# CINÉTICA DA CALOGÊNESE E DA REGENERAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS EM *Coffea arabica*

**Rodrigo Alves Catein, João Paulo de Morais Oliveira, Ana Luiza Assis Semonato, Ewelin Nunes Martins, Elias Terra Werner, Milene Miranda Praça Fontes**

Universidade Federal do Espírito Santo, Campus de Alegre, Alto Universitário, s/n, Bairro Guararema – 29500-000 – Alegre-ES, Brasil, rodrigo.catein@edu.ufes.br, joaopaulo.ueg@gmail.com, alassissemonato@gmail.com, ewelin.martins@edu.ufes.br, elias.werner@ufes.br, milenemiranda@yahoo.com.br.

**Resumo**

A embriogênese somática indireta é uma estratégia relevante para a propagação clonal de *Coffea arabica*. Este estudo caracterizou a cinética da calogênese e da regeneração de embriões somáticos em *C. arabica* cv. Catucaí Vermelho 785/10, cultivada em meio semissólido. A calogênese foi avaliada quinzenalmente ao longo de 90 dias, com 66 repetições por época de avaliação; a regeneração de embriões somáticos foi avaliada mensalmente ao longo de 330 dias, com 43 repetições por época. A porcentagem de explantes responsivos aumentou de 77,0% aos 15 dias para 96,1% aos 75 dias, com estabilização entre 75 e 90 dias. A regeneração apresentou incremento progressivo, atingindo 21,4 embriões somáticos por calo aos 330 dias, com ajuste ao modelo logístico ($R^2 = 0,990$) e tendência de estabilização entre 300 e 330 dias. Os resultados evidenciam dinâmicas temporais distintas entre a calogênese e a regeneração, e fornecem parâmetros para o manejo do período de cultivo em protocolos de propagação *in vitro* de *C. arabica*.

**Palavras-chave:** Propagação clonal. Cultura de tecidos vegetais. Morfogênese. Cultivo semissólido. Biotecnologia vegetal.

**Área do Conhecimento:** Ciências biológicas - botânica.

## Introdução

A embriogênese somática constitui importante estratégia biotecnológica para a propagação clonal de genótipos selecionados, sendo particularmente relevante em espécies perenes como o cafeeiro. Em *Coffea arabica*, a técnica já alcançou aplicação em escala comercial, consolidando o gênero *Coffea* como modelo de referência para estudos de embriogênese somática em espécies lenhosas (Etienne *et al., 2018*; Aguilar *et al*., 2022).

Na via indireta, células somáticas do explante originam calos, a partir dos quais são posteriormente regenerados embriões somáticos. O estabelecimento dessa rota morfogenética depende do genótipo, das condições fisiológicas do explante e do ambiente *in vitro* — incluindo a composição do meio e o tipo e a concentração dos reguladores de crescimento (Sanglard *et al., 2019*; Oliveira *et* al., 2023). Em *Coffea*, o regulador de crescimento ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) atua na desdiferenciação e na proliferação celular, e sua concentração influencia tanto a formação dos calos quanto a regeneração dos embriões somáticos (Oliveira *et al*., 2023); em *Psychotria viridis*, outra Rubiaceae, a composição do meio e a concentração de 2,4-D também alteraram significativamente a resposta calogênica (Andrade *et al*., 2025).

Além da composição do meio, a resposta morfogenética segue uma dinâmica temporal característica. Sanglard *et al. (2019)* verificaram diferenças no tempo necessário para a indução de calos friáveis e para a regeneração de embriões somáticos entre diferentes materiais de *Coffea*, e Oliveira *et al. (2023)* demonstraram que tanto a formação de explantes responsivos quanto a regeneração de embriões variam ao longo do cultivo em *C. arabica* e *Coffea canephora*. Em *C. arabica*, estudos recentes caracterizaram o efeito do tempo sobre a calogênese, compararam a regeneração embrionária em sistemas líquido e semissólido, e avançaram na germinação dos embriões e na recuperação das plantas (Oliveira *et al*., 2024; Silva *et al*., 2025).

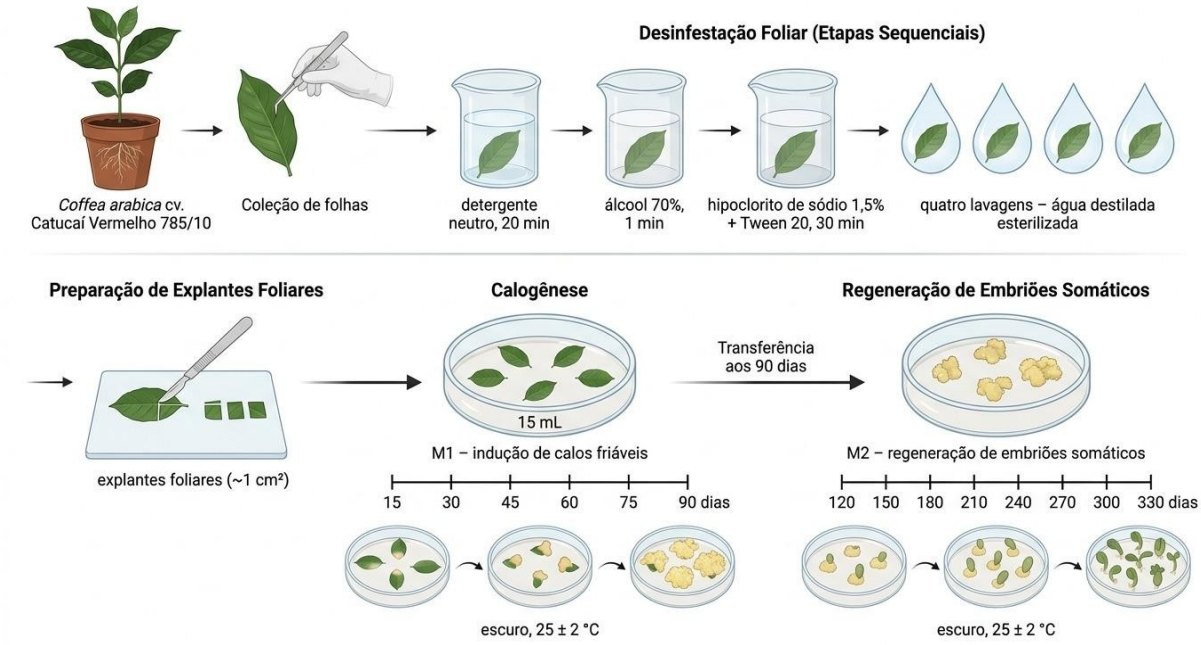
Diante disso, o objetivo deste trabalho foi caracterizar a cinética da calogênese e da regeneração de embriões somáticos em *C. arabica* cv. Catucaí Vermelho 785/10 cultivada em meio semissólido, avaliando a resposta ao longo do período de cultivo.

## Metodologia

Folhas de mudas comerciais de *C. arabica* cv. Catucaí Vermelho 785/10 foram utilizadas como fonte de explantes. A desinfestação seguiu Oliveira *et al*. (2024): as folhas foram lavadas em água corrente com detergente neutro por 20 min e, em câmara de fluxo laminar, imersas em álcool 70% por 1 min e em hipoclorito de sódio a 1,5% acrescido de Tween 20 (1 gota/100 mL) por 30 min, seguidas de quatro lavagens com água destilada esterilizada. As principais etapas experimentais estão sintetizadas na Figura 1.

Após a desinfestação, explantes foliares de aproximadamente 1 cm² foram excisados e inoculados, em grupos de cinco, em placas de Petri contendo 15 mL de meio semissólido de indução de calos friáveis (M1). O M1 continha 2,15 g $L^{-1}$ de sais de Murashige e Skoog (MS), 10 mL $L^{-1}$ de vitaminas B5 de Gamborg, 30 g $L^{-1}$ de sacarose, 0,08 g $L^{-1}$ de L-cisteína, 0,4 g $L^{-1}$ de extrato de malte, 0,1 g $L^{-1}$ de caseína, 9,06 µM de ácido 2,4-D, 4,44 µM de 6-benzilaminopurina (BAP) e 2,8 g $L^{-1}$ de Phytagel. Aos 90 dias, os calos formados a partir dos explantes responsivos foram transferidos para o meio semissólido de regeneração (M2), composto por 4,3 g $L^{-1}$ de sais MS, 10 mL $L^{-1}$ de vitaminas B5, 30 g $L^{-1}$ de sacarose, 0,04 g $L^{-1}$ de L-cisteína, 0,8 g $L^{-1}$ de extrato de malte, 0,2 g $L^{-1}$ de caseína, 4,44 µM de BAP, 2,8 g $L^{-1}$ de Phytagel e 2,0 g $L^{-1}$ de carvão ativado, conforme Sanglard et al. (2019). Ambos os meios tiveram pH ajustado para 5,6, foram autoclavados a 121 °C por 20 min e mantidos no escuro a 25 ± 2 °C.

Figura 1 – Representação esquemática das etapas experimentais de indução de calos friáveis e regeneração de embriões somáticos em *C. arabica* cv. Catucaí Vermelho 785/10.




Fonte: elaborado pelos autores.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com unidades experimentais independentes em cada época de avaliação. Na calogênese, foram utilizadas 66 repetições por época, avaliando-se o número de explantes responsivos aos 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias após a inoculação, posteriormente convertido em porcentagem. Na regeneração, foram utilizadas 43 repetições por época, contabilizando-se o número de embriões somáticos formados por calo aos 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300 e 330 dias após a inoculação inicial.

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), com a normalidade dos resíduos e a homogeneidade das variâncias avaliadas pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Como esses pressupostos não foram atendidos mesmo após transformação dos dados, as diferenças

entre as épocas foram avaliadas pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn com correção de Bonferroni (α = 0,05). A resposta temporal foi descrita por análise de regressão, com os modelos selecionados com base no coeficiente de determinação ($R^2$) e na coerência biológica das estimativas. Os resultados foram apresentados descritivamente como média ± desvio-padrão, e as diferenças entre épocas, avaliadas pelos testes não paramétricos descritos. As análises foram conduzidas no software R, a 5% de significância.

## Resultados

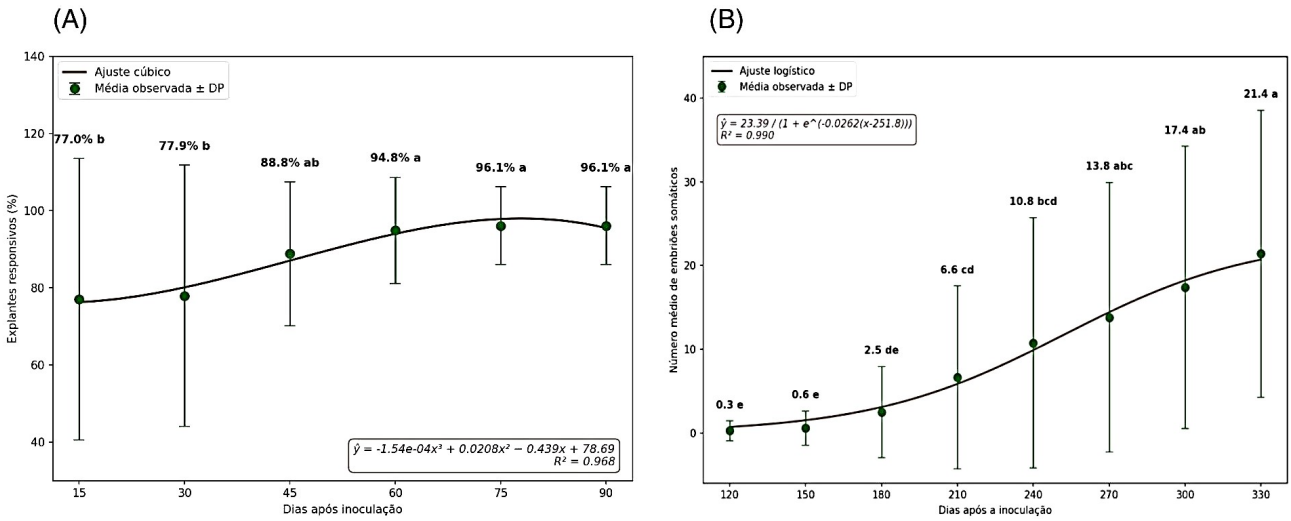
A porcentagem de explantes responsivos diferiu significativamente entre as épocas de avaliação (Kruskal-Wallis: H = 32,27; GL = 5; p = 5,25 × $10^{-6}$). O teste de Dunn indicou menor resposta aos 15 e 30 dias, resposta intermediária aos 45 dias, e maiores porcentagens aos 60, 75 e 90 dias, sem diferença entre essas três últimas épocas. A porcentagem de explantes responsivos aumentou de 77,0% aos 15 dias para 94,8% aos 60 dias, atingindo 96,1% aos 75 e aos 90 dias (Figura 2A).

A resposta calogênica ajustou-se ao modelo polinomial cúbico ($R^2$ = 0,968), caracterizado por aumento da porcentagem de explantes responsivos principalmente entre 15 e 60 dias, seguido de estabilização entre 75 e 90 dias. A equação ajustada foi $\hat{y} = -1{,}54 \times 10^{-4}x^3 + 0{,}0208x^2 - 0{,}439x + 78{,}69$.

O número de embriões somáticos também diferiu significativamente entre as épocas de avaliação (Kruskal-Wallis: H = 158,62; GL = 7; p < 0,0001). O teste de Dunn indicou as menores respostas aos 120 e 150 dias, com incremento progressivo a partir dos 180 dias; a maior média foi observada aos 330 dias, sem diferença estatística em relação a 270 e 300 dias (Figura 2B).

A dinâmica de regeneração foi descrita pelo modelo logístico ŷ = 23,39 / [1 + e^ (− 0,0262(x − 251,8))], com $R^2$ = 0,990. O modelo estimou assíntota de 23,39 embriões somáticos por calo e ponto de inflexão aos 251,8 dias, indicando tendência de estabilização da regeneração entre 300 e 330 dias.

Figura 2 – Cinética da calogênese e da regeneração de embriões somáticos em *C. arabica* cv. Catucaí Vermelho 785/10. (A) Porcentagem de explantes responsivos durante a indução e formação de calos friáveis, dos 15 aos 90 dias. (B) Número médio de embriões somáticos regenerados por calo em meio semissólido, dos 120 aos 330 dias. Os pontos representam as médias e as barras, o desvio-padrão. Letras iguais indicam ausência de diferença significativa entre as épocas pelo teste de Dunn com correção de Bonferroni (p ≥ 0,05).




Fonte: elaborado pelos autores.

## Discussão

A resposta calogênica de *C. arabica* cv. Catucaí Vermelho 785/10 aumentou progressivamente até aproximadamente 60 dias, seguida de estabilização entre 75 e 90 dias, quando cerca de 96% dos explantes já se mostravam responsivos. Esse comportamento é consistente com Oliveira *et al*. (2024), que também verificaram efeito do tempo sobre a indução e a proliferação de calos friáveis de *C. arabica*, com menores respostas aos 15 e 30 dias, e com Sanglard *et al*. (2019), que observaram diferenças na

resposta calogênica ao longo do tempo entre os materiais de *Coffea* avaliados. O elevado percentual de explantes responsivos já aos 60 dias indica que a maior parte da resposta calogênica ocorreu antes do período de transferência, fixado aos 90 dias.

A elevada formação de calos, no entanto, não se traduziu em regeneração embrionária igualmente precoce: os primeiros embriões somáticos foram observados apenas aos 120 dias, com aumento progressivo até 330 dias e tendência de estabilização nas avaliações finais. Essa defasagem temporal entre calogênese e regeneração evidencia que a formação do calo e a aquisição de competência embriogênica correspondem a etapas distintas da embriogênese somática indireta (Sanglard *et al*., 2019; Aguilar *et al*., 2022) — distinção também observada por Almeida et al. (2008), que, avaliando diferentes genótipos de *C. arabica*, verificaram calos de tamanho semelhante entre si, porém com capacidade embriogênica expressivamente diferente.

A forma das curvas ajustadas reforça essa distinção entre as duas fases. O modelo cúbico da calogênese, com estabilização já a partir de 75 dias, é compatível com uma população finita de explantes responsivos: uma vez que a maior parte das células competentes já desdiferenciou, o incremento adicional na porcentagem de resposta tende a se esgotar. Já o modelo logístico ajustado à regeneração descreve um padrão de crescimento sigmoide, no qual o ponto de inflexão (251,8 dias) indica o momento de maior velocidade de conversão em embriões somáticos por calo: antes desse ponto, o incremento é lento e crescente; depois, desacelera em direção à assíntota estimada (23,39 embriões por calo). Esse comportamento sigmoide é esperado em processos de diferenciação celular que dependem do acúmulo progressivo de sinais indutivos até um limiar, seguido da saturação da capacidade responsiva do tecido.

A duração observada para a regeneração é compatível com a natureza relativamente prolongada da embriogênese somática em cafeeiro (Samson e*t al.,* 2006; Etienne *et al.,* 2018). Samson et al. (2006) destacam que protocolos convencionais podem demandar de sete a oito meses, sendo a composição do meio e a concentração dos reguladores determinantes para reduzir o tempo de resposta e aumentar a produção de embriões; em *C. arabica* var. Colombia, o tipo de calo, os reguladores 2,4-D e BAP e a concentração de Phytagel influenciaram a capacidade embriogênica e o número de embriões regenerados (Avila-Victor *et al*., 2023). Mais recentemente, Bartos *et al*. (2025), trabalhando com *C. arabica* cv. Catuaí Vermelho, mostraram que a otimização integrada das diferentes fases de cultivo pode aumentar tanto a proliferação dos calos quanto a produção de embriões — reforçando que cada etapa do processo impõe exigências próprias.

Do ponto de vista prático, a caracterização dessas duas cinéticas oferece parâmetros diretos para o manejo do cultivo. A estabilização da calogênese entre 75 e 90 dias sugere que avaliações mais frequentes após esse período têm baixo retorno informativo, permitindo concentrar o monitoramento nos primeiros 60 dias, quando a maior parte da resposta se define. Na regeneração, a ausência de embriões visíveis antes de 120 dias e a aceleração da conversão em torno do ponto de inflexão indicam uma janela mais eficiente para intensificar avaliações e, eventualmente, direcionar intervenções que favoreçam a maturação dos embriões formados. Esse tipo de parâmetro é particularmente relevante para protocolos voltados à propagação em escala, nos quais o tempo de ciclo é um dos principais determinantes de custo (Etienne *et al*., 2018; Aguilar *et al*., 2022).

A caracterização dessa dinâmica temporal é relevante porque a eficiência da propagação não se encerra na formação dos embriões (Aguilar *et al*., 2022; Silva et al., 2025). Silva *et al*. (2025) demonstraram que as condições do meio também influenciam a germinação dos embriões somáticos e a recuperação de plantas de *C. arabica*, com melhor resposta em combinações específicas de sacarose e agentes gelificantes. Os resultados deste estudo definem, assim, a janela temporal das etapas anteriores a essa germinação — o estabelecimento dos calos e a regeneração dos embriões —, complementando os trabalhos voltados à conversão desses embriões em plantas. A compreensão integrada dessas fases é o que, em conjunto, sustenta a otimização de protocolos de propagação clonal de *C. arabica* (Etienne *et al*., 2018; Aguilar *et al*., 2022).

Vale ressaltar que a cinética aqui descrita é específica da cultivar Catucaí Vermelho 785/10, e sua magnitude — embora não necessariamente sua forma geral — pode variar entre genótipos, como já demonstrado para outros materiais de *Coffea* (Almeida *et al*., 2008; Sanglard *et al*., 2019). Essa dependência genotípica reforça a necessidade de caracterizações cinéticas específicas antes da definição de protocolos de propagação em larga escala, e sugere, como desdobramento natural deste estudo, a comparação da cinética de calogênese e de regeneração entre diferentes genótipos de *C. arabica* sob as mesmas condições de cultivo, de modo a distinguir o que é uma propriedade geral da espécie do que é particular a cada material genético.

## Conclusão

O tempo de cultivo influenciou significativamente tanto a calogênese quanto a regeneração de embriões somáticos em *C. arabica* cv. Catucaí Vermelho 785/10. A porcentagem de explantes responsivos aumentou principalmente até os 60 dias, estabilizando-se entre 75 e 90 dias, enquanto a regeneração embrionária apresentou resposta mais tardia e progressiva, com os primeiros embriões observados aos 120 dias e tendência de estabilização entre 300 e 330 dias. Esses resultados caracterizam temporalmente etapas distintas da embriogênese somática indireta e fornecem parâmetros para o manejo do período de cultivo, contribuindo para o aprimoramento de protocolos de propagação *in vitro* de *C. arabica*.

## Referências

AGUILAR, M. E.; WANG, X.-Y.; ESCALONA, M.; YAN, L.; HUANG, L.-F. Somatic embryogenesis of Arabica coffee in temporary immersion culture: advances, limitations, and perspectives for mass propagation of selected genotypes. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, 994578, 2022. DOI: 10.3389/fpls.2022.994578.

ALMEIDA, J. A. S. de; SILVAROLLA, M. B.; FAZUOLI, L. C.; STANCATO, G. C. Embriogênese somática em genótipos de *Coffea arabica* L. **Coffee Science**, v. 3, n. 2, p. 143-151, 2008. DOI: 10.25186/cs.v3i2.85.

ANDRADE, C. M. L. de; BISMARA, B. A. P. P.; SANTOS, F. P.; YONAMINE, M.; CRIPPA, J. A. de S.; HALLAK, J. E. C.; ALVES, F. H. F.; PASQUAL, M.; STEIN, V. C. Establishment of *Psychotria viridis* Ruiz & Pav. callus cultures, plantlet regeneration and *in vitro* production of the hallucinogenic indole alkaloid N,N-dimethyltryptamine. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 161, art. 65, 2025. DOI: 10.1007/s11240-025-03061-y.

AVILA-VICTOR, C. M.; ARJONA-SUÁREZ, E. de J.; IRACHETA-DONJUAN, L.; VALDEZ-CARRASCO, J. M.; GÓMEZ-MERINO, F. C.; ROBLEDO-PAZ, A. Callus type, growth regulators, and Phytagel on indirect somatic embryogenesis of coffee (*Coffea arabica* L. var. Colombia). **Plants**, v. 12, n. 20, 3570, 2023. DOI: 10.3390/plants12203570.

BARTOS, P. M. C.; GOMES, H. T.; SILVA-CARDOSO, I. M. de A.; TEIXEIRA, J. B.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Integrated optimization of a multi-step somatic embryogenesis protocol enabling large-scale propagation of *Coffea arabica* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 163, art. 68, 2025. DOI: 10.1007/s11240-025-03243-8.

ETIENNE, H.; BRETON, D.; BREITLER, J.-C.; BERTRAND, B.; DÉCHAMP, E.; AWADA, R.; MARRACCINI, P.; LÉRAN, S.; ALPIZAR, E.; CAMPA, C.; COURTEL, P.; GEORGET, F.; DUCOS, J.-P. Coffee somatic embryogenesis: how did research, experience gained and innovations promote the commercial propagation of elite clones from the two cultivated species? **Frontiers in Plant Science**, v. 9, 1630, 2018. DOI: 10.3389/fpls.2018.01630.

OLIVEIRA, J. P. de M.; SILVA, A. J. da; CATRINCK, M. N.; CLARINDO, W. R. Embryonic abnormalities and genotoxicity induced by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid during indirect somatic embryogenesis in *Coffea*. **Scientific Reports**, v. 13, 9689, 2023. DOI: 10.1038/s41598-023-36879-7.

OLIVEIRA, J. P. de M.; BERGAMIN, A. dos S.; MARTINS, G. S.; VASCONCELOS, L. C.; WERNER, E. T.; XAVIER, A. da S.; FONTES, M. M. P. Influência dos sistemas de cultivo *in vitro* na indução de embriões somáticos em *Coffea arabica*. In: ENCONTRO LATINO AMERICANO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 28.; ENCONTRO LATINO AMERICANO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 24.; ENCONTRO DE INICIAÇÃO À DOCÊNCIA, 14., 2024, São José dos Campos. **Anais [...]**. São José dos Campos: Universidade do Vale do Paraíba, 2024. p. 1-5.

SAMSON, N. P.; CAMPA, C.; LE GAL, L.; NOIROT, M.; THOMAS, G.; LOKESWARI, T. S.; DE KOCHKO, A. Effect of primary culture medium composition on high frequency somatic embryogenesis in different *Coffea* species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 86, n. 1, p. 37-45, 2006. DOI: 10.1007/s11240-006-9094-2.

SANGLARD, N. A.; AMARAL-SILVA, P. M.; SATTLER, M. C.; OLIVEIRA, S. C.; CESÁRIO, L. M.; FERREIRA, A.; CARVALHO, C. R.; CLARINDO, W. R. Indirect somatic embryogenesis in *Coffea* with different ploidy levels: a revisiting and updating study. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 136, p. 255-267, 2019. DOI: 10.1007/s11240-018-1511-9.

SILVA, W. C.; MARIANO, G. F.; OLIVEIRA, J. P. de M.; WERNER, E. T.; FONTES, M. M. P. Germinação de embriões somáticos e recuperação de plantas de *Coffea arabica in vitro*. In: ENCONTRO LATINO AMERICANO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 29.; ENCONTRO LATINO AMERICANO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 25.; ENCONTRO DE INICIAÇÃO À DOCÊNCIA, 15., 2025, São José dos Campos. **Anais [...]**. São José dos Campos: Universidade do Vale do Paraíba, 2025. p. 1-6.

## Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento da UFES/Alegre e ao Laboratório de Citogenética e Cultura de Tecidos Vegetais da UFES/Alegre pelo apoio financeiro, infraestrutura e recursos fornecidos para a realização deste estudo.