmacher, Douglas André. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. IV. Título.

Aos meus pais, Carlos e Maria, e a minha irmã, Geovanna.

Dedico e ofereço

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Catarina, e ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, pela acolhida, pela formação acadêmica e por possibilitar a realização do mestrado.

Á o meu orientador Prof. Dr. Miguel Pedro Guerra pela confiança depositada e a oportunidade de realizar este trabalho junto ao LFDGV.

Ao Dr. Douglas André Steinmacher pela coorientação, amizade, estímulo e colaboração.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo apoio financeiro.

Aos meus colegas de turma e de trabalho, pelo companheirismo, amizade e aos momentos felizes nos laboratórios.

À minha família, pelo apoio e incentivo.

A todas as pessoas que colaboraram para o feliz termino deste trabalho.

Muito obrigada!

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1 – ESTADO DA ARTE E SITUAÇÃO DO PROBLEMA.....23

Figura 1 – Distribuição geográfica da diversidade genética de cacaueteiro (*Theobroma cacao* L). Fonte: MOTAMAYOR *et al.*, 2008.....24

Figura 2 – Estrutura da flor de *Theobroma cacao* L. Figura: ALAM CHOU, 2008.....27

Figura 3. Modelo hipotético dos eventos que modulam a embriogênese somática (FEHÉR, 2005)..30

Figura 4. Rotas morfogenéticas *in vitro* estabelecidas para o cacaueteiro (*Theobroma cacao* L.). a- Crescimento de calo primário; b- Crescimento de calo secundário; c - Desenvolvimento de embriões (KLERK *et al.*, 1997 e NIEMENAK *et al.*, 2008).....33

Figura 5. Aplicações de estudos em proteômica em diferentes sistemas biológicos (HAN *et al.*, 2004; ALTELAAR *et al.*, 2012).....37

CAPÍTULO 2 – VARIABILIDADE E EFICIÊNCIA GENOTÍPICA DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE CACAUEIRO (*Theobroma cacao* L.).....55

Figura 1. Fases da embriogênese somática de *Theobroma cacao* L. a) Indução da embriogênese somática primária a partir de estaminóides; b) Calo derivado de estaminóides; c) Expressão da embriogênese somática primária; d) Embriogênese somática direta; e,g) Expressão da embriogênese somática secundária; h) Embrião somático leitoso normal; i) Embrião somático translucido normal; f) Conversão do embrião somático; j) Plântula regenerada *in vitro*.....65

Figura 2. Número médio de embriões somáticos dos tipos leitoso normal e anormal, translúcido normal e anormal observados durante a embriogênese somática primária e secundária de *Theobroma cacao* L. dos genótipos EET 103, EET 111 e SA 1. Valores médios seguidos de \pm erro padrão (barras verticais). As letras minúsculas indicam diferencia estatística entre os tipos de embriões do genótipo EET 103. Os dados foram transformados para Log (x+1), submetidos a ANOVA e teste de separação de médias TUKEY ($p < 0,05$).....67

Figura 3. Processo de conversão dos embriões somáticos de *Theobroma cacao* L. a) Embrião somático leitoso normal; b) Secção longitudinal do embrião leitoso submetido ao teste de ATO, mostrando polaridade definida e faixa procambial evidente; c) Secção transversal do embrião, ressaltado a presença de feixes vasculares e de compostos fenólicos; d) Secção longitudinal submetida ao teste de ATO, revelando a presença de células mais densas na região do meristema apical; e) Secção longitudinal submetida ao teste de ATO, evidenciando a presença de células mais densas na região do ápice radicular; f) Início da conversão emergência de raiz primária; g) Esverdecimento dos cotilédones; h) Primórdios foliares; i) Plântula regenerada in vitro; j) Embrião somático translúcido normal; k) Secção longitudinal do embrião submetida ao teste de ATO, revelando polaridade definida e faixa procambial evidente; l) Secção longitudinal submetida ao teste de ATO, presença de células mais densas na região do ápice radicular; m) Secção transversal do embrião, ressaltado a presença de feixes vasculares e compostos fenólicos; n) Secção longitudinal submetida ao teste de ATO, presença de células mais densas na região do meristema apical; o-p) Embrião somático translúcido após a conversão.....70

Figura 4. Porcentagem de conversão dos embriões somáticos do tipo leitoso e translúcido dos genótipos EET 103 e EET 111 de *Theobroma cacao* L. Valores médios seguidos de \pm desvio padrão. As letras minúsculas indicam diferença estatística entre os tipos de embriões dentro dos genótipos. Os dados foram transformados para Log (x+1), submetidos a ANOVA e teste de separação de médias TUKEY ($p < 0,05$).....71

CAPÍTULO 3 – ESTUDO DA METILAÇÃO DO DNA GLOBAL DE EMBRIÕES SOMÁTICOS E PLÂNTULAS DE *Theobroma cacao* L. POR MEIO DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA HPLC/UV.....79

Figura 1. Metilação global (5mdC) expressada em porcentagem quantificada por HPLC/UV da relação embrião somático-plântula de *Theobroma cacao* L. após a conversão. A. Conversão dos embriões do tipo leitoso no genótipo EET 103 e EET 111. B. Conversão dos embriões do tipo Translúcido no genótipo EET 103 e EET 111. Valores médios seguidos de \pm desvio padrão (barras verticais). Letras maiúsculas representam diferenças entre os genótipos e letras minúsculas entre embriões somáticos e plantas. Os dados foram submetidos a ANOVA e teste de separação de médias TUKEY ($p < 0,05$).....88

CAPÍTULO 4 – PROTEÔMICA COMPARATIVA DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE *Theobroma cacao* L.....97

Figura 1. Embriogênese somática de *Theobroma cacao* L. a) Expressão da embriogênese somática secundária; b) Embrião somático leitoso normal; c) Embrião somático translúcido normal.....99

Figura 2. Proteínas totais ($\mu\text{g}/\text{mg}$ MF) dos embriões somáticos do tipo leitoso e translúcido do genótipo EET 103 de *Theobroma cacao* L. Quantificação segundo Método de BRADFORD (1976).....105

Figura 3. Perfil proteico de embriões somáticos no estágio cotiledonar de *Theobroma cacao* L. a) Embriões somáticos do tipo leitoso; b)- Embriões somáticos do tipo translúcido.....107

Figura 4. Distribuição das proteínas expressas nos géis 2D dos embriões somáticos do tipo leitoso e translúcido do genótipo EET 103 de *Theobroma cacao* L. a) Distribuição das proteínas expressas segundo o pI; b) Distribuição das proteínas expressas segundo o peso molecular em KDa.....108

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2 – VARIABILIDADE E EFICIÊNCIA GENOTÍPICA DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE CACAUEIRO (<i>Theobroma cacao</i> L.).....	53
--	-----------

Tabela 1. Eficiência embriogênica do cacauzeiro (<i>Theobroma cacao</i> L.) a partir de estaminóides (embriogênese primária) e cotilédones de embriões somáticos (embriogênese secundária).....	62
---	-----------

CAPÍTULO 3 – ESTUDO DA METILAÇÃO DO DNA GLOBAL DE EMBRIÕES SOMÁTICOS E PLÂNTULAS DE <i>Theobroma cacao</i> L. POR MEIO DE CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA HPLC/UV.....	79
--	-----------

Tabela 1. Valores de metilação do (5mdC) expressados em porcentagem quantificada por HPLC/UV dos embriões somáticos e das plântulas de <i>Theobroma cacao</i> L. dos genótipos EET 103 e EET 111.....	85
--	-----------

CAPÍTULO 4 – PROTEÔMICA COMPARATIVA DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE <i>Theobroma cacao</i> L.....	97
---	-----------

Tabela 1. Proteínas de embriões somáticos de <i>Theobroma cacao</i> L. identificadas por MALDI-TOF-MS.....	111
---	------------

LISTA DE ABREVIATURAS

% - porcentagem
2,4-D – ácido 2,4-diclorofenoxiacético
2-DE- Eletroforese Bidimensional
5mC – 5'-metilcitidina
5mdC – 5'-metildeoxicidina
ABA – ácido abscísico
ADC- Arginina descarboxilase
AG₃ – ácido giberélico
ANOVA – análise de variância
AzaC – 5-Azacidina
BAP – 6-benzilaminopurina
CCA – Centro de Ciências Agrárias
CHAPS-3[(3-cholamidopropyl)dimetilamino]- 1 propanesulfonate
DKW- meio de cultura proposto por Driver e Kuniyuki
DNA-Ácido desoxiribonucleico
DNMT - DNA metiltransferase
dNTP - deoxirribonucleotídeo fosfatado
DTT- Ditionitrito
ED-desenvolvimento de embriões
EDTA- Ácido etilenodiamino Tetra-acético
H- Horas
HCL- Ácido clorídrico
HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência
IEF- Focalização isoeletrica
IPG- Gradiente de pH imobilizado
LEA- late embryogenesis abundant
LFDGV – Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal
MF- Massa fresca

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	9
LISTA DE TABELAS.....	12
LISTA DE ABREVIATURAS	13
1. INTRODUÇÃO.....	19
2. OBJETIVOS	21
1.1 Objetivo Geral	21
1.2 Objetivos Específicos	21
CAPÍTULO 1 – ESTADO DA ARTE E SITUAÇÃO DO PROBLEMA.....	23
1. <i>Theobroma cacao</i>	23
2. Embriogênese somática	28
3. Embriogênese somática de cacaueteiro (<i>Theobroma cacao</i> L.)	31
4. Metilação do DNA em plantas.....	34
6. Referências bibliográficas	40
CAPÍTULO 2 – VARIABILIDADE E EFICIÊNCIA GENOTÍPICA DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE CACAUEIRO (<i>Theobroma cacao</i> L.)	55
1. Resumo.....	55
2. Abstract... ..	56
3. Introdução.....	57
4. Material e métodos	58
4.1 Material Vegetal.....	58
4.2 Indução da embriogênese somática	58
4.3 Embriogênese somática primária.....	58
4.4 Embriogênese somática secundária	59
4.5 Conversão de embriões somáticos.....	60

4.6	Análises histológicas por microscopia óptica.....	60
5.	Resultados e discussão	61
5.1	Embriogênese somática primária e embriogênese somática secundária.....	61
5.2	Análises histológicas por microscopia óptica.....	68
5.3	Conversão de embriões somáticos	68
6.	Referencias bibliográficas	73

CAPÍTULO 3 – ESTUDO DA METILAÇÃO DO DNA GLOBAL DE EMBRIÕES SOMÁTICOS E PLÂNTULAS DE *Theobroma cacao* L. POR MEIO DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA HPLC/UV. 79

1.	Resumo.....	79
2.	Abstract... ..	80
3.	Introdução	81
4.	Material e métodos.....	82
4.1	Material vegetal.....	82
4.2	Extração de DNA	82
4.3	Digestão de ácidos nucleicos.....	83
4.4	Análise por HPLC/UV	84
5.	Resultados e discussão	85
6.	Referencias bibliográficas	93

CAPÍTULO 4 – PROTEÔMICA COMPARATIVA DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE *Theobroma cacao* L. 97

1.	Resumo.....	97
2.	Abstract... ..	98
3.	Introdução	99
4.1	Material vegetal.....	100
4.2	Extração de proteína.....	100
4.3	Quantificação de proteína.....	101
4.4	Eletroforese bidimensional (2D) de proteínas.....	102
4.5	Análise dos géis.....	103
4.6	Digestão e obtenção dos perfis de massa das proteínas relevantes, e identificação das proteínas.	103
5.	Resultados e discussão	104
5.1	Comparação e análise dos perfis de proteína dos embriões somáticos.....	104
5.2	Identificação de proteínas.....	110

6. Referências bibliográficas.....	114
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	121

1. INTRODUÇÃO

O cacauero (*Theobroma cacao* L.) é uma espécie tropical da família Malvaceae que tem um elevado valor económico, por ser a principal fonte na produção de chocolate. Além disso, há um crescente interesse devido ao seu alto conteúdo de polifenóis, os quais têm mostrado efeitos benéficos em doenças cardiovasculares e propriedades antioxidantes. O cacauero a além de ser um dos principais componentes económicos nas regiões onde é cultivado exerce também um importante papel na preservação ambiental. Apesar da sua utilidade, às características botânicas que esta espécie apresenta, associadas a um alto grau de auto-incompatibilidade, os plantios comerciais apresentam alta heterozigotidade genética, afetando diretamente a produtividade do seu cultivo, gerando assim a necessidade dos melhores génotipos serem propagados assexuadamente. Por estã razão, a embriogênese somática se configura como alternativa eficiente para a propagação de génotipos elite, permitindo a captura e fixação de ganhos genéticos.

A técnica de cultura de tecidos, como a embriogênese somática tem sido rotineiramente usada tanto como uma técnica de propagação clonal de plantas, bem como um modelo válido para investigar eventos estruturais, fisiológicos e moleculares que ocorrem durante o desenvolvimento embrionário.

No presente trabalho buscou-se avaliar a resposta embriogênica e capacidade de formar embriões somáticos dos génotipos do grupo genético Nacional, visando estabelecer um protocolo de propagação baseado na embriogênese somática.

Em *Theobroma cacao* L. muitos estudos da embriogênese somática têm sido realizados, com a finalidade de desenvolver um protocolo eficiente que permitam a propagação de génotipos de elite, não entanto problemas associados com a formação de um baixo número de embriões, baixas taxas de conversão e resposta embriogênica altamente génotipo-dependente, tem sido os principais limitantes de esta técnica.

Assim, também integraram-se duas técnicas como a quantificação do padrão de metilação do DNA de embriões e das plântulas obtidas durante a embriogênese somática, assim como também a elaboração de um perfil proteômico dos embriões somáticos formados durante a embriogênese somática de *Theobroma cacao* L. Propondo-se identificar a relação da metilação DNA e a capacidade conversão dos embriões somáticos, visto que a metilação do DNA é um dos mediadores chave no mecanismo epigenético associado ao desenvolvimento embrionário.

Através do perfil proteômico esperou-se identificar proteínas específicas diferencialmente expressas que estão determinando a capacidade de conversão dos embriões somáticos.

A embriogênese somática é uma rota morfogenética que compreende uma sequência de passos que incluem a indução da desdiferenciação de células somáticas, a aquisição de competência embriogênica e a formação do embrião somático, regulados pela demetilação do DNA e mediadas por reguladores de crescimento, desencadeando a duplicação do DNA, a transcrição de proteínas e a formação de embriões.

Neste contexto, o presente trabalho foi estruturado em capítulos, os quais se espera facilitem a compreensão dos resultados obtidos. O primeiro capítulo consiste no estado da arte e situação do problema, no qual a traves de uma revisão bibliográfica se trata de mostrar aspectos relevantes de *Theobroma cacao* L., da embriogênese somática, da metilação do DNA e da proteômica em plantas. O segundo capítulo consiste na avaliação da resposta dos genótipos de grupo Nacional à embriogênese somática. O terceiro capítulo relaciona aos níveis de metilação do DNA global em embriões somáticos formados durante a embriogênese somática secundária e as plântulas obtidas durante a conversão e o quarto aborda a proteômica comparativa como uma ferramenta para identificar proteínas relacionadas com a capacidade de conversão dos embriões somáticos de *Theobroma cacao* L.

2. OBJETIVOS

2.2 Objetivo Geral

O presente trabalho tem como objetivo avaliar a resposta embriogenética de genótipos de *Theobroma cacao* L. do Equador e elucidar aspectos relacionados aos padrões de metilação do DNA global e o perfil de proteínas com a capacidade de conversão dos embriões somáticos.

1.1 Objetivos Específicos

- Avaliar a variabilidade e eficiência genotípica da embriogênese somática de *Theobroma cacao* L. em quatro genótipos do grupo genético Nacional.
- Comparar os níveis de metilação global dos embriões somáticos formados como resultado da embriogênese somática secundária de *Theobroma cacao* L. e das plântulas regeneradas após a conversão dos embriões.
- Estabelecer um perfil proteico e identificar as proteínas diferencialmente expressas em dos tipos de embriões somáticos formados durante a embriogênese somática secundária de *Theobroma cacao* L.

CAPÍTULO 1 – ESTADO DA ARTE E SITUAÇÃO DO PROBLEMA

1. *Theobroma cacao*

O cacaueteiro é uma planta neotropical citada pela primeira vez na literatura botânica por Charles de L'Ecluse, que a descreveu sob o nome de *Cacao fructus*. Em 1937, foi descrita por Linneu como *Theobroma fructus*, sendo que essa classificação permaneceu até 1953, quando foi definitivamente designado como *Theobroma cacao* L. (CUATRECASAS, 1964).

Segundo VAN HALL (1914), o centro de origem do cacaueteiro é a região do Orinoco e a bacia Amazônica. CHEESMAN (1944) indica que o centro de origem do *T. cacao* está localizado no Alto Amazonas, no limite Equador-Colômbia no ecossistema formado pela influência da cordilheira dos Andes. Em condições espontâneas é encontrado no estrato inferior das florestas, em clareiras e beirando os grandes rios, onde predominam condições de temperatura e umidades elevadas (CHEESMAN, 1944; CUATRECASAS, 1964; BARTLEY, 2005). Acredita-se que a espécie foi domesticada na Mesoamérica (DIAS, 2001), sendo a única região onde existem provas de que o cultivo do cacaueteiro existiu antes da conquista europeia (PATIÑO *et al.*, 2002).

O cacaueteiro se espalhou em duas direções, dando origem a grupos genéticos distintos (CHEESMAN, 1944; CUATRECASAS, 1964; SORIA, 1966; BRAUDEAU, 1969). O grupo dos Crioulos se disseminou em direção à América Central e sul do México, sendo considerado o primeiro cacau domesticado (CUATRECASAS, 1964; BARTLEY, 2005). O grupo dos Forasteiros se disseminou até a Amazônia e no nordeste de América de Sul. Além destes grupos, um terceiro grupo genético denominado grupo dos Trinitários, constituído de híbridos naturais entre Forasteiros e Crioulos, foi encontrado em plantações devastadas por doenças em Trinitade (CHEESMAN, 1944). Como processo da disseminação pela influência humana existe também populações silvestres desde o Sul do México até as bordas meridionais da Amazônia (SOUZA; DIAS, 2001; MOTAMAYOR *et al.*, 2002). MOTAMAYOR *et al.* (2008), com auxílio de análises moleculares, demonstraram que ao invés dos grupos tradicionais Crioulo e Forasteiro

e seus híbridos (Trinitarios), existem 10 grupos geneticamente diferentes, sendo que a maior diversidade genética da espécie se encontra no oeste da Amazônia, onde localizam-se sete grupos, incluindo o grupo Nacional (Figura 1). Considera-se que esta classificação reflete com maior precisão a diversidade genética da espécie, a qual influencia diretamente na qualidade de chocolate que cada um produz.

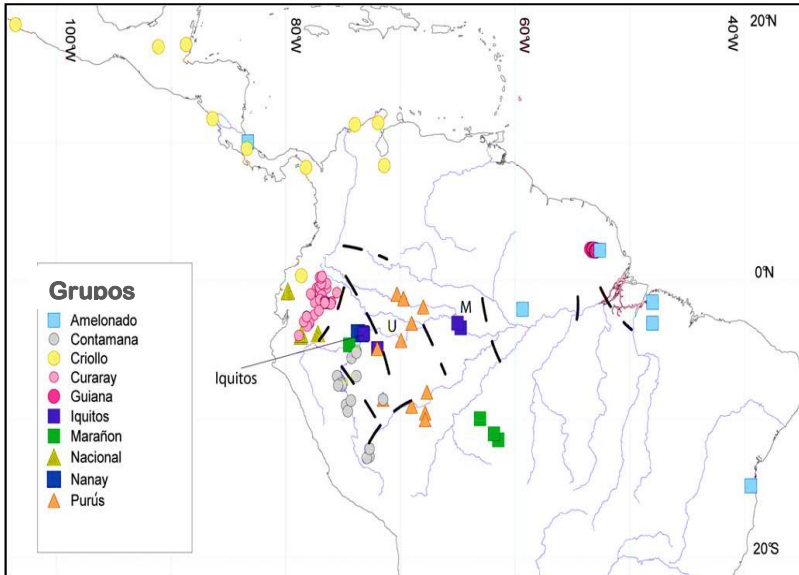


Figura 1 – Distribuição geográfica da diversidade genética de cacauero (*Theobroma cacao* L.). Fonte: MOTAMAYOR *et al.*, 2008.

Existem evidências de que árvores abandonadas de cacauero sobreviveram em ecossistemas florestais úmidos, o que o levou a ser classificado com um cultivo semi-domesticado (CLEMENT, 1997). Os grupos Criollo, Nacional e Amelonado são considerados como cultivares tradicionais com algum grau de domesticação (CLEMENT, 2010). Análises moleculares detalhadas demonstram que estas três cultivares tradicionais tem um número baixo de alelos particulares, no entanto, os grupos ocidentais amazônicos têm um número alto. Este efeito poderia ser explicado como um efeito que acompanha a seleção contínua dos seres humanos (MOTAMAYOR *et al.*, 2008). O grupo Nacional, cultivado no oeste equatorial, apresenta muita afinidade com

alguns grupos cultivados na Amazônia do Peru e com o grupo Curaray, cultivado na Amazônia do Equador. Além destes, os grupos Criollo, Nacional e Curaray ocupam ramificações importantes dentro do dendrograma de parentesco sugerido por MOTAMAYOR *et al.*, (2008), o que indica que a origem das duas cultivares tradicionais é a Amazônia equatoriana.

Posteriormente, os espanhóis levaram o cacau para outras terras conquistadas na América central e na América do sul. Assim, com os anos e a partir de ingresso do cacau no mercado Europeu a demanda cresceu e o seu cultivo se estendeu rapidamente para outras regiões, inclusive no Brasil, de onde foi levado para o Oeste da África pelos portugueses, se expandindo em Gana, Nigéria, Camarões e Costa do Marfim (PAULIN e ESKES, 1995). Atualmente encontram-se plantações de cacau em diversos países do sudoeste asiático, tais como a Indonésia, Malásia, Vietnã, Cingapura e Madagascar, entre outros (WCF, 2009). As principais regiões produtoras do cacau no mundo situam-se entre 15°N e 20°S de latitude, uma faixa bastante estreita ao longo do Equador (ICCO, 2011). No cacau, a parte economicamente aproveitável são os cotilédones das sementes, sendo descartados a casca e o embrião (BARTLEY, 2005). Diversos estudos demonstraram que o cacau é um dos alimentos de consumo habitual por prazer, e que o consumo poder trazer benefícios tangíveis para a saúde (DING *et al.*, 2006). O cacau é rico em polifenóis, os quais têm mostrado efeitos benéficos em doenças cardiovasculares, atividade anti-inflamatória, função antiplaquetária e efeitos antioxidantes, o que o define como um produto funcional (COOPER *et al.*, 2008).

A cadeia produtiva do cacau envolve produtores e compradores de amêndoas, indústrias e moageiras, empresas de importação e exportação, indústria chocolateira e de cosméticos, além de varias empresas fabricantes e distribuidoras de insumos e equipamentos envolvidos em toda a cadeia de produção (ICCO, 2009). Atualmente, mais de 20 milhões de pessoas no mundo dependem desta atividade agrícola para a subsistência e estima-se que o 70% da produção de cacau provém de pequenos agricultores, que possuem unidades produtivas menores do que cinco hectares (EUFIC, 2005).

A produção mundial de cacau tem sido ascendente. Assim, a safra 2010/2011, mostrou um superávit recorde de 343.000 toneladas, sendo a produção total em 4,3 milhões de toneladas. Sendo cerca dos 75% desta

produção é oriunda de países do continente Africano, 12% dos países do Sudoeste da Ásia e Oceania, e 13% proveniente da América do Sul e Central (ICCO, 2011). No entanto, 90% da oferta mundial se concentra em oito países, dos quais o Brasil e o Equador fazem parte. No Equador o cacau é o terceiro produto agrícola mais importante, representando 0,4% do PIB total do país e 6,7% do PIB agrícola, possuindo papel fundamental na geração de empregos, gerando em torno de 600.000 empregos diretos, representando 4% do PEA nacional e 12,5% do PEA agrícola. O Equador é o principal exportador de cacau fino do mundo participando com o 60% da produção total (ANECACAO, 2008).

Além de ser um dos principais componentes econômicos nas regiões onde é cultivado, a cultura do cacaueteiro exerce também um papel importante na preservação ambiental. Seu cultivo associado à árvores nativas tem auxiliado na preservação de biomas ameaçados. Os sistemas agroflorestais com o cacaueteiro são considerados como uma alternativa sustentável (DIAS, 2001).

O cacaueteiro é uma espécie diplóide ($2n = 20$), com tamanho do genoma estimado em 0,43 ou 0,415 X 10⁹ picogramas (FIGUEIRA *et al.*, 1992), pertence à classe das dicotiledôneas e junto com os gêneros *Herrania*, *Guazuma* e *Cola* faz parte da família Malvaceae (ALVERSON *et al.*, 1999; ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP, 2003). É uma planta umbrófila de porte arbóreo, chegando a atingir 20m de altura em condições silvestres, mas em condições de cultivo normalmente alcançam cerca de 5 metros (BARTLEY, 2005).

O cacaueteiro é uma planta hermafrodita com flores pentâmeras, monoclinas (Figura 2). A espécie é predominantemente alógama e apresenta auto-incompatibilidade gametofítica e esporofítica. O fenômeno da autoincompatibilidade (AI) tem sido definido de diversas maneiras ao longo do tempo. Assim, o conceito de maior consenso atualmente é o de LUNDQVIST (1964), citado por DE NETTANCOURT (1977; 2000). Para os autores, AI é a incapacidade de uma planta fértil hermafrodita produzir zigotos após a autopolinização. A incompatibilidade também é considerada um mecanismo fisiológico, com base genética, que favorece a alogamia, promovendo, desta forma, a manutenção da variabilidade genética (SCHIFINO e DALL'AGNOL, 2002).

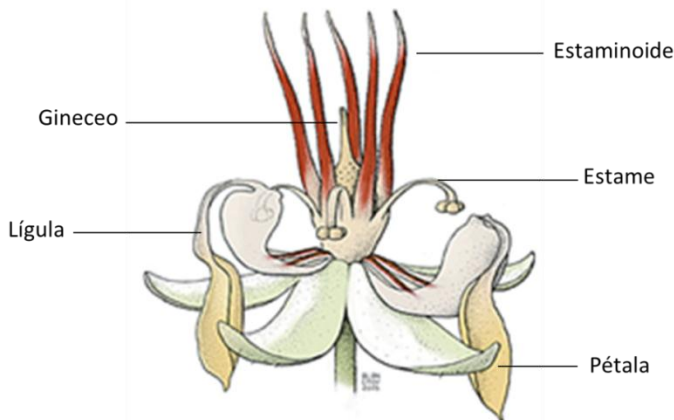


Figura 2 – Estrutura da flor de *Theobroma cacao* L. Figura: ALAM CHOU, 2008.

Existem dois tipos principais de AI, a gametofítica (AIG), em que a especificidade do pólen é gerada pelo alelo S do genoma haplóide do grão do pólen (gametófito), e a esporofítica (AIE), em que a especificidade é gerada pelo genótipo diplóide da planta adulta (esporófito) que deu origem ao grão de pólen. A reação da AI engloba desde o impedimento da germinação do pólen até o rompimento do tubo polínico (HESLOP e HARRISON, 1983; DE NETTANCOURT, 1977; 2000). Desta forma, existem na população de cacauzeiros tanto genótipos auto-compatíveis quanto genótipos auto-incompatíveis. Por isso, para que a fecundação dos gametas seja efetiva é necessária a troca de pólen entre plantas compatíveis. Esta característica é responsável por grandes alterações dos níveis de produção dos cultivos de cacauzeiro, como também pelas características genéticas das sementes sexuais, o que limita a propagação sexual da espécie (CANTALINO, 2006).

A propagação do cacauzeiro pode ser sexuada ou assexuada, sendo que a propagação sexuada por sementes resulta na segregação da progênie, o que não garante a uniformidade dos cultivos (ENRÍQUEZ, 1985). A propagação da espécie está baseada nos métodos assexuais clássicos, como a estaquia e a enxertia. A estaquia é realizada a partir de material ortotrópico, induzindo a produção de ramos que podem produzir crescimento ortotrópico vertical, com a formação da copa e arquitetura similar à de uma árvore produzida de semente mas com

diferente formação da raiz (MILLER e GUILTINAN, 2003). No entanto, estas técnicas têm desvantagens associadas á demanda intensiva de mão de obra, altos custos, taxas de propagação frequentemente baixas e padrões de crescimento indesejável das plantas (JIMENEZ, 2004).

Técnicas de cultura de tecidos vegetais se configuram como uma alternativa para a propagação massal de genótipos elite. Neste contexto, vários trabalhos associados à micropropagação de cacaueteiro têm demonstrado que a espécie é altamente recalcitrante para a micropropagação baseada na organogênese (JIMENEZ, 2004). Neste sentido, a embriogênese somática se mostra uma técnica promissora para a propagação clonal de genótipos-elite, com a qual é possível se capturar e fixar ganhos genéticos de plantas selecionadas (GUERRA *et al.*, 1999).

2. Embriogênese somática

A embriogênese somática é um processo pelo qual células somáticas haplóides ou diplóides se diferenciam em plantas completas seguindo estágios de histodiferenciação embriogenéticos característicos (WILLIAMS e MAHESWARAN, 1986; EMONS, 1994). Por sua condição séssil, as plantas necessitam se adaptar às condições extremas próprias do ambiente que as rodeia através da plasticidade do desenvolvimento vegetal. Com a impossibilidade de migração e a necessidade de contínua organogênese durante seu desenvolvimento, as plantas necessitam manter nichos de células indiferenciadas com potencial morfogenético, sendo estes os meristemas. Dessa forma, o programa ontogenético das plantas é altamente flexível e isso está ligado à reversibilidade do estado de diferenciação das células vegetais somáticas (FEHÉR *et al.*, 2003).

Essa característica esta baseada na teoria da totipotencialidade das células vegetais, em que células somáticas em uma determinada planta possuem a informação genética necessária para a geração de uma nova planta (GUERRA *et al.*, 2001). Os padrões na origem dos embriões somáticos têm sido descritos (WILLIAMS e MAHESWARAN, 1986) e são classificados como diretos e indiretos, diferenciado pela proliferação de células indeterminadas antes da formação do embrião somático no modelo indireto (HALPERIN, 1995). A embriogênese somática segue um padrão morfogenético semelhante ao observado nos embriões zigóticos formados após a fertilização da célula ovo, apresentando estágios de desenvolvimento embrionários similares (ZIMMERMAN, 1993; GOLDBERG *et al.*, 1994). Há

evidências de que os principais processos metabólicos e de desenvolvimento que ocorrem na embriogênese zigótica, podem ser reproduzidos na embriogênese somática (LELU *et al.*, 1993; FEHÉR, 2002).

O desenvolvimento *in vitro* das células depende de vários fatores, tais como: o genótipo, a idade e estado fisiológico da planta doadora do explante, e o ambiente externo no que inclui a composição do médio de cultura e as condições físicas (luz, temperatura, etc). A interação entre estes leva à indução e expressão da embriogênese somática (GAJ, 2004).

Os reguladores de crescimento tais como as auxinas e as citocininas adicionadas ao meio de cultura são considerados fatores cruciais na embriogênese somática, regulando o ciclo celular e promovendo a expressão deste rota morfogenética (FRANCIS e SORRELL, 2001; JIMENEZ, 2005). A influência dos reguladores de crescimento exógenos, especialmente o 2,4-D, tem sido reportada por FEHÉR (2003). O 2,4-D é uma auxina sintética que atua como um análogo das auxinas endógenas e está relacionado diretamente com o padrão de expressão gênica, possibilitando que as células se tornem competentes e responsivas aos sinais fisiológicos e bioquímicos indutores da embriogênese somática (DUDITS *et al.*, 1995).

Segundo TERZI e LO SCHIAVO (1990), CAUSEVIC *et al.* (2005) e FRAGA *et al.* (2012) o 2,4-D pode influenciar também o processo de metilação do DNA, o qual é conhecido como um dos mecanismos epigenéticos responsáveis pela dinâmica da expressão gênica durante o desenvolvimento embrionário.

A embriogênese somática é o resultado de diferentes eventos, em que vários sinais atuam paralelamente, sendo que a ação da auxina (seja esta exógena e/ou endógena) provoca uma resposta celular, incluindo a reorganização da estrutura celular, o arranjo da cromatina, a expressão gênica e um novo programa de desenvolvimento. Como resultado, as células indiferenciadas adquirem competência embriogênica (FEHÉR, 2005). Após essas alterações, células ou tecidos induzidos alcançam a segunda fase ou fase de expressão, na qual as células se diferenciam estabelecendo a polaridade e a consequente formação de embriões somáticos revelando sua competência embriogênica (JIMENEZ *et al.*, 2005). Acredita-se que neste processo o remodelamento da cromatina exerça papel importante em todas as fases, incluindo a desdiferenciação

celular, a reprogramação embriônica e a diferenciação dos embriões (Figura 2) (FEHÉR, 2005).

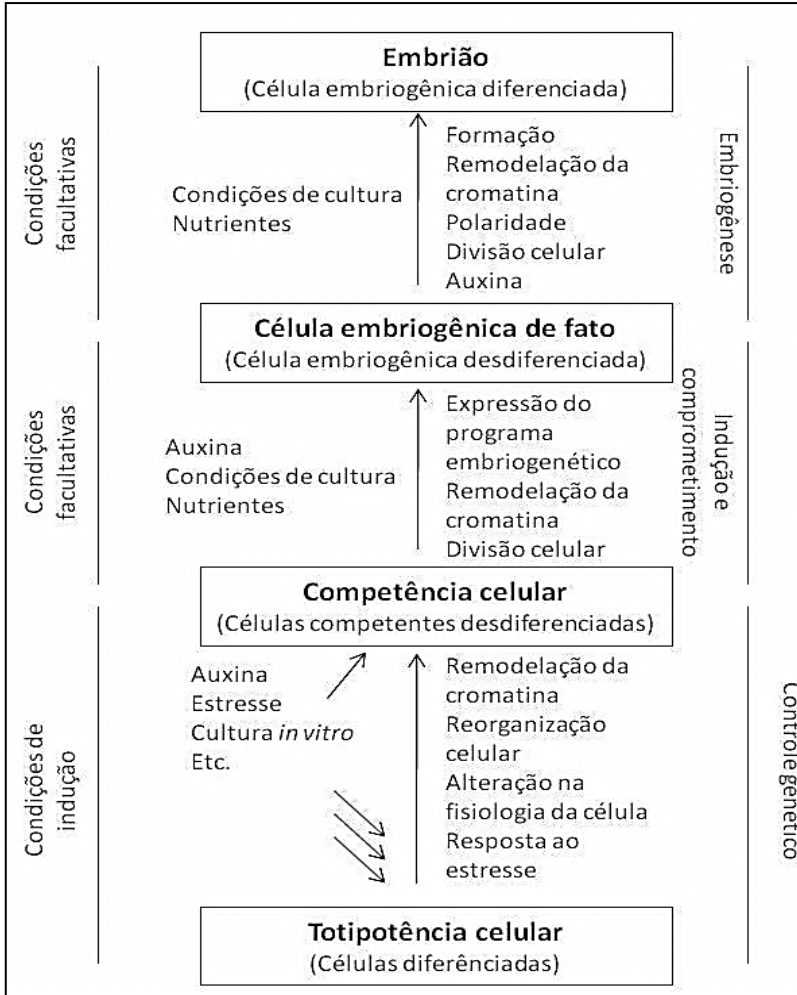


Figura 3. Modelo hipotético dos eventos que modulam a embriogênese somática (FEHÉR, 2005).

Ao longo dos últimos anos, tem sido aceita a hipótese de que o remodelamento da cromatina em resposta aos sinais ambientais ou de desenvolvimento, determina uma correta expressão espacial e temporal dos genes (LI *et al.*, 2002). Assim, também a organização da cromatina irá estabelecer os padrões de expressão dos genes (ativos ou silenciados) em determinadas regiões do genoma de uma célula e em uma determinada fase de desenvolvimento (WAGNER, 2003). Estas observações sugerem que o programa embriogênico é controlado pelo remodelamento da cromatina (FEHÉR, 2008).

A aplicação dos sistemas *in vitro* baseados na embriogênese somática para a regeneração de plantas, esta determinada não só pela eficiência na formação de embriões, mas também pela frequência e capacidade dos embriões de se converter em plantas. O processo de alterações morfológicas que o embrião sofre para dar lugar a uma planta é conhecido como conversão/germinação, e implica na formação de raízes primárias, formação da parte aérea e o esverdeamento dos hipocótilos e cotilédones (REDENBAUGH *et al.*, 1986). Em vários sistemas, uma grande quantidade de embriões é produzida, mas o principal problema ainda é a baixa frequência de conversão (GAJ, 2004).

Efeitos prejudiciais na capacidade de regeneração de embriões somáticos de *Glicine max* produzidos em meios com 2-4 D foram encontrados (LAZZERI *et al.*, 1987 e SOFIARI *et al.*, 1997). Com frequência, o desenvolvimento de embriões anômalos foi observado quando se utilizou 2-4 D no meio de indução (RODRÍGUEZ, 1994; WETZSTEIN, 1998; PESCADOR *et al.*, 2008). Estas anomalias morfológicas poderiam resultar de alterações no transporte polar de auxinas endógenas e/ou exógenas (CHOI *et al.*, 1997; YASUDA *et al.*, 2000). No entanto, é importante ressaltar que em muitos casos a morfologia anormal dos embriões não diminui o percentual de conversão (LEVI e FREGADERO, 1991; VLASINOVA e HAVEL, 1999; PARK e FACCHINI, 2000).

3. Embriogênese somática de cacauero (*Theobroma cacao* L.)

A embriogênese somática para o cacauero foi inicialmente descrita a partir de embriões zigóticos imaturos (ESAN, 1977) e posteriormente repetida em outros trabalhos por PENCE *et al.* (1979);

WANG e JANICK (1984) e DUHEM *et al.* (1989). Contudo, plântulas regeneradas a partir de embriões somáticos cujos explantes são embriões zigóticos possuem limitado valor para a propagação clonal, por serem derivados de um genótipo ainda não testado. Além disso, a germinação e conversão desses embriões somáticos tem sido deficiente (WANG e JANICK, 1984). Assim, somente embriões somáticos derivados de tecidos somáticos ou não-sexuais, tais como a nucela, folha ou tecidos florais têm grande importância para a propagação clonal ou para a conservação do germoplasma (FIGUEIRA e JANICK, 1995).

Trabalhos foram conduzidos visando a obtenção de embriões somáticos de cacau a partir de tecidos nucelares (FIGUEIRA e JANICK, 1993) e de tecidos florais (SÖNDAHL *et al.*, 1989; LOPEZ-BAEZ *et al.*, 1993; ALEMANN *et al.*, 1996). Porém, apesar dos progressos obtidos, a eficiência relatada por esses autores foi baixa tanto na obtenção de embriões somáticos quanto na sua conversão em plântulas. Melhores taxas de conversão foram obtidas em resposta à troca frequente do meio ou à lavagem dos embriões somáticos (WANG e JANICK, 1984). Resultados positivos foram também obtidos em resposta ao uso de meio suplementado com zeatina e carvão ativado, conjuntamente com a remoção dos cotilédones (DUHEM *et al.*, 1989); pela microenxertia de embriões somáticos sobre plântulas germinadas *in vitro* (AGUILAR *et al.*, 1992); pela utilização de maltose como fonte de carbono, juntamente com carvão ativado (LOPEZ-BAEZ *et al.*, 1993) e pelo enriquecimento do ambiente de cultivo com CO₂ (FIGUEIRA e JANICK, 1994).

LI *et al.* (1998) e MAXIMOVA *et al.* (2002) desenvolveram um procedimento para estimular a embriogênese somática e a regeneração de plantas a partir de tecidos florais (estaminódios) de cacau, pela utilização de três etapas no cultivo (indução de calos, desenvolvimento de embriões e regeneração de plantas) em meios de cultura suplementados com TDZ (Thidiazuron) e 2,4-D (Figura 4). Todos os genótipos testados foram responsivos às condições de cultura em taxas que variaram de 1 a 100% de eficiência. Mais de 270 plantas, derivadas de embriões somáticos de seis desses genótipos, foram estabelecidas com sucesso em casa de vegetação, abrindo caminho para a propagação desta espécie via embriogênese somática.

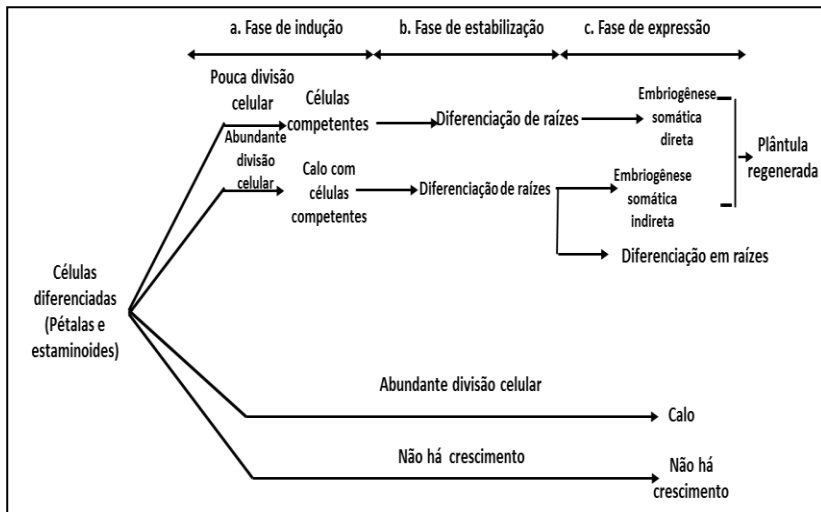


Figura 4. Rotas morfogenéticas *in vitro* estabelecidas para o cacaueteiro (*Theobroma cacao* L.). a- Crescimento de calo primário; b- Crescimento de calo secundário; c - Desenvolvimento de embriões (KLERK *et al.*, 1997 e NIEMENAK *et al.*, 2008).

Diferentes concentrações de $MgSO_4$ e K_2SO_4 foram testadas para otimizar a diferenciação dos embriões somáticos, observando-se que concentrações de sulfato maiores às normais, suplementadas ao meio de cultura podem inibir a formação de calos e promover a diferenciação dos embriões somáticos em cacaueteiro (MINYAKA *et al.*, 2008). A aplicação de sistemas de imersão temporária também foi reportada para a expressão de embriogênese somática, sendo utilizados sistemas de imersão temporária como o biorreator tipo *twin flasks* ou frascos duplos. Este sistema mostrou uma melhora na taxa de multiplicação de embriões somáticos sem causar efeitos negativos nas características morfológicas (NIEMENAK *et al.*, 2008).

Em alguns casos específicos, demonstrou-se que plântulas de outras espécies produzidas *in vitro* por meio de cultura de tecido exibem níveis elevados de instabilidade genética e variação somaclonal (RIVAL *et al.*, 1997; TREMBLAY *et al.*, 1999). Não assim, as plântulas de cacaueteiro resultado da embriogênese somática demonstraram fenótipos

normais em condições de campo e com características de crescimento semelhantes às plantas propagadas por métodos tradicionais (MAXIMOVA *et al.*, 2008).

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

Contudo, ainda não há um programa consistente de produção comercial de mudas de cacauero propagadas *in vitro* a partir da técnica de embriogênese somática.

4. Metilação do DNA em plantas

A metilação do DNA tem um papel importante no controle do *imprinting* do genoma, na inativação do cromossoma-X, no silenciamento dos *transposons* e outras sequências repetitivas de DNA, assim também na expressão de genes endógenos (CHEN e LI, 2004). A metilação do DNA ocorre na posição 5 do anel de pirimidina dos resíduos de citosina, a reação é catalisada pela enzima DNA-metiltransfera (DNMTs) (FINNEGAN e KOVAK, 2000). A metilação do DNA pode ser classificada em três tipos de acordo com a sequência das ilhas de citosina, estas podem ser CG, CHG, e CHH (H= A, C ou T). A metilação no sítio CG é característico do genoma dos animais, em plantas a metilação é sido identificada nas três ilhas de citosina CG, CHG, e CHH (FENG *et al.*, 2010a).

O nível de metilação do DNA varia de 3 a 8% em vertebrados e de 6 a 30% em plantas (CHEN e LI, 2004). Este alto grau de metilação de citosina em plantas é atribuída ao fato de que, em plantas, a metilação pode se apresentar em três ilhas (CG, CHG, e CHH), enquanto que em animais a metilação do DNA ocorre geralmente na ilha da citosina CG (GRUENBAUM *et al.*, 1989). Outra diferença no padrão da metilação das plantas e animais é que o padrão da metilação nas plantas é herdado ao longo de múltiplas gerações e em animais não. (KAKUTANI, 2002).

A metilação do DNA afeta um expressivo conjunto de processos celulares em plantas, incluindo a regulação da expressão genica durante o desenvolvimento (FINNEGAN *et al.*, 1996) e a organização da

cromatina (FINNEGAN *et al.*, 1998). A metilação de DNA em plantas está associada com o controle da estabilidade do genoma, por meio da repressão da transcrição de elementos de DNA móveis, os quais podem ser transgenes, vírus, transposons e retroelementos (KIDWELL e LISCH, 2001).

A metilação de DNA em plantas é regulada por duas atividades distintas, mas complementares: "*de novo*" e "manutenção" da metilação. Metilação *de novo* é o processo pelo qual os resíduos de citosina não metilados são metilados durante o processo de replicação do DNA, resultando na formação de novos padrões de metilação. Metilação de manutenção é o processo pelo qual os padrões de metilação preexistentes são mantidos após a replicação do DNA (CHEN e LI, 2004).

A metilação do DNA é um mecanismo dinâmico no qual a plasticidade é induzida por sinais ambientais e/ou ontogênicos, entre outros (RAMCHANDANI *et al.*, 1999). A plasticidade da metilação é definida como as alterações de metilação/demetilação que ocorrem durante o crescimento e desenvolvimento. Assim, a metilação da citosina em regiões codificadoras ou promotoras pode bloquear a expressão dos genes-alvo, no entanto a demetilação de DNA pode ser um dos passos necessários para a ativação da transcrição no genoma dos eucarióticos (FINNEGAN e KOVARIK, 2000; LU *et al.*, 2006).

Métodos para avaliar a modificação da metilação do DNA e as modificações das histonas, estão se desenvolvendo rapidamente (FRAGA e ESTELLER, 2002; VOGEL *et al.*, 2009; LAIRD, 2010). Variações nos padrões de metilação do DNA de plantas cultivadas *in vitro* podem ser analisadas principalmente por AFLP (polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado) (VOS *et al.*, 1995) associado a técnica de MSAP (polimorfismo amplificado sensível a metilação) que faz uso de enzimas de restrição sensíveis à metilação (REYNA-LOPEZ *et al.*, 1997). Embora as informações não permitam determinar os sítios específicos de metilação, a quantificação global de 5mC também pode ser empregada para analisar as alterações na metilação do DNA. A quantificação pode ser realizada por HPCE (eletroforese capilar de alta performance) e HPLC (cromatografia líquida de alta performance), ou por métodos enzimáticos/químicos (FRAGA e ESTELLER, 2002).

Com o auxílio dos diferentes protocolos desenvolvidos para a avaliação das modificações na metilação do DNA, foram reportados

vários trabalhos relacionados com a morfogênese *in vitro*. Em um sistema de cultura de células e tecidos, a diferenciação e desdiferenciação, bem como a divisão celular, são acompanhadas por eventos de metilação e demetilação do DNA genômico tecido-específicos (ARNHOLDT-SCHMITT, HERTERICH e NEUMANN, 1995), embora os detalhes dos mecanismos reguladores envolvidos na metilação do DNA ainda não estão completamente claros e poucos genes-chaves têm sido descritos.

5. Proteômica

As proteínas são as entidades funcionais chaves da célula e a análise global das mesmas proporciona informação necessária para entender o funcionamento da célula, sendo este tipo de análise é denominado proteômica (GÖRG *et al.*, 2000). Proteoma é um termo relativamente novo e refere-se ao conjunto de proteínas expressas pelo genoma de um organismo num dado momento ou condição (WASINGER *et al.*, 1995). Neste contexto, a proteômica é a ciência que estuda sistematicamente um proteoma (PARK, 2004), permitindo avaliações quantitativas e qualitativas de proteínas que atuam no metabolismo celular (CHEN e HARMON, 2006).

A proteômica tem diversas aplicações sendo as mais conhecidas:

1. Análises de perfis de expressão proteica;
2. Estudo de modificações pós-traducionais e
3. Estudos de interação proteína-proteína (Figura 5)

(ALTELAAR *et al.*, 2012). Para complementar às aplicações da proteômica, estão a bioinformática, a proteômica computacional e os instrumentos analíticos que visam estudos de modelagem e dinâmica das proteínas (REMMERIE *et al.*, 2011).

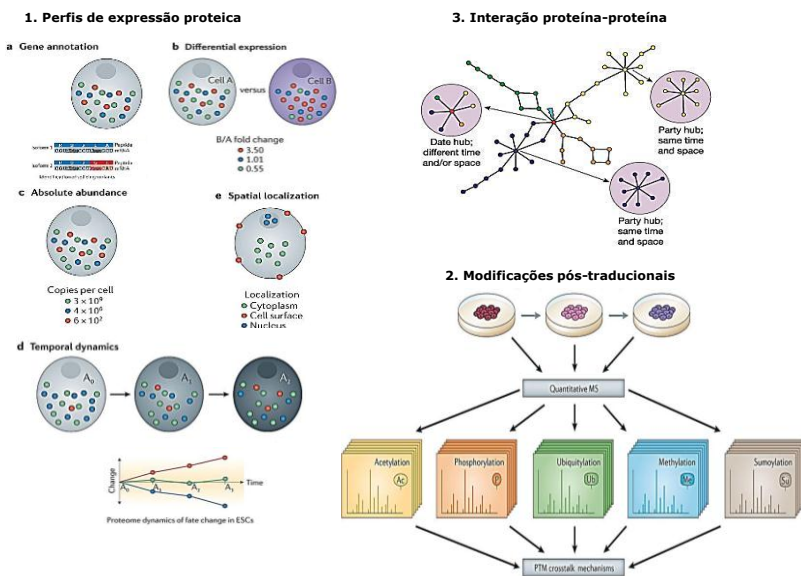


Figura 5. Aplicações de estudos em proteômica em diferentes sistemas biológicos (HAN *et al.*, 2004; ALTELAAR *et al.*, 2012).

A análise proteômica representa um desafio analítico devido às propriedades físico-químicas das proteínas e das suas unidades básicas, os aminoácidos. Além disso, comparado ao genoma, o proteoma se complementa com um *splicing* alternativo, no que diversas modificações podem ocorrer, sendo que a degradação e a complexidade são maiores, associadas à possibilidade de interconectividade entre proteínas e pelas redes de sinalização que são altamente divergentes no tempo e espaço. No entanto, o avanço nos estudos proteômicos tem fornecido respostas a diferentes questionamentos biológicos (ALTELAAR *et al.*, 2012). Neste contexto, a identificação de proteínas diferencialmente expressas permite a associação destes polipeptídeos com diferentes eventos fisiológicos que ocorrem nas células, tecidos e órgãos (KORKUMAT *et al.*, 2006). Além disso, os padrões temporais de expressão de proteínas possibilitam a identificação de proteínas marcadoras de eventos

específicos (REMMERIE *et al.*, 2011). Estudos enfocados na caracterização da dinâmica de proteínas ao longo do desenvolvimento vegetal, associada à caracterização do genoma e transcriptoma também têm sido descritos (ROBERTS, 2002; HEAZLEWOOD e MILLAR, 2003; CHEN e HARMON, 2006; ROSSIGNOL *et al.*, 2006).

O desenvolvimento conjunto da tecnologia computacional, bioinformática e instrumentação analítica têm sido determinantes para o desenvolvimento da proteômica em plantas. Assim, a confirmação da expressão gênica no nível de proteínas é crucial, ajudando a entender a sinalização e a origem dos diferentes eventos em sistemas biológicos. Atualmente os estudos de genoma são feitos a nível funcional (ALTELAAR *et al.*, 2012). Neste contexto se inclui aspectos quantitativos, aspectos funcionais, as interações entre proteínas e modificações pós-traducionais, que com o auxílio da bioinformática permitem prever a função das proteínas e obter mapas, ultrapassando a barreira das espécies (REMMERIE *et al.*, 2011).

Para espécies que são modelo de estudo genético, existe uma ampla base de dados de proteômica funcional, os quais estão disponíveis para a comunidade científica (REMMERIE *et al.*, 2011). Atualmente, poucos genomas de plantas superiores têm sido totalmente sequenciados, estando disponíveis: *Arabidopsis thaliana*, *Glycine max*, *Medicago truncatula*, *Oryza sativa*, *Populus trichocarpa*, *Sorghum bicolor*, *Vitis vinifera* e *Zea mays* ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/ PLANTAS / PlantList.html # C_SEQ](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/PLANTAS/PlantList.html#C_SEQ)). No entanto, diferentes recursos têm sido disponibilizados para facilitar as análises de espécies não sequenciadas (REMMERIE *et al.*, 2011). Para a análise comparativa de genomas e organização de dados de sequenciamento existe uma plataforma pública denominada PLAZA (PLAZA <http://bioinformatics.psb.ugent.be/plaza/>, PROOST *et al.*, 2009). Para a análise proteômica de plantas, está disponível o portal PlantGDB (www.plantgdb.org). É possível ter acesso a diferentes ferramentas, serviços, base de dados e informações relativas às ômicas. Assim, também podem ser utilizados os genomas sequenciados de outras espécies de plantas para a identificação de proteínas por homologia. No entanto a identificação de proteínas através de seqüências ESTs obtidas por MS/MS poderiam aliviar a necessidade das bases de dados de proteínas (ALTELAAR *et al.*, 2012).

Os estudos proteômicos têm demonstrado ser uma ferramenta poderosa para o estudo de eventos fisiológicos de plantas em condições específicas do desenvolvimento (ROSE *et al.*, 2004). A proteômica comparativa pode auxiliar no entendimento da dinâmica temporal e

especial de processos morfogênicos e que vem sendo utilizada principalmente para o estudo da embriogênese somática para determinar padrões proteômicos como marcadores da competência das culturas embriogênicas, onde são observadas diferenças significativas nos perfis proteômicos de tecidos embriogênicos e não-embriogênicos (KORMUTAK e VOOKOVA, 1997; MORAES *et al.*, 2006).

Neste contexto, importantes estudos proteômicos relacionados com a embriogênese somática têm sido desenvolvidos para diversas espécies, tais como: *Quercus ilex* (MAURI e MANZANERA, 2003); *Medicago truncatula* (IMIN *et al.*, 2005); *Picea glauca* (LIPPERT *et al.*, 2005); *Glycine max* (HAJDUCH *et al.*, 2005); *Vitis vinifera* (MARSONI *et al.*, 2008), *Acca sellowiana* (CANGAHUALA-INOCENTE *et al.*, 2009); *Elaeis guineensis* (SGHAIER-HAMMAMI *et al.*, 2010), *Cyclamen persicum* (WINKELMANN *et al.*, 2006; RODE *et al.*, 2011) e *Theobroma cacao* (NOAH *et al.*, 2012). Os dados publicados têm aportado importantes conhecimentos sobre esta rota morfogênica.

Em cacauero embriões somáticos e zigóticos no estagio torpedo foram comparados. Os resultados mostraram diferenças na acumulação de proteínas. A diferença mais relevante relatada entre as duas rotas de desenvolvimento está relacionada como o metabolismo dos carboidratos, sendo que o perfil proteômico dos embriões zigóticos indicou uma alta atividade glicolítica. No entanto, os embriões somáticos apresentaram alta atividade respiratória aeróbica com um excepcional incremento no ciclo do TCA e nas proteínas da fosforilação oxidativa. Proteínas ligadas ao estresse foram mais abundantes na embriogênese somática (NOAH *et al.*, 2012) implicando este ser um fator a ser melhor estudado para aumentar a eficiência da embriogênese somática em cacau.

6. Referencias bibliográficas

AGUILAR, M.E.; VILLA-LOBOS, V.M.; VASQUEZ, N. Production of cocoa plants (*Theobroma cacao* L.) via micrografting of somatic embryos. In *Vitro Cell Developmental Biology*, New York. v. 28, p. 15-19, 1992.

ALEMANNI, L.; BERTHOULY, M.; MICHAUX-FERRIÈRE, N. Somatic embryogenesis of cocoa from floral parts. *Plantations, Recherche, Developpement*, Paris, v. 3, n. 4, p. 225-237, 1996.

ALTELAAR, M.A.F.; MUNOZ, J.; HECK, A.J.R. Next-generation proteomics: towards an integrative view of proteome dynamics. *Review, Nature genetics*, 2012.

ALVERSON, W. S.; WHITLOCK, B. A.; NYFFELER, R.; BAYER, C.; BAUM, D. A. Phylogeny of the core Malvales: Evidence from *ndhF* sequence data. *American Journal of Botany*, v. 86, n. 67, p. 1474-1486, 1999.

ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP. An update of the Angiosperm Phylogeny Group Classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 141, p. 399-439, 2003.

ARNHOLDT-SCHMITT, B.; HERTERICH, S.; NEUMANN, K. Physiological aspects of genome variability in tissue culture. II. growth phase-dependent differential DNA methylation of the carrot genome (*Daucus carota* L.) during primary culture. *Theoretical and applied genetics*, v. 91, p. 809-815, 1995.

BARTLEY, B. G. D. The genetic diversity of cacao and its utilization. CABI Publishing. Wallingford, UK, p. 341, 2005.

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

CANGAHUALA-INOCENTE, G. C.; VILLARINO, A.; SEIXAS, D.; DUMAS-GAUDOT, E.; TERENCEZI, H.; GUERRA, M.P. Differential

proteomic analysis of developmental stages of *Acca sellowiana* somatic embryos. *Acta Physiologiae Plantarum*, v. 1, p. 1-18, 2009.

CANTALINO, A. Agenda Tecnológica do Arranjo Produtivo do Cacau. Secretaria de Ciência Tecnologia e Informação. Governo da Bahia. Salvador, p.43, 2006.

CAUSEVIC, A.; DELAUNAY, A.; OUNNAR, S.; RIGHEZZA, M.; DELMOTTE, F.; BRIGNOLAS, F.; HAGÈGE, D.; MAURY, S. DNA methylating and demethylating treatments modify phenotype and cell wall differentiation state in sugarbeet cell lines. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 43, p. 681-691, 2005.

CHEESMAN, E. E. Notes on the nomenclature, classification and possible relationships of cocoa populations. *Tropical Agriculture*, London, v. 21, n. 8, p. 144-159, 1944.

CHEN, S.; HARMON, A.C. Advances in plant proteomics. *Proteomics*, v. 6, p. 5504-5516, 2006.

CHEN, T.; LI, E. Structure and function of eukaryotic DNA methyltransferases. *Current Topics in Developmental Biology*, v. 60, p. 55-89, 2004.

CHOI, Y.E.; KIM, J.W.; SOH, W.Y. Somatic embryogenesis and plant regeneration from suspension cultures of *Acanthopanax koreanum* Nakai. *Plant Cell Reports*, v.17, p. 84-88, 1997.

CLEMENT, C. R. 1492 and the loss of Amazonian crop genetic resources. I. The relation between domestication and human population decline. *Economic Botany*, v. 53, n.2, p. 188-202, 1999.

CLEMENT, C. R.; ARAÚJO, M.; EECKENBRUGGE, G. C.; ALVES, P.A.; PICANÇO-RODRIGUES, D. Origin and Domestication of Native Amazonian Crops. *Diversity*, v. 2, p. 72-106, 2010.

COOPER, K.A.; DONOVAN, J.L.; WATERHOUSE, A.L.;

WILLIAMSON, G. Cocoa and health: a decade of research. *British Journal Nutrition*, v. 99, n.1, p. 1-11, 2007.

CUATRECASAS, J. Cacao and its allies: a taxonomic revision of the genus *Theobroma*. *Contributions from United States National Herbarium*, v. 35, p. 279-614, 1964.

DE KLERK, G.J, ARNOLDT-SCHMITT, B.; LIEBEREI, R.; NEUMANN, K.H. Regeneration of roots, shoots and embryos: physiological, biochemical and molecular aspects. *Biol Plant*, v. 39, n.1, p. 53-66, 1997.

DE LA CRUZ, M.; WHITKUS, R.; GOMEZ-POMPA, A.; MOTABRAVO, L. Origins of cocoa cultivation. *Genetics*, v. 83 p. 238-242, 1995.

DE NETTANCOURT, D. Incompatibility and incongruity in wild and cultivated plants. Berlin, Springer, p. 320, 2000.

DE NETTANCOURT, D. Incompatibility in angiosperms. *Sexual Plant Reproduction*, v.10, p.185-199, 1997.

DIAS, L. A. S. Melhoria Genética do Cacaueiro. 1 ed. Vicosa: Editora. Folha de Vicosa Ltda, p. 578, 2001.

DING, E. L.; HUTFLESS, S.; DING, X.; GIROTRA, S. Chocolate prevention of cardiovascular disease: A systematic review. London, *Journal of Nutrition and Metabolism*, v.3, p. 1-12, 2006.

DUDITS, D.; GYORGYEY, J.; BOGRE, L.; BAKO, L. Molecular biology of somatic embryogenesis. In Thorpe T. A. (ed) *In vitro Embryogenesis in Plants*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, p. 267-308, 1995.

DUHEM, K.; LEMERCIER, N.; BOXUS, P. Données nouvelles sur l'induction et le développement d'embryons somatiques chez *Theobroma cacao*. *Café Cacao Thé*, Paris, v. 33, p. 9-14, 1989.

EMONS, A.M.C. Somatic embryogenesis: cell biological aspects. *Acta*

botanica neerlandica, v. 43, p. 1–14, 1994.

ESAN, E. B. Tissue culture studies on cacao (*Theobroma cacao* L.), a supplementation of current research. In International cocoa research conference, Idaban, resume, p. 116-125, 1977.

FEHÉR, A. Why Somatic Plant Cells Start to form Embryos?. Somatic Embryogenesis. Plant Cell Monographs, Robinson DG, series ed., Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Germany, v. 2, p. 85-101, 2005.

FEHÉR A.; PASTERNAK T.; OTVO S K.; MISKOLCZI P.; DUDITS D. Induction of embryogenic competence in somatic plan cells, review. Biologia, Bratislava, v. 57, p. 5–12, 2002.

FEHÉR, A. The initiation phase of somatic embryogenesis: what we know and what we don't. Acta Biologica Szegediensis, v. 52, n. 1, p. 53-56, 2008.

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

FIGUEIRA, A.; JANICK, J. Development of nucellar somatic embryos of *Theobroma cacao* L. The Hague. Acta Horticulturae, v. 336, p. 231-236, 1993.

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

FIGUEIRA, A.; JANICK, J.; GOLDSBROUGH, P. Genome size and DNA polymorphism in *Theobroma cacao* L. Journal of the American Society for Horticultural Science, St. Joseph, v. 117, n. 4, p. 673-677, 1992.

FINNEGAN, E.J.; GENGER, R.K; PEACOCK, W.J; DENNIS, E.S. DNA methylation in plants. Annual. Review. Plant Physiology and Plant Molecular Biology, v.49, p.223–247, 1998.

FINNEGAN, E.J.; KOVAK, K.A. Plant DNA methyltransferases. *Plant Molecular Biology*, v. 43, p.189-201, 2000.

FINNEGAN, E.J.; PEACOCK, W.J.; DENNIS, E.S. Reduced DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* results in abnormal plant development. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, v. 93, p. 8449–8454, 1996.

FISCHER-IGLESIAS, C.; NAUHAUS, G. Zygotic embryogenesis hormonal control of embryo development. In: Bhojwani, S.S.; Soh W.Y. (eds) *Current Trends in the Embryology of Angiosperms* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, p. 223–247, 2001.

FRAGA, H. P. F.; VIEIRA, L. N.; CAPRESTANO, C. A.; STEINMACHER, D. A.; MICKE, G.A.; SPUDEIT, D. A.; PESCADOR, R.; GUERRA, M. P. 5-Azacytidine combined with 2,4-D improves somatic embryogenesis of *Acca sellowiana* (O. Berg) Burret by means of changes in global DNA methylation levels. *Plant Cell Reports (Print)*, V.31, n. 12, p. 2165-2176, 2012.

FRAGA, M.F.; ESTELLER, M. DNA methylation: a profile of methods and applications. *BioTechniques*, v. 33, p. 636–649, 2002.

FRANCIS, D.; SORRELL, D.A. The interference between the cell cycle and plant growth regulators: a mini review. *Plant Growth Regul*, v. 33, p. 1–12, 2001.

GAJ, M.D. Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Growth Regulation*, v. 43, n. 1, p. 27-47, 2004.

GOLDBERG, R.B, DEPAIVA , G.; YADEGARI, R. Plant embryogenesis: zygote to seed. *Science*, v. 266, p. 605–614, 1994.

GÖRG, A.; OBERMAIER, C.; BOGUTH, G.; HARDER, A.; SCHEIBE, B.; WILDGRUBER, R.; WEISS, W. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, v. 21, p. 1037–1053, 2000.

GROSSMAN, K. Mode of action of auxin herbicides, a new ending to a long, drawn out history. *Trends in plant science*, v. 5, n. 12, p. 506-508, 2000.

GRUENBAUM, Y.; NAVEH-MANY, T.; CEDAR, H.; RAZIN, A. Sequence specificity of methylation in higher plant DNA. *Nature*, v. 292, p. 860–862, 1982.

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

GUERRA, M.P.; DAL VESCO, L.L.; DUCROQUET, J.P.H.J.; NODARI, R.O.; REIS, M. Somatic embryogenesis in Goiabeira-serrana: Genotype Response, Auxinic shock and synthetic seeds. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v. 13, p. 117-128. 2001.

HAJDUCH, M.; GANAPATHY, A.; STEIN, J.W.; THELEN, J.J. A systematic proteomic study of seed filling in soybean. Establishment of high-resolution two-dimensional reference maps, expression profiles, and an interactive proteome database. *Plant Physiology*, v. 137, p. 1397–1419, 2005.

HALPERIN, W. In vitro embryogenesis: Some historical issues and unresolved problems T.A. Thorpe (Ed.), *Current plant science and biotechnology in Agriculture: In Vitro embryogenesis in plants*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p. 1-16, 1995.

HARDI, F. *Cacao Manual*. I. A. A. S, Turrialba. 1960.

HEAZLEWOOD, J.L.; MILLAR, A.H. Integrated plant proteomics putting green genomes to work. *Functional Plant Biology*, v. 30, p. 471-482, 2003.

HESLOP-HARRISON, J. Self-incompatibility: phenomenology and physiology. *Proceedings of the Royal Society of London B*, v.218,

p.371-395, 1983.

IMIN, N.; NIZAMIDIN, M.; DANIHER, D.; NOLAN, K.E.; ROSE, R.J.; ROLFE, B.G. Proteomic analysis of somatic embryogenesis in *Medicago truncatula*. Explant cultures grown under 6-benzylaminopurine and 1-naphthaleneacetic acid treatments. *Plant Physiology*, v. 137, p. 1250–1260, 2005.

INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION (ICCO). Determinantes de los precios del cacao y el funcionamiento del mercado mundial del cacao. Londres, (Comite de Mercado. MC/5/4), 2012.

INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION ICCO. Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics. V. XXXVII, N. 2, Cocoa year 2010/11.

INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION. Update of the annual forecasts of production and consumption and estimates of production levels to achieve equilibrium in the world cocoa market as of 21 may 2009. Moscow: ICCO, 2009. (Executive Committee. EX 136/7).

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

JOHNSTON, J.W.; HARDING, K.; BREMNER, D.H.; SOUCH, G.; GREEN, J.; LYNCH, P.T.; GROUT, B.; BENSON, E.E. HPLC analysis of plant DNA methylation: a study of critical methodological factors. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 43, p. 844–853, 2005.

KAKUTANI, T. Epi-alleles in plants: inheritance of epigenetic information over generations. *Plant Cell Physiology*, v. 43, p. 1106–1111, 2002.

KIDWELL, M.G.; LISCH, D.R. Perspective: transposable elements, parasitic DNA, and genome evolution. *Evolution*, v. 55, p.1–24, 2001.

KORMUTÁK, A.; SALAJ, T.; VOOKOVÁ, B. Storage protein dynamics in zygotic and somatic embryos of white fir. *Biologia Bratislava*, v. 61, p. 479-485, 2006.

KORMUTÁK, A.; VOOKOVÁ, B. Biochemical variation between non-embryogenic and embryogenic calli of silver fir. *Biologia Plantarum*, v. 39, p.125-130, 1997.

LAIRD, P.W. Principles and challenges of genome-wide DNA methylation analysis. *Nature Reviews Genetics*, v.11, p.191–203, 2010.

LAZZERI, P.A.; HILDEBRAND, D.F.; COLLINS, G.B. Soybean somatic embryogenesis: effects of hormones and culture manipulations. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, v. 10, p. 197–208, 1987.

LELU, M. A.; BASTIEN, C.; DRUGEAULT, A.; GOUEZ, M. L. AND KLIMASZEWSKA, K. Somatic embryogenesis and plantlet development in *Pinus sylvestris* and *Pinus pinaster* on medium with and without growth regulators. *Physiologia Plantarum*, v. 105, p. 719-728, 1999.

LI G.; HALL TC.; HOLMES-DAVIS R. Plant chromatin: development and gene control. *Bioessays*, v. 24, p.234–243, 2002.

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

LIPPERT, D.; ZHUANG, J.; RALPH, S.; ELLIS, D.E.; GILBERT, M.; OLAFSON, R.; RITLAND, K.; ELLIS, B.; DOUGLAS, C.J.; BOHLMANN, J. Proteome analysis of early somatic embryogenesis in *Picea glauca*. *Proteomics*, v. 5, p. 461–473, 2005.

LOPEZ-BAEZ, O.; BOLLON, H.; ESKES, A. B.; PÉTIARD, V. Embryogenèse somatique de cacaoyer *Theobroma cacao* L. à partir de pièces florales. *Sciences de la vie*, Paris, n. 316, p. 579-584, 1993.

LU, G.; WU, X.; CHEN, B.; GAO, G.; XU, K.; LI, X. Detection of DNA methylation changes during seed germination in rapeseed

(*Brassica napus*). Chinese Science Bulletin, v. 51, p.182-190, 2006.

MARSONI, M.; BRACALE, M.; ESPEN, L.; PRINSI, B.; NEGRI, A.S.; VANNINI, C. Proteomic analysis of somatic embryogenesis in *Vitis vinifera*. Plant Cell Reports, v. 27, p. 347–356, 2008.

MAXIMOVA, S. N.; ALEMANNI, L.; YOUNG, A.; FERRIERE, N.; TRAORE, A.; GUILTINAN, M. Efficiency, genotypic variability, and cellular origin of primary and secondary somatic embryogenesis of *Theobroma cacao* L. In Vitro Cell Developmental Biology, New York, v. 38, p. 252-259, 2002.

MAXIMOVA, S. N.; YOUNG, A.; PISHAK S.; GUILTINAN, M. Field performance of *Theobroma cacao* L. plants propagated via somatic embryogenesis In Vitro Cell Developmental Biology, v. 44, p. 487–493, 2008.

MILLER, C.R.; GUILTINAN, M.J. Perspectives on rapid vegetative multiplication for orthotropic Scion and rootstock varieties of cocoa. In: International workshop on cocoa breeding form improved production systems, Accra, p.189-194, 2003.

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

MORAES, F. M. DE S.; SOUSA, M. V.; SANTA-CATARINA, C.; FLOH, E.I.S.; RICART, C. A. O. Two-dimensional electrophoresis analysis of *Ocotea catharinensis* during somatic embryogenesis and embryogenic competence acquisition. In: XXXV Reunião Anual da SBBq, Águas de Lindóia, v. 1, p. W-19, 2006.

MOTAMAYOR, J.C.; LACHENAUD, P.; DA SILVA, E.; MOTA J.W.; LOOR, R.; KUHN, D.N. Geographic and Genetic Population Differentiation of the Amazonian Chocolate Tree (*Theobroma cacao* L.). PLoS ONE, v. 3, n. 10, p. e3311, 2008.

NIEMENAK, N.; SAARE-SURMINSKI, K.; ROHSIUS C.;

NDOUMOU, DO.; 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.

NOAH, A.M.; NIEMENAK, N.; SUNDERHAUS, S.; HAASE, C.; OMOKOLO, D.N.; WINKELMANN, T. Braun, H.P. Comparative proteomic analysis of early somatic and zygotic embryogenesis in *Theobroma cacao* L. *J. Proteomics*, 2012.

NOTHNAGEL, E.A. Proteoglycans and related components in plant cells. *International Review of Cytology*, v. 174, p. 195–29, 1992.

PARK, O.K. Proteomic Studies in Plants. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, v. 37, p. 133-138, 2004

PARK, S.U.; FACCHINI, P.J. High efficiency somatic embryogenesis and plant regeneration in California poppy, *Eschsholzia California* Cham. *Plant Cell Reports*, v.19, p.421–426, 2000.

PATIÑO, V.M. Historia y Dispersión de los Frutales Nativos del Neotrópico; Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia, p. 655, 2002.

PAULIN, D.; ESKES, A. B. Le cacaoyer: strategies de selection. *Plantations, Recherche, Développement*, v. 2 p. 5-18, 1995.

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

PESCADOR, R.; KERBAUY, G. B.; VIVIANI, D.; KRAUS, J. E. Anomalous somatic embryos in *Acca sellowiana* (O. Berg). *Revista Brasileira de Botânica*, v. 31, p. 155-164, 2008.

REDENBAUGH, K.; PAASCH, B.D.; NICHOL, J.W.; KOSSLER, M.E.; VISS, P.R.; WALKER, K.A. Somatic seeds encapsulation of

asexual plant embryos. *Bio/Technology*, v. 4, p.797–801, 1986.

REMMERIE, N.; DE VIJLDER, T.; LAUKENS, K.; HAI DANG, T.; LEMIÈRE, F.; MERTENS, I.; VALKENBORG, D.; BLUST, R.; WITTERS, E. Next generation functional proteomics in non-model plants: A survey on techniques and applications for the analysis of protein complexes and post-translational modifications. *Phytochemistry*, v.72, p. 1192–1218, 2011.

REYNA-LÓPEZ, G.E; SIMPSON, J.; RUIZ-HERRERA, J. 1997. Differences in DNA methylation patterns are detectable during the dimorphic transition of fungi by amplification of restriction polymorphisms. *Molecular and General Genetics*, v. 253, p. 703–710, 1997.

ROBERTS, J.K.M. Proteomics and a future generation of plant molecular biologists. *Plant Molecular Biology*, v. 48, p. 143-154, 2002.

RODE, C.; GALLIEN, S.; HEINTZ, D.; VAN DORSSELAER, A.; BRAUN, H.P.; WINKELMANN, T. Enolases: storage compounds in seeds? Evidence from a proteomic comparison of zygotic and somatic embryos of *Cyclamen persicum* Mill. *Plant Molecular Biology*, v. 75, p. 305–319, 2011.

RODRÍGUEZ LÓPEZ, C.M.; WETTEN, A.C.; WILKINSON, M.J. Detection and quantification of in vitro-culture induced chimerism using simple sequence repeat (SSR) analysis in *Theobroma cacao* L. *Theoretical and Applied Genetics*, v.110, p. 157–166, 2004.

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

RODRIGUEZ, A.P.M.; WETZSTEIN, H.Y. A morphological and histological comparison of the initiation and development of pecan (*Carya illinoensis*) somatic embryogenic cultures induced with naphthaleneacetic acid or 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Protoplasma*, v. 204, p.71-83, 1998.

ROSE, J.K.C.; BASHIR, S.; GIOVANNONI, J.J.; JAHN, M.M.; SARAVANAN, R.S. Tackling the plant proteome: practical approaches, hurdles and experimental tools. *Plant Journal*, v. 39, p.715–773, 2004.

ROSSIGNOL, M.; PELTIER, JB.; MOCK, H.P.; MATROS, A.; MALDONADO, A.M.; JORRIN, J. *Proteomics*, v. 6, p. 5529-5548, 2006.

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

SGHAIER-HAMMAMI, B.; JORRÍN-NOVO, J.V.; GARGOURI-BOUZID, R.; DRIRA, N. Abscisic acid and sucrose increase the protein content in date palm somatic embryos, causing changes in 2-De profile. *Phytochemistry*, v. 71, p. 1223-1236, 2010.

SOFIARI, E.; RAEMAKER C.J.J.M.; KANJU, E.; DANSO, K.; VANLAMMEREN, A.M. Jacobsen E.; Visser, R.G.F. Comparison of NAA and 2, 4-D induced somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, v. 50, n. 1, p. 45-56, 1997.

SÖNDHAL, M.R.; SEREDUK, T.B.; CHEN, Z.; BELLATO, C.M. Somatic embryogenesis and plant regeneration of cacao. *Republic of South Africa*, v. 88, p. 3078, 1989.

SORIA, J. Principales variedades de cacao cultivadas em América tropical. *Turrialba*, v. 16 p. 261-266, 1966.

TERZI, M.; LO SCHIAVO, F. Somatic embryogenesis. In Bhojwani, S.S. (ed). *Plant tissue culture: applications and limitations*, The Netherlands, Elsevier, p. 54-66, 1990.

VAN HALL, C.J.J. *Cocoa*. Macmillan, London, 1944.

VLAŠÍNOVÁ, H.; HAVEL, L. Somatic embryogenesis in *Acer palmatum* *Biology Plant*, v. 36, p. 95, 1994.

VOGEL, N.; SCHIEBEL, K.; HUMENY, A. Technologies in the wholegenome age: MALDI-TOF based genotyping. *Transfus Med Hemother*, v.36, p.253–262, 2009.

VON ARNOLD, S.; SABALA, I.; BOZHKOV, P.; DYACHOK, J.; FILONOVA, L. Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, v. 69, p. 233-249, 2002.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, v. 23, p. 4407–4414, 1995.

WAGNER, D. Chromatin regulation of plant development. *Current Opin, Science study*, v. 6, n. 1, p. 20-28, 2003.

WANG, Y. C.; JANICK, J. Inducing precocious germination in asexual embryos of *Theobroma cacao* L. *HortiScience, Alexandria*, v. 19, p. 839-841, 1984.

WASINGER, V.C.; CORDWELL, S.J.; CERPA-POLJAK, A.; YAN, J.X.; GOOLEY, A.A.; WILKINS, M.R.; DUNCAN, M.W.; HARRIS, R.; WILLIAMS, K.W.; HUMPHERY SMITH, I. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis*, v. 16, p. 1090-1094, 1995.

WILLIAMS, E.G.; MAHESWARAN, G. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. *Annual Botany*, v. 57, p. 443–462, 1989.

WINKELMANN, T.; HEINTZ, D.; VAN DORSSELAER, A.; SEREK, M.; BRAUN, H.P. Proteomic analyses of somatic and zygotic embryos of *Cyclamen persicum* Mill. reveal new insights into seed and germination physiology. *Planta*, v. 224, p.508–519, 2006.

WORLD COCOA FOUNDATION (WCF). *Cocoa Market Update*, compiled by the world cocoa foundation from published reports and resources, 2019.

YASUDA, T.; FUJII, Y.; YAMAGUCHI, T. Embryogenic callus

induction from *Coffea arabica* leaf explant by benziladenine. *Plant Cell Physiology*, v. 26, p. 595-597, 1985.

ZIMMERMAN, J.L. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. *Plant Cell*, v. 5, p.1411–1423, 1993.

CAPÍTULO 2 – VARIABILIDADE E EFICIÊNCIA GENOTÍPICA DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE CACAUEIRO (*Theobroma cacao* L.).

1. Resumo

O desenvolvimento de sistemas de propagação rápidos e eficientes para a multiplicação vegetativa de genótipos de elite *Theobroma cacao* L. podem contribuir para melhorar o desenvolvimento de esta importante espécie tropical. A indução da embriogênese somática a partir de estaminóides e a embriogênese somática secundária a partir de cotilédones de embriões imaturos tem sido amplamente descrita. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a variabilidade e eficiência genotípica da embriogênese somática de *Theobroma cacao* L. em genótipos do Equador. Os genótipos EET 103, EET 111, SA 1, SA 2 e AS 3, se mostraram responsivos à embriogênese somática primária e à embriogênese secundária. A embriogênese secundária resultou mais eficiente na formação embriões somático quando comparada com a embriogênese somática primária. Dois tipos de embriões somáticos resultantes da embriogênese somática foram identificados, segundo a aparência visual foram classificados em leitosos e translúcidos. Determinou-se que os tipos de embriões somáticos observados diferem pela capacidade de conversão, os embriões do tipo leitosos apresentaram altos de conversão frente aos embriões do tipo translúcidos. Os resultados que elevada porcentagem de conversão dos embriões podem ser obtidas a partir da classificação e seleção dos embriões somáticos.

2. Abstract

The development of micropropagation protocols allows the mass clonal propagation of *Theobroma cacao* L. elite genotypes, thus improving the development of this important tropical species. Induction of somatic embryogenesis from estamonides and secondary somatic embryogenesis from cotyledons of immature embryos has been widely described. This study aimed at to evaluate the variability and genetic efficiency of somatic embryogenesis of genotypes of *Theobroma cacao* L. belonging to Ecuador National genetic group. The genotypes EET 103, EET 111, SA 1, SA 2 E SA 3 proved responsive to primary somatic embryogenesis and secondary embryogenesis. The secondary embryogenesis resulted more efficient in developing somatic embryos as compared to primary somatic embryogenesis. Two types of somatic embryos resulting from somatic embryogenesis have been identified according visual appearance: opaque and translucent. The two types differ in the conversion capacity; opaque somatic embryos presenting higher conversion rate as compared to the translucent ones.

3. Introdução

A embriogênese somática tem sido rotineiramente usada como uma técnica de propagação *in vitro* e como um modelo válido para investigar as mudanças estruturais, eventos fisiológicos e moleculares que ocorrem durante o desenvolvimento embrionário (STASOLLA E YEUNG, 2003).

A propagação *in vitro* via embriogênese somática permite a regeneração de um grande número de indivíduos geneticamente idênticos e muitas vezes livres de patógenos. No entanto, para que a embriogênese somática seja considerada um sistema de propagação técnica e economicamente viável, é essencial aperfeiçoar as variáveis do sistema para que estas permitam lograr altas taxas de multiplicação e um obter um grande número de embriões capazes de converter em plântulas viáveis (TRAORE, 2006).

Muitos estudos da embriogênese somática de *Theobroma cacao* L. têm sido realizados, com a finalidade de desenvolver um protocolo eficiente que permita a propagação de genótipos de elite (ESAN, 1975; LOPEZ-BAEZ *et al.*, 1993; LI *et al.*, 1998; MAXIMOVA *et al.*, 2002, 2005; TRAORE, 2006; MINYAKA *et al.*, 2008; NIEMENAK *et al.*, 2008). Estes sistemas têm sido parcialmente bem sucedidos na indução e expressão da embriogênese, mas mostraram baixas taxas de conversão. Além, os resultados indicam que muitos genótipos se mostram recalcitrantes para esta rota morfogênica e que a resposta embriogênica é altamente genótipo-dependente (TAN e FURTEK, 2003).

Para aumentar a eficiência do método descrito por MAXIMOVA *et al.* (2002-2005), cujo protocolo de embriogênese secundária quem utiliza como explantes cotilédones de embriões somáticos primários, MINYAKA *et al.* (2008) determinou que a recalcitrância do *Theobroma cacao* L. para a diferenciação de embriões somáticos pode ser superada pela modificação na concentração de MgSO₄ ou K₂SO₄. O estudo mostrou que o médio de cultura suplementado com o dobro da concentração de MgSO₄ pode promover a resposta embriogênica dos explantes e a formação de embriões somáticos.

Neste contexto, o presente trabalho objetivou avaliar a variabilidade e eficiência genotípica da embriogênese somática de *Theobroma cacao* L. em genótipos do grupo genético Nacional.

4. Material e métodos

4.1 Material Vegetal

Flores imaturas dos genótipos EET 103, EET 111, SA 1, SA 2 e SA3, foram coletados da coleção da cooperativa de agricultores “San Carlos”, localizada na província de Orellana, Equador. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDGV), do CCA/UFSC.

4.2 Indução da embriogênese somática

O protocolo usado nos diferentes experimentos da embriogênese somática de *Theobroma cacao* L. foi adaptado de MAXIMOVA *et al.* (2005) e leva em conta três etapas: indução de calo primário (PCG), crescimento de calo secundário (SCG) e expressão da embriogênese com o desenvolvimento de embriões (ED). Ao invés do uso dos sais Woody Plant (WPM) no meio para indução de calo secundário, como descreve MAXIMOVA *et al.* (2005), foi definido para todos os meios de cultura o uso dos sais DKW (DRIVER e KUNIYUKI, 1984). O meio de cultura usado para o desenvolvimento de embriões (ED) foi ajustado para o dobro a concentração de $MgSO_4$ como sugerido por MINYAKA *et al.* (2008).

4.3 Embriogênese somática primaria

Os explantes utilizados foram estaminóides de flores imaturas, sendo desinfestados segundo os procedimentos descritos por LI *et al.* (1998). Após a desinfestação os estaminóides dos genótipos EET 103, EET 111, AS 2 e AS 3 foram inoculados em placas de Petri contendo 25 mL de meio de cultura semissólido PCG, composto pelos sais DKW (DRIVER e KUNIYUKI, 1984), suplementado com glicose (2%), 2,4-D (9 μ M), TDZ (45.4 nM), vitamina DKW e Phytigel[®] (2 g.L-1). Após 14 dias as culturas foram transferidas para o meio de cultura SCG, composto pelos sais DKW, suplementado com glicose (2%), 2,4D (9 μ M), Cinetina (1,16 μ M), vitamina DKW e Phytigel[®] (2 g.L-1), durante 14 dias. Após este tempo as culturas foram transferidas para meio de cultura ED, composto pelos sais DKW com o dobro da concentração de $MgSO_4$, suplementado com sacarose (3%), glicose (1%), vitamina DKW, Phytigel[®] (2 g.L-1) e isento de fitoreguladores. As culturas

foram subcultivadas no mesmo meio de cultura a cada duas semanas durante 90 dias. As culturas foram mantidas no escuro em câmara de crescimento com temperatura de $28^{\circ}\text{C}\pm 1$.

O delineamento experimental foi completamente casualizado. A unidade experimental foi constituída de cinco placas de Peri contendo seis estaminóides, como unidade amostral foi considerada cada estaminóide. Os dados de indução de embriogênese somática, resposta embriogênica e número de embriões formados foram coletados aos 90 dias de cultivo. Para detectar a diferença da resposta embriogênica, os dados coletados foram submetidos a um teste de contingência. Para detectar as diferenças na formação de embriões a unidade amostral foi considerada cada um dos calos que mostraram resposta embriogênica. Os dados foram submetidos ANOVA e ao teste de separação de médias TUKEY ($p<0,05$).

4.4 Embriogênese somática secundária

A embriogênese secundária foi induzida segundo a metodologia descrita por MAXIMOVA *et al.* (2002), a partir de cotilédones dos embriões somáticos no estado cotiledonar, dos genótipos EET 103, EET 111, AS 1 e AS 2, os quais foram seccionados e inoculados no meio de cultura SCG composto pelos sais DKW e suplementado com glicose (2%), 2,4D ($9\ \mu\text{M}$), Cinetina ($1,16\ \mu\text{M}$), vitamina DKW e Phytigel[®] (2 g.L⁻¹), durante 14 dias. As culturas embrionárias foram transferidas para o meio de cultura ED composto pelos sais DKW com o dobro da concentração de MgSO_4 e suplementado com sacarose (3%), glicose (1%), vitamina DKW (1 ML.L⁻¹) e Phytigel[®] (2 g.L⁻¹) e isento de fitoreguladores. As culturas foram subcultivadas no mesmo meio de cultura a cada duas semanas durante 90 dias. As culturas foram mantidas no escuro em câmara de crescimento com temperatura de $28^{\circ}\text{C}\pm 1$.

O delineamento experimental foi completamente casualizado. A unidade experimental foi constituída de cinco placas de Peri contendo seis cotilédones de cada genótipo. Dados de resposta embriogênica e número de embriões formados foram coletados aos 90 dias de cultivo. Os dados foram submetidos a ANOVA e a teste de separação de médias TUKEY ($p<0,05$).

4.5 Conversão de embriões somáticos

Foram selecionados embriões somáticos normais translúcidos e leitosos no estágio cotiledonar, oriundos da embriogênese somática secundária dos genótipos EET 103 e EET 111. Os embriões foram submetidos à conversão em plântulas segundo o protocolo descrito por TRAORE (2000). Os embriões foram convertidos em placas de Petri contendo 25 ml do meio de cultura de conversão (PEC) composto pelos sais DKW e suplementado com sacarose (1%), glicose (2%) e Phytigel[®] (1,75 g.L⁻¹). As culturas foram subcultivadas no mesmo meio de cultura a cada 30 dias por 90 dias. As placas de Petri contendo os embriões foram mantidas em câmara de crescimento com temperatura de 28°C± e foto período de 16 horas.

O delineamento experimental foi completamente casualizado. A unidade experimental foi constituída de cinco placas de Petri contendo seis embriões de cada genótipo. Dados de porcentagem de conversão de embriões em plântulas foram coletados, após os 90 dias de cultivo. Os dados foram submetidos a ANOVA e teste de separação de médias TUKEY ($p < 0,05$).

4.6 Análises histológicas por microscopia óptica

Amostras representativas dos embriões somáticos do tipo leitoso normal e translúcido normal no estado cotiledonar obtidos na embriogênese somática foram coletados e fixados em solução de paraformaldeído 2,5 % em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2 por pelo menos 12 horas (SCHMIDT *et al.*, 2010). Após a fixação, as amostras foram lavadas e desidratadas em séries crescentes de etanol a cada 30 minutos (30, 50, 70, 90 e 100%). As amostras foram imersas em solução de pré-infiltração, compostos pela solução de infiltração do kit de Histo-resina Leica[®] (50 mL de resina básica e 0,5 g de peróxido de benzoila) com etanol 96% (1:1, v/v) por 16-18h a 25°C. Em seguida as amostras foram imersas em solução de infiltração pura durante 24h e incluídas em solução de infiltração com endurecedor Leica[®] (dimetil sulfoxido) na proporção de 15:1 (v/v) e orientadas em moldes plásticos. Secções de 5-7 µm foram obtidas usando micrótopo de rotação Leica RM 2135, com navalha de tungstênio, as secções foram distendidas em lâminas com uma gota de água e mantidas a temperatura de 42°C ± 2°C. Após a evaporação da água, foram coradas com azul de toluidina na concentração de 0.05% em H₂O e os aspectos relevantes foram

identificados e fotografados usando câmara DP 71 acoplada a microscópio BX-40 da Olympus®.

5. Resultados e discussão

5.1 Embriogênese somática primária e embriogênese somática secundária

Durante a indução de embriogênese somática primária uma elevada formação de calos foi observada em todos os genótipos testados sem diferença significativa entre si, 93% de resposta calogenica. A resposta embriogênica dos calos só foi evidente a partir dos 90 dias após a indução, sendo esta estatisticamente diferente entre os genótipos avaliados. O genótipo EET 103 apresentou a maior frequência de calos embriogênicos (14,7%) em relação aos genótipos SA1, SA2, SA3 e EET 111 (7,0%, 4,7%, 3,1% e 1,1%, respetivamente). Em todos os genótipos, os embriões somáticos se desenvolveram entre os 45 e 60 dias após a transferência para o meio de cultura ED. O genótipo EET 103 desenvolveu o maior número de embriões por calo (20), sendo estatisticamente diferente dos genótipos SA1, SA2, SA3 e EET 111 que desenvolveram embriões em menor número (5,3; 3,3; 1,8 e 1,2, respectivamente) (Tabela 1).

A embriogênese somática secundária foi induzida a partir de cotilédones dos embriões somáticos secundários. A sua expressão ocorreu a partir dos 45 dias após a indução, na qual se verificou a formação dos embriões somáticos na superfície dos explantes. A resposta embriogênica diferiu estatisticamente entre os genótipos avaliados. Os genótipos EET 103, EET, 111, SA1 mostraram uma taxa média de indução de 57,1% comparativamente aos valores observados para o genótipo SA2 (36,4%). Todos os genótipos avaliados nesta etapa desenvolveram embriões e o genótipo EET 103 resultou no maior valor de embriões somáticos (13), valor este estatisticamente diferente daquele resultante dos genótipos SA1, SA2 e EET 111 que desenvolveram embriões em menor número (7,2; 5,4; 1,2, respectivamente) (Tabela 1).

Tabela 1. Eficiência embriogênica do cacauieiro (*Theobroma cacao* L.) a partir de estaminóides (embriogênese primária) e cotilédones de embriões somáticos (embriogênese secundária).

Genótipos	Embriogênese primária		Embriogênese secundária	
	Resposta embriogênica (%)	Número médio de embriões por explante	Resposta embriogênica (%)	Número médio de embriões por explante
EET 103	14,7 a	19,8 a	57,1 a	13,0 A
EET 111	1,1 c	3,2 b	72,7 a	7,2 A b
SA 1	7,0 b	5,2 b	73,7 a	5,4 B
SA 2	4,7 b	1,3 b	36,4 b	1,2 C
SA 3	3,0 bc	1,8 b		

Número de culturas que produziram embriões e número total de embriões foi avaliado a cada duas semanas durante 10 meses. Os dados de resposta embriogênica estão expressos em porcentagem e em número o valor médio de embriões por cultura embriogênica. As letras minúsculas indicam diferença estatística entre os genótipos. Para a resposta embriogênica os dados foram submetidos a Teste de contingência e para número de embriões os dados foram transformados para Log (x+1), submetidos a ANOVA e teste de separação de médias TUKEY (p<0,05).

A variação genotípica foi significativa para a resposta embriogênica de todos os genótipos avaliados tanto na embriogênese primária quanto na secundária. Os genótipos avaliados mostraram valores superiores de resposta embriogênica na embriogênese somática secundária quando comparada com a embriogênese somática primária. No entanto, com respeito ao número de embriões, o genótipo EET 103 resultou em valores inferiores na embriogênese somática secundária do que na embriogênese somática primária. O genótipo EET 111 apresentou um efeito contrário formando um maior número de embriões na embriogênese secundária e os genótipos SA1 e SA2 apresentaram o mesmo número de embriões tanto na embriogênese somática primária quanto na secundária (Tabela 1).

Uma característica comum observada na embriogênese primária e secundária foi a assincronia do processo. Esta característica foi também reportada para outras espécies vegetais, entre as quais *Vitis sp.* (JAYASANKAR *et al.*, 1999); *Dacus carota* (MICHALCZUK *et al.*, 1992); *Arachis sp.* (CHENGALRAYAN *et al.*, 1994); *Acca sellowiana* (GUERRA *et al.*, 2001) e *Bactris gasipaes* (STEINMACHER *et al.*, 2007).

No presente estudo foi possível visualizar a eficiência dos cotilédones de embriões como explantes para a indução da embriogênese repetitiva ou cíclica. Segundo MROGINSKI *et al.* (2010), quanto mais jovem e indiferenciado se encontra o explante, melhor será sua resposta *in vitro*. De acordo com OLMOS *et al.* (2010) os materiais que demonstram ter maior capacidade regenerativa são os obtidos de tecidos meristemáticos jovens, sejam gemas axilares ou adventícias, embriões ou sementes. Os cotilédones podem ser considerados como um tecido embrionário com elevada plasticidade de desenvolvimento, como confirmado no presente trabalho.

A expressão da embriogênese secundária foi visível após 60 dias de cultivo (Figura 1g), um tempo menor quando comparado com a embriogênese somática primária que se manifestou a partir dos 90 dias de cultivo (Figura 1c). Estas observações coincidem com os resultados apresentados por MAXIMOVA *et al.* (2002), os quais demonstraram que a formação de embriões na embriogênese somática primária e secundária de *Theobroma cacao* L. esta associada a origens ontogênicas diferentes para cada padrão de desenvolvimento. ALEMANNI *et al.* (1996b) mostrou que a embriogênese somática primária tem origem multicelular na qual a formação do embrião somático tem uma etapa intermediária de formação de calo, sendo este um característico padrão de formação indireto. Por outro lado, embriões somáticos secundários se formam a partir de uma única célula, sendo esta uma rota de formação direta, a qual comparada com a embriogênese primária mostrou formação de um número maior de embriões normais (MAXIMOVA *et al.*, 2002).

Assim, um número menor de variantes genéticas foram detectadas entre os embriões somáticos secundários quando comparados aos embriões primários de *Theobroma cacao* L. (RODRIGUEZ *et al.*, 2010), este resultado é similar ao obtido no trabalho realizado por FANG *et al.* (2009) no que embriões somáticos de *Theobroma cacao* L.

formados na embriogênese secundária não mostraram mutação. A eficiência na embriogênese somática secundária foi descrita também para várias outras espécies, tais como: *Juglans regia* (POLITO *et al.*, 1989); *Acanthopanax koreanum* (CHOI *et al.*, 1997); *Dianthus sp.* (PAREEK *et al.*, 2003); *Coffea arabica* (FIGUEROA *et al.*, 2006) e *Bactris gasipaes* (STEINMACHER *et al.*, 2011).

Neste contexto, a embriogênese somática secundária se configura como uma técnica potencial para o estabelecimento de um processo de micro propagação cíclico de genótipos de *Theobroma cacao* L. Contudo é preciso levar em consideração que esta técnica está restrita à formação de embriões primários e à resposta genótipo-dependente.

Segundo os resultados obtidos neste estudo foi possível determinar que a resposta embriogênica é influenciada significativamente pelo genótipo. Segundo MOTAMAYOR *et al.* (2008) o *Theobroma cacao* L. é uma espécie com uma ampla diversidade genética dividida em 10 grupos geneticamente diferentes. Os genótipos avaliados neste trabalho se encontram classificados dentro do grupo genético Nacional de ocorrência restrita ao Equador.

O efeito do genótipo na embriogênese somática de *Theobroma cacao* L. foi reportado por diferentes autores (LOPEZ-BAEZ *et al.*, 1993; ALEMANNI *et al.*, 1996b; LI *et al.*, 1998; MAXIMOVA *et al.*, 2002; TAN e FURTEK, 2003; TRAORE, 2006; ISSALI *et al.*, 2008). A diversidade genética da espécie tem sido um dos principais problemas para desenvolver protocolos eficientes de embriogênese somática. Assim LOPEZ-BAEZ *et al.* (1993) e ALEMANNI *et al.* (1996b), estudaram esta rota morfogenética nos grupos genéticos Criollo, Forastero e Trinitario (classificação segundo CHEESMAN, 1944) e reportaram resposta embriogênica apenas para o grupo Forastero. LI *et al.* (1998), foi o primeiro em observar resposta embriogênica para os três grupos genéticos a partir de explantes derivados de partes florais (estaminóides e pétalas). A partir deste trabalho vários outros autores (MAXIMOVA *et al.*, 2002; TRAORE, 2006; ISSALI *et al.*, 2008) também observaram respostas embriogênicas para os grupos Criollo, Forastero, Trinitario e para híbridos comerciais.

Os resultados do presente trabalho mostram uma resposta embriogênica favorável do grupo genético Nacional usando o protocolo desenvolvido por MAXIMOVA *et al.* (2002) e modificado por MINYAKA *et al.* (2008) (Tabela 1). São desconhecidos relatos na literatura sobre a capacidade embriogênicas de genótipos de *Theobroma cacao* L. do grupo Nacional, sendo estes os primeiros resultados encontrados até o presente momento.

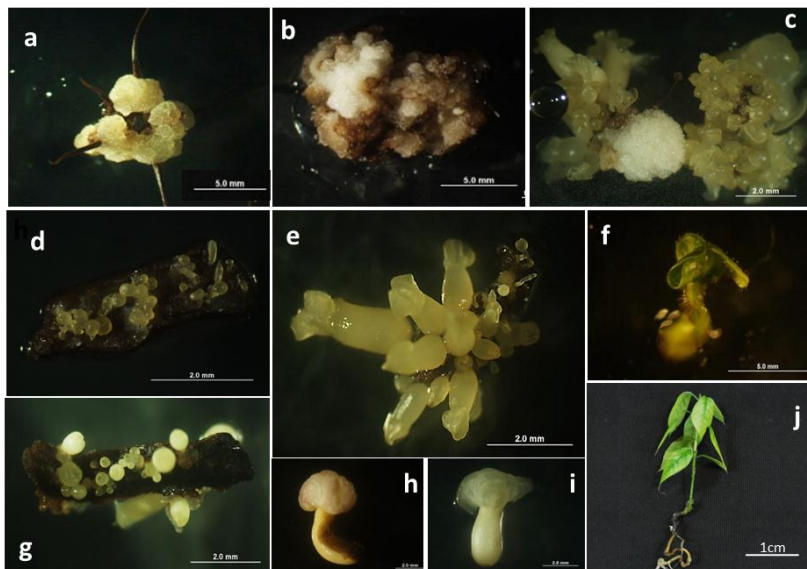


Figura 1. Fases da embriogênese somática de *Theobroma cacao* L. a) Indução da embriogênese somática primária a partir de estaminóides; b) Calo derivado de estaminóides; c) Expressão da embriogênese somática primária; d) Embriogênese somática direta; e,g) Expressão da embriogênese somática secundária; h) Embrião somático leitoso normal; i) Embrião somático translúcido normal; f) Conversão do embrião somático; j) Plântula regenerada *in vitro*.

A embriogênese somática é o resultado de um processo morfogênético no qual as células indiferenciadas adquirem competência embriogênica (FEHÉR, 2005). Em *Theobroma cacao* L. a expressão da embriogênese somática secundária resultou na formação de vários tipos de embriões, os quais poderão ser classificados pela aparência em leitosos e translúcidos (Figura 1h,i) e pela característica morfológica em normal e anormal. Embriões normais foram considerados aqueles que apresentaram bipolaridade definida, dois cotilédones e o hipocótilo bem formados. Por outro lado embriões anormais se consideraram aqueles

que apresentaram mais de dois cotilédones, hipocótilos fusionados e embriões com ausência de polaridade.

O número total de embriões totais formados da embriogênese somática secundária foi avaliado e os mesmos foram separados segundo as diferentes características morfológicas observadas: leitoso normal, leitoso anormal, translúcido normal e translúcido anormal. A observação de embriões somáticos de *Theobroma cacao* L. com aparência diferente foi mencionada por LI *et al.* (1998). Foram identificados embriões normais de dois tipos distintos: o primeiro tipo foi embriões com aparência esbranquiçada (*whitish*) e o segundo tipo com aparência amarelada e tráslúcida (*yellowish and translucent*). Esta classificação pode ser considerada similar aquela proposta para o presente trabalho, isto é: leitosos (Figura 1h) e translúcidos (Figura 1i). Ainda no presente estudo, o genótipo EET 103 foi o que mais formou embriões por explante (14), resultando em um embrião somático leitoso anormal, 5 leitosos normais, 5 translúcidos normais e 3 translúcidos anormais, sendo quantidade de embriões estatisticamente diferente entre si. Nos genótipos SA 1 e EET 111 não se observou diferença significativa no número total de embriões somáticos como também não foi observada diferença entre o número de embriões produzidos de cada um dos tipos (Figura 2).

Os dados apresentados mostraram que aproximadamente o 50% dos embriões formados durante a embriogênese somática secundária corresponderam ao grupo de embriões anômalos. A observação de embriões somáticos anômalos na embriogênese somática de *Theobroma cacao* L. foi reportada anteriormente. Assim, ALEMANO *et al.*, (1996b), e MAXIMOVA *et al.*(2002), classificaram os embriões somáticos desta espécie em três categorias: 1- embriões normais com polaridade definida, meristema apical e radicular e dois cotilédones; 2- embriões fusionados no hipocótilo ou nos cotilédones e a categoria 3 - os embriões sem polaridade. LI *et al.* (2008) e TAN e FURTEK (2003) também observaram na embriogênese somática de *Theobroma cacao* L. a formação de um grande número de embriões anômalos e assinalaram que a conversão destes nem sempre resultava em uma plântula anômala, mas sim que estes se desenvolviam mais lentamente do que os embriões somáticos normais.

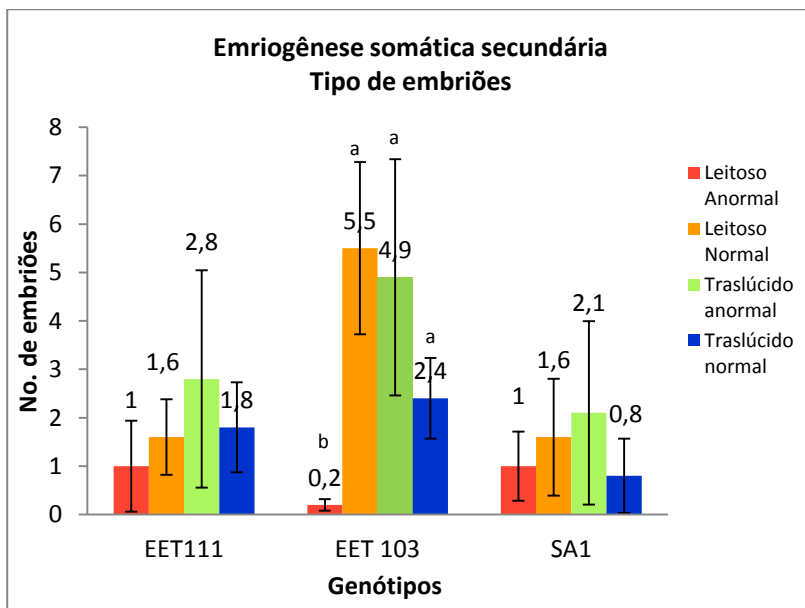


Figura 2. Número médio de embriões somáticos dos tipos leitoso normal e anormal, translúcido normal e anormal observados durante a embriogênese somática primária e secundária de *Theobroma cacao* L. dos genótipos EET 103, EET 111 e SA 1. Valores médios seguidos de \pm erro padrão (barras verticais). As letras minúsculas indicam diferença estatística entre os tipos de embriões do genótipo EET 103. Os dados foram transformados para $\text{Log}(x+1)$, submetidos a ANOVA e teste de separação de médias TUKEY ($p < 0,05$).

A formação de embriões anômalos na embriogênese somática de varias espécies também tem sido assinalada. Assim, em *Acca sellowiana* determinou-se que apenas 25% dos embriões formados foram considerados como normais, atribuindo-se este efeito a vários fatores tais como os diferentes planos de divisão das células embriogênicas, a origem unicelular ou multicelular do embrião e aos efeitos do 2,4-D no meio de indução (PESCADOR *et al.*, 2008).

Com frequência, o desenvolvimento de embriões anômalos tem sido observado quando se utiliza o 2-4 D no meio de indução

(RODRÍGUEZ e WETZSTEIN, 1998; PESCADOR *et al.*, 2008) e efeitos prejudiciais na capacidade de regeneração dos embriões foram encontrados (LAZZERI *et al.*, 1987 e SOFIARI *et al.*, 1997). No entanto, em muitos casos a morfologia anormal dos embriões não diminui a capacidade de conversão dos embriões (PARK e FACCHINI, 2000).

5.2 Análises histológicas por microscopia óptica

Para verificar a condição morfológica dos embriões do tipo leitoso e translúcido normal, análises histológicas por microscopia óptica foram realizadas. O azul de toluidina, reagente utilizado nas análises histológicas do presente estudo, apresentou reação metacromática em azul no citoplasma e o núcleo das células, não marcando vacúolos.

Os embriões somáticos do tipo leitoso (figura 3a) e translúcido normal (figura 3j) mostraram padrões morfológicos iguais. Nas secções longitudinais foi possível observar a polaridade do embrião (Figura 3b, k), identificando-se o meristema apical (Figura 3d, n) o qual apresentou células mais densas e semelhantes às células do meristema radicular (Figura 3 e, l). Nas secções longitudinais e transversais (Figura 3 cm) os feixes vasculares foram evidentes e grande quantidade de capsulas de compostos fenólicos se distribuíram por todo o tecido do embrião.

5.3 Conversão de embriões somáticos

Durante a conversão dos embriões somáticos de *Theobroma cacao* L., foi possível diferenciar o comportamento dos embriões do tipo leitoso e a dos embriões do tipo translúcido. A conversão dos embriões do tipo leitoso normal se caracterizou por ser um processo precoce, acompanhado da formação de raízes primárias e a subsequente alongação do hipocótilo (Figura 3f), posteriormente se iniciou o esverdeamento dos hipocótilos e dos cotilédones (Figura 3g), finalizando com o aparecimento de folhas jovens (Figura 3h) e a regeneração de uma plântula normal (Figura 3i). Por outro lado, a conversão dos embriões do tipo translúcido normal, se caracterizou pela ausência de raízes; os cotilédones permaneceram dormentes e o hipocótilo intumescceu sem o alongamento característico (Figura 3o). Na maioria dos casos observou-se o esverdeamento dos hipocótilos e dos cotilédones (Figura 3p).

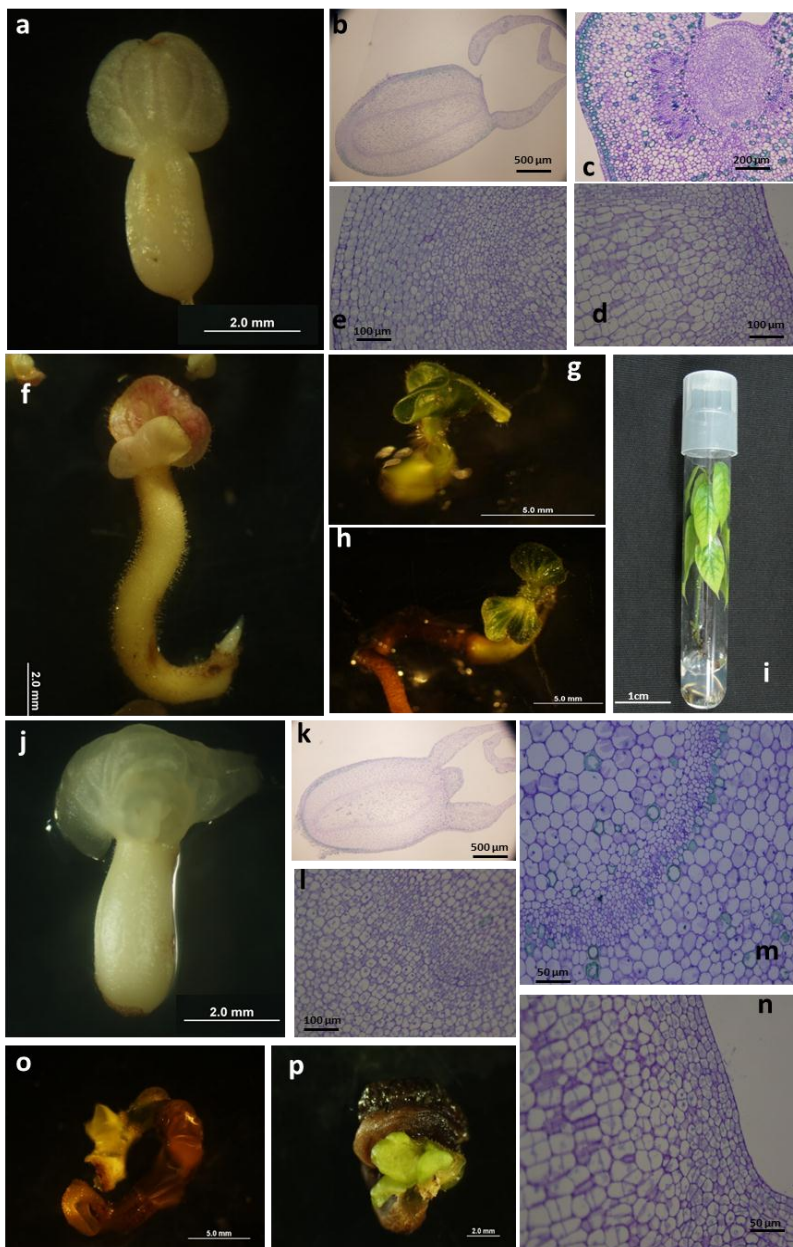


Figura 3. Processo de conversão dos embriões somáticos de *Theobroma cacao* L. a) Embrião somático leitoso normal; b) Secção longitudinal do embrião leitoso submetido ao teste de ATO, mostrando polaridade definida e faixa procambial evidente; c) Secção transversal do embrião, ressaltado a presença de feixes vasculares e de compostos fenólicos; d) Secção longitudinal submetida ao teste de ATO, revelando a presença de células mais densas na região do meristema apical; e) Secção longitudinal submetida ao teste de ATO, evidenciando a presença de células mais densas na região do ápice radicular; f) Início da conversão emergência de raiz primária; g) Esverdecimento dos cotilédones; h) Primórdios foliares; i) Plântula regenerada in vitro; j) Embrião somático translúcido normal; k) Secção longitudinal do embrião submetida ao teste de ATO, revelando polaridade definida e faixa procambial evidente; l) Secção longitudinal submetida ao teste de ATO, presença de células mais densas na região do ápice radicular; m) Secção transversal do embrião, ressaltado a presença de feixes vasculares e compostos fenólicos; n) Secção longitudinal submetida ao teste de ATO, presença de células mais densas na região do meristema apical; o-p) Embrião somático translúcido após a conversão.

A porcentagem média de conversão dos embriões somáticos do tipo leitoso foi de 76% para o genótipo EET 103 e de 90% para o genótipo EET 111. Em quanto que, a porcentagem de conversão dos embriões do tipo translúcido foi de 15% para o genótipo EET 103 e 17,8% para o genótipo EET 111. Os resultados não mostraram diferença estatística entres os genótipos, no entanto diferença estatística foi observada entre a capacidade de conversão em plântulas entre os embriões do tipo leitoso e translúcido (Figura 4).

Os resultados de conversão mostrados na Figura 4 são muitos semelhantes aos reportados por LI *et al.* (1998), para os quais, a partir de embriões somáticos do genótipo SCA-6-AI formados na embriogênese primária foram observadas taxas de conversão dos embriões do tipo leitoso maiores do que 70% e não maiores do que 30% para os embriões do tipo translúcido.

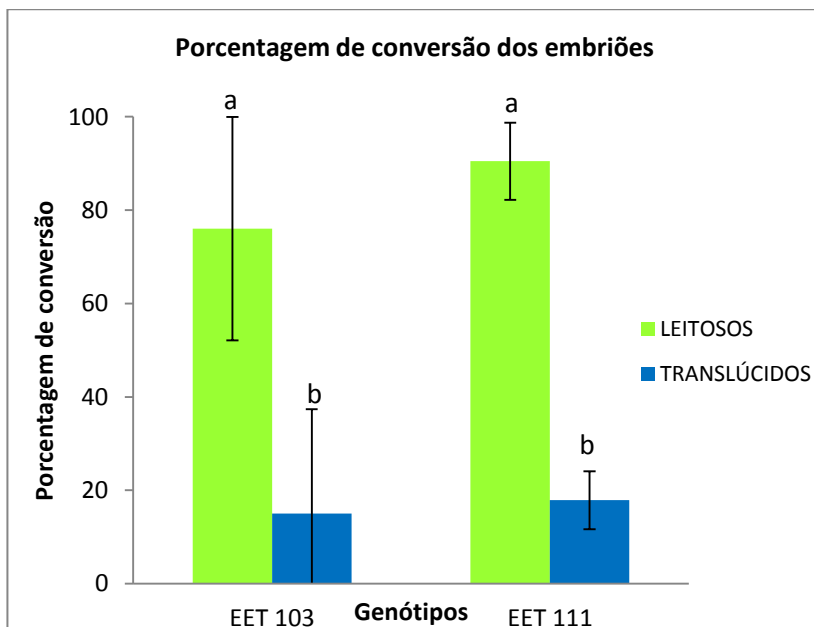


Figura 4. Porcentagem de conversão dos embriões somáticos do tipo leitoso e translúcido dos genótipos EET 103 e EET 111 de *Theobroma cacao* L. Valores médios seguidos de \pm desvio padrão. As letras minúsculas indicam diferença estatística entre os tipos de embriões dentro dos genótipos. Os dados foram transformados para $\text{Log}(x+1)$, submetidos a ANOVA e teste de separação de médias TUKEY ($p < 0,05$).

A aplicação dos sistemas *in vitro* baseados na embriogênese somática para a regeneração clonal de plantas depende não somente da eficiência na formação e desenvolvimento de embriões, mas também pela capacidade dos mesmos em gerar plântulas normais (REDENBAUGH *et al.*, 1986). Tem sido postulado que a capacidade de conversão dos embriões somáticos está determinada pelo equilíbrio hormonal e o acúmulo de substâncias de reserva (BROWNFIELD *et al.*, 2007), bem como pela maturidade morfológica e fisiológica do embrião alcançada durante a ontogênese embrionária (STASOLLA e YEUNG, 2003). Em vários sistemas, uma grande quantidade de

embriões é produzida, mas o principal problema ainda é a baixa frequência de conversão (GAJ, 2004).

Resultados anteriores em *Theobroma cacao* L. indicaram baixas taxas de conversão dos embriões somáticos em plântulas. Segundo TRAORE (2006), entre 16 e 21% dos embriões converteram em plântulas após 60 dias de cultivo. QUAINOO e DWOMON (2012) obtiveram 52% de conversão após 60 dias de cultura associado ao uso de 0,1 μ M de ABA no meio de cultura antes de sua conversão.

No presente trabalho, a taxa de conversão dos embriões somáticos do tipo leitoso foi de 76% e 90% (Figura 4) e estes resultados superam as taxas de conversão encontradas nos trabalhos anteriormente citados para esta espécie, indicando um bom potencial de conversão deste tipo de embrião somático. No entanto, apenas o 25% dos embriões formados corresponderam ao grupo leitoso normal.

A conversão dos embriões somáticos em plântulas é um processo equivalente à germinação em sementes. Assim, durante a conversão o meristema apical e radicular devem se tornar metabolicamente ativos. O êxito do processo de conversão esta condicionado pelo potencial do embrião somático para responder a esta rota de desenvolvimento, bem como da correta expressão espacial e temporal dos genes (LI *et al.*, 2002). Segundo FRAGA *et al.* (2012) a metilação do DNA é um dos inúmeros mecanismos que regulam a expressão genica e por tanto governam a transição do embrião somático heterotrófico/mixotrófico a condição de plântula autotrófica

O presente trabalho constitui o primeiro relato da embriogênese somática de *Theobroma cacao* L. do grupo genético Nacional. Assim, as informações geradas são relevantes, dado o potencial da técnica para a propagação massal *in vitro* de genótipos elite. Os resultados encontrados na etapa de conversão mostraram que uma elevada porcentagem de conversão dos embriões somáticos pode ser obtida a partir da classificação e seleção dos embriões somáticos. No entanto, as características que determinam a capacidade de conversão dos embriões somáticos do tipo leitoso, assim como os mecanismos que regulam a conversão dos embriões somáticos em plantas, precisam ser melhor elucidados.

6. Referencias bibliográficas

ALEMANNI, L.; BERTHOULY, M.; MICHAUX-FERRIÈRE, N. Somatic embryogenesis of cocoa from floral parts. *Plantations, Recherche, Developpement*, Paris, v. 3, n. 4, p. 225-237, 1996.

BROWNFIELD, L.; HAFIDH, S.; BORG, M.; SIDOROVA,; MOR, I T.; TWELL, D. A. Plant germline-specific integrator of sperm specification and cell cycle progression. *PLOS Genet*, v. 5, e1000430, 2009a.

CHEESMAN, E. E. Notes on the nomenclature, classification and possible relationships of cocoa populations. *Tropical Agriculture*, London, v. 21, n. 8, p. 144-159, 1944.

CHENGALRAYAN, K.; ABOUZID, A.; GALLO-MEAGHER, M. In vitro regeneration of plants from sugarcane seed-derived callus. *In Vitro Cellular & Developmental Biology –Plant*, v. 41, p. 477-482, 2005.

CHOI, Y.E.; KIM, J.W.; SOH, W.Y. Somatic embryogenesis and plant regeneration from suspension cultures of *Acanthopanax koreanum* Nakai. *Plant Cell Reports*, v.17, p. 84-88, 1997.

DRIVER, J.A.; KUNIYUKI, A.H. In vitro propagation of Paradox walnut root stock. *Horticultural Science*, v. 19, p. 507–509, 1984.

ESAN, E. B. Tissue culture studies on cacao (*Theobroma cacao* L.), a supplementation of current research. In International cocoa research conference, Idaban, resume, p. 116-125, 1977.

FEHÉR, A. Why Somatic Plant Cells Start to form Embryos?. *Somatic Embryogenesis. Plant Cell Monographs*, Robinson DG, series ed., Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Germany, v. 2, p. 85-101, 2005.

FRAGA, H. P. F; VIEIRA, L. N.; CAPRESTANO, C. A.; STEINMACHER, D. A.; MICKE, G.A.; SPUDEIT, D. A.;

PESCADOR, R.; GUERRA, M. P. 5-Azacytidine combined with 2,4-D improves somatic embryogenesis of *Acca sellowiana* (O. Berg) Burret by means of changes in global DNA methylation levels. *Plant Cell Reports (Print)*, V.31, n. 12, p. 2165-2176, 2012.

GAJ, M.D. Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Growth Regulation*, v. 43, n. 1, p. 27-47, 2004.

GUERRA, M.P.; DAL VESCO, L.L.; DUCROQUET, J.P.H.J.; NODARI, R.O.; REIS, M. Somatic embryogenesis in Goiabeira-serrana: Genotype Response, Auxinic shock and synthetic seeds. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v. 13, p. 117-128. 2001.

ISSALI, A.E.; TRAORÉ, A.; KOFFI, K.E.; NGORAN, J.A.K.; SANGARÉ, A. Characterization of callogenic and embryogenic abilities of some genotypes of cocoa (*Theobroma cacao* L.) under selection in Côte d'Ivoire. *Biotech*, v. 7, p. 51-58, 2008.

JAYASANKAR, S.; LITZ, R.E.; GRAY, D.G. 2000. In vitro selection of *Vitis vinifera* 'Chardonnay' with *Elsinoe ampelina* culture filtrates is accompanied by fungal resistance and enhanced secretion of chitinase. *Planta*, v. 211, p. 200-208, 2008.

LAZZERI, P.A.; HILDEBRAND, D.F.; COLLINS, G.B. Soybean somatic embryogenesis: effects of hormones and culture manipulations. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 10, p. 197-208, 1987.

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

LOPEZ-BAEZ, O.; BOLLON, H.; ESKES, A. B.; PÉTIARD, V. Embryogenèse somatique de cacaoyer *Theobroma cacao* L. à partir de pièces florales. *Sciences de la vie*, Paris, n. 316, p. 579-584, 1993.

MAXIMOVA, S. N.; ALEMANNI, L.; YOUNG, A.; FERRIERE, N.;

TRAORE, A.; GUILTINAN, M. Efficiency, genotypic variability, and cellular origin of primary and secondary somatic embryogenesis of *Theobroma cacao* L. In *Vitro Cell Developmental Biology*, New York, v. 38, p. 252-259, 2002.

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

MICHALCZUK, L.; RIBNICKY, D.M.; COOKE, T.J.; COHEN, J.D. Cohen regulation of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in carrot cell cultures. *Plant Physiology*, v. 100, p.1346-1353, 1992.

MILLER, C.R.; GUILTINAN, M.J. Perspectives on rapid vegetative multiplication for orthotropic Scion and rootstock varieties of cocoa. In: *International workshop on cocoa breeding form improved production systems*, Accra, p.189-194, 2003.

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

MOTAMAYOR, J.C.; LACHENAUD, P.; DA SILVA, E.; MOTA J.W.; LOOR, R.; KUHN, D.N. Geographic and Genetic Population Differentiation of the Amazonian Chocolate Tree (*Theobroma cacao* L.). *PLoS ONE*, v. 3, n. 10, p. e3311, 2008.

MROGINSKI, M.; SANSBERRO, P.; FLASCHLAND, E. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. *Biología y mejoramiento vegetal II*. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, INTA. Buenos Aires, 650 p. 2010.

NIEMENAK, N.; SAARE-SURMINSKI, K.; ROHSIUS C.; NDOUMOU, DO.; 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.

OLMOS, S.; LUCIANI, G.; GALDEANO E. Micropropagación Em: Biotecnología y mejoramiento vegetal II. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, INTA. Buenos Aires, p. 210, 2010.

PAREEK, A.; KOTHARI, S.L. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf cultures of ornamental species of *Dianthus*. *Scientia Horticulturae*, v. 98, p. 449-459, 2003.

PARK, S.U.; FACCHINI, P.J. High efficiency somatic embryogenesis and plant regeneration in California poppy, *Eschsholzia California* Cham. *Plant Cell Reports*, v.19, p.421–426, 2000.

PESCADOR, R.; KERBAUY, G. B.; VIVIANI, D.; KRAUS, J. E. Anomalous somatic embryos in *Acca sellowiana* (O. Berg). *Revista Brasileira de Botânica*, v. 31, p. 155-164, 2008.

POLITO, V.S.; MCGRANAHAN, G.; PINNEY, K.; LESLIE, C. Origin of somatic embryos from repetitively embryogenic cultures of walnut (*Juglans regia* L.): implications for Agrobacterium-mediated transformation. *Plant Cell Reports*, v.8, p. 219-221, 1989.

QUAINOO, A.K.; DWOMON, I.B. The Effect of Abscisic Acid in the Conversion of Cocoa Somatic Embryos into Plantlets. *Frontiers in Science*, v. 2, n. 2, p. 6-10, 2012.

REDENBAUGH, K.; PAASCH, B.D.; NICHOL, J.W.; KOSSLER, M.E.; VISS, P.R.; WALKER, K.A. Somatic seeds encapsulation of asexual plant embryos. *BioTechnology*, v. 4, p.797–801, 1986.

RODRÍGUEZ LÓPEZ, C.M.; WETTEN, A.C.; WILKINSON, M.J. Detection and quantification of in vitro-culture induced chimerism using simple sequence repeat (SSR) analysis in *Theobroma cacao* L. *Theoretical and Applied Genetics*, v.110, p. 157–166, 2004.

RODRÍGUEZ LÓPEZ, C.M.; WETTEN, A.C.; WILKINSON,

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

RODRIGUEZ, A.P.M.; WETZSTEIN, H.Y. A morphological and histological comparison of the initiation and development of pecan (*Carya illinoensis*) somatic embryogenic cultures induced with naphthaleneacetic acid or 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Protoplasma*, v.204, p.71-83, 1998.

SCHMIDT, E. C.; SANTOS, R.; HORTA, P. A.; MARASCHIN, M.; BOUZON, Z. L. Effects of UVB radiation on the agarophyte *Gracilaria domingensis* (Rhodophyta, Gracilariales): Changes in cell organization, growth and photosynthetic performance. *Micron*, v. 41, p. 919-930, 2010.

SOFIARI, E.; RAEMAKER C.J.J.M.; KANJU, E.; DANSO, K.; VANLAMMEREN, A.M. Jacobsen E.; Visser, R.G.F. Comparison of NAA and 2, 4-D induced somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, v. 50, n. 1, p. 45-56, 1997.

STASOLLA, C; YEUNG, E.C. Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryos quality. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, v. 74, p 15-35, 2003.

STEINMACHER, D. A.; GUERRA, M. P.; SAARE-SURMINSKI, K.; LIEBEREI, R. A temporary immersion system improves in vitro regeneration of peach palm through secondary somatic embryogenesis. *Annals of Botany*, p. 1, 2011.

STEINMACHER, D.A.; KROHN, N. G.; DANTAS, A. C.M.; STEFENON, V. M.; CLEMENT, C. R. ; GUERRA, M.P. Somatic Embryogenesis in Peach Palm Using the Thin Cell Layer Technique: Induction, Morpho-histological Aspects and AFLP Analysis of Somaclonal Variation. *Annals of Botany*, v. 100, p. 699-709, 2007.

TAN, C. L.; FURTEK, D. B. Development of an in vitro regeneration

system for *Theobroma cacao* from mature tissues. *Plant Science, Calcutta*, v. 164, p. 407-412, 2003.

TRAORE, A. Effects of carbon source and explant type on somatic embryogenesis on four cacao genotypes. *Hortscience*, v. 41, ed. 3, p. 753–758, 2006.

TRAORE, A. Somatic embryogenesis, embryo conversion, micropropagation and factors affecting genetic transformation of *Theobroma cacao* L. PhD thesis, The Pennsylvania State University, University Park, 2000.

CAPÍTULO 3 – ESTUDO DA METILAÇÃO DO DNA GLOBAL DE EMBRIÕES SOMÁTICOS E PLÂNTULAS DE *Theobroma cacao* L. POR MEIO DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA HPLC/UV.

1. Resumo

A metilação do DNA é conhecida por desempenhar um papel crucial na regulação do desenvolvimento das plantas e órgãos ou na diferenciação de tecidos. Durante a embriogênese somática secundária de *Theobroma cacao* L. foram identificados dois tipos de embriões somáticos, segundo a aparência visual foram classificados em leitosos e translúcidos. No presente trabalho foram comparados os níveis de metilação global do DNA dos embriões somáticos de *Theobroma cacao* L. no estágio cotiledonar formados na embriogênese somática secundária assim como também das plântulas regeneradas após a conversão dos embriões, DNA por meio de cromatografia líquida de alta eficiência HPLC/UV. Os resultados mostraram a não divergência no padrão da metilação do DNA dos embriões do tipo leitoso com as plântulas regeneradas a partir de este tipo de embriões. Contudo, um efeito de demetilação do DNA foi observado quando comparados os embriões translúcidos e as plântulas resultantes da conversão destes embriões. Assim, sugere-se que a metilação do DNA regulou o processo de conversão dos embriões somáticos e que caso a demetilação do DNA não for transitória podem ocorrer distúrbios na formação dos embriões somáticos.

2. Abstract

DNA methylation is known to play a crucial role in the regulation of plant development and differentiation. During secondary somatic embryogenesis of *Theobroma cacao* L. it was identified two types of somatic embryos: opaque and translucent. In the present study we compared the levels of global DNA methylation of *Theobroma cacao* L. somatic embryos at the cotyledonary stage, as well as the resulting regenerated plantlets by means of high performance liquid chromatography HPLC/UV. No differences were observed in the pattern of DNA methylation of opaque embryos and the regenerated plantlets from such embryos. However an effect of demethylation of DNA was observed when comparing the translucent embryos and their derived plantlets. Thus, it is suggested that DNA methylation might regulate the process of conversion of somatic embryos and that if DNA demethylation is not transient disturbances may occur in the formation of somatic embryos.

3. Introdução

A metilação do DNA é um fenômeno comum em eucariotos que tem efeitos epigenéticos e mutagênicos para diversas atividades celulares (PORTIS *et al.*, 2004). Em eucariotos, a distribuição e número de 5-methylcytosines (5mC) ao longo do DNA é hereditário, mas também pode mudar com o estado de desenvolvimento da célula (KOUKALOVA *et al.*, 2005).

Embora a função fisiológica da metilação do DNA em plantas não tem sido completamente compreendida, a metilação de DNA tem sido associada a numerosos processos biológicos, incluindo o *imprinting* genômico, a regulação da transcrição da expressão genica, controle da mobilidade dos elementos transponíveis e silenciamento de genes (HAFIZ *et al.*, 2001; MARTIENSSEN e COLOT, 2001; PASZKOWSKI E WHITHAM, 2001).

A metilação do DNA apresenta interesse científico e parte expressiva dos estudos tem se concentrado no seu efeito no silenciamento de genes (GRUNAU *et al.*, 2001). A metilação da citosina em regiões codificadoras ou promotoras pode bloquear a expressão dos genes-alvo, enquanto por outro lado a demetilação de DNA pode ser um dos passos necessários para a ativação da transcrição no genoma dos eucarióticos (FINNEGAN *et al.*, 2000; KOVARIK *et al.*, 2000; LU *et al.*, 2006).

A plasticidade da metilação é definida como as alterações de metilação/demetilação que ocorrem durante o crescimento e desenvolvimento da planta, tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Reduções no nível de metilação (hipometilação) numa população de células específica estão associados ao início de um programa de diferenciação, tal como a embriogênese somática (RAMCHANDANI *et al.*, 1999).

A regeneração de plântulas a partir do cultivo *in vitro* tem sido associada com o aparecimento ocasional de indivíduos que apresentam anomalias fenotípicas (ZHAO *et al.*, 2006). Este fenômeno é conhecido como variação somaclonal e tem duas causas principais: mutação genética e mudanças epigenéticas (RODRIGUEZ *et al.*, 2010).

No presente trabalho (Capítulo 2) evidenciara-se diferença estatística na porcentagem de conversão dos embriões somáticos do tipo

Leitoso e Translúcido formados durante a embriogênese secundária de *Theobroma cacao* L. Levando em conta que a metilação do DNA é um dos inúmeros mecanismos que regulam a expressão genica e por tanto governam a transição do embrião somático heterotrófico/mixotrófico a condição de plântula autotrófica.

Por tanto o presente capítulo teve como objetivo comparar os níveis de metilação global dos embriões somáticos do tipo Leitoso e Translúcido formados na embriogênese somática secundária de *Theobroma cacao* L. e das plântulas regeneradas após a conversão dos embriões, usando a metodologia de quantificação da metilação do DNA por meio de cromatografia líquida de alta eficiência HPLC/UV.

4. Material e métodos

4.1 Material vegetal

Foram utilizadas amostras de embriões somáticos em estágio cotiledonar do tipo leitoso e translúcido normal, plântulas convertidas e estruturas resultantes da conversão dos embriões somáticos formados na embriogênese somática secundária, dos genótipos EET 103 e EET 111. Amostras de 250 mg foram coletadas em triplicata.

4.2 Extração de DNA

As amostras coletadas foram submetidas à extração de DNA segundo o protocolo descrito por DOYLE E DOYLE (1987). Para a maceração do material as amostras foram depositadas em um cadinho de cerâmica ao qual foi adicionado nitrogênio líquido. Após a maceração foram adicionados 700 µl de tampão de extração (2% CTAB; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA; 100mM Tris-Cl, pH 8,0; 2% polivinilpirrolidona e 3% 2-mercaptoetanol), transferido para um microtubo de 2 ml e incubado em banho-maria (60-65°C) por 30 min, sendo agitado a cada 10 min para a homogeneização da amostra. Após a retirada do banho-maria foram adicionados 600 µl de clorofórmio-álcool isoamílico (CIA), submetido a agitação por inversão durante 5 min e centrifugação em microcentrífuga (12.000 a 15.000 RPM durante 8 min). Após esse procedimento, foi transferida a fase superior aquosa para um novo tubo onde foram adicionados 50 µl de CTAB 10% e 1,4 M de NaCl. O procedimento de extração com 600 µl de CIA foi repetido novamente, para garantir a qualidade do DNA por meio da máxima

extração de impurezas (proteínas, agentes fenólicos, entre outros) possível.

Após a segunda extração, foram adicionados 2/3 do volume de isopropanol para a precipitação do DNA por período não inferior a duas horas a -20°C . Submeteu-se a amostra a nova centrifugação (6000-7500 RPM) por 10 min, até a formação do pellet. O sobrenadante foi descartado e o pellet lavado duas vezes em álcool 70% por um minuto e uma vez em solução de etanol 95% por um minuto. O sobrenadante foi descartado e o pellet deixado secar por aproximadamente 30 min para a total evaporação do álcool. Uma vez lavado e livre de qualquer resíduo de álcool, o pellet foi resuspendido em 100 μl de tampão TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) e quantificado em espectrofotômetro Nanodrop® 1000 (NanoDrop Technologies, Inc.) que forneceu a concentração de ácido nucléico das amostras.

4.3 Digestão de ácidos nucléicos

Os procedimentos de digestão foram baseados no protocolo desenvolvido por JOHNSTON *et al.* (2005). As digestões com RNase realizadas com 100 μl de ácido nucléico (1 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$) em tampão TE. As amostras foram aquecidas a 65°C por 5 min para sua desnaturação e incubadas a 4°C por 10 min. Em seguida, foram adicionados 10 μl de RNase A (1 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$) e 10 μl de RNase T1 (20 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$) sendo vortexadas e incubadas a 37°C por 17 horas. Após a digestão, 20 μl de acetato de sódio (3M, pH 5,4) foram adicionados para uma concentração final de 0,3 M e os microtubos foram agitados. O DNA e o RNA resistente a RNase foram precipitados com 136 μl de isopropanol gelado (-20°C), agitados e incubados por 30 min a -20°C . As amostras foram então centrifugadas a $5.000 \times g$ por 10 min para formação de um *pellet*, sendo lavado com etanol 70% (v/v) e re-centrifugados a $5000 \times g$ por 5 min. Os *pellets* foram secos a temperatura ambiente e ressuspendidos em 100 μl de H₂O deionizada e autoclavada. A concentração de ácidos nucléicos foi novamente determinada conforme descrito anteriormente e as concentrações das amostras foram ajustadas para 0,25 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ em H₂O. As digestões de DNA com nuclease P1 e fosfatas alcalina foram realizadas utilizando 25 μg de ácido nucléico em 100 μl de H₂O

deionizada, de acordo com o descrito por JOHNSTON *et al.* (2005). Os ácidos nucleicos foram desnaturados por aquecimento a 100°C por 2 min e mantidos a 4°C por 5 min. Foram adicionados 5 µl de 10 mM ZnSO₄ e 10 µl de nuclease P1 (1.0 U.ml⁻¹ em NaOAc 30 mM (pH 5.4)) seguido da agitação das amostras e incubação para a reação de digestão a 37°C por 17 horas. Após este período, foram adicionados 10 µl de Tris 0.5 M (pH 8.3) e 10 µl de fosfatase alcalina (10 U.ml⁻¹ em (NH₄)₂SO₄ 2.5 M) aos microtubos, sendo agitados e incubados por 2h a 37°C. Por fim, as amostras foram centrifugadas a 10.000 × g por 5 min e o sobrenadante foi armazenado a -20°C até a análise por HPLC.

4.4 Análise por HPLC/UV

As análises por HPLC/UV foram baseadas no procedimento descrito por JOHNSTON *et al.* (2005). Foi utilizada uma coluna Hyperclone 5 µm C18 (250 × 4.6 mm) (Phenomenex®), pré-coluna (4.0 × 3.0 mm) (Phenomenex®) e detector UV a 280 nm. O programa de eluição por gradiente consistiu de 3 min com 100% de tampão A (0,5% v/v de metanol em tampão KH₂PO₄ 10 mM, pH ajustado para 3,7 com ácido fosfórico), seguido por um gradiente linear 3-20 min com 100% de tampão B (10% v/v de metanol em KH₂PO₄ 10 mM, pH ajustado para 3,7 com ácido fosfórico), seguido por 20-25 min com 100% de tampão B. O fluxo utilizado foi 1 mL.min⁻¹ sendo injetados 20 µl de amostra, com duas repetições cada, totalizando duas replicatas biológicas e duas replicatas técnicas de cada amostra.

As concentrações de nucleosídeos foram determinadas por comparação com padrões externos de acordo com a área do pico formado. Os padrões utilizados foram dNTPs (dA, dT, dC, 5mdC e dG) submetidos a digestão por duas horas com fosfatase alcalina (10 U.mL⁻¹) e Tris-HCl (0,5 M pH 8,3) a 37°C, visando obter-se os nucleosídeos. Os padrões de nucleosídeos (5-50 mM) foram preparados em H₂O deionizada e armazenados a -20°C.

A quantificação da 5-metil-2'-deoxicitina (5mdC) (%) foi calculada de acordo com a concentração de 5mdC dividido pela concentração de 5mdC somada a concentração de deoxicitidina (dC) multiplicado por 100.

Os dados de metilação do DNA (5mdC) dos embriões somáticos e das plântulas expressos em porcentagem foram submetidos a ANOVA e teste de separação de médias TUKEY (p<0,05).

5. Resultados e discussão

Os resultados da quantificação da metilação do DNA dos embriões somáticos e das plântulas revelaram padrões distintos de metilação em cada um dos genótipos avaliados (Tabela 1).

Tabela 1. Valores de metilação do (5mdC) expressos em porcentagem quantificada por HPLC/UV dos embriões somáticos e das plântulas de *Theobroma cacao* L. dos genótipos EET 103 e EET 111.

Genótipo	Tipo	Embrião		Plântula	
		Metilação % (5mdC)		Metilação % (5mdC)	
EET 103	Leitoso	14,76 ± 0,23	Bb	15,58 ± 0,35	Aa*
	Tráns-lúcido	17,49 ± 0,33	Aa	5,16 ± 0,15	Bc**
	Leitoso	17,8 ± 0,4	Aa	15,19 ± 0,1	Aa*
EET 111	Tráns-lúcido	17,15 ± 0,44	Aa	9,47 ± 0,27	Bb**

Valores médios seguidos de ± desvio padrão. Letras maiúsculas representam diferenças entre os tipos de embriões e plântulas e letras minúsculas entre os genótipos. Os dados foram submetidos a ANOVA e teste de separação de médias TUKEY ($p < 0,05$). * Plântulas normais ** Plântulas anormais.

No genótipo EET 103 a porcentagem da metilação dos embriões leitosos foi sutilmente menor, mas estatisticamente diferente, do que aquela observada nos embriões translúcidos (14,8% e 17,5%, respectivamente). Por outro lado, a porcentagem da metilação das plântulas normais, resultado da conversão dos embriões leitosos, mostraram valores superiores e estatisticamente diferentes do que as plântulas anormais, resultado da conversão dos embriões translúcidos (15,6% e 5,2% respectivamente). A relação da porcentagem da metilação entre o embrião e a planta, advertiu que o valor da porcentagem da metilação do embrião leitoso é sutilmente menor do que

o da planta normal quando comparada com a porcentagem da metilação do embrião translúcido e da plântula anormal, que é estatisticamente diferente (0,8% e 12,3%, respectivamente) (Tabela 1, Figura 1).

Para o genótipo EET 111, os resultados encontrados divergiram daqueles obtidos para o genótipo EET 103. A porcentagem da metilação dos embriões leitosos em relação aos embriões translúcidos foi sutilmente maior porém sem diferença estatística (17,8 % e 17,2%, respectivamente). No entanto, os valores da porcentagem da metilação das plântulas normais mostraram valores superiores do que os valores das plântulas anormais (15,9% e 9,5%, respectivamente), similar ao padrão da metilação observado no genótipo EET 103. Comparando os embriões e as plântulas após a conversão, observou-se que o valor da porcentagem da metilação do embrião leitoso é maior e estatisticamente diferente do que o da plântula normal (17,8% e 15,9%, respectivamente). Do mesmo modo, o valor da porcentagem da metilação do embrião translúcido foi expressivamente maior e estatisticamente diferente do que o valor da plântula anormal (17,2% e 9,5%, respectivamente) (Tabela 1, Figura 1)).

A metilação da citosina no DNA controla o crescimento e o desenvolvimento das plantas. A metilação específica da citosina em plantas controla praticamente todos os processos genéticos, incluindo a transcrição, replicação, mecanismo de reparo do DNA e diferenciação celular, além de estar particularmente envolvida no silenciamento de genes específicos e elementos de transposição (VANYUSHIN, 2006). Os padrões de metilação encontrados no presente trabalho possivelmente estão afetando diretamente o controle da expressão gênica, além de todos os processos genéticos descritos. Assim, os padrões expressos podem ser considerados como marcadores do processo de conversão dos embriões na embriogênese somática de *Theobroma cacao* L.

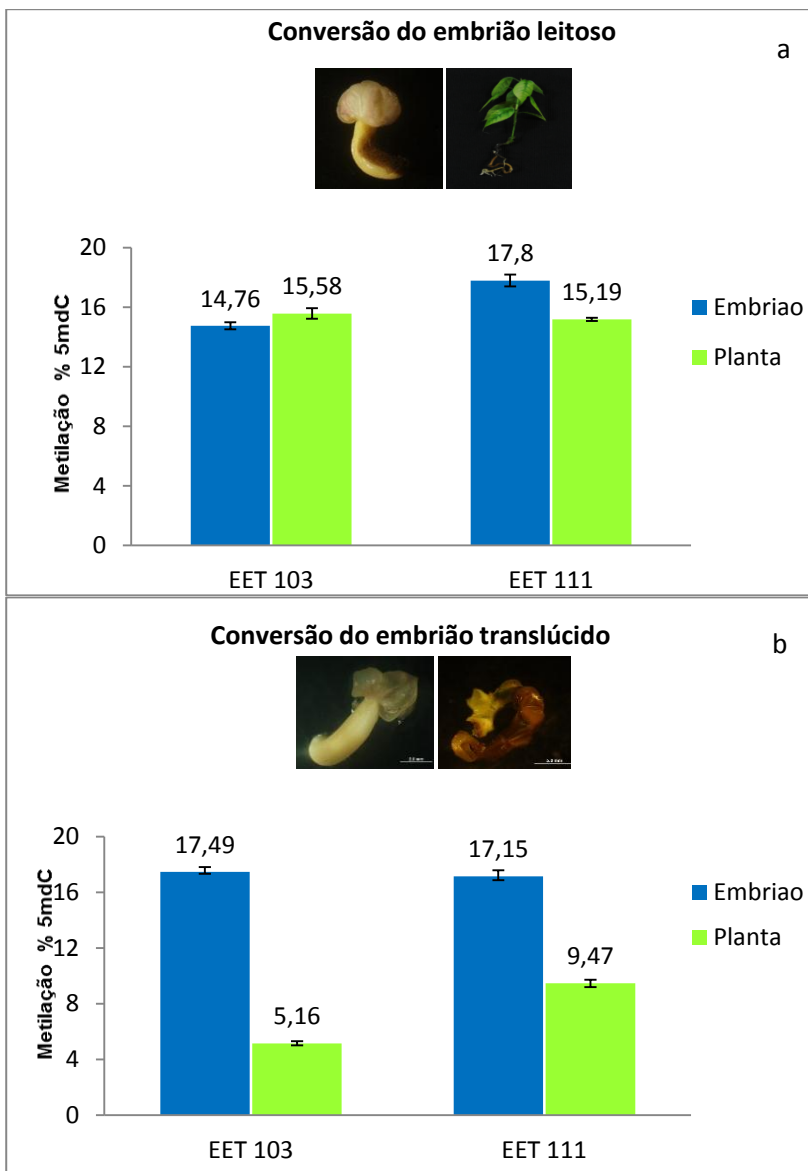


Figura 1. Metilação global (5mdC) expressada em porcentagem quantificada por HPLC/UV da relação embrião somático-plântula de *Theobroma cacao* L. após a conversão. A. Conversão dos embriões do tipo leitoso no genótipo EET 103 e EET 111. B. Conversão dos embriões do tipo Translúcido no genótipo EET 103 e EET 111. Valores médios seguidos de \pm desvio padrão (barras verticais). Letras maiúsculas representam diferenças entre os genótipos e letras minúsculas entre embriões somáticos e plantas. Os dados foram submetidos a ANOVA e teste de separação de médias TUKEY ($p < 0,05$).

A indução de embriogênese somática consiste na rescisão de um programa de expressão gênica no tecido do explante, e a sua substituição por um programa de expressão embriogênico (CHAKRABARTY *et al.*, 2003). Mudanças na metilação estão associadas à alteração de padrões que ocorre no processo de competência e de determinação sofrido pelo explante, e posteriormente na determinação dos embriões somáticos formados na embriogênese somática (RUIZ-GARCÍA *et al.*, 2005). Segundo FRAGA *et al.* (2012) essas alterações na metilação podem ser elementos chave do processo de morfogênese *in vitro*, visto que os processos de competência e determinação estão intimamente relacionados ao controle da expressão gênica.

No presente trabalho, a quantificação da metilação dos embriões normais formados na embriogênese somática de *Theobroma cacao* L. mostrou pequenas diferenças entre os genótipos (Tabela 1), que variou entre 14,8 % e 17,8%. A porcentagem de metilação encontrada nos embriões é muito similar ao valor encontrado em folhas jovens de *Oryza sativa* (16,3%) (XIONG *et al.*, 1999) e com o de sementes de *Brassica napus* em germinação (15,7 %) (LU *et al.*, 2006). No entanto este valor é significativamente menor do que o 35 e 43 % encontrado em plântulas de *Arabidopsis* (CERVERA *et al.*, 2002) e 20 e 45% encontrado em culturas embriogênicas de *Acca sellowiana* (FRAGA *et al.*, 2012). Estas diferenças no nível de metilação do DNA pode ser resultado dos diferentes tipos de tecidos testados ou do controle genético de cada um das espécies testadas, devido a divergências no tamanho do genoma, status hormonal dos explantes e condições de cultivo. Tem sido relatado que tanto os mecanismos genéticos e ambientais podem ser responsáveis pela variação dos níveis de metilação em *Arabidopsis* (RIDDLE e RICHARDS, 2002).

A aplicação dos sistemas *in vitro* baseados na embriogênese somática para a regeneração de plantas, esta determinada não só pela eficiência na formação de embriões, mas também pela frequência e capacidade dos embriões de se converter em plantas. O processo de mudanças que sofre o embrião para dar lugar a uma planta é conhecido como conversão e implica na formação de raízes primárias, a formação de um meristema com primórdios foliares e o reverdecimento de hipocótilos e cotilédones (REDENBAUGH *et al.*, 1986). A conversão dos embriões somáticos é um processo análogo à germinação de sementes. Assim, estudando a dinâmica da metilação do DNA durante o desenvolvimento das sementes de *Silene latifolia*, ZLUVOVA, JANOUSEK e VYSKOT (2001) observaram um processo moderado de hipometilação global durante a sua germinação. Este processo durante os períodos de germinação e pós-germinação refletiria uma forma de transição da semente metabolicamente quiescente para o crescimento ativo e o desenvolvimento das plântulas.

Como foi mostrado no capítulo dois, o êxito da conversão dos embriões somáticos no *Theobroma cacao* L. esta condicionada à característica dos embriões somáticos, e assim, a partir de embriões somáticos leitosos normais foram obtidas aproximadamente 80% de plantas normais enquanto a partir dos embriões translúcidos foram obtidas apenas 20% plantas anormais. Ao quantificar a metilação do DNA foi possível observar que existe uma sutil diferença entre a percentagem de metilação dos embriões leitosos e das plântulas normais regeneradas. Estes valores não se comparam com a grande diferença entre os embriões translúcidos e a plântula anormal (Figura 1). No processo de conversão dos embriões somáticos, a metilação é um dos inúmeros mecanismos que governam a transição do embrião somático heterotrófico/mixotrófico à condição de plântula autotrófica (FRAGA *et al.*, 2012). Os resultados obtidos neste trabalho mostraram uma sutil diferencia na metilação do DNA entre os embriões leitosos e as plântulas (Figura 1A), por tanto é possível supor que as mudanças no padrão de metilação sofridas durante o processo de conversão podem ser restabelecidas com a formação da plântula. As plantas têm tendência e capacidade de reestabelecer um padrão de metilação do genoma inicial (FINNEGAN *et al.*, 1998).

Estudando a progressiva erosão genética e epigenética na embriogênese somática de *Theobroma cacao* L., RODRIGUEZ *et al.* (2010) determinou que existe diferença na metilação em tecidos da mesma planta. No entanto, estudando a embriogênese somática, o perfil epigenético dos embriões somáticos resultou ser muito semelhante ao perfil epigenético das folhas da planta matriz, e divergente do perfil do explante (estaminóide). Curiosamente, a divergência epigenética que existia entre os tecidos da mesma planta foi reduzida durante a embriogênese somática, com a formação do embrião após 10 semanas de cultivo. Deste modo, é possível postular que neste caso e no padrão de metilação expressado pelos embriões somáticos leitosos, a metilação do DNA poderia estar controlando a integridade do genoma a através do controle da formação de eventos recombinantes aberrantes (VIGOUROUX *et al.*, 2002).

O início de um processo de diferenciação celular implica um aumento/redução da metilação do DNA, chamado metilação *de novo*. Assim no estudo da metilação do DNA durante a germinação de *Triticum aestivum* L. a análise da metilação do DNA, mostrou que os eventos de demetilação foram três vezes maiores do que a metilação *de novo*, o que indica que a demetilação foi predominante na germinação de sementes de *Triticum aestivum*, mesmo que eventos de metilação também ocorrerão (MENG *et al.*, 2012).

A formação de plantas anormais na conversão dos embriões somáticos de *Theobroma cacao* L. foi um evento decorrente dos embriões translúcidos (capítulo dois). Ao quantificar a metilação dos embriões translúcidos, não se encontrou diferença estatística com os embriões leitosos. No entanto, os valores da metilação das plântulas obtidas a partir destes embriões revelaram valores inferiores comparados com os valores da metilação dos embriões leitosos e com as plântulas regeneradas destes embriões (Figura 1B). Neste contexto, é possível presumir que o processo de diferenciação celular prévio à conversão propriamente dita se ativa e os embriões somáticos entram num processo de transição similar com o registrado na germinação de sementes, no o que os eventos de demetilação superam a metilação (ZLUBOVA, JANOUSEK e VYSKOT, 2001; KOORNNEEF *et al.*, 2002; LU *et al.*, 2006; FAIT *et al.*, 2006; MENG *et al.*, 2012). As características morfológicas das plântulas, ausência da raiz e meristema apical permitem deduzir que os embriões translúcidos não conseguirão superar a etapa de transição requerida pelo processo de conversão para a formação da plântula normal. Outro aspecto a ser considerado é o valor

da metilação, o qual foi significativamente menor do que os embriões e as plântulas normais. Por tanto é possível postular que estes embriões mantem um *status* intermediário ou de transição entre embrião e plântula, conseqüentemente exibem anomalias fenotípicas.

Segundo RODRIGUEZ *et al.* (2012) a alteração generalizada no perfil de metilação do DNA de um genoma tem o potencial para conduzir variações fisiológicas ou de desenvolvimento entre plantas recuperadas a partir de cultura de tecidos.

A influência da hipometilação do DNA na capacidade de conversão dos embriões somáticos foi reportada por FRAGA *et al.* (2012), quando embriões somáticos de *Acca sellowiana* formados em meios de cultura com drogas hipometilantes como a 5-Azacitidina (Azac) apresentaram baixas taxas de conversão, considerando-se como um evento decorrente do desbalanço na metilação gerado por esta droga.

Em trabalhos desenvolvidos em *Arabidopsis*, as plantas que mostraram diminuição da metilação exibiram uma série de anormalidades fenotípicas e no desenvolvimento, incluindo redução da dominância apical, menor tamanho das plantas, tamanho e forma da folha alterada, diminuição da fertilidade, e alteração no tempo da floração. Estas observações sugeriram que a metilação do DNA desempenha um papel importante na regulação de muitas vias de desenvolvimento em plantas e que as anormalidades do desenvolvimento vistas nas plantas pode ser devido a uma desregulação da expressão gênica (FINNEGAN *et al.*, 1996).

Os resultados apresentados no presente capítulo indicam que durante a conversão dos embriões somáticos em plântulas de *Theobroma cacao* L., o programa de expressão gênica foi controlado, pelo menos em parte, pelos mecanismos epigenéticos que dependem da metilação/ demetilação do DNA. O trabalho desenvolvido evidenciou que quando o processo de conversão dos embriões em plantas é eficiente não há acumulação de eventos de metilação. Assim durante a conversão dos embriões somáticos a metilação do DNA poderia controlar a integridade do genoma a através do controle da formação de eventos recombinantes aberrantes. Porém, existe a possibilidade que as plantas

regeneradas *in vitro* não exibam anormalidades ligadas com a metilação do DNA.

6. Referencias bibliográficas

CERVERA, M.T.; RUIZ-GARCIA, L.; MARTINEZ-ZAPATER, J.M. Analysis of DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* based on methylation-sensitive AFLP markers. *Molecular Genetic Genomics*, v. 268, p. 543-552, 2002.

CHAKRABARTY, D.; YU, K.W.; PAEK, K.Y. Detection of DNA methylation changes during somatic embryogenesis of Siberian ginseng (*Eleuterococcus senticosus*). *Plant Science*, v. 165, n.1, p. 61-68, 2003.

DOYLE, J.J.; DOYLE J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, v. 19, n. 1. P.11-15, 1987.

FAIT, A.; ANGELOVICI, R.; LESS, H.; OHAD, I.; URBANCZYK-WOCHNIAK, E.; FERNIE, A.R.; GALILI, G. *Arabidopsis* seed development and germination is associated with temporally distinct metabolic switches. *Plant Physiology*, v. 142, p. 839-854.

FINNEGAN, E.J.; GENGER, R.K; PEACOCK, W.J; DENNIS, E.S. DNA methylation in plants. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, v.49, p.223–247, 1998.

FINNEGAN, E.J.; KOVAK, K.A. Plant DNA methyltransferases. *Plant Molecular Biology*, v.43, p.189–201, 2000.

FRAGA, H. P. F.; VIEIRA, L. N.; CAPRESTANO, C. A.; STEINMACHER, D. A.; MICKE, G.A.; SPUDEIT, D. A.; PESCADOR, R.; GUERRA, M. P. 5-Azacytidine combined with 2,4-D improves somatic embryogenesis of *Acca sellowiana* (O. Berg) Burret by means of changes in global DNA methylation levels. *Plant Cell Reports (Print)*, v.31, n. 12, p. 2165-2176, 2012.

GRUNAU, C.; RENAULT, E.; ROSENTHAL, A.; ROIZES, G.

MethoDB public database for DNA methylation data. *Nucleic Acids and Proteins*, v. 29, p. 270-274, 2001.

HAFIZ, I.; ANJUM, M.; GREWAL, A.; CHAUDHARY, G. DNA methylation an essential mechanism in plant molecular biology. *Acta Physiology Plant*, v. 23, p.491-499, 2001.

JOHNSTON, J.W.; HARDING, K.; BREMNER, D.H.; SOUCH, G.; GREEN, J.; LYNCH, P.T.; GROUT, B.; BENSON, E.E. HPLC analysis of plant DNA methylation: a study of critical methodological factors. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 43, p. 844–853, 2005.

KASHKUSH, K.; FELDMAN, M.; LEVY, A.A. Transcriptional activation of retrotransposons alters the expression of adjacent genes in wheat. *Nature Genetic*, v.33, p. 102-106, 2003.

KOORNNEEF, M.; BENTSINK, L.; HILHORST, H. Seed dormancy and germination. *Curr. Opin. Plant Biology*, v. 5, p. 33-36, 2002.

KORCH, C.; HAGBLOM, P. *In-vivo* modified gonococcal plasmid pJD a model system for analysis of restriction enzyme sensitivity to DNA modifications. *Europe Journal Biochemical*, v. 161, p. 519-524, 1986.

KOUKALOVA, B.; FOJTOVA, M.; LIM, K.Y.; FULNECEK, J.; LEITCH, A.R.; KOVARIK, A. Dedifferentiation of tobacco cells is associated with ribosomal RNA gene hypomethylation, increased transcription, and chromatin alterations. *Plant Physiology*, v.139, p.275-286, 2005.

KOVARIK, A.; VAN HOUTD, H.; HOLY, A.; DEPICKER, A. Druginduced hypomethylation of a posttranscriptionally silenced transgene locus of tobacco leads to partial release of silencing. *FEBS Letters*, p. 467, v. 47-51, 2000.

LU, G.; WU, X.; CHEN, B.; GAO, G.; XU, K.; LI, X. Detection of DNA methylation changes during seed germination in rapeseed (*Brassica napus*). *Chinese Science Bulletin*, v. 51, p.182-190, 2006.

- MARTIENSSEN, R.A.; COLOT, V. DNA methylation and epigenetic inheritance in plants and filamentous fungi. *Science*, v. 293, p.1070-1074, 2001.
- MENG, F.R.; LI, Y.C.; YIN, J.; LIU, H.; CHEN, X.; NI, N.; SUN, Q.X. Analysis of DNA methylation during the germination of wheat sedes. *Biologia Plantarum*, v. 56, ed.2, p.269-275, 2012.
- PASZKOWSKI, J.; WHITHAM, S.A. Gene silencing and DNA methylation processes. *Curr. Opin. Plant Biology*, v.4, p. 123-129, 2001.
- PORTIS, E.; ACQUADRO, A.; COMINO, C.; LANTERI, S. Analysis of DNA methylation during germination of pepper (*Capsicum annuum* L.) seeds using methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP). *Plant Science*, v.166, p. 169-178, 2004.
- RAMCHANDANI, S.; BHATTACHARYA, S.K.; CERVONI, M.; SZYF, M. DNA methylation is a reversible biological signal. *PNAS*, 96:6107–6112, 1999.
- REDENBAUGH, K.; PAASCH, B.D.; NICHOL, J.W.; KOSSLER, M.E.; VISS, P.R.; WALKER, K.A. Somatic seeds encapsulation of asexual plant embryos. *Bio-Technology*, v. 4, p.797–801, 1986.
- REDENBAUGH, K.; SLADE, D.; VISS, P.; FUJII, J.D. Encapsulation of somatic embryos in synthetic seed coats. *Hortscience*, v. 22, p. 803-809, 1987.
- RIDDLE, N.C.; RICHARDS, E.J. The control of natural variation in cytosine methylation in *Arabidopsis*. *Genetics*, v. 162, p. 355- 363, 2002.
- RODRÍGUEZ LÓPEZ, C.M.; WETTEN, A.C.; WILKINSON, M.J. Progressive erosion of genetic and epigenetic variation in callus derived cocoa (*Theobroma cacao*) plants. *New Phytology*, v. 186, p.

856-868, 2010.

RUIZ-GARCÍA, L.; CERVERA, M.T.; MARTÍNEZ-ZAPATER, J.M. DNA methylation increases throughout *Arabidopsis* development. *Planta*, v. 222, p. 301–306, 2005.

VALLEDOR, L.; HASBÚN, R.; MEIJÓN, M.; RODRÍGUEZ, J.L.; SANTAMARÍA, E.; VIEJO, M.; BERDASCO, M.; FEITO, I.; FRAGA, M.F.; CAÑAL, M.J.; RODRÍGUEZ, R. Involvement of DNA methylation in tree development and micropropagation. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, v. 91, p. 75–86, 2007.

VANYUSHIN, B.F. DNA methylation in plants. Springer-Verlag Berlin Heidelberg CTMI, v. 301, p. 67–122, 2006.

VIGOUROUX, Y.; JAQUETH, J.S.; MATSUOKA, Y.; SMITH, O.S.; DOEBLEY, J. Rate and pattern of mutation at microsatellite loci in maize. *Molecular Biology and Evolution*, v. 19, p. 1251–1260, 2002.

XIONG, L.Z.; XU, C.G.; SAGHAI MAROOF, M.A.; ZHANG, Q. Patterns of cytosine methylation in an elite rice hybrid and its parental lines, detected by a methylation-sensitive amplification polymorphism technique. *Molecular Gen Genetic*, v. 261, p. 439-446, 1999.

ZHAO, X.; CHAI, Y.; LIU, B. Epigenetic inheritance and variation of DNA methylation level and pattern in maize intra-specific hybrids. *Plant Science*, v. 172, 930–938, 2007.

ZLUVOVA, J.; JANOUSEK, B.; VYSKOT, B. Immunohistochemical study of DNA methylation dynamics during plant development. *Journal of Experimental Botany*, v. 365, p. 2265-2273, 2001.

CAPÍTULO 4 – PROTEÔMICA COMPARATIVA DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE *Theobroma cacao* L.

1. Resumo

A embriogênese somática tem sido rotineiramente usada como uma técnica de propagação *in vitro* e como um sistema-modelo para investigar as mudanças estruturais e eventos fisiológicos e moleculares que ocorrem durante o desenvolvimento embrionário. Abordagens baseadas na análise proteômica podem permitir um melhor entendimento desta rota morfogênética em nível molecular. O presente estudo teve como objetivo estabelecer um perfil proteico e identificar as proteínas diferencialmente expressas nos embriões somáticos de *Theobroma cacao* L. do tipo leitoso e translúcido no estágio cotiledonar, por meio da Eletroforese Bidimensional (2-D). Foram identificadas proteínas diferencialmente expressas nos dois tipos de embriões, sendo detectados *spots* exclusivos para os embriões do tipo leitoso e do tipo translúcido (8 e 26, respectivamente). As proteínas foram identificadas por espectrometria de massas (MALDI-TOF). Foram identificadas 15% das proteínas. As proteínas diferencialmente expressas nos embriões do tipo translúcido formam parte do grupo das proteínas LEA, as quais poderiam estar relacionadas, entre outras, com o equilíbrio hormonal do embrião e conseqüentemente com a sua capacidade conversão.

2. Abstract

Somatic embryogenesis has been routinely used as high performance micropropagation system as well as a model system to investigate structural, physiological and molecular events that occur during embryonic development. Proteomic approaches may provide a better understanding of this morphogenetic route at a molecular level. The present study aimed at to establish a protein profile as well as to identify differentially expressed proteins in translucent an opaque cotyledonary-staged somatic embryos of *Theobroma cacao* L. by means of 2D- electrophoresis. Differentially expressed proteins were identified in the two types of embryo, being detected 8 exclusive spots associated to the opaque type, and 26 exclusive spots to the translucent type. The protein (15%) were identified by the mass spectrometry (MALDI-TOF). Proteins differentially expressed in the translucent type embryos take part of the LEA proteins, which may be related to the hormonal balance of the embryo and therefore with the conversion capacity.

3. Introdução

A embriogênese somática é definida como um processo no qual uma estrutura bipolar, semelhante a um embrião zigótico se desenvolve a partir de uma célula não zigótica e sem conexão vascular com o tecido original. Os embriões somáticos são usados para o estudo de regulação do desenvolvimento embrionário, mas também como um sistema de alta eficiência regenerativa na micropropagação em larga escala (VON ARNOLD *et al.*, 2002).

A embriogênese somática tem sido investigada em algumas espécies modelo, tais como *Daucus carota* e *Medicago sativa*, para a descrição dos eventos morfológicos e mecanismos associados expressão gênica (CHUGH e KHURANA, 2002; SUPRASANNA E BAPAT, 2005; MORDHORST *et al.*, 1997). Não entanto, apesar dos esforços realizados os mecanismos precisos que regulam esta rota morfogenética *in vitro* ainda não foram elucidados. Esforços para descrever à embriogênese somática em nível molecular utilizando a abordagem proteômica têm sido feitos para diferentes espécies: *Daucus carota* (DODEMAN e DUCREUX, 1996), *Medicago sativa* (ALEITH E RICHTER, 1990;) *Saccharum officinarum* (BLANCO *et al.*, 1997), *Picea glauca* (STASOLLA *et al.*, 2004; LIPPERT *et al.*, 2005), *Cyclamen persicum* (WINKELMANN *et al.*, 2006), *Vitis vinifera* (MARSOMI *et al.*, 2008), *Acca sellowiana* (CANGAHUALA-INOCENTE *et al.*, 2009) e *Thebroma cacao* (NOAH *et al.*, 2012).

Neste contexto, algumas proteínas envolvidas no processo da embriogênese somática tem sido identificadas, tais como as *receptor-like kinases* (SERKs) (HECHT *et al.*, 2001), proteínas *late embryogenesis abundant* (LEA) (CHUGH e KHURANA, 2002), proteínas de choque térmico (*heat shock proteins*-HSPs) (GYORGYEY *et al.*, 1991), proteínas de ligação ao GTP (DUDITS *et al.*, 1995), proteínas de transferência de lípidos (LTPs) (CHUGH e KHURANA, 2002), proteínas arabinogalactanas (AGP) (VON ARNOLD *et al.*, 2002), quitinases e peroxidases (HENDRIKS e DE VRIES, 1995).

Em *Theobroma cacao* L., as abordagens proteômicas estão ainda numa fase inicial (AWANG *et al.*, 2010) e os estudos tem se focado principalmente na melhoria dos produtos derivados de tratamentos pós-

colheita (AWANG *et al.*, 1993, ABECIA-SORIA *et al.*, 2005). Com uma metodologia, um tanto discutível, NOAH *et al.* (2012) comparou o proteoma de embriões somáticos de *Theobroma cacao* L. com os seus homólogos zigóticos no estágio torpeda. Os autores concluíram que os perfis proteicos dos dois tipos de embriões foram semelhantes, mas que a abundância de proteínas específicas diferiu.

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo estabelecer um perfil proteômico e identificar as proteínas diferencialmente expressas nos embriões somáticos do tipo leitoso e translúcido formados durante a embriogênese somática secundária de *Theobroma cacao* L. por meio de Eletroforese Bidimensional. (2-D).

4. Material e métodos

4.1 Material vegetal

Foram utilizadas amostras de embriões somáticos em estágio cotiledonar do tipo leitoso e translúcido normal, formados na embriogênese somática secundária (Figura 1). Amostras de 500 mg foram coletadas em seis replicatas biológicas do genótipo EET 103.

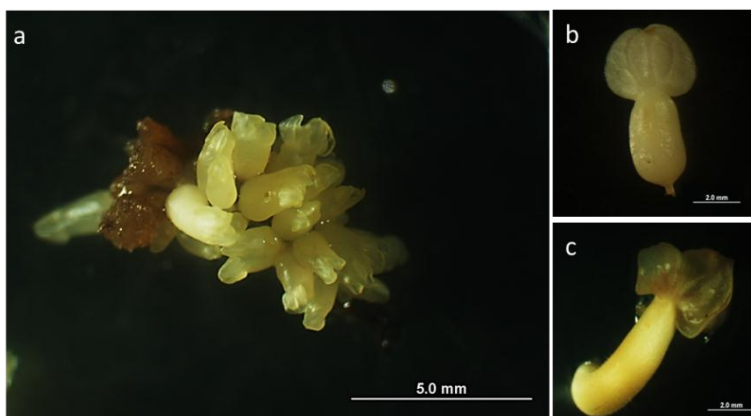


Figura 1. Embriogênese somática de *Theobroma cacao* L. a) Expressão da embriogênese somática secundária; b) Embrião somático leitoso normal; c) Embrião somático translúcido normal.

4.2 Extração de proteína

As amostras coletadas foram submetidas à extração com fenol segundo o protocolo descrito por CARPETIERE *et al.* (2005) com modificações feitas no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Molecular de Plantas LFDGV/UFSC. Para a maceração do material as amostras foram depositadas em um cadinho de cerâmica ao qual foi adicionado nitrogênio líquido. Após a maceração foi colocado 5,0 ml de Tampão de Extração de proteínas (50mM Tris-HCl pH 8.5, 5 mM EDTA, 100 mM KCl, 2% w/v Mercaotoetanol, 30% w/v sacarose, 1 mM PMSF) e transferidos para um tubo falcon de 10 ml. Uma vez no tubo foram adicionados 5,0 ml de Fenol Saturado e submetidos a agitação em vórtex durante 30 minutos. Posteriormente, a solução homogeneizada foi centrifugada (4000 g) durante 30 minutos a, a 4° C. Após esse procedimento, foi transferida a fase fenólica para um novo tubo falcon. O procedimento de extração com 5,0 ml de Tampão de Extração de proteínas foi repetido novamente, para garantir a qualidade da proteína e a extração.

Após a segunda extração, foram adicionados 5 ml de 100 mM acetato de amônio em Metanol na proporção 1:5 (v/v), para a precipitação da proteína por um período de 12-14 horas a -20° C. Posteriormente, o tubo foi centrifugado (4000 g), por 30 minutos a 4°C. O precipitado foi lavado com 0,5 ml de Metanol puro em 3 oportunidades consecutivas, e logo lavado com Acetona em 3 oportunidades consecutivas. Finalmente, as proteínas foram solubilizadas em 0,3 ml de Tampão de Solubilização de proteínas (7 M Uréia ; 2 M Tiouréia; 2% IPG buffer; 3% CHAPS; 1,5% DTT) mediante leve agitação em vórtex, e conservadas a -4°C.

4.3 *Quantificação de proteína*

A quantificação de proteínas foi realizada seguindo o método de BRADFORD (1976). As concentrações das proteínas totais extraídas foram calculadas a partir de uma curva de calibração realizada com concentrações conhecidas de BSA.

4.4 Eletroforese bidimensional (2D) de proteínas

A eletroforese foi realizada de acordo com a metodologia descrita por CARPENTIER *et al.* (2005). O equipamento 60 Ettan IPGPhor (General Electric Healthcare) foi utilizado para a electrofocalização (IEF-1^o dimensão) das tiras desidratadas (IPG dry strips) de 13 cm, com gradiente de pH de 3 a 10. O equivalente a 600 µg de proteínas foram reidratadas por ao menos 12 horas em 250 µl de tampão de reidratação (Uréia 7M; Tiouréia 2M; CHAPS 3%; IPG buffer (2,5%); azul de bromofenol 0,002%; DTT 0,2%). A voltagem foi ajustada em modo gradiente, totalizando, aproximadamente, 39000 Vh. Após o procedimento as tiras de gel foram tratadas em 5,0 ml de Solução de Equilíbrio/DTT (50 mM Tris-HCl pH 8,8; 6M uréia; 30% glicerol; 1 %DTT; 2% SDS; 0,002% azul de bromofenol) por 20 minutos, em seguida por mais 20 min as tiras de gel foram colocadas em 5,0 ml de Solução de Equilíbrio/Iodoacetamida (75mM Tris-HCl pH 8,8; 6M uréia; 30% glicerol; 2,5mM Iodoacetamida; 2% SDS; 0,002% azul de bromofenol).

Para a segunda dimensão (2D) as tiras equilibradas, contendo as proteínas, foram fixadas ao gel de poliacrilamida a 12%, condições desnaturantes (1,5 M Tris-HCl pH 8,8; 30% Mix de Acrilamida; 10% SDS; 0,1% Persulfato de Amônio; 0,04% TEMED) e sob gel de 0,1% agarose contendo 0,2% azul de bromofenol. A eletroforese foi realizada em cuba SE 600 Ruby (GE Healthcare) a 4^o C, contendo Tampão de Corrida (25mM Tris ; 200 mM Glicina ; 0,1% SDS), aplicando-se corrente elétrica de intensidade 10 mA por gel durante 60 minutos, 20 mA por gel durante 60 minutos e 30 mA por gel até alcançar o final da placa. Marcadores de massa molecular com proteínas padrões entre 10 e 250 kDa (BioRad, 161-0363) foram submetidas à coeletroforese. Os géis foram fixados em solução de metanol (50%), ácido acético (12%) e água destilada (38%) por 6 h e posteriormente revelados com azul de Coomassie (1% Blue Coomassie G-250; 0,1 N H₃PO₄; 0,6 M (NH₄)₂SO₄; 20% metanol) durante 48 h, após incubação dos géis durante 12 h em solução de fixação (50% Metanol; 12% Ácido Acético Glacial). Em seguida, os géis foram lavados em água destilada até retirada do excesso de corante, logo em 0,1 M Tris-H₃PO₄ pH 6,5 durante três minutos, e 25% Metanol durante um minuto, e em 20% Sulfato de Amônio durante over night. Finalmente, os géis foram descorados com lavagem em água destilada durante 96 horas, e

armazenados em 20% Sulfato de Amônio a 4° C, até digitalização (2D Electrophoresis Guide Handbook).

4.5 *Análise dos géis*

Os géis corados foram digitalizados com Image Scanner II e calibrados com Labscan 5 software (Amersham Biosciences). As análises de imagem foram realizadas com Image Master 2-D Platinum (Amersham Biosciences), versão 6.0, que permite detecção, quantificação e a congruência entre os múltiplos géis. Para as análises comparativas foram considerados só os spots que estiveram reproduzidos nas seis replicatas biológicas. As proteínas foram consideradas diferencialmente expressas quando exibida uma variação de ± 2 vezes.

4.6 *Digestão e obtenção dos perfis de massa das proteínas relevantes, e identificação das proteínas.*

A metodologia seguida para a digestão com tripsina foi descrita por WESTERMEIER *et al.* (2002). Os *spots* de interesse foram manualmente retirados dos géis, colocados em microtubos de 1,5 ml e descorados com solução de acetonitrila (50%) e bicarbonato de amônio (25 mM) por 1h em temperatura ambiente. Em seguida, os géis foram desidratados com acetonitrila (100%) por 5 min e secas no *Speedvac* (ThermoSavant, Milford, USA) por 15 min. Os géis foram reidratados em 10 μL de solução de tripsina ($10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de Tripsina Promega, Madison, USA) em bicarbonato de amônio (25mM), pH 8. A digestão foi feita por 12 horas a 37°C. Para a remoção dos peptídeos do gel adicionou-se 30 μL de solução de extração (50% acetonitrila, 5% Trifluoracético - TFA), homogeneizado no vortex por 30 min a temperatura ambiente e coletando-se o homogeneizado em novos tubos tipo eppendoff de 500 μL , foram realizadas 3 lavagens obtendo-se um volume final de 100 μL .

Para análise em espectrômetro de massa, o volume obtido foi seco no *Speedvac* por 1h a temperatura ambiente e hidratado com 2 μL de TFA (0,1%). 1 μL dos peptídeos foi misturado com 1 μL da matriz

saturada (ácido α -ciano-4-hidroxi-cinâmico, Sigma) e colocado na placa de aço MTP 384 target TF (Bruker Daltonics). Os peptídeos padrão de calibração externa foram a Angiotensina II [M+H]⁺ mono 1046.5418, Angiotensina I [M+H]⁺ mono 1296.6848, Substancia P [M+H]⁺ mono 1347.7354, Bombesina [M+H]⁺ mono 1619.8223 e ACTH clip(18-39) [M+H]⁺ mono 2465.1983. A massa dos peptídeos foi medida usando um espectrômetro de massa de alto desempenho do tipo MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight) Autoflex/MS da Bruker Daltonics. A lista de picos gerados foi analisada usando FlexAnalysistm versão 2 software (Bruker Daltonics) e o algoritmo SNAP. As massas dos peptídeos foram pesquisadas nos bancos de dados da Mascot *on line* (Matrix Science). Os parâmetros utilizados para a aceitação da identificação foram: taxonomia: plantas verdes, enzima: tripsina, clivagem perdida: 1, modificações variáveis: carbamidometil, valores da massa: MH⁺, erro de peptídeo: 100ppm e monoisotópico. Em adição, as buscas se realizaram sem reprimir a proteína ao PM e pI, e sem qualquer especificação taxonômica.

5. Resultados e discussão

5.1 Comparação e análise dos perfis de proteína dos embriões somáticos

A quantificação de proteínas totais revelou que o conteúdo de proteínas dos embriões leitosos em relação aos embriões translúcidos foi sutilmente maior, porem sem diferenças estatísticas (48,0 μ g/g e 42,0 μ g/g de MF, respectivamente) (Figura 2).

Frações das proteínas totais extraídas a partir dos embriões somáticos do tipo leitoso e translúcidos foram separadas por 2D IEF/SDS-PAGE. A inspeção visual dos géis revelou que ambas as fracções eram formadas por componentes semelhantes (manchas sobre os géis 2D). No entanto, a análise das imagens no programa Image Master Platinum detectou \pm 286 e 304 spots de proteína no padrão dos embriões leitosos e translúcidos, respectivamente. Também, foi possível observar a expressiva diferença de expressão de alguns *spots* quando comparados os dois tipos de embriões (Figura 3). O perfil encontrado nos géis para os dois tipos de embriões foi reprodutível nas seis replicatas biológicas.

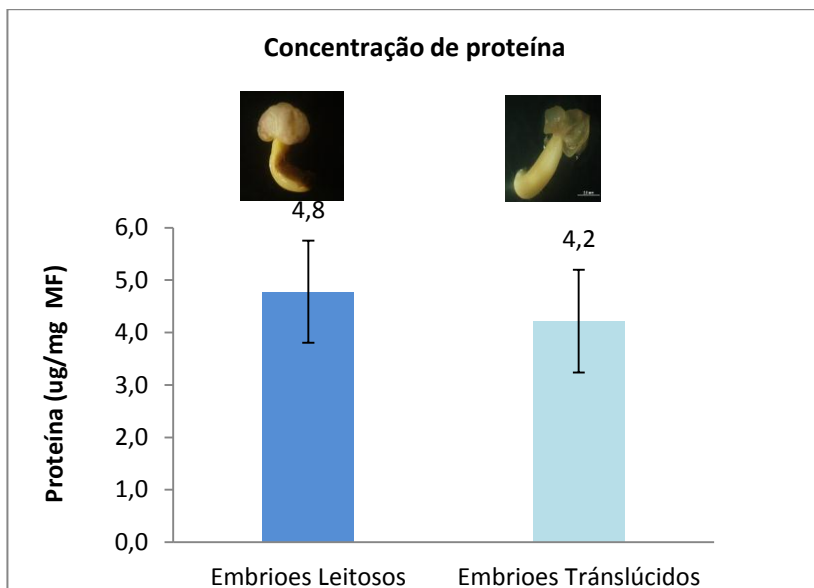


Figura 2. Proteínas totais ($\mu\text{g}/\text{mg}$ MF) dos embriões somáticos do tipo leitoso e translúcido do genótipo EET 103 de *Theobroma cacao* L. Quantificação segundo Método de BRADFORD (1976).

Para a análise comparativa os géis dos embriões somáticos foram relacionados. A comparação revelou que, dos 286 *spots* detectados nos embriões somáticos leitosos, 8 *spots* foram exclusivos. Já, nos embriões somáticos translúcidos observou-se 26 *spots* exclusivos dos 304 detectados, porém 278 *spots* resultaram comuns para os dois tipos de embriões. Das proteínas comuns, a maior parte apresentou expressão constante e apenas 40 *spots* tiveram diferença de expressão ao comparar os dois tipos de embriões. Os *spots* dos embriões somáticos leitosos e translúcidos se dispuseram de forma semelhantes nos géis. A maioria dos *spots* apresentou ponto isoeletrico entre 5-7 e peso molecular entre 30-60 KDa (Figura 4 a ,b).

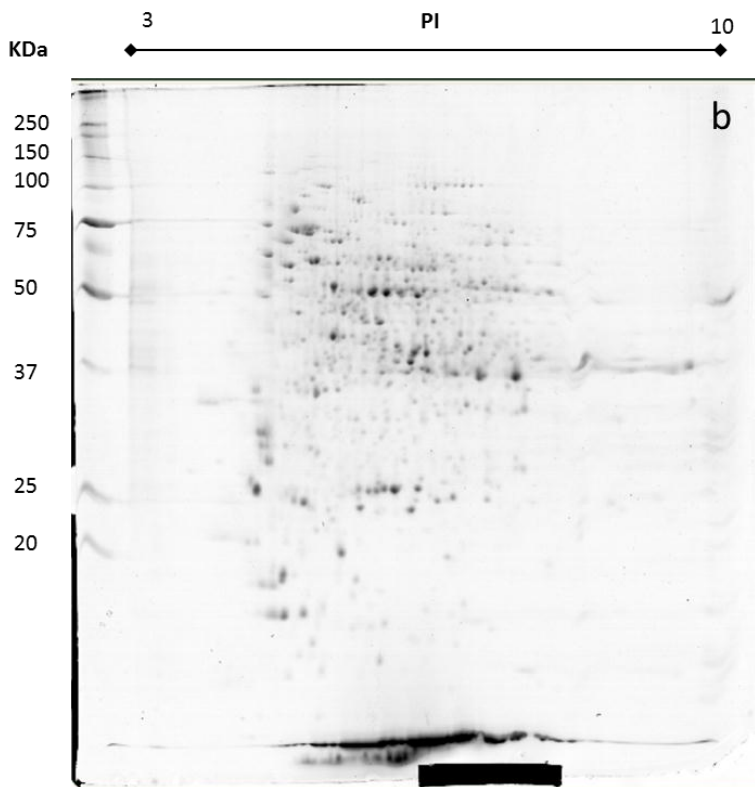


Figura 3. Perfil proteico de embriões somáticos no estágio cotiledonar de *Theobroma cacao* L. a) Embriões somáticos do tipo leitoso; b)- Embriões somáticos do tipo translúcido.

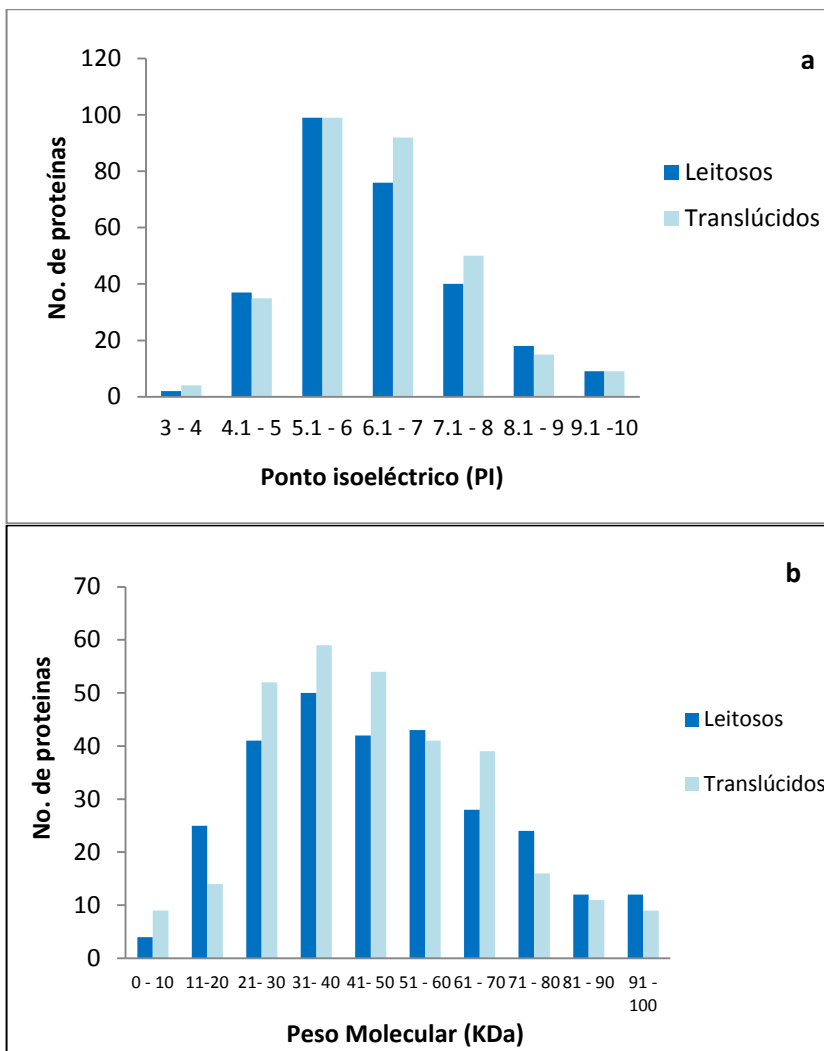


Figura 4. Distribuição das proteínas expressas nos géis 2D dos embriões somáticos do tipo leitoso e translúcido do genótipo EET 103 de *Theobroma cacao* L. a) Distribuição das proteínas expressas segundo o pI; b) Distribuição das proteínas expressas segundo o peso molecular em KDa.

A formação do embrião somático é o resultado de um programa de-diferenciação e a subsequente expressão da embriogênese somática associada com mudanças complexas no padrão de proteínas. Assim a correta expressão em tempo e espaço das proteínas envolvidas no processo vai garantir que suas funções sejam executadas (FEHÉR, 2003).

Diferentes aspectos bioquímicos da embriogênese somática ao nível de proteína têm sido investigados em muitas espécies. Com o auxílio da Eletroforese bidimensional (2DGE) de proteínas têm-se desenvolvido vários perfis proteicos identificando um número variável de proteínas. Neste sentido, IMIN *et al.* (2004) estabeleceram um mapa proteômico referência para o estágio globular do embrião somático de *Medicago truncatula* e mostraram mais de 2000 proteínas expressas. WILKELMANN *et al.* (2006) detectaram 200 spots nos embriões somáticos e zigóticos de *Cyclamen persicum* e CANGAHUALA-INOCENTE *et al.* (2008) identificaram 118 spots nos diferentes estádios de desenvolvimento dos embriões somáticos de *Acca sellowiana*. PAN *et al.* (2009) mostraram que o número médio de proteínas variou com as fases de desenvolvimento e entre 746 e 825 proteínas foram expressas em embriões somáticos de *Citrus sinensis*. NOAH *et al.* (2012) detectaram cerca de 1000 spots por gel em embriões somáticos e zigóticos de *Theobroma cacao* L. no estágio torpedo.

RACUSEN e SCHIAVONE (1988) estudaram o acúmulo de proteínas durante o desenvolvimento dos embriões somáticos em cenoura mostrando que o número de proteínas era dependente do estágio de desenvolvimento e do tecido analisado. Assim também é preciso levar em conta o fato de que vários autores usam diferentes protocolos de extração e as técnicas 2D podem resultar em diferenças de resolução e detecção dos spots entre as espécies (WILKELMANN *et al.*, 2006).

No presente trabalho foram identificados números diferentes de proteínas expressas (281 e 303) que respondem a um mesmo estágio de desenvolvimento dos embriões somáticos de *Theobroma cacao* L, estes embriões apresentam resposta diferente à conversão em plantas. Neste contexto, a identificação das proteínas diferencialmente expressas é de muita importância, pois elas poderiam ser marcadoras da capacidade de conversão dos embriões somáticos.

5.2 Identificação de proteínas

Spots de proteínas diferenciais foram usados para identificação por espectrometria de massa MALDI-TOF-MS. Foram analisados 35 *spots* de expressão diferencial nos embriões somáticos. *Theobroma cacao* L. não é uma planta modelo e seu genoma foi recentemente descrito (ARGOUT *et al.*, 2011) e apenas um número limitado de proteínas tem sido registradas até o momento. Assim, no presente trabalho não foi possível estabelecer correspondência positiva dos peptídeos com a proteína conhecida, para nenhum dos *spots* analisados. Não entanto, nesta secção será discutida a função das proteínas que apresentaram maior probabilidade de correspondência (*scores* superiores do que 20), Três *spots* (333, 1109, 1116) foram identificados nos embriões translúcidos e apenas um *spot* (2203) foi identificado na base de dados de proteínas SwissProt e NCBI (Tabela 1).

Nos embriões do tipo leitoso a única proteína possível de ser identificada foi classificada no grupo das peroxidases (Cationic peroxidase), as quais são consideradas como proteínas de resposta ao stress.

A embriogênese somática pode ser considerada um caso extremo de adaptação, uma estratégia de sobrevivência e uma resposta ao stress celular em condições de cultura *in vitro* (DUDITS *et al.*, 1995; PASTERNAK *et al.*, 2002). Auxinas sintéticas, tais como o 2,4-D, desempenham um papel crítico na indução de células embriogênicas, e a suplementação com elevadas concentrações deste regulador 2,4-D no meio de cultura determina um estresse celular (DUDITS *et al.*, 1995). O tratamento das células com auxinas produz uma explosão oxidativa que gera uma condição de estresse da qual resulta a indução da embriogênese somática (THIBAUD-NISSEN *et al.*, 2003).

No presente trabalho, uma proteína relacionada ao estresse foi identificada nos embriões somáticos do tipo leitoso (*spot* 2203-Cationic peroxidase). As peroxidases atuam como catalisadoras de vários processos biológicos e degradam o peróxido de hidrogênio, um subproduto que ocorre naturalmente do metabolismo do oxigênio nas células, e o converte em água e oxigênio. Assim, o aumento na atividade das peroxidases acompanhou a formação de meristemas apicais e radiculares em calos de *Nicotiana tabacum* (THORPE *et al.*, 1978) e *Kalmia latifolia* (KEVERS e GASPAR, 1992). A influencia das peroxidases na embriogênese somática como uma resposta ao estresse oxidativo foi reportada na embriogênese somática de varias

espécies: *Daucus carota* (CORDEWENE *et al.*, 1991); *Lycium barbarum* L. (KAIRONG *et al.*, 1999); *Asparagus officinalis* (TAKEDA *et al.*, 2003); *Cyclamen persicum* (RENSING *et al.*, 2005 e RODE *et al.* (2011) e *Phoenix dactylifera* L. (ABOHATEM *et al.*, 2011).

Tabela 1. Proteínas de embriões somáticos de *Theobroma cacao* L. identificadas por MALDI-TOF-MS.

ID	Proteína	Código	Fonte	Scor	Cobertura (%)
Embriões leitosos					
2203	Cationic peroxidase 2	PER2_ARAHY	<i>Arabidopsis thaliana</i>	36	17
Embriões translúcidos					
333	Dehydration-responsive element-binding protein 2D	DRE2D_ARATH	<i>Arabidopsis thaliana</i>	28	15
1109	Late embryogenesis abundant protein EMB564	EMB5_MAIZE	<i>Zea mays</i>	26	12
1116	Early responsive to dehydration 15	ERD15_ARATH	<i>Arabidopsis thaliana</i>	23	15

RODE *et al.* (2011), indicaram que as peroxidases são mais abundantes em embriões somáticos do que em embriões zigóticos de *Cyclamen persicum*, sugerindo que os embriões somáticos se encontram

mais estressados do que os embriões zigóticos. NOAH *et al.* (2012) observou que as proteínas de estresse, tais como as peroxidases são mais abundantes no proteoma dos embriões somáticos do que no proteoma de embriões zigóticos de *Theobroma cacao* L.

De fato, as células somáticas de plantas parecem necessitar de um número de fatores de estresse para alterar seu programa de desenvolvimento para um estado fisiológico específico que permita a reprogramação da expressão e a aquisição de competência embrionária (PASTERNAK *et al.*, 2002 e FEHÉR, 2003). Em *Theobroma cacao* L. os componentes do meio de cultura (MgSO) e os reguladores de crescimento (TDZ, 2,4-D e cinetina) necessários para alterar a competência de células somáticas do explante floral conferindo competência embriogênica (LI *et al.*, 1998; ALEMANO *et al.*, 1996 e MAXIMOVA *et al.*, 2005) poderiam estar regulando a resposta ao estresse e conseqüentemente influenciado a formação do embrião somático.

Nos embriões somáticos do tipo translucido as proteínas diferencialmente expressas corresponderam ao grupo das proteínas LEA (*late embryogenesis abundant*) (Tabela 1). Estas proteínas LEA são um grupo de proteínas hidrofílicas e sua expressão está relacionada com a fase tardia dos estágios do desenvolvimento de embriões e sementes e durante a aquisição de tolerância à dessecação (CHUGH e KHURANA, 2002). Além disso, elas se encontram presentes em órgãos vegetativos, e atuam durante condições normais de crescimento (RORAT *et al.*, 2004), embora também se acumulam em resposta ao estresse hídrico provocado pela seca, por baixa temperatura ou salinidade elevada (ISMAIL *et al.*, 1999b; NYLANDER *et al.*, 2001) sugerindo um papel de osmoproteção durante a limitação água (DURE, 1993b; BRAY, 1997; GARAY-ARROYO *et al.*, 2000; HOEKSTRA *et al.*, 2001). Vários papéis funcionais têm sido propostos para os diferentes subgrupos de proteínas LEA, incluindo chaperonas moleculares, ligação e reparação do ADN, ligação com cálcio e componente estrutural do citoesqueleto (WISE e TUNNACLIFFE, 2004).

Assim, parte expressiva dos genes diferencialmente expressos durante o programa de embriogênese somática pertence à família gênica LEA (SHIH *et al.*, 2008). Assim, tem sido amplamente reconhecido que as proteínas LEA têm um relevante papel durante a embriogênese somática. Nesta rota morfogenética a expressão destas proteínas aumenta na fase torpedo ou durante o processo de acumulação de

substancias de reserva, sendo esta expressão regulada por ABA (BEWLEY e BLACK, 1994; CHUGH e KHURANA, 2002).

No presente trabalho foi identificado as proteínas LEA diferencialmente expressas nos embriões somáticos do tipo translúcido. A capacidade de conversão destes embriões (avaliada no capítulo 2) foi expressivamente menor quando comparada à conversão dos embriões somático do tipo leitoso. Por tanto, é possível supor que expressão diferencial destas proteínas nos embriões translúcidos tenha ocorrido em função de um desabalando hormonal, com ênfase no ABA. Vários trabalhos indicam que o ABA desempenha um papel importante no mecanismo de regulação do desenvolvimento de sementes e na subseqüente germinação (KERMODE, 1990). Assim a aplicação exógena de ABA durante a embriogênese somática de uma ampla variedade de espécies, tem mostrado resposta (CHUGH e KHURANA, 2002).

Em resumo, os resultados do presente trabalho possibilitaram determinar que as diferenças entre os embriões do tipo leitoso e translúcido estão ligadas ao perfil de expressão proteico. A identificação das proteínas permitiu determinar que a expressão diferencial das proteínas LEA poderia estar afetando capacidade de conversão dos embriões somáticos de *Theobroma cacao* L. Assim, análises diferenciais nos teores de ABA em embriões somáticos translúcidos e leitosos poderão elucidar esta questão.

6. Referências bibliográficas

ABECIA-SORIA, L.; PEZOA-GARCIA, N. H.; AMAYA-FARFAN, J. Soluble albumin and biological value of protein in cocoa (*Theobroma cacao* L.) beans as a function of roasting time. *Journal of Food Science*, v. 70, p. 294–298, 2005.

ABOHATEM, M.; CHAKRAFI, F.; JAITI, F.; DIHAZI, A.; BAAZIZ, M. Arbuscular Mycorrhizal Fungi Limit Incidence of *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* on Date Palm Seedlings by Increasing Nutrient Contents, Total Phenols and Peroxidase Activities. *The Open Horticulture Journal*, v. 4. P.10-16, 2011.

ALEITH, F.; RICHTER, G. Gene expression during induction of somatic embryogenesis in carrot cell suspensions. *Planta*, v. 183, p. 17-24, 1990.

ALEMANNI, L.; BERTHOULY, M.; MICHAUX-FERRIÈRE, N. Somatic embryogenesis of cocoa from floral parts. *Plantations, Recherche, Developpement*, Paris, v. 3, n. 4, p. 225-237, 1996.

ARGOUT, X.; SALSE, J.; AURY, J.M.; GUILTINAN, M.J.; DROC, G.; GOUZY, J. *et al.* The genome of *Theobroma cacao*. *Nature Genetic*, v. 43, p. 101-108, 2011.

AWANG, A.; KARIM, R.; MITSUI, T. Proteomic analysis of *Theobroma cacao* pod husk. *Journal of Applied Glycoscience*, v. 57, p. 245–267, 2010.

AWANG, Y.B.; ATHERTON, J.G.; TAYLOR, A.J. Salinity effects on strawberry plants grown in rockwool. I. Growth and leaf water relations. *Journal of Horticultural Science*, Ashford, v.68, n.5, p.783-790, 1993.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. *Seeds: physiology of development and germination*. New York, Plenum, n. 2, p. 455, 1994.

BLANCO, M.A., NIEVES, N., SÁNCHEZ, M., BORROTO, C.G.,

CASTILLO, R., GONZÁLEZ, J.L., ESCALONA, M., BÁEZ, E.; HERNÁNDEZ, Z. 1997. Protein changes associated with plant regeneration in embryogenic calli of sugarcane (*Saccharum* sp.). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, v.51, p.153-158, 1997.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248, 1976.

BRAY, E.A. Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Science*, v. 2, p.48-54, 1997.

CANGAHUALA-INOCENTE, G. C.; VILLARINO, A.; SEIXAS, D.; DUMAS-GAUDOT, E.; TERENZI, H.; GUERRA, M.P. Differential proteomic analysis of developmental stages of *Acca sellowiana* somatic embryos. *Acta Physiologiae Plantarum*, v. 1, p. 1-18, 2009.

CARPENTIER, S.C.; WITTERS, E.; LAUKENS, K.; DECKERS, R.S.; PANIS, B. Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: An evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis. *Proteomics*, v.5, p.2497-2507, 2005.

CHUGH A.; KHURANA, P. Gene expression during somatic embryogenesis recent advances. *Current Science*, v. 86, p.715-730, 2002.

CORDEWENER, J.; BOOIJ, H.; DER ZANDT, H.; VAN ENGELN, F.; VAN KAMMEN, A.; DE VRIES, S.C. Tunicamycin inhibited carrot somatic embryo genesis can be restored by secreted cationic peroxidase isoenzymes. *Planta*, v. 184, p. 478-486, 1991.

DODEMAN, V.L.; GUILLOUX, M.L.; DUCREUX, G.; DE VIENNE, D. Somatic and zygotic embryos of *Daucus carota* L. display different protein patterns until conversion to plants. *Plant Cell Physiology*, v. 39, p. 1104-1110, 1998.

DUDITS, D.; GYORGYEY, J.; BOGRE, L.; BAKO, L. Molecular biology of somatic embryogenesis. In Thorpe T. A. (ed) *In vitro Embryogenesis in Plants*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, p. 267-308, 1995.

DURE, L. Structural motifs in LEA proteins. In TJ Close, EA Bray, eds, *Plant Responses to Cellular Dehydration during Environmental Stress*, American Society of Plant Physiologists, Rockville, p. 91-103, 1993.

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

GARAY-ARROYO, A.; COLMENERO-FLORES, J.M.; GARCIARRUBIO, A.; COVARRUBIAS, A.A. Highly hydrophilic proteins in prokaryotes and eukaryotes are common during conditions of water deficit. *Journal of Biological Chemistry*, v. 275, p. 5668-5674, 2000.

GYORGYEY, J.; GARTNER, A.; NEMETH, K.; MAGYAR, Z.; HIRT, H.; HEBERLE-BORS, E.; DUDITS, D. Alfalfa heat shock genes are differentially expressed during somatic embryogenesis. *Plant Molecular Biology*, v. 16, p. 999-1007, 1991.

HECHT, V.; VELLE-CALZADA, .JP.; HARTOG, M.V.; SCHMIDT, E.D.L.; BOUTILIER, K.; GROSSNIKLAUS, U.; DE VRIES, S.C. The *Arabidopsis* SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1 gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. *Plant Physiology*, v.127, p.803-816, 2001.

HENDRIKS, T. E DE VRIES, S. The role of secreted proteins in carrot somatic embryogenesis. In: Terzi M, Cella R, Falavigna A, eds. *Current issues in plant molecular and cellular biology*. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, p. 359-368, 1995.

HOEKSTRA, F.A.; GOLOVINA, E.A.; BUINTINK, J. Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends Plant Science*, v. 6, p. 431-438, 2001.

ISMAIL, A.M.; HALL, A.E.; CLOSE, T.J. Purification and partial characterization of a dehydrin involved in chilling tolerance during seedling emergence of cowpea. *Plant Physiology*, v.120, p. 237–244, 1999b.

KAIRONG, C.; GENSHENG, X.; LIN, Q.; XINMIN, L.; YAFU, W. The analysis of differential gene expression in early somatic embryogenesis on *Lycium barbarum*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, v. 59, n. 3, p. 169-174, 1999.

KERMODE, A. R. Regulatory mechanisms involved in the transition from seed development to germination. *Critical Review, Plant Sciences*, v. 2, p.155–195, 1990.

KEVERS, C.; GASPAR, T. Micropropagation of *Kalmia latifolia*: Acclimation and rooting performance dependent on the preceding steps: Relationship with peroxidase activity. *Mededelin gen van de Faculteit Landbouwwetenschappen Universiteit, Gent*, v. 57, p. 977-85, 1992.

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

LIPPERT, D.; ZHUANG, J.; RALPH, S.; ELLIS, D.E.; GILBERT, M.; OLAFSON, R.; RITLAND, K.; ELLIS, B.; DOUGLAS, C.J.; BOHLMANN, J. Proteome analysis of early somatic embryogenesis in *Picea glauca*. *Proteomics*, v. 5, p. 461–473, 2005.

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

MORDHORST, A.P.; TOONEN, M.A.J.; DEVRIES, S.C. Plant embryogenesis. Review, *Critical Reviews in Plant Sciences*, v.16, p. 535–576, 1997.

NOAH, A.M.; NIEMENAK, N.; SUNDERHAUS, S.; HAASE, C.; OMOKOLO, D.N.; WINKELMANN, T. Braun, H.P. Comparative proteomic analysis of early somatic and zygotic embryogenesis in *Theobroma cacao* L. *J. Proteomics*, 2012.

NYLANDER, M.; SVENSSON, J.; PALVA, E.T.; et al. Stress-induced accumulation and tissue-specific localization of dehydrins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, v. 45, p. 263-279, 2001.

PAN, Z.; GUAN, R.; ZHU, S.; DENG, X. Proteomic analysis of somatic embryogenesis in Valencia sweet orange (*Citrus sinensis* Osbeck) *Plant Cell Report*, v.28. p. 281–289, 2009.

PASTERNAK, T.P.; PRINSEN, E.; AYAYDIN, F.; MISKOLCZI, P.; POTTERS, G.; ASARD, H.; VANONCKELEN, H.A.; DUDITS, D.; FEHÉR, A. The role of auxin, pH, and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa. *Plant Physiology*, v. 129, n. 4, p. 1807-1819, 2002.

RACUSEN, R.H.; SCHIAVONE, F.M. Detection of spatially and stage specific proteins in extracts from single embryos of the domesticated carrot. *Development*, v. 103, p. 665-674, 1988.

RENSING, S.A.; LANG, D.; SCHUMANN, E.; RESKI, R. and HOHE, A. EST sequencing from embryogenic *Cyclamen persicum* cell cultures identifies a high proportion of transcripts homologous to plant genes involved in somatic embryogenesis. *Journal of Plant Growth Regulation*, v. 24, n. 2, p. 102-115, 2005.

RODE, C.; GALLIEN, S.; HEINTZ, D.; VAN DORSSELAER, A.; BRAUN, H.P.; WINKELMANN, T. Enolases: storage compounds in seeds? Evidence from a proteomic comparison of zygotic and somatic embryos of *Cyclamen persicum* Mill. *Plant Molecular Biology*, v. 75, p. 305–319, 2011.

RORAT, T.; GRYGOROWICZ, W.J.; IRZYKOWSKI, W.; REY, P. Expression of KS-type dehydrins is primarily regulated by factors related to organ type and leaf developmental stage during vegetative growth. *Planta*, v.218, p 878–885, 2004.

SHIH, M.D.; LIN, S.D.; HSIEH, J.S.; TSOU, C.H.; CHOW, T.Y.; LIN, T.P.; HSING, Y.I.C. Gene cloning and characterization of a soybean (*Glycine max* L.) LEA protein, GmPM16. *Plant Molecular Biology*, v. 56, p. 689–703, 2004.

STASOLLA, C; YEUNG, E.C. Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryos quality. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, v. 74, p 15-35, 2003.

SUPRASANNA, P.; BAPAT, V.A. Differential gene expression during somatic embryogenesis. In: MUJIB, A. and SAMAJ, J. eds. *Somatic Embryogenesis, Plant Cell Monographs*. Berlin; Springer-Verlag, v. 2, p. 305-320, 2005.

TAKEDA K., KAISHO T. AND AKIRA S. Toll-like receptors. *Annual Review, Immunol*, v. 21, p. 335-376, 2003.

THIBAUD-NISSEN, F.; SHEALY, R.T.; KHANNA, A.; VODKIN, L.O. Clustering of microarray data reveals transcript patterns associated with somatic embryogenesis in soybean. *Plant Physiology*, v. 132, n. 1, p. 118-136, 2003.

THORPE, T.A.; GASPAR, T. Changes in isoperoxidases during shoot formation in tobacco callus. *In vitro*, v. 14, p. 522-526. 1978.

VON ARNOLD, S.; SABALA, I.; BOZHKOVA, P.; DYACHOK, J.; FILONOVA, L. Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, v. 69, p. 233-249, 2002.

WINKELMANN, T.; HEINTZ, D.; VAN DORSSELAER, A.; SEREK,

M.; BRAUN, H.P. Proteomic analyses of somatic and zygotic embryos of *Cyclamen persicum* Mill. reveal new insights into seed and germination physiology. *Planta*, v. 224, p.508–519, 2006.

WISE, M.J.; TUNNACLIFFE, A. POPP the question: what do LEA proteins do? *Trends Plant Science*, v. 9, p. 13–17, 2004.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

No presente trabalho observou-se resposta diferencial à embriogênese somática em quatro diferentes genótipos de *Theobroma cacao* L. do grupo genético Nacional do Equador. Este resultado implica em avanços no emprego desta rota morfogênética *in vitro* para a micropropagação clonal massal o melhoramento e a conservação deste importante recurso genético vegetal.

Os resultados obtidos com relação à metilação do DNA nos embriões somáticos e nas plântulas deles gerados mostraram que, no início da conversão dos embriões somáticos em plântulas ocorreu uma redução no nível de metilação destes embriões somáticos o que parece estar associado a um novo programa de expressão gênica. Isto sugere que a estabilidade na metilação pode controlar a expressão de eventos aberrantes nas plantas regeneradas a partir dos embriões somáticos.

A ocorrência de dois tipos de embriões somáticos identificados durante a expressão da embriogênese somática (translúcidos e leitosos) mostrou que a capacidade de conversão destes embriões não está determinada somente por uma aparente normalidade morfo-anatômica, mas também pela correta expressão de um programa genético que gera como produto final proteínas específicas. Assim, foi possível identificar que a expressão de proteínas LEA prévia à conversão dos embriões somáticos em plantas pode impedir o início a expressão do novo programa genético que regula a conversão dos mesmos em plântulas.

A identificação dos embriões somáticos do tipo leitoso como unidades modelo para o êxito do processo de conversão sugere a necessidade de se aprofundar o estudo das características que determinam esta condição. As características identificadas poderiam ser consideradas como marcadores da qualidade dos embriões somáticos. A partir deste conhecimento se espera poder iniciar trabalhos que permitam identificar os mecanismos bioquímicos, fisiológicos, genéticos e epigenéticos que regulam a indução e desenvolvimento de embriões somáticos do tipo leitoso, na procura de aumentar a formação de embriões somáticos do este tipo. Desta maneira espera-se avançar no estabelecimento de um protocolo eficiente de embriogênese somática para esta espécie.