

INFLUÊNCIA DOS SISTEMAS DE CULTIVO *IN VITRO* NA INDUÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS EM *COFFEA ARABICA*

João Paulo de Moraes Oliveira, Aline dos Santos Bergamin, Geisiele Silva Martins, Loren Cristina Vasconcelos, Elias Terra Werner, André da Silva Xavier, Milene Miranda Praça Fontes.

Universidade Federal do Espírito Santo, Alto Universitário, S/N Guararema, 29500-000 – Alegre - ES, Brasil, joaopaulo.ueg@gmail.com, alinebergamin258@hotmail.com, geisiele.martins@edu.ufes.br, loren-vasconcelos@hotmail.com, elias.werner@ufes.br, xavierandre23@hotmail.com, mileneufes@gmail.com.

Resumo

A indução de embriões somáticos em *Coffea arabica* é desafiadora e depende das condições de cultivo *in vitro*, que afetam a quantidade e qualidade dos embriões. Sistema líquido facilita a assimilação de nutrientes e crescimento rápido das células, enquanto o semissólido oferece suporte estável e liberação gradual de nutrientes. Este estudo investigou como os sistemas de cultivo *in vitro*, líquido e semissólido, influenciam a indução de embriões somáticos em *C. arabica*. Mudanças foram adquiridas e suas folhas utilizadas como fonte de explantes. Após desinfestação, os explantes foliares foram inoculados em meio de indução e proliferação de calos friáveis, mantidos no escuro por 90 dias. Os calos friáveis foram então transferidos para o meio semissólido e líquido para indução de embriões somáticos, sendo mantidos no escuro por seis meses. O tempo influenciou a indução e proliferação dos calos friáveis, com menor indução observada aos 15 e 30 dias. Embora não tenha havido diferença significativa no número de embriões somáticos entre os sistemas, o meio líquido resultou em uma formação mais rápida das estruturas embrionárias, mas também apresentou mais anormalidades morfológicas.

Palavras-chave: Café. Cultura de Tecido Vegetal. Embriogênese somática indireta.

Área do Conhecimento: Engenharia Agrônômica.

Introdução

A indução de embriões somáticos em *Coffea arabica* ainda representa um desafio na propagação e melhoramento de cultivares de café. O sucesso dessa técnica depende amplamente das condições de cultivo *in vitro*, que podem influenciar significativamente a quantidade e a qualidade dos embriões regenerados (Oliveira *et al.*, 2023). Entre os diversos fatores que afetam a indução de embriões somáticos, os sistemas de cultivo *in vitro* se destacam como um elemento chave. Sistemas líquidos e semissólidos são frequentemente utilizados, e suas características distintas podem impactar o desenvolvimento embrionário, afetando assim a regeneração de pântulas (Oliveira *et al.*, 2021a).

Os sistemas de cultivo *in vitro* oferecem diferentes ambientes para o cultivo, propagação e indução de embriões somáticos. Os sistemas líquidos, por exemplo, permitem uma melhor assimilação dos nutrientes e crescimento mais rápido dos tecidos cultivados devido à maior disponibilidade de meios de cultura e a circulação contínua (Papanastasiou *et al.*, 2008; Savio *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2021a). Em contraste, os sistemas semissólidos oferecem um suporte físico mais estável e uma liberação gradual dos nutrientes, o que pode afetar a formação e a qualidade dos embriões somáticos (Savio *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2021a). Esses aspectos tornam importante a comparação entre os dois tipos de sistemas para otimizar os protocolos de cultivo *in vitro* para *C. arabica*.

Estudos têm mostrado que os sistemas de cultivo podem afetar a resposta morfogenética dos explantes, como a formação dos calos friáveis e a indução de embriões somáticos. A eficácia desses sistemas é influenciada pela composição do meio de cultura, concentração de reguladores de crescimento, pH, e outros fatores ambientais *in vitro* (Van Boxtel; Berthouly, 1996). A comparação das respostas e do cultivo dos calos friáveis de *C. arabica* em sistemas líquidos e semissólidos pode fornecer *insights* sobre como cada sistema contribui e influencia a indução e o desenvolvimento de embriões somáticos.

Este estudo tem como objetivo realizar uma análise comparativa dos sistemas de cultivo *in vitro*, com ênfase nas diferenças entre sistemas líquidos e semissólidos, para avaliar sua influência na indução de embriões somáticos em *C. arabica*. A compreensão das vantagens e limitações de cada sistema permitiu aprimorar os protocolos de cultivo, promovendo uma melhor eficiência na produção de embriões somáticos e, conseqüentemente, contribuindo para o avanço na propagação e melhoramento genético desta importante planta de café.

Metodologia

Mudas comerciais de *C. arabica* (variedade 785/10 vermelho) foram adquiridas, e suas folhas foram utilizadas como fonte de explantes. As folhas foram coletadas e lavadas em água corrente com detergente neutro por 20 min, seguidas de imersão em álcool 70% por 1 min. Em seguida, foram submetidas à desinfestação em solução de hipoclorito de sódio a 1,5%, por 30 min, com a adição de uma gota de Tween 20 para cada 100 mL de solução. Após esse procedimento, as folhas passaram por três lavagens sucessivas em água destilada e encaminhadas para inoculação. Explantes foliares (~1cm²) foram excisados, e cinco fragmentos foram inoculados em placa de Petri contendo meio de indução e proliferação de calos friáveis, constituído de 2,15 g L⁻¹ de 1/2MS, 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 hidrolisada, 9,06 µM de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), 4,44 µM de 6-benzilaminopurina (BAP) e 2,8 g L⁻¹ de fitagel, pH = 5,6. O meio de cultura foi esterilizado em autoclave a 121°C e 1,5 atm por 20 min e renovados mensalmente. As placas de Petri foram mantidas no escuro a uma temperatura de 25 ± 2°C por 90 dias, totalizando 50 placas de Petri. A cada 15 dias, foi avaliado o número de explantes responsivos que induziram a formação de calos friáveis. O experimento foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado com 50 repetições, levando em consideração o fator tempo. Foi aplicado o teste de normalidade de *Shapiro-Wilk*, e, confirmada a normalidade dos dados, procedeu com análise de variância e o teste de *Scott-Knott*. Além disso, foi aplicada uma análise de regressão quadrática com as médias.

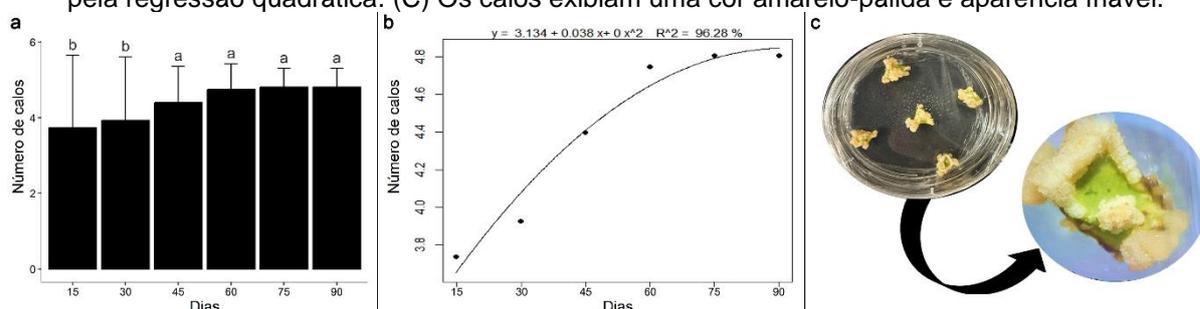
Para indução de embriões somáticos, 0,8 g de calos friáveis foram inoculados em placa de Petri em meio semissólido, constituído com 4,3 g L⁻¹ de MS, 30 g L⁻¹ de sacarose, 0,04 g L⁻¹ de L-cisteína, 0,8 g L⁻¹ de extrato de malte, 0,2 g L⁻¹ de caseína hidrolisada, 4,44 µM de BAP, 2,8 g L⁻¹ de fitagel e 2 g L⁻¹ de carvão ativado, com pH ajustado para 5,6. Paralelamente, foram utilizados frascos de Erlenmeyer de 120 mL contendo 50 mL de meio líquido, com a mesma formulação, porém sem a adição do agente gelificante, o fitagel. O meio de cultura foi esterilizado em autoclave a 121°C e 1,5 atm por 20 min e renovados mensalmente. As placas de Petri foram mantidas no escuro a uma temperatura de 25 ± 2°C por seis meses, totalizando 100 placas de Petri. Os frascos de Erlenmeyer foram agitados a 100 rpm, também no escuro, a 25 ± 2°C por seis meses, totalizando 24 frascos de Erlenmeyer. O número de embriões somáticos foi contabilizado ao final do experimento, considerando apenas os calos friáveis que induziram a formação de embriões somáticos. Esses embriões foram transferidos para o meio de regeneração de plântulas, constituído de 4,3 g L⁻¹ de MS, 10 mL L⁻¹ de vitaminas B5, 30 g L⁻¹ de sacarose, 7 g L⁻¹ de agar, e pH ajustado para 5,6, sendo inoculado um embrião por tubo de ensaio. Os tubos foram mantidos em uma sala de crescimento sob um regime claro/escuro de 16/8 h com 36 µmol m⁻² s⁻¹ de radiação luminosa fornecida por duas lâmpadas fluorescentes (20 W, Osram®), a 25 ± 2 °C. O experimento foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado. Foi aplicado o teste de normalidade de *Shapiro-Wilk*, e, confirmada a normalidade dos dados, procedeu com análise de variância e o teste de *Scott-Knott*.

Resultados

O tempo exerceu influência sobre a indução e proliferação dos calos friáveis. Os primeiros explantes responsivos com pré-formação de estruturas calogênicas foram observados com 15 dias, apresentando um número médio de 3,73 explantes responsivos. A indução e proliferação dos calos friáveis aumentaram progressivamente até 75 dias, com valores médios de 3,73 aos 15 dias, 3,92 aos 30 dias, 4,40 aos 45 dias, 4,75 aos 60 dias e 4,81 aos 75 dias, estabilizando-se posteriormente. Os tempos avaliados apresentaram diferenças estatísticas, com a menor indução e proliferação dos calos friáveis observadas aos 15 e 30 dias, em comparação com os tempos de 45, 60, 75 e 90 dias (Fig. 1a). A massa dos calos aumentou gradualmente até 90 dias no meio de indução e proliferação de calos friáveis. A análise de regressão foi significativa e destacou a importância do tempo para a indução e

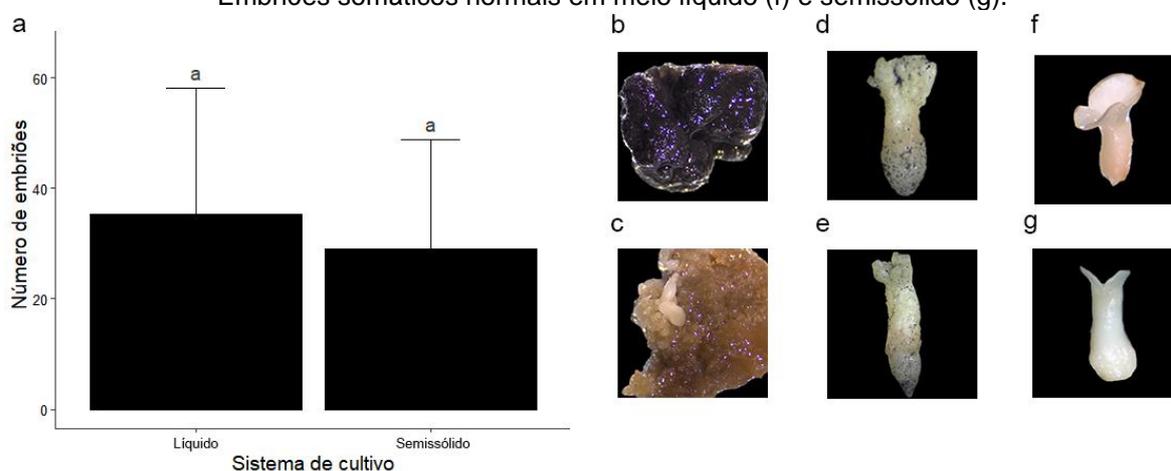
proliferação dos calos friáveis (Fig. 1b). Todos os calos apresentavam uma coloração amarelo-pálida e uma textura friável, sendo, portanto, denominados calos friáveis (Fig. 1c).

Figura 1 – Indução e proliferação de calos friáveis ao longo do tempo. (a) A indução e proliferação de calos exibiram valores distintos ao longo de 90 dias. (b) O modelo ajustado foi significativo ($p < 0,05$) pela regressão quadrática. (c) Os calos exibiam uma cor amarelo-pálida e aparência friável.



Os sistemas de cultivo não exerceram influências no número médio de embriões somáticos em *C. arábica* (Fig. 2a). No sistema de cultivo em meio líquido, foi observado um número médio de 35 embriões somáticos por calo embriogênico, enquanto no sistema de cultivo em meio semissólido o número médio foi de 29 embriões somáticos por calo embriogênico. Embora não tenha havido diferença estatística significativa, o meio líquido resultou na formação das primeiras estruturas embrionárias após 30 dias, enquanto o meio semissólido levou 40 dias para a observação das primeiras estruturas embrionárias (Fig. 3b-c). Em ambos os sistemas de cultivo, a regeneração dos embriões somáticos em *C. arábica* ocorreu de forma assíncrona, com embriões em um mesmo calo embriogênico exibindo diferentes estágios de desenvolvimento, como globulares, codiformes, torpedos e cotiledonares. Embriões somáticos cotiledonares maduros foram regenerados em ambos os sistemas de cultivos. Além disso, em ambos os sistemas de cultivo, especialmente em meio líquido, observou-se que alguns embriões somáticos regenerados de *C. arábica* apresentavam anormalidades morfológicas (Fig. 2 d-e).

Figura 2 – Indução de embriões somáticos em sistema líquido e semissólido. (a) O número médio de embriões somáticos não diferiu em relação ao sistema de cultivo. Calos embriogênicos em meio líquido (b) e semissólido (c). Embriões somáticos anormais em meio líquido (d) e semissólido (e). Embriões somáticos normais em meio líquido (f) e semissólido (g).



Discussão

O tempo de cultivo demonstrou ser um fator determinante na indução e proliferação dos calos friáveis em *C. arábica*. A observação de uma resposta calogênica já nos primeiros 15 dias e o aumento progressivo da proliferação até os 75 dias sugerem que o período de cultivo é essencial para otimizar

a produção de calos de alta qualidade. As diferenças estatísticas significativas entre os períodos avaliados reforçam a necessidade de um tempo adequado para permitir o acúmulo de massa calosa, fator essencial para a posterior regeneração de embriões somáticos. Esses resultados ressaltam a importância de períodos prolongados para otimizar a resposta calogênica em diferentes espécies de *Coffea*, pois períodos de cultivo mais curtos podem levar a uma menor proliferação de calos, comprometendo assim a eficiência da embriogênese somática indireta (Oliveira *et al.*, 2021a; Oliveira *et al.*, 2021b; Oliveira *et al.*, 2023). Além disso, a análise de regressão significativa evidencia a correlação positiva entre o tempo de cultivo e a indução de calos friáveis, evidenciando a importância do controle temporal no protocolo de cultura de tecidos para *C. arabica*. Oliveira *et al.* (2021b) e Oliveira *et al.* (2023), também evidenciaram correlação positiva do tempo de cultivo com a indução de calos friáveis em diferentes espécies de *Coffea*. A coloração amarelo-pálida e a textura friável dos calos observados indicam que as condições do meio foram adequadas para o seu desenvolvimento. Essas características são cruciais para o sucesso do estabelecimento da embriogênese somática indireta em *Coffea* (Sanglard *et al.*, 2019).

Os sistemas de cultivo em meio líquido e semissólido não diferiram significativamente para o número médio de embriões somáticos por calo embriogênico em *C. arabica*. Esse resultado corrobora com Teixeira *et al.* (2004), que também não encontraram diferença significativa na regeneração de embriões somáticos de *C. arabica* entre os dois sistemas. Em contraste, Oliveira *et al.* (2021a) observaram diferenças significativas entre os dois sistemas de cultivo para o híbrido de Timor 'CIFIC 4106', um alotriploide natural resultante do cruzamento entre *C. arabica* e *C. canephora*. Os autores relataram que o sistema de cultivo em meio líquido promoveu uma maior regeneração de embriões somáticos por calo embriogênico a curto prazo em comparação com o sistema semissólido. A formação mais rápida das estruturas embrionárias no meio líquido em comparação ao meio semissólido, conforme observado neste estudo, pode ser atribuída à maior capacidade de assimilação e à melhor acessibilidade das células cultivadas aos compostos do meio de cultura (Van Boxtel; Berthouly, 1996; Papanastasiou *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2023). No sistema líquido, as citocininas são mais eficazes porque não estão conjugadas ao agente gelificante, o que acelera a indução de embriões somáticos (Papanastasiou *et al.*, 2008).

A ocorrência de regeneração assíncrona dos embriões somáticos, com diferentes estágios de desenvolvimento coexistindo em um mesmo calo embriogênico, é um fenômeno comumente reportado na embriogênese somática de *Coffea* (Sanglard *et al.*, 2019; Oliveira *et al.*, 2021c; Oliveira *et al.*, 2023). Essa assincronia representa um desafio para a cultura de tecido vegetal em *Coffea*, especialmente para aqueles que buscam uma regeneração uniforme de embriões somáticos. As anormalidades morfológicas observadas em alguns embriões somáticos também já foram descritas em outros estudos em *Coffea*, sendo frequentemente atribuídas a variações nas condições de cultivo, como a composição do meio de cultura ou das condições ambiente *in vitro* (Oliveira *et al.*, 2021c; Oliveira *et al.*, 2023). Além disso, o potencial osmótico pode ter influenciado a formação de embriões somáticos anormais, visto que o sistema de cultivo em meio líquido, que apresentou uma maior incidência desses embriões, possui um potencial osmótico menor em comparação com o sistema semissólido. Segundo Jeannin *et al.* (1995), uma pressão osmótica abaixo de 400 mOsm kg⁻¹ H₂O está associada à organogênese, enquanto uma pressão osmótica acima desse valor está associada à embriogênese somática. As anomalias podem impactar negativamente a viabilidade e a capacidade regenerativa dos embriões somáticos, sendo um fator importante a ser considerado na otimização dos protocolos de cultura de tecidos para *C. arabica*.

Conclusão

O estudo demonstrou que o tempo exerce um impacto significativo na indução e proliferação dos calos friáveis em *C. arabica*, tendo um aumento gradual até 75 dias, estabilizando-se posteriormente. Embora não tenha exibido diferença significativa no número médio de embriões somáticos entre os sistemas de cultivo líquido e semissólido, o meio líquido promoveu uma formação mais rápida das estruturas embrionárias. Ambos os sistemas apresentaram regeneração assíncrona e alguns embriões exibiram anormalidades morfológicas, especialmente no meio líquido, indicando a necessidade de ajustes nos protocolos de cultivo para otimizar a qualidade dos embriões somáticos de *C. arabica*.

Referências

JEANNIN, G.; BRONNER, R.; HAHNE, G. Somatic embryogenesis and organogenesis induced on the immature zygotic embryo of sunflower (*Helianthus annuus* L.) cultivated in vitro: Role of the sugar. **Plant Cell Rep.** v. 15, n. , 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF00193720>. Acesso em: 13 ago. 2024.

OLIVEIRA, J.P.M.; FERREIRA, A.; CLARINDO, W.R. In vitro regeneration of stable allotriploid plantlets of the “Híbrido de Timor”(*Coffea*). **Cytologia**, v. 86, n. 3, 2021a. Disponível em: <https://doi.org/10.1508/cytologia.86.201>. Acesso em: 13 ago. 2024.

OLIVEIRA, J.P.M.; SANGLARD, N. A.; FERREIRA, A.; CLARINDO, W. R. Genomic methylated cytosine level during the dedifferentiation and cellular competence in *Coffea arabica* lines: Insights about the different in vitro responses. **Forests**, v. 12, n. 11, 2021b. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/f12111536>. Acesso em: 13 ago. 2024.

OLIVEIRA, J.P.M.; SANGLARD, N. A.; FERREIRA, A.; CLARINDO, W.R. Ploidy level, epigenetic and in vitro environment influence the indirect somatic embryogenesis of the new synthetic autoallohexaploid *Coffea*. **Plant Cell Tissue Organ Cult**, v. 146, n. 3, 2021c. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02093-4>. Acesso em: 13 ago. 2024.

OLIVEIRA, J.P.M.; SILVA, A.J.D.; CATRINCK, M.N.; CLARINDO, R.C. Embryonic abnormalities and genotoxicity induced by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid during indirect somatic embryogenesis in *Coffea*. **Sci Rep**, v. 13, n. 1, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-023-36879-7>. Acesso em: 13 ago. 2024.

PAPANASTASIOU, I.; SOUKOULI, K.; MOSCHOPOULOU, G.; KAHIA, J.; KINTZIOS, S. Effect of liquid pulses with 6-benzyladenine on the induction of somatic embryogenesis from coffee (*Coffea arabica* L.) callus cultures. **Plant Cell Tissue Organ Cult**, v. 92, n. , 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11240-007-9326-0>. Acesso em: 13 ago. 2024.

SANGLARD, N.A.; AMARAL-SILVA, P.M.; SATTTLER, M.C.; OLIVEIRA, S.C.; CESÁRIO, L.M.; FERREIRA, A.; CARVALHO, R.C.; CLARINDO, W.R. Indirect somatic embryogenesis in *Coffea* with different ploidy levels: A revisiting and updating study. **Plant Cell Tissue Organ Cult**, v. 136, n. , 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11240-018-1511-9>. Acesso em: 13 ago. 2024.

SAVIO, L.E.B., ASTARITA, L.V.; SANTARÉM, E.R. Secondary metabolism in micropropagated *Hypericum perforatum* L. grown in non-aerated liquid medium. **Plant Cell Tissue Organ Cult**, v. 108, n. , 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11240-011-0058-9>. Acesso em: 13 ago. 2024.

TEIXEIRA, J. B.; JUNQUEIRA, C. S.; PEREIRA, A.J.P.C.; MELLO, R.I.S.; SILVA, A.P.D.; MUNDIM, D.A. Multiplicação clonal de café (*Coffea arabica* L.) via embryogenesis somática. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, Brasília, 2004.

VAN BOXTEL, J.; BERTHOULY, M. High frequency somatic embryogenesis from coffee leaves. **Plant Cell Tissue Organ Cult**, v. 44, n. , 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF00045907>. Acesso em: 13 ago. 2024.

Agradecimentos

Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES), Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) e Laboratório de Citogenética e Cultura de Tecidos Vegetal - UFES/Alegre.