

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL**

**LUCIMARA RIBEIRO VENIAL**

**DUPLICAÇÃO DO CONJUNTO CROMOSSÔMICO EM *Coffea canephora*  
Pierre ex A. Froehner E *Coffea arabica* L.**

**ALEGRE - ES**

**2019**

LUCIMARA RIBEIRO VENIAL

**DUPLICAÇÃO DO CONJUNTO CROMOSSÔMICO EM *Coffea canephora***

**Pierre ex A. Froehner E *Coffea arabica* L.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para obtenção do título de Mestra em Produção Vegetal, na linha de pesquisa em Biotecnologia e Ecofisiologia do Desenvolvimento de Plantas.

Mestranda: Lucimara Ribeiro Venial

Orientador: Prof. D.Sc. Wellington Ronildo Clarindo

ALEGRE-ES

2019

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

---

R484d Ribeiro Venial, Lucimara, 1992-  
Duplicação do conjunto cromossômico em Coffea canephora Pierre ex A. Froehner E Coffea arabica L. / Lucimara Ribeiro Venial. - 2019.  
37 f. : il.

Orientador: Wellington Ronildo Clarindo.  
Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias.

1. café. 2. poliploidização. 3. cultura de tecidos vegetais. 4. citogenética. I. Ronildo Clarindo, Wellington. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. III. Título.

CDU: 63

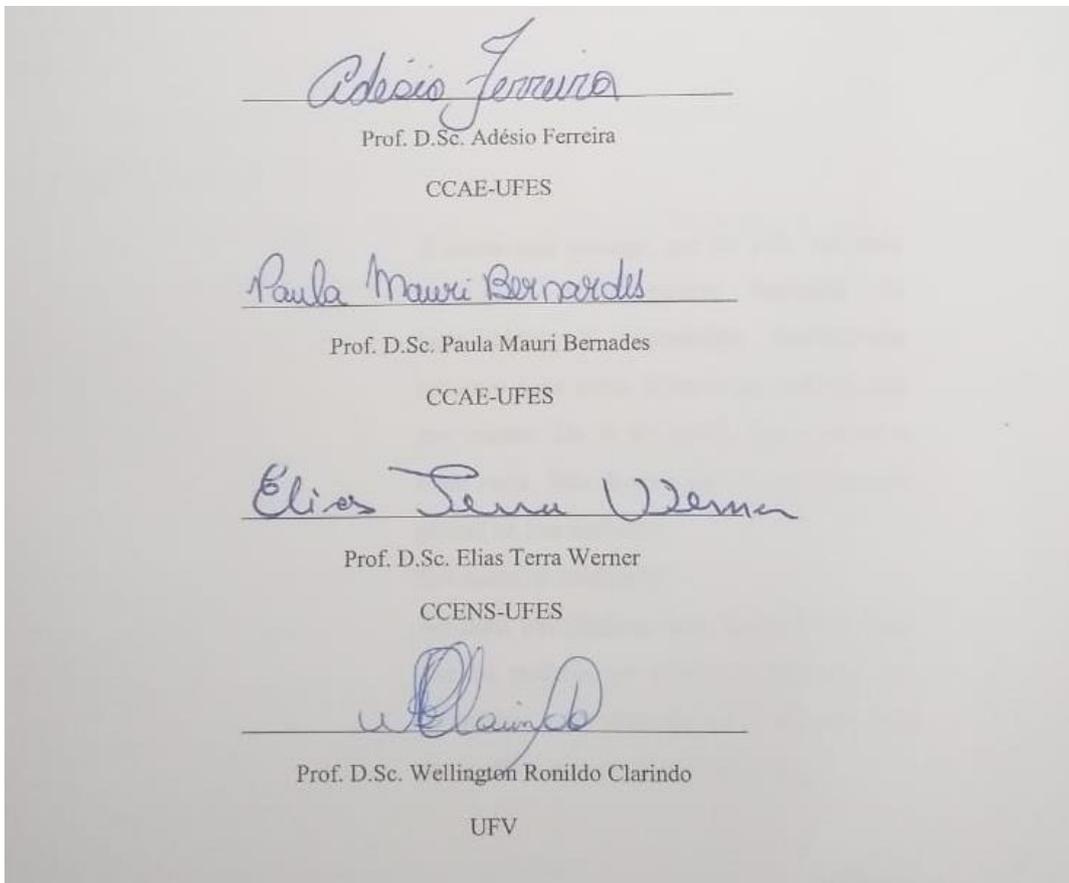
**LUCIMARA RIBEIRO VENIAL**

**DUPLICAÇÃO DO CONJUNTO CROMOSSÔMICO EM *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner  
E *Coffea arabica* L.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Produção Vegetal, na linha de pesquisa em Biotecnologia e Ecofisiologia do Desenvolvimento de Plantas.

Aprovada em 26 de fevereiro de 2019.

Banca examinadora:



À minha mãe Solange, por ter sido um anjo em vida. Uma pessoa banhada de benevolência e compaixão, mostrou-me somente suas cores belas e me cobriu com seu manto. De ti só recebi amor, amor e mais nada. Não houve um só dia que não pensei na sua ausência.

E, a todas as mulheres;

Ao meu pai Djalma, que sempre me disse que eu poderia ser quem eu quisesse, me incentivou a ser dona de mim. Me deu asas, me ensinou a voar, apoia meu voo.

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal do Espírito Santo (CCAUE-UFES) e ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, pela oportunidade de realização do curso;

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001. A Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) pelo auxílio financeiro e apoio à pesquisa;

Ao professor Dr. Wellington Ronildo Clarindo, pela orientação, ensinamentos, conselhos e sugestões, pelo apoio e compreensão nos momentos difíceis e principalmente pela amizade.

À banca examinadora, que prontamente aceitaram o convite para participarem e pela contribuição na melhoria deste trabalho;

Aos meus pais Solange e Djalma meu singelo obrigada por todo o esforço empunhado em um cabo de uma enxada para que eu pudesse estudar. Se todo mundo tivesse a criação que me foi concedida, o amor que me foi dado, que mundo bom seria!

Aos meus irmãos queridos Andréia, Júnior e Adriano, em especial à minha cunhada Leidiane. Vocês que sempre cultivaram meu sonho, nosso sonho!

Ao Tio Zé e Tio Tião (in memoriam), por terem me amado como filha e a eles, eu amado como pais, não há palavras que expressem minha gratidão. Minha querida Tia Nelice por cumprir seu papel de mãe na qual Dona Solange a encarregou;

A meus amados sobrinhos: Gabriel, Luiz Henrique, Sofia, Cristal e Miguel por serem a alegria da minha vida e me ensinarem o amor mais puro desse mundo;

À minha incrível amiga Fernanda, por todo amor incondicional que dedicou a mim em momentos muitos difíceis, por ser meu porto;

À minha extraordinária Ariane por todos os momentos vividos juntas, por ser minha inspiração. Ao Paulo pela imensa ajuda na construção desse trabalho e nas alegrias da vida. A Mariana por toda a ajuda, sempre atenciosa e gentil;

A Paula por ser minha amiga mesmo conhecendo todas as minhas peculiaridades, por me levar para dentro de sua família e me deixar fazer abrigo;

A Manoel pela alegria em tempos nebulosos, não sei como teria sido o inverno sem você!

A Patricia que sempre me escutou, me aconselhou e me amou; A Kamilla pela amizade nos tempos sombrios, me amou quando não havia nada em mim, me apoiou, me levantou;

À minha genuína Yumi pela amizade quando muita gente havia partido, me estendeu a mão, me deu abrigo, se fez abrigo, curou minha alma. Nos tempos difíceis esteve comigo, não há palavras para escrever meu sentimento de gratidão por seu amor ter me acolhido;

Aos amigos Eloá, Nohora, Iago, Caio e Rafael pela amizade, pelo apoio em momentos tenebrosos. Aos companheiros de LAB por tornar o ambiente incrível para a realização da pesquisa, em especial a Stefanie e Natália;

Ao governo PT pela oportunidade porque antes nem isso a gente tinha, pelo investimento em políticas públicas, pela criação e inclusão da minha classe social nas universidades. Pela expansão do Bolsa família e concessão do benefício à minha mãe durante os tempos de baixos recursos na família. Pela criação dos programas de permanência estudantil na qual fui agraciada a graduação toda. Por mudar o meu destino e da minha família. Alerta, desperta. Ainda cabe sonhar! #LULALIVRE!

A Deus e Nossa Senhora por me amparar em momentos de total descrença.

**Meus sinceros agradecimentos!**

## **BIOGRAFIA**

Lucimara Ribeiro Venial, filha de Solange Pinto Ribeiro e Djalma Venial, nasceu em 13 de janeiro de 1992, em Apiacá, estado do Espírito Santo. Coursou o ensino fundamental, na Escola de Ensino Fundamental Bonsucesso. Coursou o ensino médio no Colégio Idelfonso Bastos Borges- UFF, na cidade de Bom Jesus do Itabapoana, estado do Rio de Janeiro. Em abril de 2010, ingressou no curso de graduação em Agronomia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCA-UFES) na cidade de Alegre. Durante a graduação, trabalhou como bolsista de monitoria de Fitopatologia em 2013. De 2014 a 2016 participou do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica/PIBIC, na área de tecnologia de sementes e propagação de plantas. Em agosto de 2016, recebeu o título de Engenheira Agrônoma (CCAUE-UFES), e ingressou em julho do mesmo ano no Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal do CCAUE-UFES, onde iniciou o curso de Mestrado em Produção Vegetal na Linha de Pesquisa em Biotecnologia e Ecofisiologia do Desenvolvimento de Plantas, com obtenção do título de Mestra em Produção Vegetal em 26 de fevereiro de 2019.

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| INTRODUÇÃO.....   | 13 |
| MATERIAL E MÉTODOS.....   | 16 |
| Material vegetal .....  | 16 |
| Duplicação do conjunto cromossômico e regeneração de plântulas..... | 19 |
| Nível de ploidia de DNA das plântulas regeneradas .....             | 21 |
| RESULTADOS .....  | 21 |
| Duplicação do conjunto cromossômico e regeneração de plântulas..... | 22 |
| Avaliação do nível de ploidia de DNA .....                          | 23 |
| DISCUSSÃO .....   | 27 |
| CONCLUSÃO.....  | 31 |
| REFERÊNCIAS .....   | 32 |

## RESUMO

VENIAL, L. R. Universidade Federal do Espírito Santo, Dezembro – 2019.  
**DUPLICAÇÃO DO CONJUNTO CROMOSSÔMICO EM *Coffea canephora* E *Coffea arabica*.** Orientador: Prof. D.Sc. Wellington Ronildo Clarindo.

A poliploidia refere-se à ocorrência de mais de dois conjuntos cromossômicos por núcleo. A poliploidização sintética pode ser conduzida *in vitro*, em condições físicas e químicas controladas. As diferentes estratégias de poliploidização podem promover alterações genômicas e, conseqüentemente, os novos indivíduos podem exibir diferentes fenótipos acerca dos aspectos fisiológicos, morfológicos e reprodutivos quando comparados aos seus progenitores. Entretanto, alguns gargalos têm sido ressaltados por diferentes autores, tais como a alta taxa de mortalidade dos explantes, baixa taxa de regeneração de plântulas e grande número de mixoploides. Nesse contexto, as suspensões de agregados celulares (SAC), obtidas nas etapas iniciais da embriogênese somática indireta (ESI), representam um material vegetal promissor para duplicação do conjunto cromossômico (DCC) *in vitro* em virtude da elevada taxa de proliferação das células. Além disso, as SAC são matidas em agitação orbital constante, permitindo que mais células tenham contato direto com os compostos empregados para DCC diferente do que ocorre no sistema semissólido. Nesse trabalho, foi objetivado regenerar plântulas autotetraploides e autoalo-octaploides de *Coffea canephora* e *Coffea arabica*, respectivamente, a partir de um novo procedimento *in vitro* de DCC para *Coffea*. Explorando a ESI, as SACs foram tratadas com solução de colchicina 0,0 (controle), 0,5, 1,5 ou 2,5 mM em meio de cultura líquido sob agitação orbital constante por 48, 72 ou 96 h. Inoculadas em meio semissólido, as SAC passaram a ser denominadas de massa celular (MC), as quais mostraram respostas morfogênicas distintas entre as espécies de *Coffea*, tempo de tratamento e concentração de colchicina. Embriões somáticos cotiledonares maduros foram regenerados a partir de massas celulares tratadas com 2,5 mM/48 h e 2,5 mM/72 h para *C. canephora* e com 0,5 mM/48 h para *C. arabica*. Avaliando o nível de ploidia de DNA, 36 (34,9%) plântulas de *C. canephora* foram classificadas como autotetraploides ( $2n = 4x = 44$ ) e 61 (21,1%) de *C. arabica* como autoalo-octaploides ( $2n = 8x = 88$ ). O procedimento de DCC, explorando as SAC e a ESI, promoveu a duplicação de todo o genoma e resultou em um número relativamente alto de poliploides estáveis das duas espécies de *Coffea*. Portanto, considerando os resultados obtidos, a metodologia adotada para DCC *in vitro* é reprodutível para indução, regeneração e propagação *in vitro* de poliploides para *Coffea*, podendo ser adaptada para outras espécies arbustivas e lenhosas. Tendo em vista a novidade e a importância desse procedimento para gerar novos germoplasmas, foram mostradas a base e as etapas do procedimento DCC.

**Palavras-chave:** café, poliploidização, cultura de tecidos vegetais, citogenética.

## ABSTRACT

VENIAL, L. R. Universidade Federal do Espírito Santo, February – 2019  
**CHROMOSOME DOUBLING IN *Coffea canephora* AND *Coffea arabica*.** Advisor:  
Prof. D.Sc. Wellington Ronildo Clarindo.

Polyploidy refers to the occurrence of more than two chromosomal sets per nucleus. Synthetic polyploidization may be conducted in vitro under controlled physical and chemical conditions. Different polyploidization strategies may promote genomic alterations and, consequently, new individuals may exhibit different phenotypes regarding physiological, morphological and reproductive aspects when compared to their parents. However, some bottlenecks have been highlighted by different authors, such as the high explant mortality rate, low seedling regeneration rate and large number of mixoploids. In this context, cell aggregate suspensions (CAS), obtained through the indirect somatic embryogenesis (ISE) system, represent a promising plant material for in vitro chromosome doubling (CD) due to the high rate of cell proliferation. In addition, CASs are killed in constant orbital agitation, allowing more cells to have direct contact with the compounds employed for CD than in the semisolid system. In this work, we aimed to regenerate autotetraploid and auto-alloctaploid seedlings of *Coffea canephora* and *Coffea arabica*, respectively, from a new in vitro CD procedure for *Coffea*. Exploring the ISE, the CASs were treated with 0.0 (control), 0.5, 1.5 or 2.5 mM colchicine solution in liquid culture medium under constant orbital agitation for 48, 72 or 96 h. Inoculated in semisolid medium, SACs were renamed cellular mass (CM), which showed distinct morphogenic responses among *Coffea* species, treatment time and colchicine concentration. Mature cotyledonary somatic embryos were only regenerated from cellular masses treated with 2.5 mM / 48 h and 2.5 mM / 72 h treated CM for *C. canephora* and 0.5 mM / 48 h for *C. arabica*. Evaluating the DNA ploidy level, 36 (34.9%) *C. canephora* seedlings were classified as autotetraploid ( $2n = 4x = 44$ ) and 61 (21.1%) of *C. arabica* as auto-alloctaploid ( $2n = 8x = 88$ ). The DC procedure exploiting the CASs and ISE promoted duplication of the entire genome and resulted in a relatively high number of stable polyploids of the two *Coffea* species. Therefore, considering the results obtained, the methodology adopted for in vitro CD is reproducible for induction, regeneration and in vitro propagation of polyploids to *Coffea* and can be adapted to other shrub and woody species. Given the novelty and importance of this procedure for generating new germplasm, we show the basis and steps of the CD procedure.

**Keywords:** coffee, polyploidization, plant tissue culture, cytogenetic.

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**CF** – Calos friáveis

**DCC** – Duplicação do conjunto cromossômico

**ES** – Embriões somáticos

**ESCM** – Embrião somático cotiledonar maduro

**ESI** – Embriogênese somática indireta

**MC** – Massa celular

**SAC** – Suspensões de agregados celulares

## INTRODUÇÃO

A poliploidização leva a ocorrência de mais de dois conjuntos cromossômicos completos no núcleo celular. Este fenômeno ocorre naturalmente, promovendo a formação de indivíduos autopoliploides, alopoliploides verdadeiros ou alopoliploides segmentais (Stebbins, 1947). Assim, a poliploidia possui papel importante na evolução e diversificação das plantas (Soltis et al., 2009). Além das alterações genômicas (genéticas e epigenéticas), os poliploides também podem exibir novas características morfológicas, fisiológicas e reprodutivas (Adams et al., 2005).

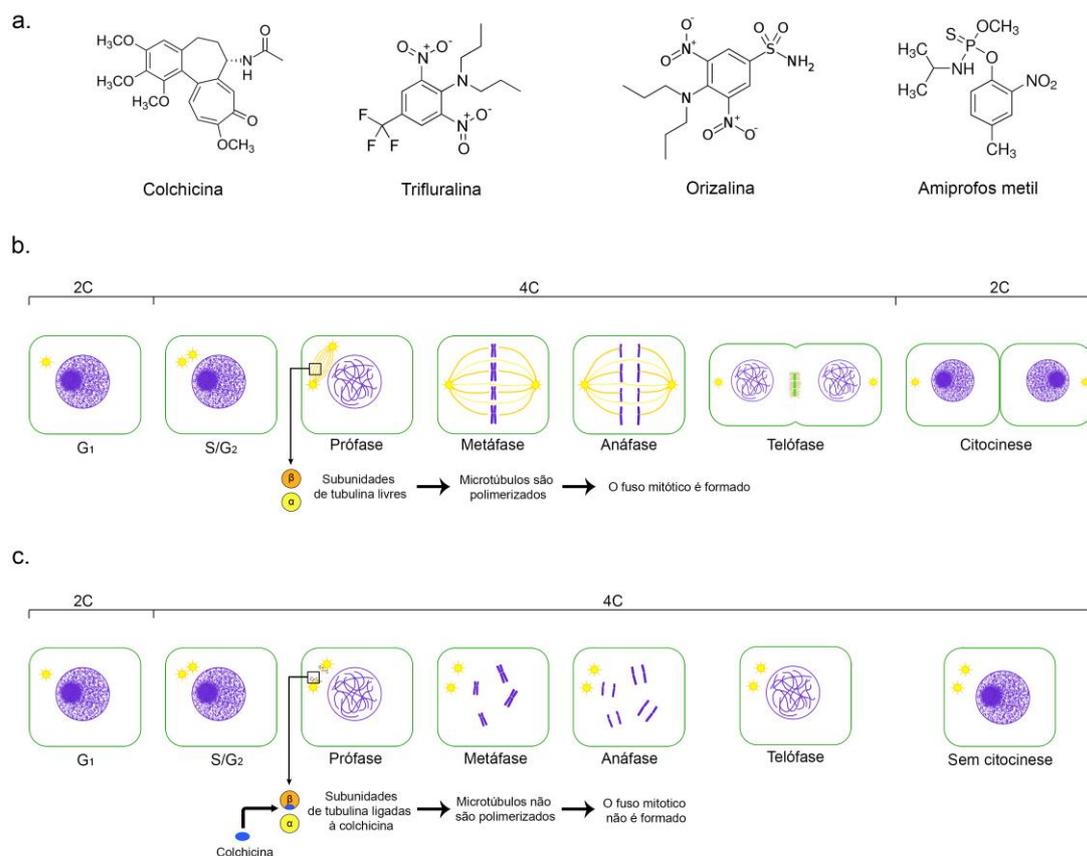
O impacto da poliploidia natural na diversidade e evolução das plantas inspirou vários grupos de pesquisa a estabelecer diferentes estratégias para a poliploidização sintética (duplicação do conjunto cromossômico – DCC) (Dhooghe et al., 2011). Em um cenário agrônomico, os procedimentos *ex vitro* e *in vitro* para induzir a poliploidia sintética resultam em novos germoplasmas para os programas de melhoramento de espécies agrônomicas, ornamentais, medicinais e florestais (Dhooghe et al., 2011; Sattler et al., 2016).

Poliploides sintéticos têm sido obtidos principalmente a partir da DCC em ambiente *in vitro*, desde Murashige e Nakano (1966), em condições físicas e químicas controladas. Para tal, o material biológico (explante ou propágulo), apresentando células proliferativas comprometidas com o ciclo celular ou reprodutivas em meiose, é exposto a um agente antitubulínico adicionado ao meio de cultura (Murashige; Nakano, 1966). Os diferentes compostos antitubulínicos (colchicina, orizalina, trifluralina, amiprofosmetil e propizamida) previnem a formação de fuso mitótico (Fig. 1) ou meiótico por meio da ligação a  $\alpha$ -tubulina e  $\beta$ -tubulina, impedindo, desta forma, a formação do heterodímero constituinte do microtúbulo (Hancock, 1997; Planchais et al., 2000). Em

virtude deste efeito citológico, não ocorre a segregação das cromátides-irmãs (anáfase mitótica Fig. 1; anáfase II meiótica) ou dos cromossomos homólogos (anáfase I meiótica), assim como também não ocorre a citocinese (Fig. 1), resultando em células com o dobro do número de conjuntos cromossômicos.

Em relação às estratégias *in vitro*, o conjunto cromossômico foi duplicado para árvores e arbustos, como *Acacia dealbata* Link., *Acacia mangium* Willd. (Blakesley et al., 2002), *Platanus acerifolia* (Ait.) Willd. (Liu et al., 2007), *Jatropha curcas* L. (Oliveira et al., 2013), *Ziziphus jujuba* Mill. (Shi et al., 2015), *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl. (Blasco et al., 2015), alotriploide “Híbrido de Timor” (*Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner x *Coffea arabica* L., Sanglard et al., 2017), alotriploide *Populus alba* L. x *Populus berolinensis* Dippel. (Liu et al., 2018), *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden, *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake, *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cabbage e homoploide *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* (Silva et al., 2019).

Expandindo a aplicabilidade, adaptações foram realizadas para solucionar os principais gargalos do procedimento *in vitro* da DCC: baixa taxa de poliploides estáveis, alta taxa de mixoploides e mortalidade dos propágulos. Atualmente, o procedimento mais promissor *in vitro* associa a via da embriogênese somática indireta (ESI) ao tratamento com o agente antitubulínico. Adaptações nos procedimentos de DCC são imperativos para ampliar sua aplicação para outras espécies. Desta forma, assim como para *Citrus* L. (Wu; Mooney, 2012; Petersen et al., 2003; Zhang et al., 2007; Dutt et al., 2010), Sanglard et al., (2017) associaram a ESI ao tratamento com colchicina, duplicando o conjunto cromossômico de um híbrido de *Coffea* de  $2n = 3x = 33$  cromossomos e  $1C = 2.10$  pg de conteúdo de DNA nuclear para  $2n = 6x = 66$  e  $2C = 4.20$  pg.



**Figura 1** – Esquema representativo do efeito dos antitubulínicos no ciclo celular. a) Estrutura química dos principais antitubulínicos utilizados para a DCC: colchicina – (S)-N-(5,6,7,9-tetrahydro-1,2,3,10-tetramethoxy-9-oxobenzo[a]heptalen-7-yl)acetamide; trifluralina –  $\alpha,\alpha,\alpha$ -trifluoro-2,6-dinitro-N,N-dipropyl-p-toluidina; orizalina – 3,5-dinitro-N<sup>d</sup>,N<sup>d</sup>-dipropylsulfanilamide; e amiprofos metil – O-metil O-(2-nitro-p-tolil)N-isopropilfosforamidotionato. b) Representação do ciclo celular sem a interferência de um agente antitubulínico, seus eventos celulares e as alterações sob o conteúdo relativo de DNA (2C, 4C) considerando uma célula diploide em G<sub>1</sub>. c) Efeito do agente antitubulínico sob o ciclo celular e, conseqüentemente, sob o conteúdo relativo de DNA. Agentes antitubulínicos evitam a formação do fuso mitótico, impedindo a segregação das cromátides-irmãs e a ocorrência da citocinese. Assim, o conjunto cromossômico é duplicado, resultando em uma única célula-filha com conteúdo relativo de DNA em G<sub>1</sub> equivalente a 4C e com o dobro do número de conjuntos cromossômicos.

A maioria dos estudos (Wu; Mooney, 2002; Petersen et al., 2003; Zhang et al., 2007; Sanglard et al., 2017) conduziu a DCC associando ESI ao tratamento com colchicina em meio semissólido. Diferentemente, Dutt et al. (2010) realizaram a DCC em suspensões de agregados celulares (SAC), as quais são estabelecidas em meio líquido a partir de calos friáveis (CF). O uso dos agregados celulares baseia-se na

elevada taxa de proliferação celular em comparação com os CF em meio semissólido (van Boxtel; Berthouly, 1996).

Variações na resposta ESI foram observadas após o tratamento com o agente antitubulínico, uma vez que a taxa de embriões somáticos (ES) e plântulas regeneradas varia entre os CF e também entre as SAC (Zhang et al., 2007; Wu; Mooney, 2012; Sanglard et al., 2017). As causas dessas variações podem estar associadas às condições in vitro, à ocorrência de variação somaclonal durante a ESI, e/ou ao efeito citotóxico do tratamento antitubulínico (Dhooghe et al., 2011).

Independente do sistema de cultura de tecidos in vitro (semissólido ou líquido), a DCC por meio da associação ESI/antitubulínico (Wu; Mooney, 2012; Petersen et al., 2003; Zhang et al., 2007; Dutt et al., 2010; Sanglard et al., 2017) está resolvendo os principais gargalos deste método in vitro. Assim, o objetivo deste trabalho foi estabelecer um novo procedimento para DCC a partir de SAC de *Coffea canephora* e *Coffea arabica*, espécies de grande relevância em termos agronômicos. *C. canephora* é uma espécie diploide com  $2n = 2x = 22$  cromossomos e conteúdo de DNA nuclear  $2C = 1,43$  pg, e *C. arabica* é um alotetraploide verdadeiro que possui  $2n = 4x = 44$  cromossomos e  $2C = 2,62$  pg (Clarindo; Carvalho, 2009).

## **MATERIAL E METÓDOS**

### *Material vegetal*

Uma planta de *C. canephora*, a qual tem sido propagada in vitro (Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo, Brasil), e uma planta de *C. arabica*, mantida em estufa (Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil), foram utilizadas como doadores de explantes. O número cromossômico, nível de ploidia ( $2n = 2x = 22$

para *C. canephora* e  $2n = 4x = 44$  para *C. arabica*) e valor  $2C$  nuclear ( $2C = 1,43$  pg para *C. canephora* e  $2C = 2,62$  para *C. arabica*) dos doadores de explantes foram confirmados por Sanglard et al. (2019).

#### *Estabelecimento dos CF e das SAC*

As folhas coletadas da planta doadora de *C. arabica* foram desinfestadas de acordo com de Oliveira et al. (2013). Cinco fragmentos foliares de  $\sim 1$  cm<sup>2</sup> foram excisados das plantas doadoras de explantes das espécies de *Coffea* e colocados em placas de Petri de 60 x 15 mm contendo meio M1 (Tabela 1). A indução de CF foi conduzida no escuro a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . Após 60 dias, sob condições assépticas, 0,5 g de CF foram transferidos para Erlenmeyers de 125 mL, contendo 30 mL de meio M2 (Tabela 1). Os Erlenmeyers foram mantidos em agitador orbital a 100 rpm,  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . Para o estabelecimento das SAC, o material foi subcultivado a cada 15 dias, respeitando os 0,5 g de agregados celulares por Erlenmeyer.

**Tabela 1** – Meios de cultura empregados para indução de calos (M1), estabelecimento das SAC (M2), DCC (M2), regeneração de ES (M3 e M4) e de plântulas (M5) de *C. canephora* e *C. arabica*.

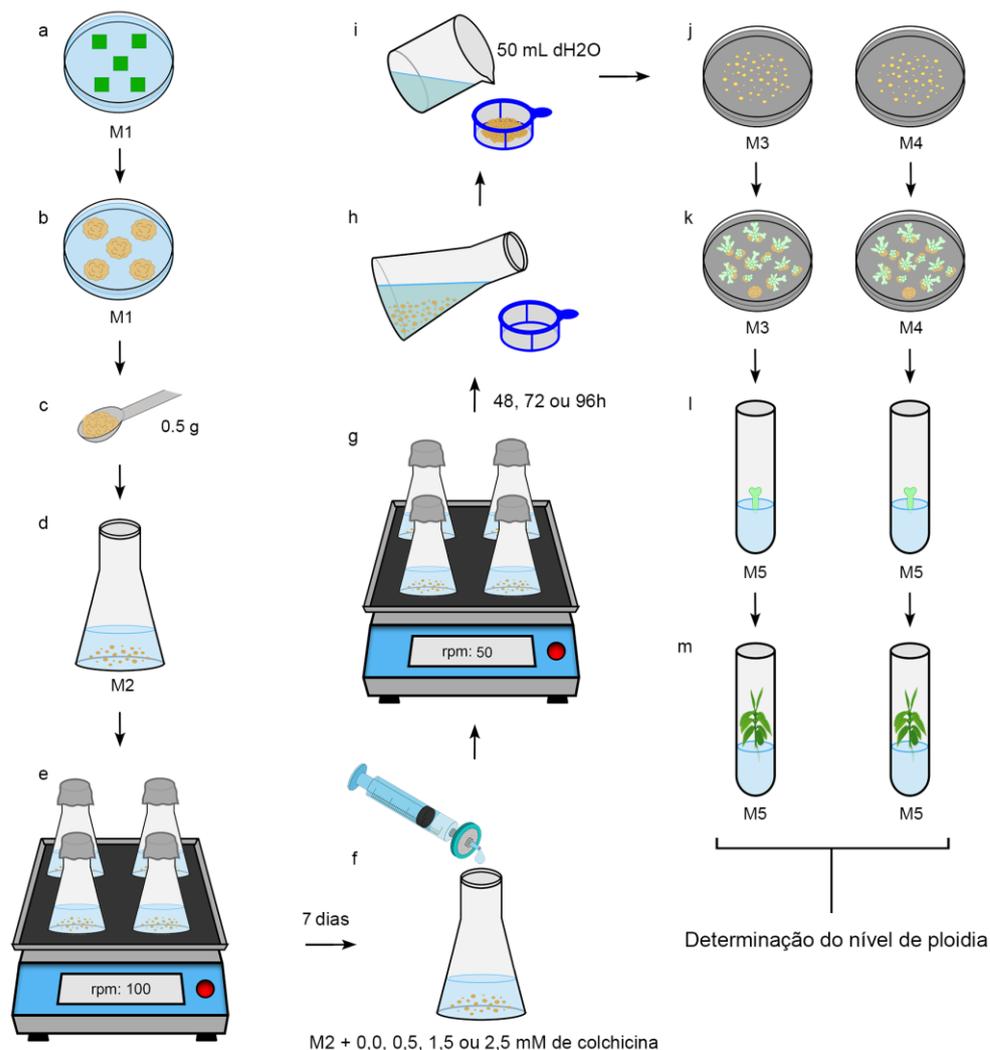
| Componentes              | Meios                   |                         |                         |                         |                         |
|--------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
|                          | M1                      | M2                      | M3                      | M4                      | M5                      |
| MS (Sigma®)              | 2,15 g L <sup>-1</sup>  | 2,15 g L <sup>-1</sup>  | 4,3 g L <sup>-1</sup>   | 4,3 g L <sup>-1</sup>   | 4,3 g L <sup>-1</sup>   |
| Vitaminas Gamborg's B5   | 10 ml L <sup>-1</sup>   |
| Sacarose (Sigma®)        | 30 g L <sup>-1</sup>    |
| L-cisteína (Sigma®)      | 0,08 g L <sup>-1</sup>  | 0,08 g L <sup>-1</sup>  | 0,04 g L <sup>-1</sup>  | 0,04 g L <sup>-1</sup>  | -                       |
| Extrato malte (Sigma®)   | 0,4 g L <sup>-1</sup>   | -                       | 0,8 g L <sup>-1</sup>   | 0,8 g L <sup>-1</sup>   | -                       |
| Caseína (Sigma®)         | 0,1 g L <sup>-1</sup>   | -                       | 0,2 g L <sup>-1</sup>   | 0,2 g L <sup>-1</sup>   | -                       |
| 2,4-D (Sigma®)           | 0,002 g L <sup>-1</sup> | 0,002 g L <sup>-1</sup> | -                       | -                       | -                       |
| BAP (Sigma®)             | 0,001 g L <sup>-1</sup> | -                       |
| GA <sub>3</sub> (Sigma®) | -                       | -                       | -                       | -                       | 0,001 g L <sup>-1</sup> |
| Phytigel (Sigma®)        | 2,8 g L <sup>-1</sup>   | -                       | 2,8 g L <sup>-1</sup>   | 2,8 g L <sup>-1</sup>   | 2,8 g L <sup>-1</sup>   |
| Carvão ativado (Isofar®) | -                       | -                       | 2 g L <sup>-1</sup>     | 4 g L <sup>-1</sup>     | -                       |
| pH                       | 5,6                     | 5,6                     | 5,6                     | 5,6                     | 5,6                     |

MS: Murashige e Skoog (1962); 2,4-D: ácido 2,4- diclorofenoxiacético; BAP: 6-benzilaminopurina; GA<sub>3</sub>: ácido giberélico.

M1: Meio de indução de calos; M2: Meio de estabelecimento e proliferação das SAC; M3, M4: Meio de regeneração de ES. M5: Meio de germinação de embriões somáticos cotiledonares maduros (ESCM).

### *DCC e regeneração de plântulas*

Após o quarto subcultivo (60 dias), as SAC foram tratadas com colchicina, um composto alcaloide isolado de sementes e bulbos de *Colchicum autumnale* L. (Planchais et al., 2000). O tratamento com colchicina foi realizado sete dias após o quarto subcultivo, de acordo com as curvas de crescimento das SAC de *C. canephora* e *C. arabica* (van Boxtel; Berthouly, 1996). Então, a solução de colchicina filtro esterilizada foi adicionada a cada Erlenmeyer para uma concentração final de 0,0 (controle), 0,5, 1,5 ou 2,5 mM. As SAC foram mantidas sob tratamento com colchicina por 48, 72 ou 96 h, em agitador orbital a 50 rpm a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  (Fig. 2). Um Erlenmeyer foi utilizado para cada tratamento com colchicina 0,0, 0,5, 1,5 ou 2,5 mM. Após a exposição à colchicina, as SAC de cada Erlenmeyer foram despejadas separadamente em filtro estéril de 40  $\mu\text{m}$  (BD Falcon<sup>TM</sup>), e cuidadosamente lavadas com pelo menos 50 mL de dH<sub>2</sub>O autoclavada para eliminação da colchicina residual (Fig. 2). Os agregados celulares de cada Erlenmeyer foram subdivididos em duas placas de Petri de 60 x 15 mm contendo meio M3 ou M4 (Tabela 1). Com a transferência para o sistema in vitro semissólido, os agregados celulares foram denominados como massa celular (MC). Após a regeneração dos embriões somáticos, apenas os ESCM foram transferidos para tubos contendo meio M5 para germinação (Tabela 1).



**Figura 2** – Esquema representando o procedimento para DCC a partir das SAC de *Coffea* submetidas ao tratamento com colchicina. (a) Fragmentos foliares de *Coffea* (~1 cm<sup>2</sup>) em meio M1 (Tabela 1). (b) CF após ~30 dias em M1. (c) 0,5 g de CF em (d) Erlenmeyers de 125 mL contendo 30 mL de meio M2 (Tabela 1). (e) SAC em agitador orbital a 100 rpm. (f) Adição da solução de colchicina filtro esterilizada após sete dias de subcultivo, respeitando a curva de crescimento das SAC relatada para *Coffea* (van Boxtel; Berthloulou, 1996). (g) SAC sob tratamento com colchicina por tempos distintos em agitador orbital a 50 rpm. (h e i) Lavagem cuidadosa e contínua das SAC com 50 mL de dH<sub>2</sub>O estéril. (j) SAC transferidas para meio semissólido M3 ou M4 (Tabela 1). Inoculadas em M3 ou M4, as SAC passaram a ser denominadas de massa ceclular (MC). (k) MC apresentando embriões somáticos globulares, cordiformes, torpedos e cotiledonares de *C. canephora* ou de *C. arabica* em M3 e M4. (l) ESCM em meio M5 (Tabela 1). (m) Plântulas regeneradas das duas espécies de *Coffea*, das quais foram retiradas folhas para determinação do nível de ploidia de DNA.

### *Nível de ploidia de DNA das plântulas regeneradas*

O nível de ploidia de DNA e o valor 2C nuclear das plântulas de *C. canephora* e *C. arabica* regeneradas foram determinados a partir de suspensões nucleares extraídas de folhas e coradas de acordo com Otto (1990) e Praça-Fontes et al. (2011). Assim como Sanglard et al. (2017), as suspensões nucleares obtidas de folhas das plantas doadoras de explantes de *C. canephora* e *C. arabica* foram usadas como controle para determinação do nível de ploidia de DNA. As suspensões foram analisadas em citômetro Partec PAS® (Partec® GmbH, Munster, Alemanha).

## **RESULTADOS**

### *Estabelecimento dos CF e das SAC*

Após 90 dias no M1 (Tabela 1), o número médio de explantes responsivos, determinado pelos fragmentos foliares com calos friáveis, foi de 1,07 para *C. canephora* e de 2,37 para *C. arabica*. No M2 (Tabela 1), as SAC foram estabelecidas a partir de calos friáveis das duas espécies de *Coffea* após o terceiro subcultivo, equivalente a 45 dias. Portanto, o procedimento de DCC foi conduzido no sétimo dia durante o quarto subcultivo. Após a transferência dos agregados celulares para M3 ou M4, eles foram denominados como MC (Fig. 3). As respostas dos explantes para a formação de CF ocorreram de maneira distinta entre as espécies de *Coffea*.

### *DCC e regeneração de plântulas*

ES foram regenerados a partir das MC tratadas com colchicina e mantidas em M3 e M4 (Fig. 3). Os tratamentos responsivos para a formação de ES foram diferentes entre as duas espécies de *Coffea*. Os ES de *C. canephora* foram regenerados a partir das MC tratadas com colchicina 2,5 mM/48 h e mantidos em M3 ou M4 e com colchicina

2,5 mM/72 h em M3. Para *C. arabica*, os ES foram regenerados a partir de MC tratadas com colchicina 0,5 mM/72 h e mantidas em M3 ou M4 (Fig. 3 c e d.). As MC das duas espécies de *Coffea* apresentaram embriões somáticos globulares (Fig. 4 a), que foram convertidos em codiforme (Fig. 3b), em torpedos (Fig. 3c) e, na sequência morfogênica, em cotiledonares (Fig. 4 d-f). Os embriões somáticos cotiledonares amadureceram, resultando nos ESCM (Fig. 4 f). Portanto, ES em diferentes estágios de desenvolvimento foram observados na mesma massa celular responsiva, evidenciando uma resposta assíncrona do ISE (Fig. 3, 4). Além disso, MC não responsivas ocorreram para as duas espécies nos diferentes tratamentos, incluindo o controle.

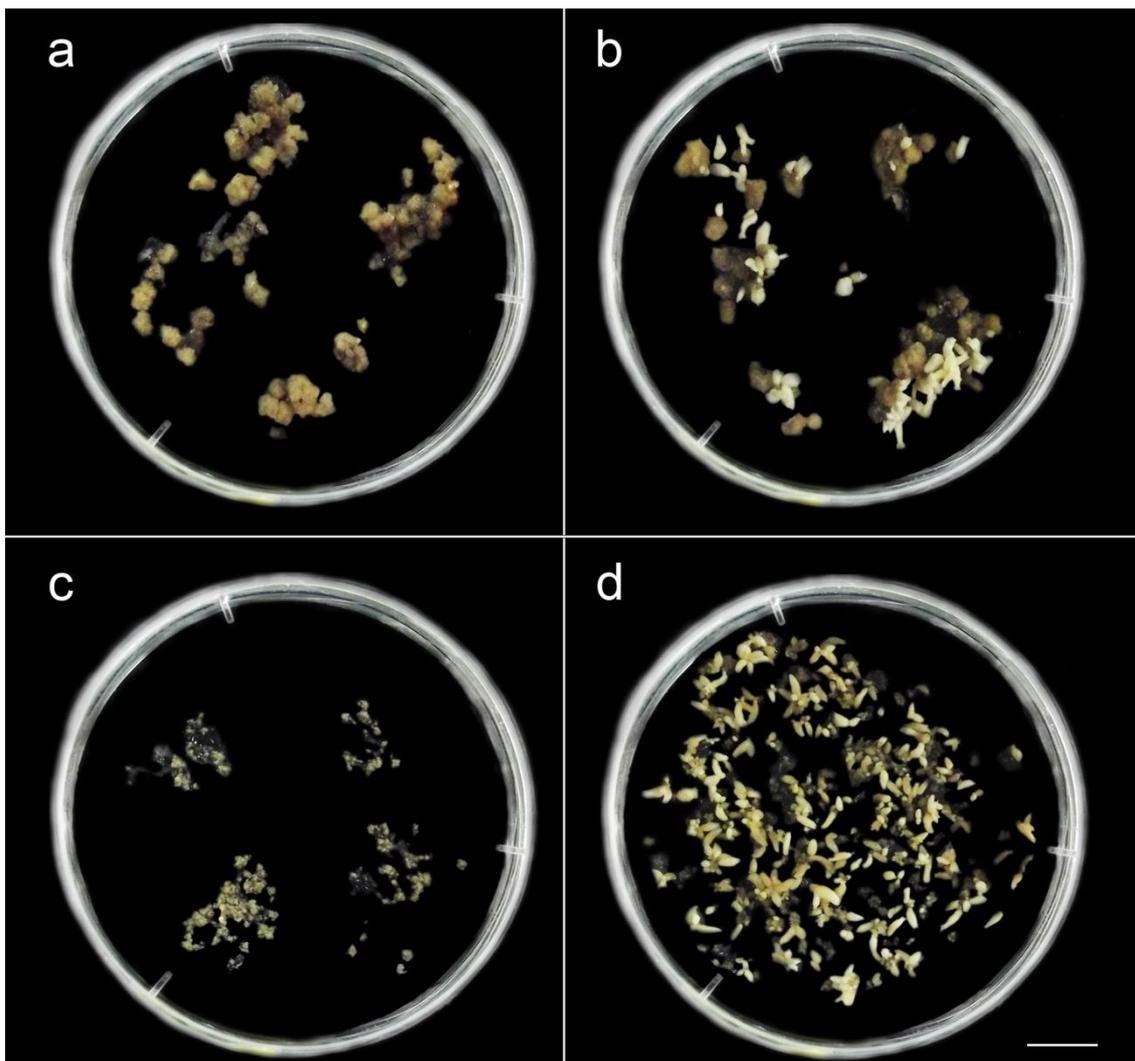
A resposta *in vitro* para a regeneração ocorreu de maneira distinta entre as espécies de *Coffea*, entre os tratamentos com colchicina (tempo e concentração) e entre os meios M3 e M4 (Tab 1, 2). O tempo de regeneração foi menor e com maior número de ESCM para o tratamento responsivo de *C. arabica* em relação ao de *C. canephora*. Em M3 e M4 (Tabela 2), 324 ESCM foram regenerados para *C. arabica* após 90 dias e 76 para *C. canephora* após 120 dias (Tabela 2).

Durante toda a resposta *in vitro*, 878 ESCM foram contabilizados, dos quais 621 de *C. arabica* e 257 de *C. canephora*. Gradualmente, as plântulas foram regeneradas a partir dos ESCM em meio M5 (Tabela 1) após 60 dias, resultando em 392 (44,6%) plântulas, sendo 103 plântulas para *C. canephora* e 289 para *C. arabica* (Tabela 1). Esse número reduzido de plântulas em relação ao de ESCM deve-se à falha ou ao desenvolvimento morfológico inadequado da raiz e/ou da parte aérea. As MC mostraram uma produção contínua de ES para as espécies, por mais de um ano, com potencial de regeneração de plântulas ao longo de vários meses. No entanto, em nosso estudo, eles foram contabilizados até 150 dias em M3 ou M4.

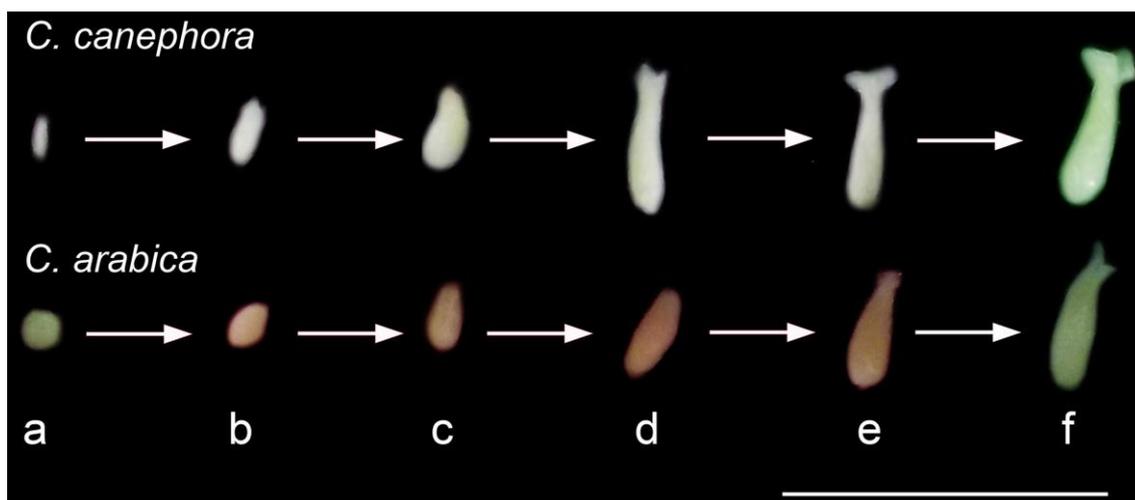
### *Avaliação do nível de ploidia de DNA*

No final dos 150 dias em M3 e M4, os ESCM foram transferidos para o M5. Como resultado, plântulas foram obtidas após dois meses e, assim, o nível de ploidia de DNA foi avaliado, representando 103 (40,1%) plântulas para *C. canephora* e 289 (46,5%) para *C. arabica* em relação ao número total de ESCM (Tabela 2). O nível de ploidia de DNA foi determinado para plântulas individuais (392 plântulas, Tabela 2) por comparação com o pico de núcleos G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> da planta doadora de explantes. Para as plântulas previamente selecionadas como tetraploides (*C. canephora*) e octaploides (*C. arabica*), o nível de ploidia de DNA foi determinado novamente após dois meses e após seis meses. Assim, a condição poliploide foi confirmada para todas as plântulas de *Coffea* (Tabela 2) em todas as análises por citometria de fluxo, evidenciando uma condição poliploide sólida. Nenhuma placa mixoploide foi identificada.

Plântulas com nível de ploidia de DNA equivalente ao tetraploide ( $4C = 2,86 \pm 0,053$  pg) foram encontradas para *C. canephora* (doador de explante com  $2C = 1,43$  pg,  $2n = 2x = 22$  cromossomos), sendo 12 plântulas (26,7%) de 2,5 mM/48 h/M3, 16 (43,2%) de 2,5 mM/48 h/M4 e 8 (34,9%) de 2,5 mM/72 h/M3. O procedimento de DCC in vitro (Fig. 1) resultou plântulas octaploides de *C. arabica*. Essas plântulas com  $4C = 5,22 \pm 0,028$  pg foram obtidas de 0,5 mM/72 h/M3 (27 plântulas – 26,5%) e M4 (34 plântulas - 18,2%). Assim, 61 (21,1%) plântulas foram classificadas como octaploides para *C. arabica* (Tabela 2). Considerando a origem evolutiva dessa espécie, que é um alotetraploide verdadeiro de *C. canephora* x *Coffea eugenoides* Moore, e o nível de ploidia das plântulas ( $4C = 5,22$  pg), esses germoplasmas podem ser considerados autoalo-octaploides.



**Figura 3** – Diferentes respostas in vitro da MC de *C. canephora* (a e b) e de *C. arabica* (c e d) observadas após o tratamento das SAC com colchicina (Tabela 1, Fig. 2). (a e b) MC de *C. canephora*, após 150 dias (Tabela 2), tratadas com colchicina 2,5 mM/48 h (Fig. 2) e mantidas em meio M4 (Tabela 1). (a) Placa de Petri mostrando predomínio de MC não responsivas e outras com ES globular. (b) Placa de Petri exibindo MC não responsivas e responsivas com ES em estágios distintos de desenvolvimento (globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar inicial). (c) MC não responsiva de *C. arabica* tratada com colchicina 0,5 mM/72 h e mantida em M4 durante 90 dias. (d) Inúmeros ES de *C. arabica* em diferentes estágios de desenvolvimento. Este resultado foi obtido após 90 dias de tratamento das SAC com colchicina 0,5 mM/72 h. Barra = 1 cm.



**Figura 4** – Regeneração, conversão e maturação dos ES de *C. canephora* e *C. arabica*. ES globulares (a), cordiformes (b), torpedos (c), cotiledonar inicial (d), cotiledonares médios (e) e cotiledonares maduros (f). Barra = 1 cm.

**Tabela 2.** Resposta da ESI a partir das MC após tratamento das SAC com colchicina, considerando as MC que apresentaram ESCM de *C. arabica* e *C. canephora*.

| <i>Coffea</i>       | Tratamento com colchicina | Meios <sup>1</sup> | ESCM em 90 dias <sup>2</sup> | ESCM em 120 dias <sup>2</sup> | ESCM em 150 dias <sup>2</sup> | Total de ESCM | Total de plântulas <sup>3</sup> | Total (%) de plântulas com número de conjuntos cromossômicos duplicados <sup>4</sup> |
|---------------------|---------------------------|--------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|---------------|---------------------------------|--|
| <i>C. canephora</i> | 2.5 mM/48 h               | M3                 | -                            | 25                            | 100                           | 125           | 45 (36.0%)                      | 12 (26.7%)   |
|                     |                           | M4                 | -                            | 29                            | 70                            | 99            | 37 (37.4%)                      | 16 (43.2%)   |
|                     | 2.5 mM/72 h               | M3                 | -                            | 22                            | 11                            | 33            | 21 (63.6%)                      | 8 (38.1%)  |
|                     |                           |                    |                              |                               |                               | 257           | 103 (40.1%)                     | 36 (34.9%)   |
| <i>C. arabica</i>   | 0.5 mM/72 h               | M3                 | 89                           | 70                            | 78                            | 237           | 102 (43.0%)                     | 27 (26.5%)   |
|                     |                           | M4                 | 235                          | 40                            | 109                           | 384           | 187 (48.7%)                     | 34 (18.2%)   |
|                     |                           |                    |                              |                               |                               | 621           | 289 (46.5%)                     | 61 (21.1%)   |

1 – Vide Tabela 1.

2 – Número total e % de ESCM regenerados em M3 ou M4 e transferidos para M5 (Tabela 1).

3 – Número total e % de plântulas com folhas para avaliação do nível de ploidia de DNA após dois meses em M5.

4 – Número e % de plântulas que apresentaram nível de ploidia de DNA equivalente ao dobro do número de conjuntos cromossômicos em relação à planta doadora de explantes.

## DISCUSSÃO

Neste estudo, um novo procedimento de DCC foi estabelecido a partir de SAC da espécie diploide *C. canephora* e do alotetraploide verdadeiro *C. arabica*, resultando em plântulas autotetraploides de *C. canephora* ( $4C = 2,86$  pg) e autoalo-octaploides de *C. arabica* ( $4C = 5,24$  pg). Esses novos germoplasmas foram gerados aproximadamente dentro de um ano, sendo 90 dias para produção de CF, 67 dias para estabelecimento de SAC, 2 – 4 dias para tratamento com colchicina, 150 dias para regeneração de ESCM e 60 dias para regeneração das plântulas. Esse tempo relativamente curto, representa um avanço para os programas de melhoramento de *Coffea*, que dependem de estratégias que demandam vários cruzamentos, grande progênie e tempo para gerar novos germoplasmas. Por exemplo, o tempo de seleção de híbridos *in vitro* (~8 anos) é menor que o tempo de seleção de híbridos no programa de melhoramento tradicional (~25 anos) (Etienne et al., 2018). Além disso, os novos germoplasmas foram formados a partir de fragmentos foliares das plantas selecionadas. As células dessas folhas apresentaram alto grau de plasticidade, permitindo a reprogramação e a formação de embriões somáticos e plântulas a partir da seguinte rota de ESI: células diferenciadas → células desdiferenciadas → células rediferenciadas.

Para induzir a DCC em sistema líquido, foi explorada a elevada taxa de proliferação das células das SAC de *Coffea* (van Boxtel; Berthouly, 1996; Clarindo et al., 2013). Diferentemente do que ocorre no sistema semissólido (Loyola-Vargas; Vazquez-Flota, 2006; Dutt et al., 2010), a SAC é mantida em agitação orbital constante, permitindo que mais células tenham contato direto com os diferentes compostos do meio de cultura. Dentre os compostos, destacam-se os reguladores de crescimento que promovem a proliferação celular (2,4-D em nosso estudo) e o

antitubulínico durante o procedimento de DCC. No sistema semissólido, por exemplo, há uma redução na taxa de difusão de nutrientes em virtude da consistência gelatinosa do meio (Loyola-Vargas; Vazquez-Flota, 2006).

O principal aspecto do procedimento (Fig. 2) foi o tratamento antitubulínico aplicado às SAC em proliferação no sistema líquido *in vitro*. As condições químicas e físicas do ambiente da cultura de tecidos foram eficazes, dando origem a CF (primeira fase – desdiferenciação) e SAC com células proliferativas (segunda fase), ESCM (terceira fase) e plântulas com diferentes níveis de ploidia (quarta fase). A ESI tem sido extensivamente explorada para a regeneração de plântulas de *Coffea* desde van Boxtel e Berthouly (1996), considerando a reprodutibilidade para diferentes espécies e genótipos da mesma espécie (Samson et al., 2006; Almeida et al., 2008; Ibrahim et al., 2015 ), como *C. canephora*, *C. eugenioides*, o alotriploide “Híbrido de Timor” 'CIFC 4106' e o alotetraploide verdadeiro *C. arabica* (Sanglard et al., 2019). Além da propagação *in vitro*, os novos germoplasmas de *Coffea* obtidos neste estudo confirmam que as condições *in vitro* de van Boxtel e Berthouly (1996) são a base para estabelecer protocolos aplicados de cultura de tecidos para esse gênero.

A regeneração de ESCM de *Coffea* ocorreu basicamente após a remoção da auxina exógena 2,4-D e a suplementação do meio de cultura com carvão ativado. Assim, a eliminação do principal componente químico responsável por manter as células em condição totipotente foi necessária, conforme recomendado por Rose et al. (2010) e Nic-Can e Loyola-Vargas (2016). O carvão ativado é adicionado ao meio de cultura em virtude da sua capacidade de adsorção de resíduos 2,4-D exógenos (Pan; van Staden, 1998), além da adsorção de substâncias inibidoras presentes no meio ou produtos tóxicos liberados pelas células, contribuindo, portanto, para regeneração de

embriões somáticos, conversão e maturação para o estágio cotiledonar maduro (Pasqual et al., 2002).

O controle osmótico também é fundamental para a regeneração de ES. Um potencial osmótico relativamente alto é necessário para indução de CF e estabelecimento e proliferação da SAC. Por outro lado, a diminuição do potencial osmótico é fundamental para a regeneração do ES, mimetizando o ambiente das sementes durante o desenvolvimento do embrião zigótico (Merkel et al., 1995; Finkelstei; Crouch 1986; Dutt et al., 2010).

O princípio para promover a DCC foi poliploidizar o maior número possível de células das SAC de *Coffea* usando a colchicina como antitubulínico, a qual pode ser substituída por outro composto com o mesmo efeito específico. Os compostos antitubulínicos possuem ação citotóxica específica caracterizada pelo impedimento da formação do fuso mitótico e, conseqüentemente, da segregação das cromátides-irmãs e da citocinese (Planchais et al., 2000; Dutt et al., 2010; Acanda et al., 2015). Como a poliploidização ocorreu em células das SAC de *Coffea*, foi concluído que a coesina que une as cromátides-irmãs dos cromossomos foi clivada, duplicando o número de cromossomos como em uma anáfase normal. No entanto, os cromossomos permaneceram na célula como resultado da ausência do fuso mitótico e, conseqüentemente, da não ocorrência de citocinese. A reorganização da membrana nuclear em torno desses cromossomos ocorreu na telófase e as células-filhas foram formadas contendo um único núcleo em uma nova condição poliploide em comparação com a planta doadora.

A colchicina aplicada no sétimo dia após o subcultivo também contribuiu para gerar 36 (34,9%) autotetraploides de *C. canephora* e 61 (21,1%) autoalo-octaploides de *C. arabica*. Para *Citrus*, Dutt et al. (2010) também trataram as SAC com colchicina

após sete dias no terceiro subcultivo. Nossos resultados, assim como os de Zhang et al. (2007) e Dutt et al. (2010), destacam que o momento para o tratamento com o antitubulínico deve ser escolhido conforme o número de células na fase S da interfase. Para *Coffea*, essa fase do ciclo celular ocorre no intervalo de 7 a 9 dias (van Boxtel; Berthouly, 1996) e pode ser verificada para cada espécie de planta utilizando, por exemplo, a citometria de fluxo. Além disso, esses dados aumentam o controle experimental e, conseqüentemente, o número de poliploides, pois permitem atestar que as células são proliferativas, escolher um momento antes da ocorrência da mitose e da citocinese e realizar o tratamento com colchicina em menor intervalo de tempo.

Outro impacto do procedimento de DCC foi a regeneração de poliploides puros para as duas espécies de *Coffea*. As SAC são consideradas células meristemáticas, tornando-se uma fonte adequada de material biológico proliferativo para a DCC, gerando poliploides estáveis e substituindo o meristema apical da parte aérea (ápices caulinares) amplamente empregados (Dhooghe et al., 2011). Os poliploides puros de *Coffea* mostram a possibilidade da ESI de regenerar embriões somáticos e, conseqüentemente, uma plântula oriunda de apenas uma célula dos CF (sistema semissólido, Petersen et al., 2003; Zhang et al., 2007; Wu; Mooney, 2012; Sanglard et al., 2017) ou SAC (sistema líquido, Dutt et al., 2010, Acanda et al., 2015). Além disso, a DCC usando células pró-embriogênicas de CF ou SAC reduz ou anula a regeneração de plântulas mixoploides (Dutt et al., 2010, Acanda et al., 2015; Sanglard et al., 2017). Por outro lado, a DCC a partir de ápices caulinares exige a poliploidização de todas ou de pelo menos a maioria das células que constituem as zonas periférica, central e medular (camadas L1, L2 e L3). Portanto, os mixoploides gerados a partir desse explante são resultado da falha na DCC.

Embora a ESI seja um sistema vantajoso para DCC (Wu ; Mooney, 2002; Petersen et al., 2003; Zhang et al., 2007; Sanglard et al., 2017), foram observadas massas celulares sem embriões somáticos e outros com regeneração, conversão e maturação contínua de embriões somáticos. A primeira hipótese para explicar as divergências na resposta da ESI é o efeito citotóxico da colchicina, mas as massas celulares não tratadas com colchicina também não mostraram embriões somáticos. Além disso, as massas celulares responsivas de *C. canephora* foram tratadas com colchicina 2,5 mM, exatamente a maior concentração desse composto. Acanda et al. (2015) relataram que a exposição à colchicina reduziu o potencial embriogênico em comparação ao controle. O mesmo destaque foi relatado por vários autores, independente do material biológico usado para a DCC in vitro.

Outra possibilidade é a ocorrência de variação somaclonal. A variação somaclonal é um fenômeno comum na cultura de tecidos vegetais causado por alterações genéticas e epigenéticas no genoma nuclear, bem como alterações genéticas no genoma das organelas (Rao et al., 1992; Kaeppeler et al., 2000). Portanto, o termo variação somaclonal descreve a variabilidade produzida pela propagação in vitro como resultado das condições físicas e químicas, tempo e sistema de propagação (líquido ou semissólido) empregado.

## **CONCLUSÃO**

Considerando o percentual obtido de plântulas com o conjunto cromossômico duplicado, os resultados do presente trabalho sugerem que a associação da ESI e o tratamento com antitubulínico das SAC é um procedimento bem-sucedido para produzir plantas poliploides sólidas para *Coffea*, podendo também ser promissor para outras espécies. Novos germoplasmas de *Coffea* foram gerados, *C. canephora* autotetraploide

e auto-alotetraploides *C. arabica*, promovendo uma diversificação do germoplasma in vitro desse gênero. Esses indivíduos podem ser usados como doadores de explantes para outros procedimentos de cultura de tecidos, bem como podem ser aclimatizados para avaliações morfológicas, fisiológicas e reprodutivas.

## REFERÊNCIAS

ACANDA, Y.; MARTÍNEZ, Ó.; GONZÁLEZ, M.; V.; PRADO, M.; J.; REY, M. Highly efficient in vitro tetraploid plant production via colchicine treatment using embryogenic suspension cultures in grapevine (*Vitis vinifera* cv. Mencía). **Plant Cell Tiss Organ Cult**, v. 123, p. 547–555, 2015.

ADAMS K. L.; CRONN R.; PERCIFIELD R.; WENDEL J.F. Genes duplicated by polyploidy show unequal contributions to the transcriptome and organ-specific reciprocal silencing. **Proc Natl Acad Sci**, v.100, p. 4649–4654, 2003.

ALMEIDA, J.; A.; S.; SILVAROLLA, M.; B.; FAZUOLI, L.; C.; STANCATO, G.; C. Embriogênese somática em genótipos de *Coffea arabica* L. **Coffee Science**, v. 3, p.143-151, 2008.

BLAKESLEY, D.; ALLEN, A.; PELLNY, T.; K.; ROBERTS, A.; V. Natural and induced polyploidy in *Acacia dealbata* Link. and *Acacia mangium* Willd. **Ann Bot**, v. 90, p.391–398, 2002.

BLASCO, M.; BADENES, M.; L.; DEL MAR NAVAL, M. Colchicine-induced polyploidy in loquat (*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 120, n. 2, p. 453-461, 2015.

CLARINDO, W.; R.; CARVALHO, C.; R. Comparison of the *Coffea canephora* and *C. arabica* karyotype based on chromosomal DNA content. **Plant Cell Rep**, v. 28, p.73-81, 2009.

CLARINDO, W.; R.; CARVALHO, C.; R.; CAIXETA, E.; T.; KOEHLER, A.; D. Following the track of “Híbrido de Timor” origin by cytogenetic and flow cytometry approaches. **Genet Resour Crop Evol**, v. 60, p.2253–2259, 2013.

de OLIVEIRA, S.;C.; NUNES, A.;C.; CARVALHO, C.;R.; CLARINDO, W.;R. In vitro polyploidization from shoot tips of *Jatropha curcas* L.: a biodiesel plant. **Plant Growth Regulation**, v. 69, p.79-86, 2013.

DHOOGHE E.; VAN LAERE K.; EECKHAUT T.; LEUS L.; VAN HUYLENBROECK J. Mitotic chromosome doubling of plant tissues in vitro. **Plant Cell Tissue Organ Cult (PCTOC)**, v. 104, p.359-73, 2011.

DUTT, M.; VASCONCELLOS, M.; SONG.; K.; J.; GMITTER, F.; G.; GROSSER, J.; W. In vitro production of autotetraploid *Ponkan mandarin* (*Citrus reticulata* Blanco) using cell suspension cultures. **Euphytica**, v. 173, p.235–242, 2010.

ETIENNE, H.; ANTHONY, F.; DUSSERT, S.; FERNANDEZ, D.; LASHERMES, P.; BERTRAND, B. Biotechnological applications for the improvement of coffee (*Coffea arabica* L.). **In Vitro Cell Dev Biol Plant**, v. 38, p. 129-138, 2002.

FINKELSTEIN, R.; R.; CROUCH, M.; L. Rapeseed embryo development in culture on high osmoticum is similar to that in seeds. **Plant Physiol**, v. 81, p. 907–912, 1986.

IBRAHIM, M.; S.; D.; HARTATI, R.; R.; S.; RUBIYO, R.; PURWITO, A.; SUDARSONO, S. The Induction of Primary and Secondary Somatic Embryo to Support Arabica Coffee Propagation. **Journal of Tropical Crop Science**, v.2, 2015.

KAEPLER, S.; M.; KAEPLER, H.; F.; RHEE, Y. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. **Plant Molecular Biology**, v. 43, p. 179-188, 2000.

LIU, G.; LI, Z.; BAO, M. Colchicine-induced chromosome doubling in *Platanus acerifolia* and its effect on plant morphology. **Euphytica**, v. 157, p.145–154, 2007.

LIU, W.; ZHENG, Y.; SONG, S.; HUO, B.; L.; I.; D.; WANG, J. In vitro induction of allohexaploid and resulting phenotypic variation in *Populus*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 134, n. 2, p. 183-192, 2018.

LOYOLA-VARGAS, V.; VAQUEZ-FLOTA, F. **Plant cell culture protocols**. 2 ed. Totowa; Humana, v. 46, 2006.

MERKEL, S.; A.; PARROTT, W.; A.; FLINN, B.; S. Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. In: Thorpe TA (ed) In vitro Embryogenesis in Plants. **Kluwer Academic Publishers**, Netherlands, 1995.

MURASHIGE, T.; NAKANO R. Tissue culture as a potential tool in obtaining polyploid plants. **Journal of Heredity**, v. 57, p.115-8, 1966.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, v. 15, p.473-497, 1962.

NIC-CAN, G.; I.; LOYOLA-VARGAS, V.; M. The Role of the Auxins During Somatic Embryogenesis. In: Loyola-Vargas VM, Ochoa-Alejo N (eds) Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications. **Springer International Publishing**, p. 171-182, 2016.

OTTO, F.; J. DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. *Methods in cell biology*, **Academic Press**, v, 33, p. 105–110, 1990.

PAN, M.; J.; VAN STADEN, J. The use of charcoal in in vitro culture: a review. **Plant Growth Regul**, v. 26, p. 155–163, 1998.

PASQUAL, M.; FINOTTI, D.; R.; DUTRA, L.; F.; CHAGAS, E.; A.; RIBEIRO, L.; DE O. Cultivo in vitro de embriões imaturos de tangerineira Poncã em função do pH e da concentração de ágar. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.3, p. 199-202, 2002.

PETERSEN, K.; K.; HAGBERG, P.; KRISTIANSEN, K. Colchicine and oryzalin mediated chromosome doubling in different genotypes of *Miscanthus sinensis*. **Plant Cell Tissue Organ Cult (PCTOC)**, v.73, p.137–146, 2003.

PLANCHAIS, S.; GLAB, N.; INZÉ, D.; BERGOUNIOUX, C. Chemical inhibitors: a tool for plant cell cycle studies. **Febs Letters**, v. 30, p.78-83, 2000.

PRAÇA-FONTES, M.; M.; CARVALHO, C.; R.; CLARINDO, W.; R. C-value reassessment of plant standards: an image cytometry approach. **Plant Cell Rep**, v. 30, p. 2303–2312, 2011.

RAO, I.M.; ROCA, W.M.; AYARZA, M.A.; TABARES, E.; GARCIA, R. Somaclonal variation in plant adaptation to acid soil in the tropical forage legume *Stylosanthes guianensis*. **Plant and Soil**, v. 146, p. 21-30, 1992.

ROSE, R.; J.; MANTIRI, F.; R.; KURDYUKOV, S.; CHEN, S.; K.; WANG, X.; D.; NOLAN, K.; E.; SHEAHAN, M.; B. Developmental biology of somatic embryogenesis. In: Pua EC, Davey MR (eds) **Plant developmental biology-biotechnological perspectives**, p. 3–26, 2010.

SAMSON, N.; P.; CAMPA, C.; GAL, L.; L.; NOIROT, M.; THOMAS, G.; LOKESWARI, T.; S.; D.; E.; KOCHKO, A. Effect of primary culture medium composition on high frequency somatic embryogenesis in different *Coffea* species. **Plant Cell Tissue Organ Cult (PCTOC)**, v. 86, p. 37–45, 2006.

SANGLARD, N.; A.; AMARAL-SILVA, P.; M.; SATTLER, M.; C.; DE OLIVEIRA, S.; C.; NUNES, A.; C.; SOARES, T.; C.; CARVALHO, C.; R.; CLARINDO, W.; R. From chromosome doubling to DNA sequence changes: outcomes of an improved in vitro procedure developed for allotriploid “Híbrido de Timor” (*Coffea arabica* L.

*Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner). **Plant Cell Tissue Organ Cult (PCTOC)**, v.131, p. 223-231, 2017.

SANGLARD, N.; A.; AMARAL-SILVA, P.; M.; SATTTLER, M.; C.; DE 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 (PCTOC)**, 1-13, 2019.

SATTTLER, M.; C.; CARVALHO, C.; R.; CLARINDO, W.; R. The polyploidy and its key role in plant breeding. **Planta**, v.243, p.281-96, 2016.

SHI, Q.; LIU, P.; WANG, J.; XU, J.; NING, Q.; LIU, M. A novel in vivo shoot regeneration system via callus in woody fruit tree Chinese jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.). **Scientia Horticulturae**, v. 188, p. 30-35, 2015.

SILVA, A.; J.; CARVALHO, C.; R.; CLARINDO, W.; R. Chromosome set doubling and ploidy stability in synthetic auto-and allotetraploid of *Eucalyptus*: from in vitro condition to the field. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, p. 1-8, 2019.

SOLTIS, D.;E.; ALBERT, V.;A.; LEEBENS-MACK, J.; BELL, C.;D.; PATERSON, A.;H.; ZHENG, C.; SANKOFF, D.; WALL, P.;K.; SOLTIS, P.;S. Polyploidy and angiosperm diversification. *American journal of botany*, v. 96, p.336-48, 2009.

STEBBINS, G.; L. Types of polyploids: their classification and significance. **Adv. Genet**, v.1, p. 403–429, 1947.

van BOXTEL, J.; BERTHOULY, M. High frequency somatic embryogenesis from coffee leaves. **Plant Cell Tissue Organ Cult (PCTOC)**, v. 44, p.7–17, 1996.

WU, J.; H.; MOONEY, P. Autotetraploid tangor plant regeneration from in vitro *Citrus* somatic embryogenic callus treated with colchicine. **Plant Cell Tissue Organ Cult (PCTOC)**, v.70, p.99–104, 2002.

ZHANG, J.; ZHANG, M.; DENG, X. Obtaining autotetraploids in vitro at a high frequency in *Citrus sinensis*. **Plant Cell Tissue Organ Cult (PCTOC)**, v.89, p.211–216, 2007.