



República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0820686-4 B1

(22) Data do Depósito: 01/12/2008

(45) Data de Concessão: 14/02/2018



(54) Título: PROCESSO PARA A PROPAGAÇÃO DE THEOBROMA CACAO L. POR EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

(51) Int.Cl.: A01H 4/00

(30) Prioridade Unionista: 04/12/2007 EP 07122289.7

(73) Titular(es): NESTEC S.A.

(72) Inventor(es): BRUNO JEAN-MARIE FLORIN; BERNARD MASSERET; CAROLINE DENISE MONIQUE VACHET

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**PROCESSO PARA A PROPAGAÇÃO DE *THEOBROMA CACAO L.* POR EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA**".

Campo da Invenção

[001] A presente invenção refere-se à multiplicação *in vitro* e regeneração de plantas de *Theobroma cacao L.* para atingir a propagação clonal em nível de grande escala (ou pré-comercial) por embriogênese somática.

Antecedentes da Invenção

[002] *Theobroma cacao L.* é uma árvore tropical de interesse econômico importante para muitos países. Cacau é principalmente alogâmico e propagado a partir de sementes de polinização cruzada dando lugar às plantações que muitas vezes são estabelecidas com sementes não selecionadas, resultando em grande heterogeneidade, sendo que apenas 10% a 20% das árvores produzem 60% a 80% dos grãos de cacau. Portanto, a propagação vegetativa de plantas selecionadas seria desejável, porém os métodos convencionais, tais como o corte ou o enxerto frequentemente apresentam padrão de crescimento. Em tais plantios clonais, as plantas de cacau são menores e tendem a apresentar um maior crescimento dos brotos laterais, bem como alguns ramos serem muito próximos do solo. A poda é necessária para corrigir e levantar a copa de tais árvores. Além disso, estes métodos de propagação são difíceis de aplicar, numa base comercial em grande escala.

[003] A embriogênese somática é um tipo de propagação vegetativa com base na totipotência da célula vegetal, que oferece uma poderosa alternativa a outros métodos de propagação vegetativa, por exemplo, corte ou enxerto.

[004] Independentemente da espécie da planta, a embriogênese somática envolve geralmente:

- a) indução de calos embriogênicos, seguida por sua identificação e seleção através de isolamento físico,
- b) multiplicação de células embriogênicas,
- c) regeneração de um grande número de embriões provenientes dessas células (fase embriogênica), e
- d) conversão desses embriões em embriões maduros capazes de regenerar uma planta.

[005] A propagação de *Theobroma cacao* L. por embriogênese somática em meio gel sólido é conhecida usando botões de flor de cacau, que são submetidos a

- a) embriogênese primária em um disco de Petri por 9 semanas no escuro, a 25 °C em um meio de cultura em gel sólido adequado causando indução e expressão para produzir embriões primários,
- b) embriogênese secundária em disco de Petri
 - i) para 9 a 16 semanas no escuro, a 25 °C em um meio de cultura em gel sólido adequado para produzir calos embriogênicos seguidos por
 - ii) 2 x 3 semanas (segundo os quais os calos são transplantados e sub-cultivados em um meio fresco depois de 3 semanas) no escuro a 25 °C em um meio de cultura em gel sólido adequado causando expressão para produzir adicionalmente embriões secundários,
- c) maturação dos embriões secundários em plântulas por 4 a 6 semanas, na luz a 30 °C / 25 °C em um meio de maturação em gel sólido,
- d) desenvolvimento *in vitro* por 4 a 8 semanas na luz a 25°C em um meio de cultura em gel sólido.

[006] As plântulas são desenvolvidas em seguida transplantadas na estufa para a aclimação das plantas, em seguida para o viveiro antes de ir para o campo onde crescem nas árvores de cacau.

[007] As composições dos meios de cultura basal são bem conhecidas às pessoas versadas na técnica e elas fazem sólidos pelo uso de um gel tal como Agar ou como gelrite. O meio de cultura pode ser qualquer um dos descritos em Driver & Kuniyuki, Hortscience 19 (1984), 507 -509; Yasuda, Fuji and Yamaguchi, Plant Cell Physiol. 26 (1985), 595-597; Murashige T. e Skoog. Physiol. Plant. 15 (1962), 473 -497, Berthouly M. e Michaux - Ferriere N., Plant Cell Tiss. Org. Cult. 44 (1996), 169 - 176 and Halperin, 146 W. (1964), 408- 410, Lloyd & Mc COWN, WPM, Basal Salts Int. Plant Prop. Soc. Proc. Vol. 30 (421 - 427) 1981 Vitamins Mullin & al. Phytopath. Vol. 64 (1425 - 1429) 1974, cujos documentos estão aqui incorporados para fim de referência. A composição dos meios basais e de alguns hormônios de crescimento para a propagação de *Theobroma cacao L.* através de embriogênese somática não é a mesma para as plantas de café, mas as composições de meios adequados poderiam ser facilmente verificáveis por pessoas versadas na técnica.

[008] A multiplicação bem-sucedida dos calos embriogênicos por embriogênese somática utilizando um meio nutriente de gel sólido permitiu uma produção significativa de árvores de cacau "*in vitro*", que são mais vigorosas (diâmetro do tronco), produzem frutificação mais cedo, são anteriores em ervilhas que sustentam, são mais tolerantes à seca, dão um rendimento melhor das primeiras culturas das árvores produzidas, e necessita apenas de metade do trabalho de poda, comparada com as árvores de cacau obtidas por enxerto ou corte. No entanto, ainda é desejável melhorar ainda mais a propagação, a fim de cultivar árvores de cacau em uma escala comercial.

[009] Embora seja conhecida a propagação vegetativa de plantas de café por embriogênese somática, utilizando ambos os meios de cultura de nutrientes sólidos e os meios de cultura de nutriente líquidos, o uso de meios de cultura de nutrientes líquidas para a propagação ve-

getativa de plantas de cacau por embriogênese somática não é conhecida. Os embriões de cacau são maiores do que os embriões de café e muito mais frágeis e é importante limitar a manipulação dos embriões, que é realizada usando pinças e levam a elevados custos do trabalho. Isso é diferente de café porque os embriões de café produzem cotilédones menores e, portanto, podem ser transferidos de um meio para outro, sem danificá-los.

Sumário da Presente Invenção

[0010] Foi surpreendentemente descoberto que o uso de meios de cultura de nutrientes líquidos para a propagação vegetativa de plantas de cacau por embriogênese somática melhora a multiplicação de calos embriogênicos, bem como provê um aumento significativo na produção de plantas de cacau nas *in vitro* em comparação com o uso de meios sólidos. De acordo com a presente invenção é provido um processo para a propagação de *Theobroma cacao L.* por embriogênese somática, utilizando material explante, que é submetido a

a) embriogênese primária no escuro em um meio de cultura sólido causando indução e expressão para a produção de embriões primários,

b) embriogênese secundária

i) em que os embriões primários são tratados no escuro em um meio de cultura sólido ou líquido para produzir e multiplicar os calos embriogênicos seguidos por,

ii) tratamento dos calos embriogênicos no escuro em meio de cultura líquido adequado causando expressão dos calos para produzir adicionalmente novos embriões secundários,

c) pré-germinação de embriões secundários em um disco de Petri em um meio sólido ou em um biorreator em um meio líquido, em embriões pré-germinados em estágio cotiledonar,

d) germinação *ex vitro* dos embriões secundários pré-

germinados no estágio cotiledonar semeando diretamente em um substrato de cultura na estufa para produzir as plântulas e,

e) desenvolvimento das plântulas.

Descrição Detalhada da Invenção

[0011] O material explante pode ser convenientemente obtido, por exemplo, a partir dos botões florais, utilizando estaminódios e pétalas e folhas.

[0012] Os meios de cultura utilizados em geral compreendem macro e micro-nutrientes juntos com vitaminas, hormônios de crescimento, de glicose e/ou sacarose. Se o meio for sólido também contém um agente de gelificação, tais como ágar ou gelrite.

[0013] A embriogênese principal da etapa (a) para a produção de embriões primários é convenientemente realizada em um disco de Petri, durante um período adequado, que pode ser de 5 a 15 semanas e preferencialmente de 7 a 12 semanas. A temperatura pode ser de 20°C a 30 °C e preferencialmente de 24 °C a 27 °C.

[0014] A etapa (a) pode ser realizada em mais de um estágio, por exemplo, em um disco de Petri para o primeiro estágio em um primeiro meio de cultura para a produção de calos primários, transferência para um segundo disco de Petri para o segundo estágio em um segundo meio de cultura para produzir calos embriogênicos, e transferir para um terceiro disco de Petri para o terceiro estágio em um terceiro meio de cultura para produzir embriões primários. No terceiro estágio, o meio de cultura pode vantajosamente ser repostado em torno do meio do tratamento.

[0015] Os primeiro e segundo meios de cultura contêm fitohormônio (ou reguladores de crescimento), por exemplo, 2,4-D, TDZ, quinolina, que são fundamentais para a indução da embriogênese somática no primeiro e segundo estágios, e no terceiro meio os hormônios de crescimento são ausentes para facilitar a diferenciação do em-

brião no terceiro estágio.

[0016] Por exemplo, quando o material explante for obtido a partir de botões florais, 1 a 10 e, preferencialmente 2 a 5 botões florais podem ser utilizados em um disco de Petri, por exemplo, de 5 cm de diâmetro médio de 10 ml.

[0017] A embriogênese secundária da etapa b (i) para produzir e multiplicar os calos embriogênicos é convenientemente realizada em um disco de Petri ou frasco Erlenmeyer durante um período de tempo adequado que pode ser de 10 a 25 semanas e, preferencialmente de 8 a 22 semanas. A temperatura pode ser de 20 °C a 30 °C e preferencialmente de 24 °C a 27 °C. Um grau de multiplicação de 1,5 a 3 pode ser obtido para o calo embriogênico.

[0018] Se desejado ou necessário, o calo embriogênico pode ser armazenado por congelamento em nitrogênio líquido para uso futuro.

[0019] O tratamento de calos embriogênicos na etapa b (ii) para causar expressão para produzir adicionalmente novos embriões secundários é convenientemente realizado em um frasco Erlenmeyer ou um biorreator possuindo uma capacidade de 250 ml a 10 litros, preferencialmente em um frasco Erlenmeyer de 250 ml durante um período de 1 a 6 semanas, preferencialmente 3 semanas. A temperatura pode ser de 20°C a 30°C e preferencialmente de 24 °C a 27 °C. O tratamento em um frasco Erlenmeyer é feito preferencialmente com agitação, por exemplo, agitação em um agitador rotativo a 120 rotações por minuto. O tratamento dos embriões secundários na etapa (c) faz com que a pré-germinação para produzir adicionalmente embriões pré-germinados no estágio cotiledonar seja realizada em um disco de Petri em meio de nutriente sólido ou em meio de nutriente líquido ou em um frasco Erlenmeyer ou em um biorreator de imersão temporária por um período de 3 a 12 semanas, preferencialmente de 6 a 9 semanas, preferencialmente em biorreator de imersão temporária segundo o qual

cerca da metade por meio do tratamento, o meio nutriente é repostado. A temperatura pode ser de 20°C a 30°C e, preferencialmente 25°C. Preferencialmente, o tratamento dos calos embriogênicos da etapa (b, ii + c) é realizado durante um período total de 9 a 12 semanas maneira pela qual cerca da metade por meio do tratamento, o meio de nutriente é repostado.

[0020] Assim, a vantagem da presente invenção usando um meio líquido na etapa b (ii) e (c) que a germinação pode ter lugar *ex vitro*, isto é, os embriões secundários pré-germinados em estágio cotiledonar podem ser semeados diretamente em um substrato de cultura na estufa a partir desse momento elas germinam para produzir as plântulas. Isso elimina a germinação *in vitro* separada no processo conhecido. O substrato de cultura pode ser, por exemplo, uma mistura de vermiculite / perlita, turfa de coco, etc.

[0021] As plântulas são então transplantadas para o viveiro, finalmente no campo e cresceram em árvores de cacau.

[0022] Vantagens adicionais da utilização de um meio líquido, em vez de um meio sólido para a multiplicação dos calos embriogênicos e para a expressão e a pré-germinação de embriões são como segue:

- i) melhora a multiplicação de calos embrionários,
- ii) melhora a sincronização da ocorrência e do desenvolvimento dos embriões
- iii) Ao conceder a conversão direta "*ex vitro*" dos embriões secundários em plântulas, a manipulação individual dos embriões sob condições "*in vitro*" é permitida evitar uma drástica redução dos trabalhos sob condições estéreis,
- iv) provê um aumento significativo na produção de plantas de cacau *in vitro*, e
- v) O meio líquido é mais econômico devido à eliminação de agar ou gelrite para a solidificação, levando a custos mais baixos (es-

pecialmente os custos do trabalho) e melhor sincronia do desenvolvimento do embrião, porque existe uma melhor homogeneidade do estágio de desenvolvimento entre a população de embriões).

EXEMPLO

[0023] O exemplo a seguir ilustra a presente invenção.

Exemplo 1

[0024] 5 botões florais são cultivados em um disco de Petri de 5 cm de diâmetro em meio de 10 ml compreendendo macronutrientes (DKW / Hortscience 19. 1984), micro-nutrientes DKW, DKW vitaminas, 20g/l de glicose, 250 mg/l de Glutamina, 100 mg/l de Myo-Inositol, 2,4-D 2 mg/l, TDZ 5µg/l, 3g/l de Gelrite por 2 semanas a 25 °C no escuro para a produção de calos primários.

[0025] Os calos primários são transferidos para um segundo disco de Petri de 5 cm de diâmetro em meio de 10 ml compreendendo macro-nutrientes WPM, micro-nutrientes WPM, vitaminas B5, 20g/l de glicose, 2,4-D 2 mg/l, 0,25 mg/l de quinetina por 2 semanas em 25 °C no escuro para a produção de calos embriogênicos.

[0026] Os calos embriogênicos são transferidos a um terceiro disco de Petri de 5 cm de diâmetro em meio de 10 ml compreendendo macro-nutrientes DKW, micronutrientes DKW, vitaminas DKW, 1 g/l de glicose, 30 g/l de sacarose por 2x3 semanas a 25 °C no escuro produzir cerca de 5 a 30 embriões primários.

[0027] Os embriões primários são transferidos para um quarto desço de Petri de 5 cm de diâmetro em meio de 10 ml compreendendo macro-nutrientes (Murashige e Skoog. 1962), micro-nutrientes DKW, vitaminas DKW, 2,4,5-T 1 mg/l, 0,25 mg/l de adenina, 30 g/l de glicose, 400 mg/l de L-lisina, 400 mg/l de L-leucina, 400 mg/l de L-arginina, 200 mg/l de L-triptofano, 3g/l de Gelrite por 15 semanas em 25 °C no escuro a produção de calos embriogênicos secundária com um grau de multiplicação de 1,5 a 3.

[0028] O calo embriogênico é transferido para um frasco Erlenmeyer de 250 ml contendo um meio líquido compreendendo macro-nutrientes (Murashige and Skoog. 1962), micro-nutrientes DKW, vitaminas DKW, glicose 30 g/l, 0,025 mg/l de adenina, 400 mg/l de L-lisina, 400 mg/l de L-leucina, 400 mg/l de L-arginina, 200 mg/l de L-triptofano e cultivadas por um período de 3 semanas fazendo com que a expressão de calos embriogênicos produza adicionalmente novos embriões secundários.

[0029] Os embriões secundários são então, pré-germinados em um biorreator de imersão temporária de 5 litros contendo meio líquido compreendendo macro-nutrientes/2 (Murashige and Skoog. 1962), micro-nutrientes DKW/2, vitaminas DKW, 10 g/l de glicose, 5 g/l de sacarose e cultivados durante 6 a 9 semanas a 25° C segundo o qual metade do caminho através do tratamento, o meio nutriente é repostado.

[0030] Na etapa (d) os embriões secundários pré-germinados em estágio cotiledonar são então semeados em um substrato compreendendo turfa sphagnum Blond + perlite + 15% + vermiculita 10% na estufa.

[0031] O processo todo leva de cerca de 30 a 40 semanas, a cerca de um ano a partir da indução *in vitro* para a estufa.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para a propagação de *Theobroma cacao L.* por embriogênese somática utilizando material explante, caracterizado pelo fato de que é submetido a:

a) embriogênese primária no escuro em um meio de cultura sólido por 5 a 15 semanas a uma temperatura entre 20 e 30°C causando indução e expressão para a produção de embriões primários,

b) embriogênese secundária

i) em que os embriões primários são tratados no escuro, em um meio de cultura sólido ou líquido por 10 a 25 semanas a uma temperatura entre 20 e 30°C para produzir e multiplicar calos embriogênicos seguido por:

ii) tratamento dos calos embriogênicos no escuro em um meio de cultura líquido adequado por 1 a 6 semanas a uma temperatura entre 20 e 30°C causando expressão dos calos embriogênicos para produzir adicionalmente novos embriões secundários,

c) pré-germinação de embriões secundários em um disco de Petri em um meio sólido, ou em um biorreator em um meio líquido por 3 a 12 semanas a uma temperatura entre 20 e 30°C, em embriões secundários pré-germinados em estágio cotiledonar,

d) germinação *ex vitro* dos embriões secundários pré-germinados no estágio cotiledonar semeando diretamente em um substrato de cultura na estufa para produzir as plântulas e,

e) desenvolvimento das plântulas.

2. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a etapa (a) compreende um primeiro estágio em um primeiro meio de cultura para a produção de calos primários, um segundo estágio para transferir para um segundo disco de Petri em um segundo meio de cultura para produzir calos embriogênicos, e um terceiro estágio de transferência para um terceiro disco de Petri em um

terceiro meio de cultura.

3. Processo, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que, durante o terceiro estágio, o terceiro meio de cultura pode ser repostado.

4. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que os calos embriogênicos são obtidos a partir dos botões florais, estaminódios e pétalas e folhas.

5. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a embriogênese primária da etapa (a) é realizada durante um período de tempo de 7 a 12 semanas.

6. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a embriogênese primária da etapa (a) é realizada a uma temperatura entre 24 °C e 27 °C.

7. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a embriogênese secundária da etapa (b, i) é realizada durante um período de tempo de 8 a 22 semanas.

8. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a embriogênese secundária da etapa (b, i) é realizada a uma temperatura de 24 °C a 27 °C.

9. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o tratamento dos calos embriogênicos da etapa (b, ii + c) é realizado durante um período de 9 a 12 semanas por meio da qual cerca da metade do tratamento, o meio nutriente é repostado.

10. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a embriogênese secundária da etapa (b, ii) é realizada a uma temperatura de cerca de 24 °C a 27 °C.

11. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que os embriões secundários pré-germinados em estágio cotiledonar na etapa (c) são semeados diretamente sobre um substrato de cultura na estufa a partir desse momento elas germinam

ex vitro para produzir as plântulas.

12. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as plântulas são então transplantadas para o viveiro, finalmente, em campo e cultivadas em árvores de cacau.