INDUÇÃO DE CALOS EM EXPLANTES FOLIARES DE DIFERENTES CULTIVARES DE CAFEEIRO (*Coffea arabica* L.)

Autores: Thalya Campelo Vitor[1], Katia Aguiar Monteiro[1], Mayla Bessá Scota[1], Artur Campos de Oliveira[1], Ana Luiza Assis Semonato[1], Milene Praça Fontes[1], Elias Terra Werner[1]

[1] Universidade Federal do Espírito Santo, ES / Laboratório de Citogenética e Cultura de Tecidos Vegetais, Alto Universitário, S/N, Guararema - 29500-000 - Alegre-ES, Brasil, thalyavitor26@gmail.com, katiamonteiro0603@gmail.com, mayla_scotta@hotmail.com, camposdeoliveira.artur@gmail.com, alassissemonato@gmail.com, milene.fontes@ufes.br, elias.werner@ufes.br

Resumo

O cafeeiro (*Coffea arabica* L.) apresenta elevada relevância econômica, mas limitações fisiológicas e a recalcitrância podem dificultar sua propagação. Nesse contexto, a cultura de tecidos vegetais constitui uma estratégia promissora para a propagação clonal e regeneração *in vitro*. Este estudo avaliou a indução de calos *in vitro* em explantes foliares de quatro genótipos de *C. arabica* (Arara, Catucaí 785-15, Catucaí Amarelo 2SL e Acauã), cultivados em meio suplementado com 2,4-D e Picloram. Aos 30 dias, o Picloram promoveu maior indução calogênica no genótipo Arara (75,78%), superando 2SL (41,66%) e 785 (20,00%). Aos 60 dias, não houve interação entre os fatores, mas o Picloram apresentou maior média de indução (45,14%) em relação ao 2,4-D (13,15%). O genótipo Acauã não apresentou indução de calos nas condições avaliadas. Os resultados obtidos fornecem subsídios para o aprimoramento de protocolos de cultura de tecidos em *C. arabica* e constituem uma etapa inicial para o estabelecimento de sistemas de embriogênese somática voltados à propagação clonal e à produção de mudas de cafeeiro.
Palavras-chave:Auxinas.Calogênese. Cultura de tecidos

Área do Conhecimento: Ciências biológicas, Fisiologia.

Introdução

Dessa forma, considerando a variabilidade das respostas morfogênicas entre as cultivares, as condições estabelecidas para um determinado material não podem ser necessariamente padronizadas para outros, sendo necessária a avaliação das respostas de cada cultivar de interesse. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a indução de calos em explantes foliares de diferentes clones de cafeeiro (*C. arabica* L.), comparando as respostas morfogênicas das cultivares Arara, 785, 2SL e Acauã.

Diante da crescente demanda mundial por café, o setor cafeeiro tem buscado selecionar e multiplicar cultivares com características agronômicas superiores, especialmente aquelas com maior potencial produtivo (Silva *et al.,* 2024). Portanto, é indispensável a seleção de grãos de cultivares em potencial, para propagar em maior número os indivíduos com características favoráveis, como *C.arabica*: Arara, Catucaí 785-15, Catucaí Amarelo 2SL e Acauã .Apesar do potencial de propagação por sementes, o café apresenta limitações relacionadas à conservação e à manutenção da qualidade fisiológica durante o armazenamento (Ellis *et al*., 1990; Fantazzini *et al*., 2018; Alixandre *et al.,* 2024).

Em virtude dessas limitações, abordagens biotecnológicas como a cultura de tecidos vegetais *in vitro* constitui uma estratégia eficiente para a propagação em larga escala e conservação de espécies de interesse econômico, como as cultivares de *C. arabica* (Gosal *et al.,* 2018; Etienne *et al.,* 2018). Entretanto, o sucesso dessas abordagens depende, primeiramente, do estabelecimento asséptico do explante e, em seguida, da indução eficiente de calos, constitui uma etapa determinante para as fases subsequentes da morfogênese *in vitro,* pois condiciona a competência regenerativa do tecido; entre essas fases, destaca-se a embriogênese somática, amplamente empregada para a regeneração em massa de plantas com alta fidelidade clonal à planta-matriz (Gaj, 2004;Yang *et al*., 2010). Dessa forma,

a indução de calos constitui uma etapa crítica e ainda pouco explorada para diversas cultivares de café, sendo indispensável compreendê-la antes de se avançar para etapas morfogênicas posteriores.

Nesse cenário, o uso de explantes foliares coletados diretamente do campo apresenta-se como uma alternativa viável para contornar as limitações impostas. O estabelecimento *in vitro* de explantes oriundos do campo é frequentemente limitado por contaminantes endofíticos e epifíticos, o que pode comprometer a formação de culturas assépticas; por isso, protocolos de desinfestação bem ajustados, incluindo o uso de PPM, podem ser importantes para reduzir a contaminação, embora sua eficácia dependa da espécie e do tipo de contaminante (Leifert *et al*., 1994). Dessa forma, a definição de protocolos eficientes de desinfestação, incluindo o uso de agentes antimicrobianos como o PPM (Plant Preservative Mixture), é indispensável para garantir baixas taxas de contaminação (Santos *et al.,* 2019). As limitações encontradas nas técnicas de propagação para a obtenção de mudas saudáveis, uniformes e geneticamente estáveis restringem a capacidade dos viveiros de atender à crescente demanda por mudas de qualidade (Braghini *et a*l., 2007; Almeida *et al.,* 2007).

O café (*Coffea* spp.) está entre os produtos agrícolas de maior relevância econômica no comércio brasileiro e internacional, movimentando desde a agricultura familiar até a indústria em larga escala. O Brasil consolidou-se como o maior produtor e exportador mundial, com produção estimada em 66,7 milhões de sacas beneficiadas para a safra 2026 (Conab, 2026), cabendo à espécie *Coffea arabica* L. a maior parte desse volume (Alves, 2026; Brasil, 2023).

Para *C. arabica*, diferentes protocolos de indução de calos e embriogênese somática *in vitro* têm sido descritos, evidenciando a influência do tipo e da origem do explante e da composição do meio de cultura, especialmente do balanço entre auxinas e citocininas (Maciel *et al.,* 2003; Souza *et al*., 2015; Avila-Victor *et al*., 2023). Em protocolos de embriogênese somática, os calos são frequentemente induzidos a partir de explantes foliares mantidos no escuro, em meio MS (Murashige e Skoog, 1962) suplementado com combinações de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) e BAP (6-Benzilaminopurina) (Maciel *et al*., 2003; Souza *et al.,* 2015; Avila-Victor *et al*., 2023). A resposta morfogênica pode variar entre espécies e, principalmente, entre cultivares. Em *C. arábica*, Caturra e Catuaí apresentaram respostas distintas às combinações de BAP, AIA (Ácido Indol-3-Acético) e nitrato de prata (AgNO3), evidenciando a influência da cultivar na resposta embriogênica (Rojas- Lorz *et al.,* 2019). Essa variabilidade está relacionada à interação entre características do explante, composição do meio de cultura e particularidades da planta doadora (Molina *et al*., 2002; Avila-Victor *et al.,* 2023).

Metodologia

Folhas de *C. arabica* (cultivares Arara, 785, 2SL e Acauã) foram coletadas em viveiro localizado no município de Alegre, ES, e transportadas ao Laboratório de Citogenética e Cultura de Tecidos Vegetais (LABCITO), onde foram submetidas à desinfestação e ao estabelecimento *in vitro*. Inicialmente, as folhas foram lavadas com detergente neutro sob água corrente por 20 minutos (Fig. 1A). Em câmara de fluxo laminar, foram imersas em etanol 70% por 1 minuto e, posteriormente, em solução de hipoclorito de sódio a 2%, acrescida de duas gotas de Tween 20 (0,1%), por 20 minutos (Fig. 1B). Em seguida, foram realizados três enxágues consecutivos com água de osmose reversa autoclavada (Fig. 1C). As folhas desinfestadas foram seccionadas em segmentos de aproximadamente 1 cm², utilizados como explantes para a indução da calogênese (Fig. 1D).

Os explantes foram inoculados em placas de Petri contendo 10 mL de meio de cultura composto por sais MS (Murashige and Skoog, 1962), (4,4 g L^{-1}), 30 g L^{-1} de sacarose, 4,44 µM de 6-benzilaminopurina (BAP) e 2 mL L^{-1} de PPM™ (Plant Preservative Mixture), solidificado com 2,8 g L^{-1} de Phytagel. O pH do meio foi ajustado para 5,8 ± 0,1 antes da autoclavagem (Fig. 1E). Para a indução de calos, foram estabelecidos dois tratamentos, ambos contendo BAP na concentração de 4,44 µM, diferindo quanto à fonte de auxina: ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) ou Picloram (ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico), ambos a 54,36 µM.Após a inoculação, as placas foram vedadas e mantidas no escuro, em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C, para avaliação da resposta calogênica (Fig. 1F).

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 4 × 2, considerando quatro cultivares de *C. arabica* (Arara, 2SL, 785 e Acauã) e dois reguladores de crescimento vegetal (RCVs), 2,4-D e Picloram, ambos associados ao BAP. Foram utilizadas 20

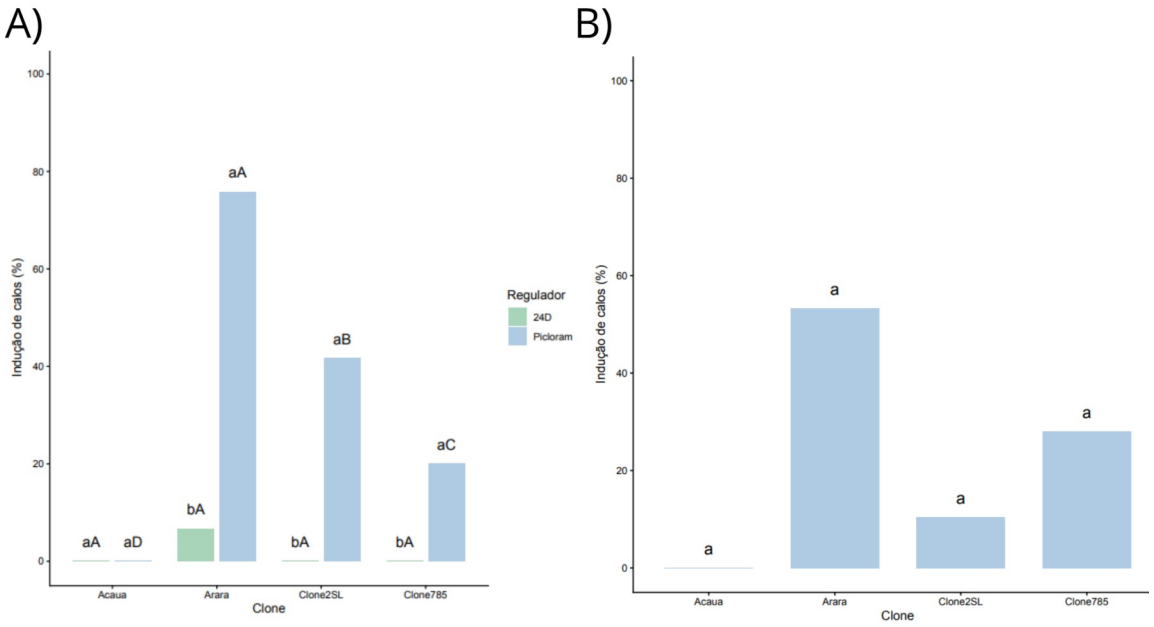
repetições por combinação cultivar × RCV, sendo cada repetição constituída por uma placa de Petri contendo cinco explantes, totalizando 160 placas e 800 explantes. A variável avaliada foi a porcentagem de indução de calos, mensurada aos 30 e 60 dias de cultivo.

Para as análises estatísticas, os pressupostos de normalidade dos erros e homogeneidade das variâncias foram verificados pelos testes de Shapiro-Wilk e Bartlett, respectivamente. Posteriormente, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, quando observadas diferenças significativas, as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. As análises foram realizadas no software RStudio (versão 2025.5.0), utilizando o pacote ExpDes.pt (versão 1.2.2).

Resultados

A indução de calos aos 30 dias de cultivo apresentou interação significativa entre cultivar e RCV ($p = 1{,}50 \times 10^{-6}$), indicando que a resposta das cultivares variou em função do RCV utilizado (Figura 2).

Figura 1 - Indução de calos em explantes foliares de diferentes clones de *Coffea arabica* L. aos 30 e 60 dias de cultivo. (A) 30 dias de cultivo; (B) 60 dias de cultivo. Acauã, Arara, 2SL e 785.

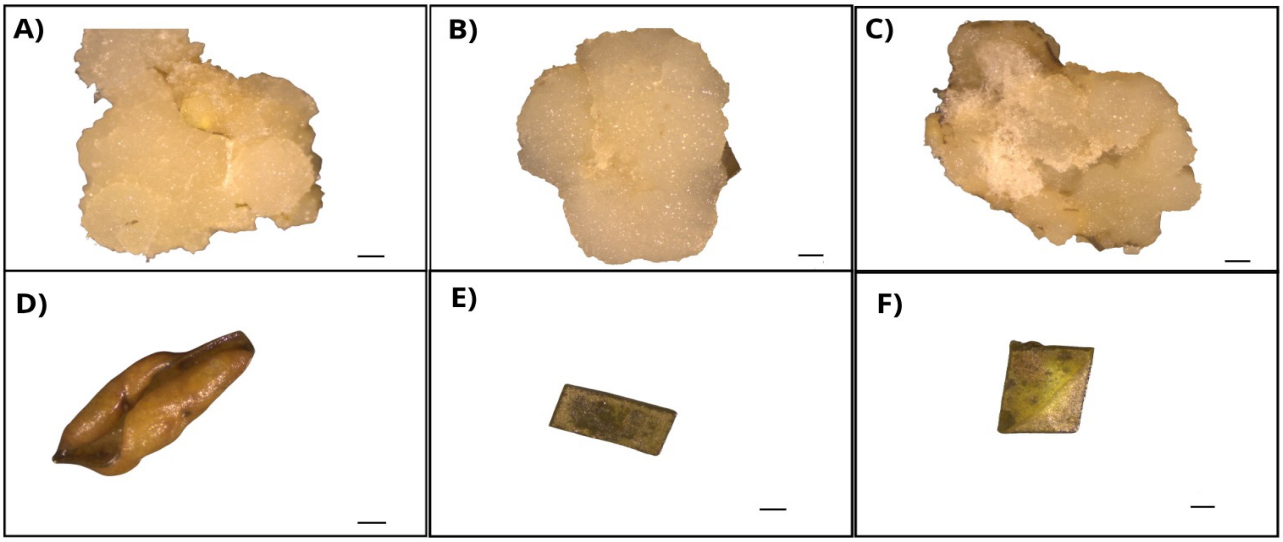


Fonte: A autora, 2026. Nota:.Médias seguidas pela mesma letra, dentro de cada nível do fator RCV, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5% de significância.

Aos 30 dias de cultivo, no tratamento com Picloram, o clone Arara apresentou a maior porcentagem de indução de calos (75,79%), sendo estatisticamente superior aos clones 2SL (41,67%) e 785 (20,00%), que diferiram entre si. O clone Acauã não apresentou formação de calos, uma vez que os explantes foram perdidos por contaminação durante o período de cultivo (Fig. 1A)

Aos 60 dias de cultivo, não houve interação significativa no fatorial duplo (p-=0,358), indicando que a cultivar e RCV influenciaram a indução de calos de forma independente cultivar (p=0,00028) e RCV (p=0,00003). A indução de calos foi estatisticamente igual entre as cultivares, apresentando cerca de 53,33% no Arara, 28% na cultivar 785, 10,40% 2SL e a cultivar Acauã 0,00% devido à contaminação dos explantes (Fig. 1B)

Figura 2. Aspecto morfológico dos explantes de *C. arabica* aos 60 dias de cultivo, submetidos à indução de calos com diferentes reguladores de crescimento. A–C: cultivares Arara, 2SL e 785, respectivamente, cultivados em meio suplementado com Picloram. D–F: cultivares Arara, 2SL e 785, respectivamente, cultivados em meio suplementado com 2,4-D. Barras = 50 mm.



Fonte: A autora, 2026.

Discussão

A contaminação é um dos principais fatores limitantes ao estabelecimento *in vitro* de explantes provenientes de plantas cultivadas em campo. Neste estudo, o uso do biocida PPM (Plant Preservative Mixture™) contribuiu para o controle da contaminação e possibilitou a sobrevivência dos explantes para a etapa de indução de calos. A eficiência do PPM no controle de microrganismos também foi relatada por Romadanova *et al*. (2022), que demonstraram sua ação sobre contaminação bacteriana endofítica em culturas *in vitro* de macieira. Em explantes de *Pyrus communis* provenientes de plantas cultivadas em campo, Grimaldi e Bastos (2023) também observaram bom controle microbiano e sobrevivência utilizando tratamentos com PPM, reforçando seu potencial como estratégia auxiliar no estabelecimento *in vitro* de material vegetal de difícil descontaminação.

Após a desinfestação, avaliou-se a capacidade dos RCVs 2,4-D e picloram em promover a indução de calos. Embora o 2,4-D seja amplamente utilizado na indução de calogênese em *C.arabica*, sua resposta pode variar conforme a combinação e a concentração dos RCVs. Ahmed *et al.,* (2013) obtiveram 96% de indução de calos em explantes foliares de híbridos de *C. arábica* utilizando 1,0 mg L^{-1} de 2,4-D associado a 2,0 mg L^{-1} de BAP. No presente estudo, entretanto, não foi observada indução de calos nos tratamentos contendo 2,4-D, indicando que sua eficiência pode estar relacionada às condições específicas de cultivo e as concentrações utilizadas. No entanto, o picloram foi o RCV que promoveu a indução de calos nas condições avaliadas, enquanto o 2,4-D não resultou em formação de calos. Esse resultado demonstra que a resposta calogênica em *C. arábica* pode variar de acordo com o RCV utilizado e com as condições de cultivo. Em um estudo com três cultivares de *C. arábica* (‘Rubi’, ‘Catuaí Vermelho 81’ e ‘IAPAR 59’), Barrueto Cid *et al*., (2004) obtiveram formação de calos em 100% dos explantes foliares cultivados em meio MS suplementado com 4 µM de picloram, sem a necessidade de adição de outro regulador de crescimento para a indução. Dessa forma, a resposta observada no presente estudo reforça o potencial do picloram para a indução de calos em *C. arabica*, embora diferenças na concentração do RCV e na composição do meio possam influenciar a resposta morfogênica.

Conclusão

Nas condições avaliadas, o 2,4-D não promoveu indução de calos, enquanto o Picloram apresentou resposta superior, evidenciando a influência do RCV e da cultivar na calogênese de *C. arabica*. A cultivar Arara apresentou o melhor desempenho sob Picloram, enquanto Acauã não pôde ser avaliada devido à contaminação total dos explantes. A eficiência do PPM no controle da contaminação na maioria dos explantes também indica seu potencial como estratégia de desinfestação para material foliar de campo. Assim, os resultados reforçam a necessidade de protocolos específicos para cada cultivar, especialmente quanto à desinfestação e à indução de calos.

Referências

Ahmed, W.; Feyissa, T.; Disasa, T. Somatic embryogenesis of a coffee (Coffea arabica L.) hybrid using leaf explants. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 88, n. 4, p. 469–475, 2013. Disponível em: https://doi.org/10.1080/14620316.2013.11512993. Acesso em: 12 set. 2026.

Alixandre, R. D. et al. Physiological quality of seeds of arabic coffee cultivars stored for a period of two years**. Brazilian Journal of Biology**, v. 84, e285879, 2024. Disponível em: https://doi.org/10.1590/1519-6984.285879. Acesso em: 18 jun. 2026.

Almeida, J. A. S. de. Da folha à obtenção de embriões somáticos de Coffea. **O Agronômico,** Campinas, v. 59, n. 1, p. 63-64, 2007.

Alves, P. Café arábica: o grão que domina o mercado premium e responde por mais de 60% da produção mudial. **Notícias Agrícolas**, 2026. Disponível em:https://www.noticiasagricolas.com.br/noticias/cafe/421829-cafe-arabica-o-grao-que-domina-o-mercado-premium-e-responde-por-mais-de-60-da-producao-mundial.html. Acesso em: 18 jun. 2026.

Avila-Victor, C. M. et al. Callus type, growth regulators, and Phytagel on indirect somatic embryogenesis of coffee (Coffea arabica L. var. Colombia). **Plants**, v. 12, p. 3570, 2023. Disponível em:
https://doi.org/10.3390/plants12203570. Acesso em: 18 jun. 2026.

Barrueto Cid, L. P.; Ramos Cruz, A. R.; Rodrigues Castro, L. H. Somatic embryogenesis from three coffee cultivars: 'Rubi', 'Catuaí Vermelho 81', and 'IAPAR 59'. **HortScience**, Alexandria, v. 39, n. 1, p. 130–131, 2004. Disponível em: https://doi.org/10.21273/HORTSCI.39.1.130. Acesso em: 12 set. 2026.

Braghini, M. T.; Fazuoli, L. C. **Armazenamento de sementes de café**. O Agronômico, Campinas, v. 59, n. 1, p. 44-45, 2007.

Brasil. Ministério da Agricultura e Pecuária. **Brasil é o maior produtor mundial e o segundo maior consumidor de café.** Brasília, DF: MAPA, 2023.

Companhia Nacional de Abastecimento (Conab). **Arábica**. Brasília, DF: Conab, 2026. Disponível em: https://www.gov.br/conab/ptbr/atuacao/informacoesagropecuarias/safras/serieshistoricas/cafe/arabica. Acesso em 18 maio 2026.

Ellis, R. H.; Hong, T. D.; Roberts, E. H. An intermediate category of seed storage behaviour? I. Coffee. **Journal of Experimental Botany,** v. 41, n. 9, p. 1167–1174, set. 1990. Disponível em: https://doi.org/10.1093/jxb/41.9.1167. Acesso em: 18 jun. 2026.

Gaj, M. D. Factors Influencing Somatic Embryogenesis Induction and Plant Regeneration with Particular Reference to Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. **Plant Growth Regulation**, v. 43, p. 27–47, 2004. Disponível em:

https://doi.org/10.1023/B:GROW.0000038275.29262.fb. Acesso em: 12 set. 2026.

Gosal, S. S.; Wani, S. H. (org.). **Biotechnologies of Crop Improvement**, Volume 1: cellular approaches. Cham: Springer International Publishing, 2018.

Grimaldi, F.; Bastos, F. E. A. Controle da contaminação *in vitro* durante o estabelecimento de explantes de *Pyrus communis* utilizando a Mistura Preservativa para Plantas™. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v. 19, 2023. Disponível em: https://doi.org/10.46526/pccm.2023.v19.185. Acesso em: 12 set. 2026.

Leifert, C.; Morris, C. E.; Waites, W. M. Ecologia de saprófitas e patógenos microbianos em plantas cultivadas *in vitro* e em campo: razões para problemas de contaminação *in vitro*. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 13, n. 2, p. 139–183, 1994. Disponível em: https://doi.org/10.1080/07352689409701912. Acesso em: 12 set. 2026.

Maciel, A. L. de R. et al. Embriogênese somática indireta em explantes foliares de *Coffea arabica* L. cv. Obatã. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, n. 1, p. 107–116, fev. 2003.

Murashige, T.; Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473–497, 1962.

Rojas-Lorz, L.; Arrieta-Espinoza, G.; Valdez-Melara, M.; Pereira, L. F. P.; Gatica-Arias, A. Influence of silver nitrate on somatic embryogenesis induction in *Arabica coffee* (Coffea arabica L.). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 62, e19180228, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1590/1678-4324-2019180228. Acesso em: 12 set. 2026.

Romadanova, N. V. et al. Effect of Plant Preservative MixtureTM on Endophytic Bacteria Eradication from In Vitro-Grown Apple Shoots. **Plants**, v. 11, n. 19, p. 2624, 2022. Disponível em: https://doi.org/10.3390/plants11192624. Acesso em: 12 set. 2026.

Santos, D. W. R. dos et al. Effects of a commercial biocide, kasugamycin and consistency of the culture medium on the in *vitro* establishment of bamboo. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 49, 2019.

Souza, A. C. de et al. Indução de calos embriogênicos em *Coffea arabica* L. cv. Catuaí Amarelo. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 9., 2015, Curitiba. **Anais** [...]. Brasília, DF: EmbrapaCafé, 2015. Disponível em: https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1041507/inducao-de-calos-embriogenicos-em-coffea-arabica-l-cv-catuai-amarelo. Acesso em: 22 jun. 2026.

Yang, J. L.; Zhao, B.; Seong, E. S. et al. Callus induction and high-efficiency plant regeneration via somatic embryogenesis in *Papaver nudicaule* L., an ornamental medicinal plant. **Plant Biotechnol Rep**, v. 4, p. 261–267, 2010. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s11816-010-0144-1. Acesso em: 12 set. 2026.

Agradecimentos

A Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo ,Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.