

GERMINAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS E RECUPERAÇÃO DE PLANTAS DE *Coffea arabica* in vitro

Autores: Warley Costa Silva, Gustavo Fernandes Mariano, João Paulo de Moraes Oliveira, Elias Terra Werner, Milene Miranda Praça Fontes

¹Universidade Federal do Espírito Santo, Alto Universitário, S/N Guararema, 29500-000 - Alegre-ES, Brasil, warley.silva@edu.ufes.br, gustavo123mariano@hotmail.com, joaopaulo.ueg@gmail.com, elias.werner@ufes.br, milene.fontes@ufes.br.

Resumo

O gênero *Coffea* possui grande relevância econômica, sendo a embriogênese somática (E.S.) uma técnica promissora para a propagação vegetativa, produção de mudas e melhoramento genético com alta fidelidade genética. Este trabalho teve como objetivo avaliar a germinação de embriões somáticos de *Coffea arabica* em meios de cultura com diferentes concentrações de sacarose, reguladores de crescimento vegetal e agentes gelificantes. Os resultados indicaram que as combinações com menores concentrações de sacarose e gelrite proporcionaram os melhores resultados em termos de desenvolvimento e normalidade das plantas, enquanto concentrações mais elevadas de agente gelificante reduziram a eficiência do processo. Ademais novos estudos podem ser realizados afim de aprimorar o processo de germinação e desenvolvimento de plantas completas, com desenvolvimento normal dos indivíduos, a partir de embriões somáticos de *Coffea arabica*.

Palavras-chave: Rubiaceae, Cultura de Tecidos Vegetais, Embriogênese somática, Café arábica, Solidificantes.

Área do Conhecimento: Ciências Agrárias / Agronomia.

Introdução

A família Rubiaceae se caracteriza por plantas lenhosas, de pequeno, médio e grande porte, arbustivas ou arbóreas, com ampla distribuição pelo globo (CHIQUIERI *et al.*, 2004), apresenta cerca de 650 gêneros, com aproximadamente 13.000 espécies, sendo a quarta maior família das Angiospermas (ROBBRECHT *et al.*, 2012). No Brasil encontram-se 1.010 espécies, distribuídas em 100 gêneros, com ocorrência predominante na Floresta Ombrófila Densa (FERREIRA, 2013). O gênero *Coffea* inclui cerca de 124 espécies, sendo conhecido pela presença de espécies de importância econômica, como o *Coffea arabica* e o *Coffea canephora*, que são os principais responsáveis pelo abastecimento mundial de café (CASTILLO *et al.*, 2020).

No biênio de 2023/24 a produção mundial de café foi estimada em 178 milhões de sacas, sendo 102 milhões de café arábica, mesmo com produtividade do cultivo afetada negativamente pelas condições climáticas desse período (ICO, 2024). No Brasil, foram produzidas 54.215 milhões de sacas de café, sendo dessas 39.598 milhões de café arábica (CONAB, 2024).

O cultivo dessa espécie é dependente de condições edafoclimáticas ideais, com temperaturas entre 18 e 23°C (PEREIRA; MOREIRA, 2021), além disso, a qualidade das sementes deve ser considerada, quanto a características genéticas, físicas e fisiológicas, como a viabilidade germinativa sob diferentes condições, desenvolvimento de plantas saudáveis, rápido desenvolvimento e produção de frutos, e qualidade de bebida (RIBEIRO *et al.*, 2024).

Afim de garantir a qualidade e a produtividade do cultivo é preciso escolher o cultivar adequado a ser produzido, para isso, pesquisas de melhoramento genético por todo mundo buscam desenvolver cultivares resistentes as condições climáticas, com alta produtividade e qualidade da bebida, tais pesquisas se baseiam processos reprodutivos e na seleção de plantas matrizes consideradas ideais, a partir desses indivíduos se iniciam o processo de propagação do material. Para isso técnicas de propagação vegetativa se mostram favoráveis por permitir a propagação do material com fidelidade genética, garantindo que as combinações dos genótipos selecionados sejam mantidos, sem recombinações geradas pela reprodução sexuada (ANDRADE *et al.*, 2023).

Como mecanismo de propagação vegetativa a ser empregado na produção de mudas para o cultivo, a Cultura de Tecidos Vegetal (CVT) se apresenta como uma possibilidade. A CTV se caracteriza por

técnicas de propagação e/ou conservação vegetal *in vitro*, que permitem a propagação de material vegetal com alta fidelidade genética e controle sobre a sanidade do material propagado, independente de variações sazonais e climáticas, além de tempo e espaço reduzidos (GEORGE, 2008). Dentre as diferentes técnicas da CTV, a Embriogênese Somática (E.S.) é conhecidamente empregada no cultivo de café, tal técnica consiste em uma reprodução vegetativa a partir de calos gerados de material somático, que, sob condições específicas de concentrações de reguladores de crescimento vegetal, desenvolvem estruturas celulares que se assemelham aos embriões zigóticos, sem que ocorra troca de gametas, tais estruturas são chamadas de embriões somáticos (SOUZA *et al.*, 2015). Possui aplicações como formação de bancos de germoplasma, transformação genética, estudo de desenvolvimento embrionário, e propagação vegetativa de embriões em grande quantidade (VON ARNOLD *et al.*, 2002), dos quais é possível o desenvolvimento de plantas completas sob condições adequadas de regeneração do material vegetal.

Estudos desenvolvidos para a E.S., buscam encontrar protocolos eficientes para o processo de propagação, que desenvolvam plantas viáveis ao cultivo. Sendo a área de estudos recente, é necessário aprimorar as técnicas adotadas nas diferentes etapas do processo, o presente trabalho explora a etapa da recuperação/conversão dos embriões somáticos, afim de determinar as melhores concentrações de preparo de meios de cultivo para o desenvolvimento de plantas completas e saudáveis a partir dos mesmos.

Metodologia

Para indução de calos, folhas de *Coffea arabica* previamente estabelecidas *in vitro* foram utilizadas como explantes vegetais, sendo segmentadas em tamanho de aproximadamente 1cm² e submetidas a inoculação em meio MS (Murashige; Skoog, 1962) suplementado com 30 g/l de sacarose, 0,1 g/l de caseína, 0,08 g/l de cisteína, 0,4 g/l de extrato de malte, 1 mg/l de BAP e 2 mg/l de 2,4-D, pH de 5,7±1, solidificados com 2,8 g/l de fitigel e mantidos no escuro em sala de crescimento a temperatura de 25±1 °C, por 60 dias até a formação de calos.

Após esse período, para regeneração do embrião somático, o material foi transferido para um novo meio de cultivo MS, suplementado com 30 g/l de sacarose, 0,2 g/l de caseína, 0,04 g/l de cisteína, 0,8 g/l de extrato de malte, 2 g/l de carvão ativado e 1 mg/l de BAP, pH de 5,7±1, solidificados com 2,8 g/l de fitigel e mantidos no escuro, em sala de crescimento a temperatura de 25±1 °C, por 90 dias até o surgimento de calos embrionários e início do surgimento de embriões somáticos. Após o surgimento de calos embrionários, o material foi transferido para meio MS líquido, nas mesmas concentrações do anterior, e mantidos sob agitação orbital a 120 rpm, no escuro, em sala de crescimento a temperatura de 25±1 °C, até o surgimento de embriões somáticos.

Após o desenvolvimento dos embriões somáticos no estágio cotiledonar, eles foram isolados e transferidos para meios de cultivo MS (4,43 g/l) com adição de carvão ativado (2 g/l). Foram testados diferentes tratamentos, variando as concentrações de sacarose, reguladores de crescimento vegetal e agentes gelificantes, com o objetivo de identificar as condições mais adequadas para a germinação e recuperação da planta (Tabela 1). O pH de todos os tratamentos foi ajustado a 5,7±1 e os frascos, contendo 60 ml de meio, mantidos em sala de crescimento sob fotoperíodo claro/escuro de 16/8 h com 80 µmol m⁻² s⁻¹ de radiação luminosa fornecida por duas lâmpadas fluorescentes (20 W, Osram®), a 25 ± 2 °C, por 60 dias.

Tabela 1: Concentrações de reagentes, reguladores de crescimento vegetal e solidificantes nos meios de cultura.

	Sacarose	Cinetina	BAP	fitigel	Gelrite
T1	30 g/l	-	-	2,8 g/l	-
T2	3 g/l	0,1 mg/l	0,2 mg/l	-	3 g/l
T3	3 g/l	0,1 mg/l	0,2 mg/l	-	9 g/l
T4	6 g/l	0,1 mg/l	0,2 mg/l	-	12 g/l

Fonte: Os autores, 2025.

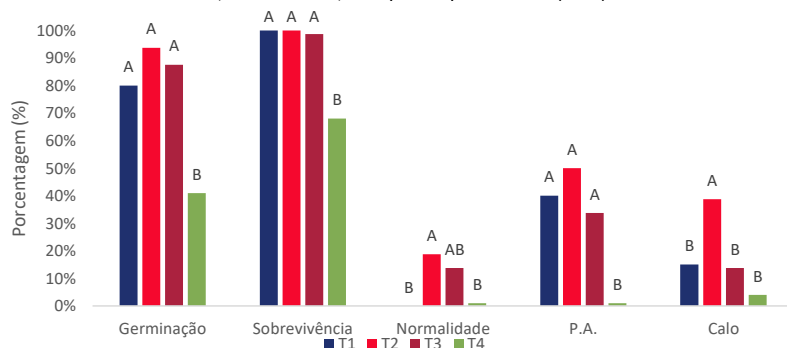
Passado o período de germinação dos embriões somáticos e recuperação das plantas, o material foi avaliado quanto a porcentagem de germinação, sobrevivência, desenvolvimento normal das plantas

(indivíduos se desenvolvendo com parte aérea e raiz), desenvolvimento de parte aérea (sem raízes), e presença de calos. As plantas recuperadas com desenvolvimento normal foram subcultivadas em meio MS, acrescido de 30 g/l de sacarose, 1 mg/l de GA3, pH de 5,7±1 e solidificados com 2,8 g/l de fitagel, e mantidos em sala de crescimento sob fotoperíodo claro/escuro de 16/8 h com 80 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de radiação luminosa fornecida por duas fitas de led de cor rosa, a 25 ± 2 °C.

Resultados

Os resultados obtidos em relação as porcentagens de germinação dos embriões somáticos, não apresentou diferença estatística entre os três primeiros tratamentos, sendo o maior em valor T2, com 93% dos ES germinados, e com T4, sendo o menor valor encontrado, com apenas 41% de sucesso na germinação. Considerando as taxas de sobrevivência dos ES após o tempo de desenvolvimento, T1, T2 e T3 apresentaram 100% de sobrevivência, se diferenciando apenas de T4, que apresentou 68% de sobrevivência, sendo estatisticamente inferior (Figura 1).

Figura 1: Gráfico de porcentagem comparativa entre os tratamentos testado para a recuperação/conversão de Embriões Somáticos, quanto a porcentagem de germinação, sobrevivência, normalidade, indução de parte aérea (P.A.) e de calos.



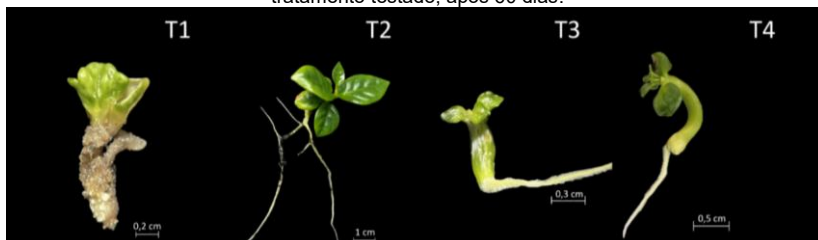
*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si dentro de cada variável de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: Os autores, 2025.

Quanto ao aspecto de desenvolvimento de parte aérea (sem raízes), e por fim, o desenvolvimento de calos nos indivíduos. Quanto ao desenvolvimento normal da planta (indivíduos se desenvolvendo com parte aérea e raiz), foram observadas taxas relativamente baixas em todos os tratamentos, sendo T2 com 18,75%, seguido por T3, com 13,75%, sem diferença estatística. Considerando o desenvolvimento apenas da parte aérea (sem raízes), T1, T2 e T3 não apresentaram diferenças estatísticas, sendo T2 o de maior valor, com 50% dos indivíduos apresentando apenas parte aérea. Por fim, em relação ao surgimento de calos nos embriões somáticos, observa-se que T2 também foi o tratamento em que houve maior porcentagem, com 38,75% dos embriões somáticos neste tratamento desenvolvendo calos, superior estatisticamente aos demais (Figura 1).

Observando a aparência dos indivíduos e as estruturas presentes nos mesmos após passados os 60 dias de inoculação em meio de cultivo, com os devidos tratamentos para germinação dos embriões somáticos foi possível observar diferenças. Na Figura 2 estão representados ES germinados representativos de cada tratamento, em T1 está representado um indivíduo que apresentou apenas parte aérea, e a formação de calos, em T2 um exemplar de planta com desenvolvimento normal, com raízes e parte aérea bem desenvolvidas, em T3 e T4 estão representadas indivíduos que apresentaram parte aérea e raízes, porém com desenvolvimento tardio e anormal dos mesmos.

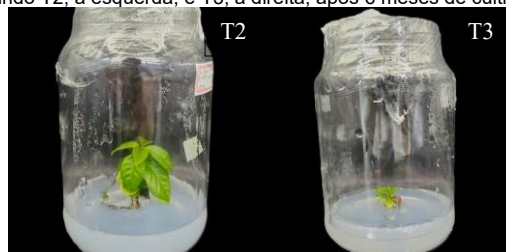
Figura 2: Plântulas de *Coffea arabica* germinadas a partir de embriões somáticos, segundo cada tratamento testado, após 60 dias.



Fonte: Os autores, 2025.

Considerando os aspectos analisados é possível determinar que os embriões submetidos ao T2 apresentaram a melhor germinação, com maior incidência de plantas recuperadas com desenvolvimento normal (parte aérea e raiz), observável em comparação com T3, após 6 meses de cultivo (Figura 3).

Figura 3: Plantas de *Coffea arabica* recuperadas/convertidas a partir de embriões somáticos, segundo T2, a esquerda, e T3, a direita, após 6 meses de cultivo.



Fonte: Os autores, 2025.

Discussão

Para a regeneração de embriões somáticos foram utilizadas diferentes concentrações de sacarose, reguladores de crescimento, e solidificantes, além do uso de solução MS, como fonte de micro e macronutrientes, e carvão ativado, como adsorvente antioxidante e retardador da absorção das substâncias dos meios de cultivo.

Para o tratamento T1, foram empregadas concentrações de reagentes como controle, utilizando valores padrões da cultura de tecidos vegetais e da embriogênese somática, sem acréscimo de reguladores de crescimento vegetal, e com carvão ativado como agente responsável por retardar a absorção dos componentes do meio, e adsorver o excesso de regulador de crescimento vegetal, principalmente a auxina, remanescente nos embriões somáticos, e assim permitir estímulo e resposta aos demais fitormônios endógenos. Tais testes garantiram resultados favoráveis para sobrevivência e desenvolvimento dos indivíduos, em especial em parte aérea, porém insatisfatório em relação a normalidade da planta e baixo surgimento de calos.

Nos demais tratamentos foram utilizadas baixas concentrações de reguladores de crescimento vegetal, afim de estimular e ativar a atividade dos mesmos nos embriões, além disso foram empregadas diferentes concentrações de sacarose e gelificantes, com a utilização do gelrite. Os valores de sacarose inferiores aos de T1 tiveram como objetivo fornecer o mínimo de fonte energética ao material para sua sobrevivência, e estimular o desenvolvimento do maquinário fotossintético funcional como fonte principal de energia (CUENCA; VIEITEZ, 2000). Essa alteração nas concentrações se mostrou favorável, considerando os aspectos de desenvolvimento dos embriões, isso se deve ao fato de que,

com as baixas disponibilidades de fontes energéticas no meio de cultura, a planta é estimulada ao desenvolvimento adequado dos seus órgãos de forma a ser apta a produzir sua própria fonte de energia, corroborando com os resultados obtidos por Garcia *et al.* (2002) com embriões zigóticos isolados, que observou que a concentração de sacarose não afetaram a germinação dos indivíduos, mas afetaram seu desenvolvimento negativamente em altas concentrações.

Em relação a variação de proporção de sacarose utilizada nos tratamentos de concentrações inferiores ao tradicional da CTV, tal escolha aparentou causar pouca alteração dos resultados uma vez que os meios com variação da proporção apresentaram resultados próximos entre si nos testes, com diferença negativa observável apenas em relação a normalidade dos indivíduos e surgimento de calos, porém outros fatores podem estar relacionados as alterações nestas variáveis.

A concentração e o tipo de agente gelificante utilizado são essenciais para o desenvolvimento vegetal *in vitro*, uma vez que influenciam nas características de difusão, como a absorção de água, nutrientes e trocas de íons, que afetam no crescimento, resposta e desenvolvimento dos materiais vegetais (DAS *et al.*, 2015). Os tratamentos T2, T3 e T4 foram submetidos a diferentes concentrações de gelrite, sendo T2 o valor tradicional de uso recomendado pelo fabricante, e os demais valores superiores, tais escolhas teve como objetivo reduzir o potencial osmótico e aumentar o potencial hídrico, diminuindo a velocidade de absorção da água e dos solutos do meio pelos embriões, limitando a disponibilidade dos nutrientes e fontes de energia, estimulando o desenvolvimento do metabolismo autotrófico, além disso, podem afetar a sensibilidade do material a citocinina (BOUAAZA *et al.*, 2024).

As diferentes concentrações de gelificantes empregados nos tratamentos foram um dos fatores responsáveis pela variação dos resultados obtidos, observa-se que sob as menores concentrações de gelrite, associado a menor concentração de sacarose (T2), foi possível obter melhores resultados, para todas as variáveis observadas, enquanto a maior concentração de gelrite apresentou os resultados menos satisfatórios. Altas concentrações de gelrite afetaram negativamente o desenvolvimento dos embriões, por influências na absorção dos componentes do meio de cultura, considerando seu baixo potencial osmótico e alto potencial hídrico, os embriões somáticos fizeram a absorção dos nutrientes, reguladores e carbono de forma lenta, podendo até mesmo perder água para o meio, assim, apresentando pouco desenvolvimento, ou até mesmo de forma errática, enquanto nas concentrações ideais (T2) foi observado o contrário (BOUAAZA *et al.*, 2024).

Conclusão

Através dos tratamentos propostos, foi possível avaliar a resposta de germinação dos embriões somáticos e recuperação de plantas de *Coffea arabica* sob diferentes concentrações de sacarose, reguladores de crescimento vegetal e agentes gelificantes. Nos tratamentos que incluíram variações de sacarose e gelrite, observou-se que baixas concentrações de solidificante, associadas à menor disponibilidade de sacarose, proporcionaram melhores resultados em termos de normalidade das plantas e desenvolvimento equilibrado, observado em T2, enquanto concentrações mais elevadas de gelrite resultaram em desempenho inferior. Portanto, é possível determinar que para a germinação de embriões somáticos, a menor concentração de gelrite, associada a baixas concentrações de sacarose e a presença de reguladores de crescimento vegetal, oferecem as melhores condições, porém, novos estudos podem ser realizados afim de aprimorar o processo para a recuperação de plantas completas com desenvolvimento normal mais eficiente a partir de embriões somáticos de *Coffea arabica*.

Referências

ANDRADE, F. H. A. DE *et al.* IBA and melatonin increase trigonelline and caffeine during the induction and initiation of adventitious roots in *Coffea arabica* L. cuttings. **Scientific reports**, v. 13, n. 1, 13 set. 2023.

BOUAAZA, G. *et al.* Effect of Gelling Agent and Plant Growth Regulators on *In Vitro* Shooting and Rooting of *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Advances in Agriculture**, v. 2024, n. 1, 1 jan. 2024.

CASTILLO, J. L. S. *et al.* Genetic diversity of coffee (*Coffea* spp.) in Mexico evaluated by using DArTseq and SNP markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 67, n. 7, p. 1795–1806, 25 abr. 2020.

A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

CHIQUEIRI, A.; DI MAIO, F. R.; PEIXOTO, A. L. A distribuição geográfica da família Rubiaceae Juss. na Flora Brasileira de Martius. **Rodriguesia**, Rio de Janeiro, v. 55, n. 84, p. 47-57, 2004.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. **2º Levantamento de Café - Safra 2025**. Disponível em: <<https://www.gov.br/conab/pt-br/atuacao/informacoes-agropecuarias/safras/safra-de-cafe/2o-levantamento-de-cafe-safra-2025/2o-levantamento-de-cafe-safra-2025>>.

CUENCA, B.; VIEITEZ, A. M. Influence of carbon source on shoot multiplication and adventitious bud regeneration in in vitro beech cultures. **Plant Growth Regulation**, v. 32, n. 1, p. 1–12, 2000.

DAS, N. *et al.* Progress in the development of gelling agents for improved culturability of microorganisms. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. 698, 23 jul. 2015.

FERREIRA, B. G. A. ESTAQUIA DE *Psychotria nuda* (Cham. & Schltdl.) Wawra: INFLUÊNCIA DO AMBIENTE DE COLETA, FENOFASES, NUTRIÇÃO MINERAL E FATOR GENÉTICO. **Ufpr.br**, 2013.

GARCÍA, J. L. *et al.* Influence of carbon source and concentration on the in vitro development of olive zygotic embryos and explants raised from them. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 69, n. 1, p. 95–100, 2002.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G.-J. D. Plant Tissue Culture Procedure - Background. **Plant Propagation by Tissue Culture**, v. 3, p. 1–28, 2008.

INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION - ICO. **World Coffee Statistics Database | International Coffee Organization**. Disponível em: <<https://ico.org/what-we-do/world-coffee-statistics-database/>>, 2024.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco culture. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473–497, 1962.

PEREIRA, L. L.; MOREIRA, T. R. **Quality Determinants In Coffee Production**. Cham: Springer International Publishing, 2021.

RIBEIRO, T. L. *et al.* The expression of 1-Cys-PRX reflects changes in *Coffea arabica* seed quality during storage. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v. 36, n. 4, p. 691–700, 25 jun. 2024.

ROBBRECHT, E.; DE BLOCK, P.; DEGREEF, J.; STOFFELEN, P. Monographic and systematic studies in Rubiaceae. National Botanic Garden of Belgium, 2012.

SOUZA, A. D. *et al.* **INDUÇÃO DE CALOS EMBRIOGÊNICOS EM *Coffea arabica* L. CV. CATUAÍ AMARELO** 1. [s.l.: s.n.] 2015. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1041507/1/Inducaodecalos.pdf>>. Acesso em: 11 ago. 2025.

VON ARNOLD, S. *et al.* Developmental pathways of somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 69: 233-249. 2002.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES).

Comentado [A1]: DATA