EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA *in vitro* DE *Paubrasilia echinata* A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS IMATUROS

Autores: Thalya Campelo Vitor[1], Mayla Bessa Scotá[1], Warley Costa Silva[1], Gustavo Fernandes Mariano[1], Claudete Santa-Catarina[2], Milene Miranda Praça Fontes[1], Elias Terra Werner[1]

[1]Universidade Federal do Espírito Santo, ES / Laboratório de Citogenética e Cultura de Tecidos Vegetais, Alto Universitário, S/N, Guararema - 29500-000 - Alegre-ES, Brasil, thalyavitor26@gmail.com.mayla_scotta@hotmail.com, warley.costa.545@gmail.com, gustavo123mariano@hotmail.com, milenemiranda@yahoo.com.br,elias.werner@ufes.br
[2]Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Campos dos Goytacazes-RJ, Brazil, claudete@uenf.br

Resumo

A embriogênese somática *in vitro* apresenta potencial para a propagação de espécies ameaçadas, como *Paubrasilia echinata*, sendo seu sucesso influenciado pela origem e idade dos explantes, assim como o de reguladores de crescimento vegetal (RCVs). O objetivo foi avaliar o efeito do RCV 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) em diferentes concentrações (0, 5 e 10 µM) na embriogênese somática a partir de embriões zigóticos imaturas de *P. echinata*. O controle (sem 2,4-D) apresentou calos embriogênicos e evolução da embriogênese somática até a fase de codiforme, enquanto os tratamentos com 2,4-D produziram apenas calos sem características embriogênicas. Aos 120 dias, a maior indução de calos foi obtida com 5 µM de 2,4-D (95,55%), seguida de 10 µM (80,04%), enquanto o controle apresentou 13,33%. Os resultados demonstram o potencial embriogênico de embriões zigóticos imaturos de *P. echinata*, com formação de estruturas embriogênicas e desenvolvimento até a fase de codiforme na ausência de 2,4-D.Tais achados fornecem a otimização de protocolos de propagação e conservação *in vitro* desta espécie de elevado valor ecológico e cultural.
Palavras-chave: 2,4-diclorofenoxiacético.embriões somáticos .micropropagação. pau-brasil.

Área do Conhecimento: Ciências biológicas. Fisiologia.

Introdução

Paubrasilia echinata (Lam.) Gagnon, H.C.Lima & G.P.Lewis, conhecida como pau-brasil, é uma espécie arbórea, endêmica da Mata Atlântica brasileira, e é considerada árvore símbolo do país (Borges et al., 2008; Rees et al., 2023). Apesar da elevada importância histórica e ecológica (Silvers, Michael, 2025), a espécie sofreu intensa exploração e encontra-se classificada como “em perigo de extinção” pela Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da International Union for Conservation of Nature (IUCN, 2016) desde 1998, e pela Lista Vermelha de Ameaça da Flora Brasileira do Ministério do Meio Ambiente (Brasil, 2022).

A cultura de tecidos vegetais *in vitro* constitui uma estratégia eficiente para a propagação em larga escala e conservação de espécies ameaçadas como o pau-brasil (Jaiswal et al., 2022; Schueler et al., 2026). Dentre as técnicas de cultivo *in vitro*, a embriogênese somática destaca-se como a mais promissora para fins de conservação, por possibilitar a regeneração massal de indivíduos geneticamente idênticos à planta-matriz, além de aplicações complementares como a produção de sementes sintéticas, a criopreservação de genótipos e a formação de bancos de germoplasma *in vitro* (Méndez-Hernández et al., 2019).

Embora estudos anteriores tenham relatado a indução de calos e a formação de estruturas com características embriogênicas em *P. echinata*, a resposta embriogênica ainda é dependente das condições de cultivo, especialmente da origem e do estágio de desenvolvimento do explante e da concentração de reguladores de crescimento vegetal (RCV).

No caso de *P. echinata*, os estudos disponíveis concentram-se na calogênese a partir de explantes foliares (Werner et al., 2009, 2010) e de ovários florais (Scotá et al., 2025), permanecendo escassos os estudos sobre a indução de calos embriogênicos a partir de embriões zigóticos imaturos sob diferentes concentrações de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético). Nesse contexto, a utilização de

sementes imaturas em estádios iniciais de desenvolvimento pode representar uma estratégia promissora, uma vez que tecidos jovens tendem a apresentar maior responsividade a estímulos morfogênicos *in vitro* (Costa et al., 2026; Yang et al., 2012), contribuindo para o aprimoramento de protocolos de propagação e conservação da espécie.

Diante dessa lacuna, o presente estudo teve como objetivo avaliar a indução de calos embriogênicos em embriões zigóticos de sementes imaturas de *P. echinata*, coletadas três semanas após a antese, sob diferentes concentrações de 2,4-D (0, 5 e 10 µM), visando contribuir para a otimização de protocolos de propagação e conservação da espécie.

Metodologia

Frutos de *P. echinata,* coletadas três semanas após antese, foram utilizadas como explantes. O processo de desinfestação foi realizado em câmara de fluxo laminar. As bagas contendo as sementes foram inicialmente lavadas com água corrente e detergente neutro, seguidas de enxágue com água comum para remoção dos resíduos. Em seguida, foram imersas em álcool 70% (v/v) por 1 minuto e, posteriormente, em hipoclorito de sódio (NaClO) a 2,5% de cloro ativo (Qboa) contendo 0.5 g L^{-1} do fungicida Captan, por 60 min. Após esse tratamento, as bagas foram enxaguadas 5 vezes com água de osmose autoclavada. Ao final as bagas foram abertas e os embriões zigóticos (EZ) (sementes imaturas) foram inoculadas em placas de Petri contendo 10.0 mL de meio de cultura MS (Murashige and Skoog, 1962), preparado com 4.4 g L^{-1} dos sais, suplementado com 30.0 g L^{-1} de sacarose e 2.8 g L^{-1} de Phytagel, e ajuste do pH para 5.8± 0.1 antes da autoclavagem. Os EZ foram submetidos a três tipos de meios: meio controle (sem RCV), ou então suplementado com o RCV 2,4-D nas concentrações de 5.0 e 10.0 µM.

Após 60, 90 e 120 dias foi avaliado a porcentagem de calos não embriogênicos, e de calos embriogênicos. O experimento foi em DIC (delineamento inteiramente casualizado) com 15 repetições, sendo cada repetição constituída de 3 explantes cada.

Para as análises estatísticas, inicialmente, os pressupostos de normalidade dos erros e homogeneidade das variâncias de cada variável foram verificados pelo teste de Shapiro-Wilk e Bartlett, respectivamente. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguida do teste de médias de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Todas as análises estatísticas foram realizadas no software RStudio (versão 2025.5.0), com o pacote "ExpDes.pt", versão 1.2.2.

Resultados

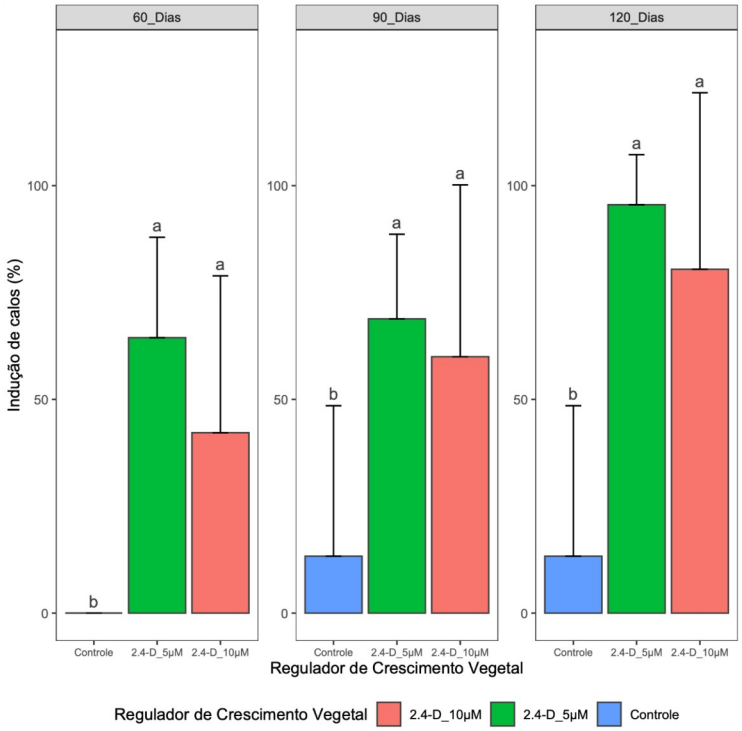
A análise de variância (ANOVA) revelou diferença estatística significativa entre os embriões zigóticos de *P. echinata* cultivados sob diferentes meios (Controle, 2,4-D 5 µM e 2,4-D 10 µM) quanto à indução de calos (Fig.1).

Aos 60 dias, os meios suplementados com 2,4-D apresentaram maior indução de calos, com 64,44% para 5 µM e 42,22% para 10 µM, sendo estatisticamente superiores ao controle, que não apresentou formação de calos (0%). As concentrações de 5 e 10 µM de 2,4-D não diferiram estatisticamente entre si (Fig. 1). Aos 90 dias, a indução de calos aumentou para 68,88% e 60,00% nos meios contendo 5 e 10 µM de 2,4-D, respectivamente, mantendo-se estatisticamente iguais entre si e superiores ao controle (13,33%) (Fig. 1). Aos 120 dias, o meio suplementado com 5 µM de 2,4-D apresentou a maior indução média de calos (95,55%), sendo estatisticamente igual ao tratamento com 10 µM (80,04%) e superior ao controle (13,33%) (Fig. 1).

Assim, embora a adição de 2,4-D tenha promovido maior formação de calos ao longo do cultivo, o aumento da concentração de 5 para 10 µM não resultou em diferença significativa na resposta calogênica em nenhum dos períodos avaliados.

Figura 1 - Indução de calos (%) em embriões zigóticos de *P. echinata* provenientes de sementes imaturas, coletadas três semanas após a antese, sob diferentes concentrações de 2,4-D (0, 5 e 10 µM), aos 60, 90 e 120

dias de cultivo. Barras representam as médias (n = 15). Letras iguais indicam ausência de diferença pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).



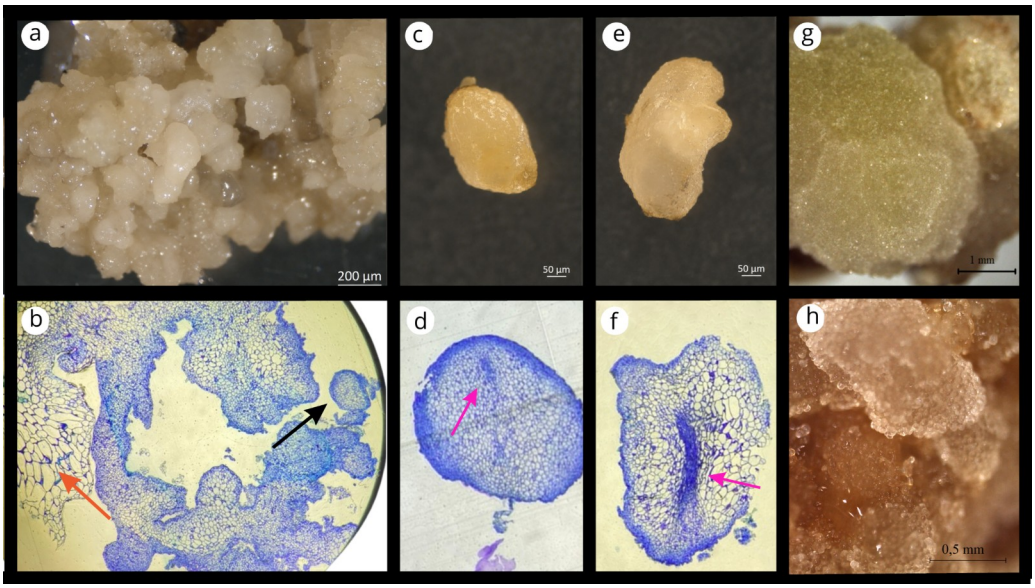
Fonte: O autor, 2026.

Em relação à caracterização morfológica dos calos, somente aqueles formados no meio-controle apresentaram características embriogênicas (Fig. 2c-d). Nos tratamentos suplementados com 2,4-D, os calos apresentaram maior proliferação, porém não exibiram características embriogênicas (Fig. 2g-h).

A avaliação morfológica evidenciou diferenças entre os calos quanto à organização e à aparência das estruturas formadas. Os calos cultivados no meio-controle apresentaram coloração predominantemente creme, superfície nodular e formação de agregados celulares de diferentes tamanhos (Fig. 2a). Em secção histológica, foram observadas regiões com maior organização celular e formação de estruturas individualizadas, caracterizando áreas de natureza embriogênica (Fig. bB). Entre essas estruturas, foram identificados embriões somáticos no estádio globular, com formato aproximadamente esférico e células organizadas ao redor da região central, onde foi observada a região do feixe vascular (Fig. 2c-d).

No estádio codiforme, observou-se o alongamento da estrutura embrionária e maior diferenciação da organização interna dos tecidos, com a presença da região correspondente ao feixe vascular (Fig. 2e-f). Em contraste, os calos obtidos nos meios suplementados com 2,4-D apresentaram organização celular menos definida e aspecto granular, sem a formação de estruturas embrionárias individualizadas (Fig. 2g-h), sendo caracterizados como calos não embriogênicos.

Figura 2- Aspectos morfológicos e histológicos de calos e embriões somáticos. (A–B) Calos embriogênicos cultivados em meio controle; (C–D) embrião somático no estádio globular; (E–F) embrião somático no estádio codiforme; (G–H) calos não embriogênicos.



Fonte: O autor, 2026. Seta preta: indica região de calo embriogênico (b); Seta vermelha: indica região de calo não embriogênico (b); Setas rosas: indicam a região do feixe vascular no embrião globular (d) e codiforme (f).

Discussão

O protocolo de indução de calos, obtenção de calos embriogênicos e formação de ES foi eficiente. Todavia, apenas o meio controle apresentou características embriogênicas e evolução de alguns embriões globulares até o estádio de codiforme, conforme apresentado na Figura 2, e os meios suplementados com 2,4-D desenvolvem calos não embriogênicos.

O uso RCV 2,4-D para a etapa de indução de calos e embriogênese somática é comum em diversos protocolos com diferentes espécies (Werner et al., 2009; Fehér, 2015; Garcia et al., 2019). Contudo, para algumas espécies, e relatado para *P. echinata* (Werner et al., 2009, Scotá et al. 2025), concentrações elevadas ou exposição prolongada ao RCV favorecem a desdiferenciação e divisão celular e formação de calos não embriogênicos, corroborando ao nosso estudo.

Alguns estudos apontam sucesso na indução de ES ao remover o tecido caloso da exposição prolongada ao RCV 2,4-D e transferência para um novo meio (Kim et al., 2003). Esses estudos alegam que o uso do 2,4-D é necessário apenas para um primeiro impulso e aquisição da competência morfogênica (Kim et al., 2003; Sharma et al., 2008; Karami et al., 2023), e após a retirada desse meio é que acontece de fato indução de ES *in vitro*. Os resultados encontrados neste estudo evidenciam que a exposição prolongada ao RCV 2,4-D de fato favorece apenas a formação de calos não embriogênicos, e portanto, novos testes seriam necessários para verificar se a retirada dos calos do meio contendo o RCV surtiria efeito na formação de calos embriogênicos.

Por outro lado, embora diversos protocolos em Fabaceae especialmente em leguminosas como *Acacia catechu* e *Acacia confusa* dependam do 2,4-D para a indução de calos embriogênicos (Nanda et al., 2003;Arumugam et al., 2019), nosso estudo com as espécie *P. echinata* nos leva a crer que o uso de explantes jovens, como EZ imaturos, cultivados em meio MS, suplementado com 30 g L^{-1} seja o caminho mais próximo para o estabelecimento de um protocolo de sucesso de embriogênese somática *in vitro* para *P. echinata.*

Os resultados encontrados neste estudo corroboram com Fehér et al. (2003) e Jiménez e Thomas (2005), que relataram a indução de ES *in vitro* a partir de explantes jovens, e atribuindo o sucesso possivelmente as características endógenas desses tecidos, por já possuírem um nível mais elevado de hormônio vegetal e também como uma resposta ao ambiente *in vitro*, considerado estressante.

Esse resultado reforça que, embora o 2,4-D exerça papel central na indução da calogênese na maioria dos protocolos descritos na literatura, sua exigência não é universal, variando consideravelmente entre espécies e até entre genótipos de uma mesma espécie.

Portanto, essa variação encontrada das respostas dos explantes *in vitro* reforça a necessidade de novos estudos, a fim de estabelecer protocolos específicos (Jaiswal et al., 2022) para cada espécie em estudo, incluindo a arbórea desse estudo *P. echinata*.

Conclusão

Embora a suplementação com 2,4-D estimule significativamente a proliferação de calos em EZ de *P. echinata*, a competência embriogênica manifestou-se de forma exclusiva na ausência do regulador. Isso evidencia que a elevada produção de massa calogênica não garante a qualidade morfogênica do tecido. Conclui-se, portanto, que o meio isento de 2,4-D constitui a estratégia mais adequada para a indução de calos embriogênicos em *P. echinata*, otimizando os protocolos de propagação *in vitro* direcionados à conservação desta espécie ameaçada da Mata Atlântica.

Referências

ARUMUGAM, S. et al. *In vitro* plant regeneration from immature leaflets derived callus of *Acacia confusa* Merr via organogenesis. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology,** v. 18, p. 197–201, 2009. DOI: https://doi.org/10.1007/BF03263319

BORGES, L. A. et al. Phenology, pollination, and breeding system of the threatened tree *Caesalpinia echinata* Lam. (Fabaceae), and a review of studies on the reproductive biology in the genus. **Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants, [**S. l.], v. 204, n. 2, p. 111-130, 2009. DOI: https://doi.org/10.1016/j.flora.2008.01.003

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Portaria MMA nº 148, de 7 de junho de 2022. Altera os Anexos da Portaria nº 443, de 17 de dezembro de 2014, da Portaria nº 444, de 17 de dezembro de 2014, e da Portaria nº 445, de 17 de dezembro de 2014. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, ed. 108, p. 74, 8 jun. 2022.

COSTA, A. D. et al. Developmental stage dictates the morphogenetic competence of royal poinciana [*Delonix regia* (Bojer ex Hook.) Raf.] cotyledons. **Trees**, [S. l.], v. 40, p. 29, 2026. DOI: https://doi.org/10.1007/s00468-025-02715-w.

FEHÉR, A. Somatic embryogenesis — stress-induced remodeling of plant cell fate. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) — Gene Regulatory Mechanisms,** [S. l.], v. 1849, n. 4, p. 385–402, 2015. DOI: https://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2014.07.005

GARCIA, C. et al. Abnormalities in somatic embryogenesis caused by 2,4-D: an overview. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture,** [S. l.], v. 137, p. 193–212, 2019. DOI: https://doi.org/10.1007/s11240-019-01569-8

IUCN. **The IUCN Red List of Threatened Species**. Version 2016. Gland, Switzerland: IUCN, 2016. Disponível em: https://www.iucnredlist.org. Acesso em: 7 set. 2026.

JAISWAL, P. et al. Plant tissue culture in tree species. In: RAI, A. C. et al. (ed.). **Advances in plant tissue culture.** [S. l.]: Academic Press, 2022. p. 345-356. DOI: https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90795-8.00020-5

JIMÉNEZ, V. M.; THOMAS, C. Participation of plant hormones in determination and progression of somatic embryogenesis. In: **Somatic embryogenesis.** Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2005. p. 103-118.

KARAMI, O. et al. Endogenous auxin maintains embryonic cell identity and promotes somatic embryo development in *Arabidopsis*. **The Plant Journal,** [S. l.], v. 113, n. 1, p. 7–22, 2023. DOI: https://doi.org/10.1111/tpj.16024

KIM, S. W.; OH, S. C.; LIU, J. R. Control of direct and indirect somatic embryogenesis by exogenous growth regulators in immature zygotic embryo cultures of rose. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**,

[S. l.], v. 74, p. 61–66, 2003. DOI: https://doi.org/10.1023/A:1023355729046

MÉNDEZ-HERNÁNDEZ, H. A. et al. Signaling Overview of Plant Somatic Embryogenesis. **Frontiers in Plant Science,** [S. l.], v. 10, art. 77, 2019. DOI: https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00077

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum,** v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962. DOI: https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x

NANDA, R. M.; ROUT, G. Embriogênese somática *in vitro* e regeneração de plantas em *Acacia arabica*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, [S. l.], v. 73, p. 131–135, 2003. DOI: https://doi.org/10.1023/A:1022858118392

REES, M. et al. Phylogenomic and morphological data reveal hidden patterns of diversity in the national tree of Brazil, *Paubrasilia echinata*. **American Journal of Botany**, [S. l.], v. 110, n. 11, e16241, 2023. DOI: https://doi.org/10.1002/ajb2.16241

SCHUELER, J. O. et al. Espectro de luz e tipo de explante impulsionam a reprogramação hormonal e proteômica na micropropagação da espécie ameaçada *Paubrasilia echinata*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 164, p. 49, 2026. DOI: https://doi.org/10.1007/s11240-026-03347-9

SCOTÁ, M. B. et al. Indução *in vitro* de calos em ovários florais de *Paubrasilia echinata*. In: ENCONTRO LATINO-AMERICANO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 24., 2025, São José dos Campos. **Anais** [...]. São José dos Campos: Universidade do Vale do Paraíba, 2025. v. 61.

SHARMA, S. K. et al. Molecular regulation of somatic embryogenesis in potato: an auxin led perspective. **Plant Molecular Biology,** [S. l.], v. 68, p. 185–201, 2008. DOI: https://doi.org/10.1007/s11103-008-9360-2

SILVERS, M. Pernambuco: Listening for “the Very Substance of America”. In: GRIBENSKI, F.; PANTALONY, D.; TKACZYK, V. (ed.). **Unsound Supplies**: Noisy Matter and the Making of Modern Soundscapes. Nova York: Oxford Academic, 2025. DOI: https://doi.org/10.1093/9780197814611.003.0007

WERNER, E. T. et al. Controle da calogênese do pau-brasil *in vitro*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 33, n. 6, p. 987–996, 2009.

WERNER, E. T. et al. Meios de cultura, reguladores de crescimento e fontes de nitrogênio na regulação da calogênese do pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.). **Acta Botanica Brasilica, [**S. l.], v. 24, n. 4, p. 1046–1051, 2010.

YANG, L.; LI, Y.; SHEN, H. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryo cultures of mountain ash (*Sorbus pohuashanensis*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture, [**S. l.], v. 109, p. 547–556, 2012. DOI: https://doi.org/10.1007/s11240-012-0121-1

Agradecimentos

Este trabalho contou com o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES), por meio da concessão de bolsa (040/2023) e do financiamento (T.O. nº 860/2023).