EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA INDIRETA DE *Coffea arabica* EM CULTIVO *IN VITRO* SEQUENCIAL COM MEIOS SEMISSÓLIDO E LÍQUIDO

Ana Luiza Assis Semonato, Rodrigo Alves Catein, João Paulo de Morais Oliveira, Geisiele Silva 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, alassissemonato@gmail.com, rodrigo.catein@edu.ufes.br, joaopaulo.ueg@gmail.com, martinsgeisiele@gmail.com, elias.werner@ufes.br, milene.fontes@ufes.br

Resumo

A embriogênese somática indireta envolve etapas morfogênicas com exigências distintas, tornando relevante o emprego sequencial de diferentes condições de cultivo. Este estudo avaliou a embriogênese somática de *Coffea arabica* cv. Catucaí Vermelho 785/10 utilizando meio semissólido p ara indução de calos friáveis e meio líquido agitado para regeneração embrionária. No meio semissólido a porcentagem de explantes responsivos aumentou de 74,0% aos 15 dias para 95,6% aos 45 dias, atingindo 100% a partir dos 60 dias. Aos 90 dias, os calos foram transferidos para meio líquido, no qual a regeneração aumentou progressivamente de 1,2 para 85,4 embriões somáticos entre 90 e 330 dias. A regeneração apresentou ajuste logístico ($R^2 = 0,997$). Os resultados demonstram a funcionalidade d a sequência semissólido–líquido para integrar indução e regeneração; como os meios diferiram também na composição, as respostas não podem ser atribuídas exclusivamente ao estado físico.

Palavras-chave: Propagação clonal. Cultura de tecidos vegetais. Calogênese. Morfogênese. Biotecnologia vegetal.

Área do Conhecimento: Ciências biológicas - botânica.

Introdução

A propagação em grande escala de genótipos elites de Coffea, segregantes e/ou representados p or poucos indivíduos, pode ser realizada por meio da embriogênese somática indireta. A micropropagação clonal de cafeeiros por embriogênese somática envolve uma sequência de etapas c om exigências distintas, desde o estabelecimento do tecido embriogênico até a formação e o desenvolvimento dos embriões. A eficiência desse processo depende da adequação das condições d e cultivo em cada fase. Em *Coffea arabica*, o desenvolvimento de suspensões celulares embriogênicas e de sistemas de cultivo líquido contribuiu para ampliar a multiplicação do material embriogênico e a p rodução de embriões, favorecendo o avanço da técnica em escala comercial para materiais selecionados (Etienne *et al*., 2018; Aguilar *et al*., 2022).

Entre os fatores envolvidos nesse processo, o estado físico do meio de cultura pode modificar as c ondições às quais o material vegetal é submetido durante o cultivo. Em sistemas semissólidos, o tecido permanece apoiado sobre uma matriz gelificada, enquanto em sistemas líquidos ocorre maior contato do material com os componentes do meio. Esses sistemas têm sido empregados em diferentes etapas da embriogênese somática de *Coffea*, especialmente em estratégias voltadas à multiplicação e regeneração do material embriogênico (Etienne *et al*., 2018; Aguilar *et al*., 2022). Em *C. arabica*, Oliveira *et al*. (2024) compararam os sistemas líquido e semissólido e não observaram diferença significativa no número médio de embriões, porém verificaram formação mais precoce de estruturas e mbrionárias em meio líquido.

A embriogênese somática apresenta dinâmica temporal, na qual a formação de calos e a regeneração embrionária constituem etapas distintas e dependentes das condições de cultivo (Sanglard *et al*., 2019; Aguilar *et al*., 2022). A combinação sequencial de sistemas permite adequar essas condições às diferentes fases morfogênicas, como já explorado em protocolos multietapas de *Coffea* (Etienne *et al*., 2018; Bartos *et al*., 2025). Nesse contexto, o acompanhamento da resposta ao longo do tempo permite identificar o estabelecimento da calogênese, o início da regeneração e os

períodos de maior incremento embrionário, contribuindo para o manejo do cultivo e o refinamento de protocolos de propagação *in vitro* (Sanglard *et al*., 2019; Oliveira *et al*., 2024).

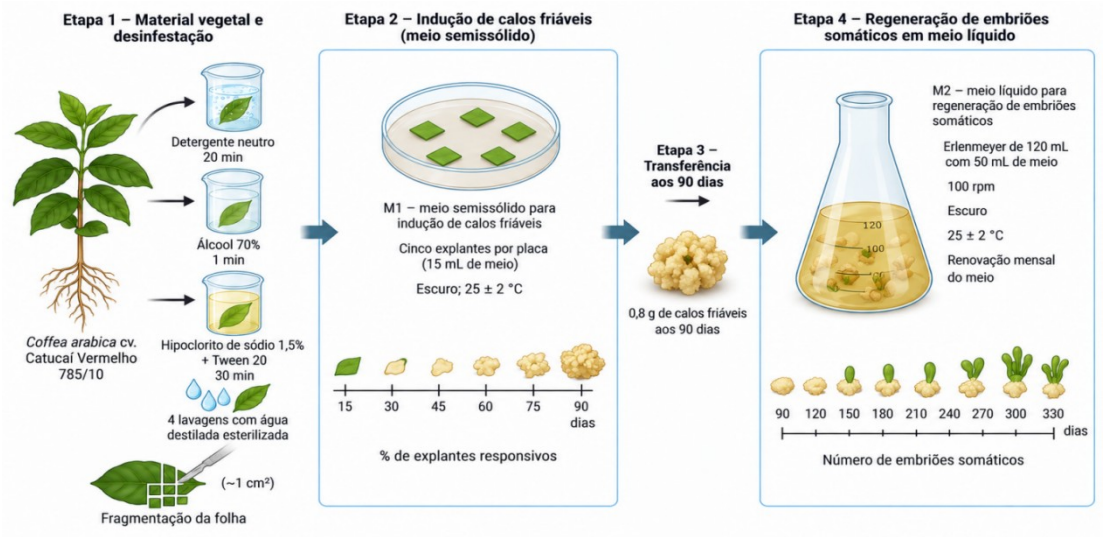
Diante disso, objetivou-se avaliar a embriogênese somática indireta de *C. arabica* cv. Catucaí Vermelho 785/10 em um sistema sequencial de cultivo, empregando meio semissólido para indução e estabelecimento de calos friáveis e meio líquido agitado para a regeneração de embriões somáticos, caracterizando a resposta morfogênica obtida em cada etapa.

Metodologia

Foram utilizadas folhas de mudas comerciais de *Coffea arabica* cv. Catucaí Vermelho 785/10. A desinfestação, baseada em Oliveira *et al.* (2024), consistiu em lavagem com detergente neutro por 20 min, seguida de álcool 70% por 1 min e hipoclorito de sódio a 1,5% + Tween 20 (1 gota/100 mL) por 30 min, finalizando com quatro lavagens em água destilada esterilizada. Explantes foliares de aproximadamente 1 cm² foram inoculados, cinco por placa de Petri, em 15 mL do meio de indução M1, empregado na forma semissólida. O M1 foi constituído por 2,15 g L^{-1} de sais MS, 10 mL L^{-1} de vitaminas B5, 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 2,4-D e 4,44 µM de BAP, sendo solidificado com 2,8 g L^{-1} de Phytagel, conforme Sanglard *e t al.* (2019). Nessa etapa, os explantes permaneceram individualizados sobre a matriz gelificada durante a indução e formação dos calos friáveis.

Aos 90 dias, 0,8 g de calos friáveis foram transferidos para Erlenmeyers de 120 mL contendo 50 m L do meio de regeneração M2, utilizado na forma líquida. O M2 continha 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 e 2,0 g L^{-1} de carvão ativado, sem adição de 2,4-D ou agente gelificante, com base em Oliveira *et al.* (2024). Os frascos foram mantidos sob agitação orbital a 100 rpm e o meio foi renovado mensalmente. Ambos os meios foram ajustados para pH 5,6 e autoclavados a 121 °C por 20 min; as culturas permaneceram no escuro a 25 ± 2 °C. O fluxo e as épocas de avaliação estão apresentados na Figura 1.

Figura 1 - Representação esquemática das etapas experimentais da embriogênese somática indireta de *Coffea a rabica* cv. Catucaí Vermelho 785/10, incluindo desinfestação e preparo dos explantes, indução e formação de calos em meio semissólido e regeneração de embriões somáticos em meio líquido.



Fonte: elaborada pelos autores.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com unidades experimentais independentes em cada época de avaliação. Na calogênese, foram utilizadas 50

repetições por tratamento, avaliando-se a porcentagem de calos responsivos, enquanto na regeneração foram utilizadas 25 repetições por tratamento, contabilizando-se o número de embriões somáticos. Os dados foram apresentados como média ± desvio-padrão e analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn com correção de Bonferroni (α = 0,05). A tendência temporal foi descrita por regressão, selecionando-se os modelos pelo coeficiente de determinação (R^2) e pela coerência biológica das curvas.

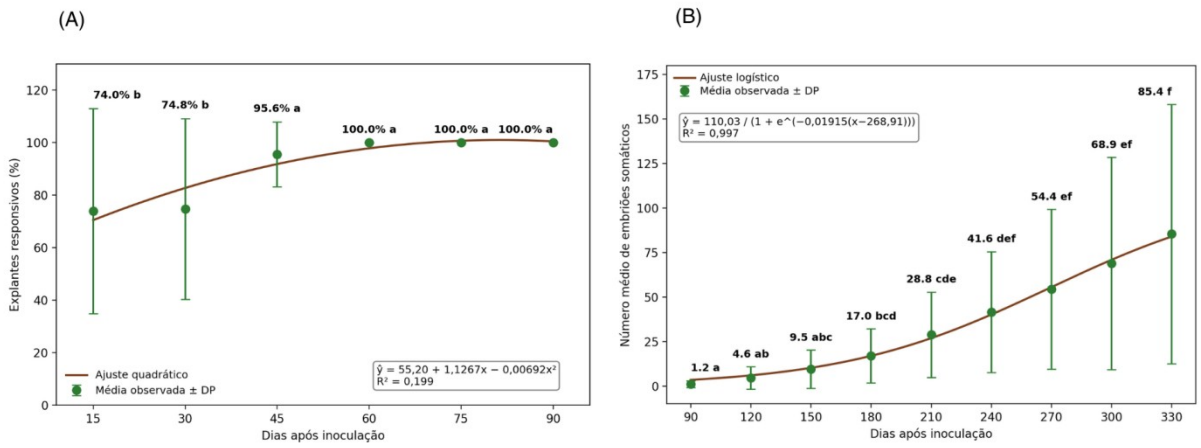
Resultados

A porcentagem de calos variou entre as épocas de avaliação (Kruskal-Wallis: H = 83,46; GL = 5; $p < 0,0001$). O teste de Dunn indicou menores respostas aos 15 e 30 dias, quando foram observados 74,0% e 74,8% de calos friáveis, respectivamente. Aos 45 dias, a resposta aumentou para 95,6%, enquanto aos 60, 75 e 90 dias todas as unidades atingiram 100% de responsividade, sem diferença entre essas quatro últimas épocas (Figura 2A).

O número de embriões somáticos também variou entre as épocas de avaliação (Kruskal-Wallis: H = 155,23; GL = 8; $p < 0,0001$). O teste de Dunn indicou menor resposta aos 90 dias, seguida de incremento progressivo ao longo do cultivo. As médias aumentaram de 1,2 embrião aos 90 dias para 4,6; 9,5; 17,0; 28,8; 41,6; 54,4; 68,9 e 85,4 embriões aos 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300 e 330 dias, respectivamente. Aos 330 dias foi observada a maior média, sem diferença estatística em relação às épocas de 270 e 300 dias pelo teste de Dunn (Figura 2B).

A dinâmica da regeneração apresentou ajuste ao modelo logístico $\hat{y} = 110,03/[1 + e^{(-0,01915(x - 268,91))}]$, com $R^2 = 0,997$. O modelo estimou assíntota de 110,03 embriões somáticos e ponto de inflexão aos 268,91 dias, indicando desaceleração progressiva da taxa de formação de novos embriões após esse período (Figura 2B).

Figura 2 - Resposta temporal da embriogênese somática indireta de *Coffea arabica* cv. Catucaí Vermelho 785/10 sob cultivo sequencial. (A) Porcentagem de explantes responsivos durante a indução e formação de calos em meio semissólido, dos 15 aos 90 dias. (B) Número médio de embriões somáticos regenerados em meio líquido, dos 90 aos 330 dias. Os pontos representam as médias e as barras o desvio-padrão; as linhas representam os modelos de regressão ajustados. 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

O sistema avaliado separou a embriogênese somática indireta de *C. arabica* em duas condições d e cultivo distintas, associadas a fases morfogênicas diferentes. Na etapa inicial, os explantes foliares permaneceram em M1 semissólido, contendo 2,4-D e BAP e sustentado por Phytagel, condição na qual ocorreu a indução e o estabelecimento dos calos friáveis. A responsividade aumentou de 74,0% aos 15 dias para 95,6% aos 45 dias e atingiu 100% a partir dos 60 dias. Assim, mais do que representar a penas uma resposta temporal, esses dados mostram que a fase semissólida utilizada foi capaz de estabelecer uma população altamente responsiva de calos antes de sua transferência para a etapa de regeneração. A indução de tecido embriogênico a partir de explantes foliares constitui uma etapa fundamental da embriogênese somática indireta de cafeeiros, e sua eficiência pode ser influenciada t anto pela composição do meio quanto pelo genótipo e pelas condições de cultivo (Sanglard *et al.*, 2019; Etienne *et al.*, 2018).

A transferência para M2 representou uma alteração simultânea do estado físico e da composição do ambiente de cultivo. Diferentemente do M1, o M2 foi empregado na forma líquida sob agitação a 100 rpm, apresentou maior concentração de sais MS, não continha 2,4-D nem agente gelificante e incluiu carvão ativado, além de diferentes concentrações de L-cisteína, extrato de malte e caseína. Portanto, a transição entre as etapas não deve ser interpretada como uma comparação isolada entre meio semissólido e líquido, mas como uma mudança integrada de condições destinada à regeneração embrionária. Após essa transferência, o número médio de embriões aumentou continuamente, alcançando 85,4 aos 330 dias, demonstrando a manutenção da capacidade regenerativa do material no sistema líquido.

O emprego de fases líquidas possui particular relevância na embriogênese somática de *Coffea*, sobretudo pela possibilidade de aumentar o contato do material embriogênico com o meio e permitir o manejo de maiores quantidades de tecido. O desenvolvimento de suspensões celulares e posteriormente de sistemas líquidos e de imersão temporária constituiu um dos principais avanços para o escalonamento da propagação clonal de cafeeiros (Etienne *et al.*, 2018; Aguilar *et al.*, 2022). Etienne *et al.* descrevem o uso de meios líquidos para multiplicação de tecido embriogênico e produção de e mbriões como uma etapa decisiva para a ampliação da embriogênese somática em café. Sistemas de imersão temporária representam uma evolução dessa estratégia e possibilitam manipular grandes quantidades de embriões, embora também apresentem limitações próprias, como assincronia e alterações morfofisiológicas (Aguilar *et al.*, 2022). No presente estudo, entretanto, foi utilizado cultivo l íquido contínuo em Erlenmeyers sob agitação, e não um sistema de imersão temporária.

Essa distinção é especialmente importante na comparação com Oliveira *et al.* (2024). Nesse estudo, os autores avaliaram diretamente sistemas líquido e semissólido e verificaram formação mais precoce de estruturas embrionárias no cultivo líquido, embora sem diferença significativa no número médio final de embriões. No presente experimento, os dois estados físicos não constituíram tratamentos paralelos: o meio semissólido foi utilizado para indução de calos e o líquido para regeneração, com formulações distintas. Dessa forma, não é possível atribuir o aumento da produção de embriões exclusivamente ao estado líquido. O resultado demonstra, em vez disso, que a sequência M1 semissólido – M2 líquido foi funcional para conduzir o material desde o estabelecimento do calo friável até a regeneração de embriões somáticos.

Sob essa perspectiva, um resultado particularmente relevante é que a fase de indução alcançou 1 00% de responsividade já aos 60 dias, embora a transferência para o meio líquido tenha sido realizada aos 90 dias. Isso estabelece uma questão experimental diferente daquela relacionada apenas à cinética determinar se o período de permanência no M1 pode ser reduzido sem comprometer a competência regenerativa posterior no M2. A resposta exige experimentos específicos, pois elevada frequência de calogênese não implica necessariamente igual competência embriogênica. Estudos futuros poderiam, portanto, comparar épocas de transferência entre M1 e M2 e, separadamente, testar os estados semissólido e líquido mantendo a composição química dos meios controlada. Esse desenho permitiria discriminar o efeito do momento de transferência daquele decorrente do estado físico e da formulação nutricional.

Conclusão

O cultivo sequencial empregado permitiu conduzir etapas distintas da embriogênese somática indireta de *C. arabica* cv. Catucaí Vermelho 785/10 sob condições específicas. O meio M1 semissólido

possibilitou elevada formação de calos friáveis, com 100% de responsividade a partir dos 60 dias, enquanto a transferência para o M2 líquido agitado foi seguida por regeneração progressiva, alcançando média de 85,4 embriões somáticos aos 330 dias. Como os meios diferiram tanto no estado físico quanto na composição, os resultados não permitem atribuir as respostas exclusivamente à presença ou ausência de agente gelificante. Em conjunto, os dados demonstram a aplicabilidade da sequência semissólido–líquido para integrar as fases de indução e regeneração e indicam o momento de transferência entre essas condições como um ponto relevante para o futuro refinamento do protocolo.

Referências

AGUILAR, M. E.; WANG, X.-Y.; ESCALONA, M.; YAN, L.; HUANG, L.-F. Somatic embryogenesis of A rabica 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.

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, 2 025. 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.; 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 e mbriões somáticos em *Coffea arabica*. In: ENCONTRO LATINO AMERICANO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 28.; ENCONTRO LATINO AMERICANO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 24.; ENCONTRO DE I NICIAÇÃO À DOCÊNCIA, 14., 2024, **São José dos Campos. *Anais [...]***. São José dos Campos: Universidade do Vale do Paraíba, 2024. p. 1-5.

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.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Universidade Federal do Espírito Santo e ao Laboratório de Citogenética e Cultura de Tecidos Vegetais (LABCITO) pelo apoio ao desenvolvimento da pesquisa.