CULTURA DE TECIDOS DE *Cannabis sativa*: REGENERAÇÃO, RECALCITRÂNCIA E ESTABILIDADE, UMA REVISÃO DE LITERATURA

Nicole Lima dos Santos, Rodrigo Alves Catein, Ana Luiza Assis Semonato, João Paulo de Morais Oliveira, Elias Terra Werner, Milene Miranda Praça Fontes

Universidade Federal do Espírito Santo, Campus de Alegre, Alto Universitário, s/n, Bairro Guararema – 29500-000 – Alegre-ES, Brasil; nicolels3@icloud.com, rodrigo.catein@edu.ufes.br, alassissemonato@gmail.com, joaopaulo.ueg@gmail.com, elias.werner@ufes.br, milenemiranda@yahoo.com.br

Resumo

Este estudo analisou a regeneração, a recalcitrância e a estabilidade de *Cannabis sativa* cultivada *in vitro* por meio de revisão de literatura com busca estruturada realizada até setembro de 2026. Quinze estudos experimentais compuseram a síntese comparativa. A regeneração mostrou-se dependente do genótipo, do explante e das condições de cultivo, com baixa reprodutibilidade de alguns protocolos entre materiais genéticos, embora abordagens recentes tenham alcançado 70–90% de regeneração de novo em diferentes genótipos. Quanto à estabilidade, marcadores convencionais indicaram elevada uniformidade clonal, enquanto métodos genômicos e epigenéticos de maior resolução detectaram variantes e alterações de metilação associadas ao cultivo e aos subcultivos. Conclui-se que protocolos para *C. sativa* devem integrar eficiência regenerativa, abrangência genotípica, confirmação da origem dos brotos e avaliação genética e epigenética do material regenerado.

Palavras-chave: Micropropagação. Organogênese. Competência regenerativa. Variação somaclonal. Epigenética.

Área do Conhecimento: Ciências biológicas - Botânica.

Introdução

O interesse medicinal e biotecnológico em *Cannabis sativa* tem impulsionado o desenvolvimento de estratégias de propagação, conservação e melhoramento *in vitro*, especialmente para a manutenção de materiais clonais e aplicação de técnicas de transformação genética e edição genômica (Monthony *et al*., 2021b; Hesami *et al*., 2021). Nesse contexto, a cultura de tecidos permite a propagação clonal, a conservação de germoplasma e o desenvolvimento de diferentes aplicações biotecnológicas em *C. sativa* (Monthony *et al*., 2021b; Hesami *et al*., 2021). Para estratégias de transformação genética e edição genômica, sistemas eficientes de regeneração *de novo* são particularmente importantes, pois a recuperação de plantas modificadas depende da reprogramação celular e da regeneração de novos tecidos e órgãos (Ikeuchi *et al*., 2019; Bennur *et al*., 2025). Entretanto, *C. sativa* apresenta recalcitrância regenerativa e respostas fortemente influenciadas pelo genótipo, pelo explante e pelas condições de cultivo (Galán-Ávila *et al*., 2020; Monthony *et al*., 2021a; Bennur *et al*., 2025).

Essa dependência constitui uma importante limitação à reprodutibilidade dos protocolos. Monthony *et al.* (2021a) não conseguiram reproduzir em dez genótipos medicinais a elevada regeneração anteriormente descrita para um único genótipo, apesar da indução de calos em todos os materiais avaliados. Galán-Ávila *et al.* (2020) também demonstraram diferenças expressivas na capacidade regenerativa entre explantes e cultivares. Em contraste, Bennur *et al.* (2025) obtiveram regeneração *de novo* entre 70% e 90% em nove materiais genéticos utilizando nós cotiledonares, com a origem dos novos brotos confirmada histologicamente, indicando avanços recentes na ampliação da aplicabilidade entre genótipos.

Além da eficiência regenerativa, a estabilidade do material mantido *in vitro* representa um aspecto relevante para a propagação clonal de *C. sativa*. Variações na metilação do DNA foram identificadas entre clones cultivados *in vitro* por Boissinot *et al.* (2024), enquanto Adamek *et al.* (2024) detectaram 9.405 variantes genéticas e associação positiva entre seu acúmulo e o número de subcultivos. Kastelec *et al.* (2025) verificaram hipometilação progressiva durante a micropropagação, e Lefebvre *et al.* (2026)

observaram maior ocorrência de alterações genéticas no estabelecimento e nos primeiros subcultivos, além de padrões epigenéticos dependentes da cultivar.

Diante disso, este estudo teve como objetivo analisar criticamente a regeneração, a recalcitrância e a estabilidade de *C. sativa* cultivada *in vitro*, identificando fatores associados à eficiência, à reprodutibilidade e à estabilidade dos protocolos descritos na literatura.

Metodologia

Realizou-se uma revisão de literatura com busca estruturada nas bases Scopus, Web of Science Core Collection, CAB Abstracts, AGRICOLA, PubMed/MEDLINE e SciELO, complementada pelo Google Acadêmico, com buscas realizadas até setembro de 2026. Não foi estabelecido limite temporal, sendo considerados artigos em português e inglês. Utilizaram-se combinações dos termos "*Cannabis sativa*", "tissue culture", micropropagation, "*in vitro* regeneration", organogenesis, "somatic embryogenesis", recalcitrance, "genetic stability", "somaclonal variation", epigenetic, methylation e ploidy, além dos equivalentes em português.

Incluíram-se artigos experimentais originais que investigaram regeneração, competência regenerativa, recalcitrância ou estabilidade genética, epigenética, citológica ou fitoquímica de *Cannabis sativa* cultivada *in vitro*. Excluíram-se revisões, capítulos, resumos, estudos sem texto completo e trabalhos restritos à germinação, ao enraizamento, à indução de calos ou à multiplicação axilar sem avaliação dos desfechos definidos; gemas preexistentes não foram consideradas regeneração de novo. Após a remoção de duplicatas por DOI e título, realizou-se a triagem de títulos e resumos, seguida da leitura integral. Ao final, 15 estudos experimentais compuseram a síntese comparativa. Extraíram-se genótipos, explante, via regenerativa, meio e reguladores, eficiência, aclimatização, abrangência genotípica e método de avaliação da estabilidade.

A síntese foi organizada nos eixos regeneração/recalcitrância e estabilidade, comparando resultados, limitações e divergências para identificar lacunas e propor critérios para protocolos eficientes, reproduzíveis entre genótipos e biologicamente estáveis.

Resultados

A comparação dos estudos demonstrou elevada influência do genótipo, do explante e do meio de cultura sobre a regeneração de *Cannabis sativa* (Tabela 1). O maior resultado foi obtido por Lata *et al.* (2010b) em um único genótipo medicinal, mas não foi reproduzido em dez genótipos por Monthony *et al.* (2021a). Os ensaios com diferentes cultivares também apresentaram respostas variáveis (Cheng *et al.*, 2016; Galán-Ávila *et al.*, 2020; Sorokin; Kovalchuk, 2025), enquanto Bennur *et al.* (2025) alcançaram regeneração *de novo* entre 70% e 90% nos nove materiais avaliados.

Tabela 1 – Comparação dos estudos sobre regeneração e recalcitrância de *Cannabis sativa*.

Estudo	Genótipo e explante	Via regenerativa	Meio/PGR principal	Regeneração e reprodutibilidade
Lata *et al.* (2010b)	Clone medicinal MX; folha	Organogênese indireta via calo	MS + 0,5 µM NAA + 1,0 µM TDZ; indução com 0,5 µM TDZ	96% de resposta e 12,3 brotos por explante; avaliado em apenas um genótipo
Cheng *et al.* (2016).	Oito cultivares de cânhamo; cotilédones de 2–3 dias	Formação direta de brotos	MS + 0,4 mg L^{-1} TDZ + 0,2 mg L^{-1} NAA	Regeneração de 35,7% a 54,8%; resposta parcialmente dependente do genótipo
Galán-Ávila *et al.* (2020)	Cinco cultivares; hipocótilos, cotilédones e folhas	Organogênese direta	ZEA^{RIB} isolada ou associada ao NAA	49,45% em hipocótilos, 4,70% em cotilédones e 0,42% em folhas; influência significativa da cultivar, do explante e do meio

Estudo	Genótipo e explante	Via regenerativa	Meio/PGR principal	Regeneração e reprodutibilidade
Monthony *et al.* (2021a)	Dez genótipos medicinais; folhas	Organogênese indireta tentada	MS + 1,0 µM TDZ + 0,5 µM NAA; indução com 0,5 µM TDZ	100% de calogênese e 0% de organogênese; protocolo anterior não reproduzido
Hesami *et al.* (2023)	Genótipo UP305; calos foliares	Competência embriogênica investigada	Não se aplica à análise transcriptômica	Regeneração não quantificada; 6.118 genes diferencialmente expressos; diferenças envolvendo sinalização hormonal e regulação epigenética entre tipos de calo.
Sorokin e Kovalchuk (2025)	Diferentes cultivares; hipocótilos com ou sem nó cotiledonar e meristema apical	Formação de brotos com contribuição de meristemas preexistentes	MS + 0,4 mg L^{-1} TDZ + 0,2 mg L^{-1} NAA	Maior resposta com nó cotiledonar e meristema preservados; resposta variável entre cultivares
Bennur *et al.* (2025)	Seis cultivares de cânhamo e três linhagens medicinais; nó cotiledonar ligado ao cotilédone	Organogênese direta *de novo*, confirmada histologicamente	MS + 0,4 mg L^{-1} TDZ + 0,2 mg L^{-1} NAA durante 7–14 dias	Regeneração de 70% a 90% e sete brotos por explante responsivo; elevada resposta nos nove materiais

Fonte: Elaborada pelos autores (2026).

Os explantes juvenis apresentaram maior competência regenerativa, destacando-se cotilédones, hipocótilos e nós cotiledonares (Cheng *et al.*, 2016; Galán-Ávila *et al.*, 2020; Bennur *et al.*, 2025). As combinações de TDZ e NAA foram recorrentes, embora a resposta permaneça dependente do material vegetal (Lata *et al.*, 2010b; Cheng *et al.*, 2016; Sorokin; Kovalchuk, 2025; Bennur *et al.*, 2025). A preservação de meristemas preexistentes também elevou a formação de brotos em alguns protocolos, sem representar necessariamente regeneração *de novo* (Sorokin; Kovalchuk, 2025). Em nível molecular, Hesami *et al.* (2023) identificaram diferenças na expressão de genes relacionados à sinalização hormonal, à embriogênese e à remodelação da cromatina entre diferentes tipos de calos.

A estabilidade apresentou resultados distintos conforme a dimensão e o método avaliados (Tabela 2). Marcadores ISSR e SSR, citometria de fluxo e análises fitoquímicas indicaram manutenção da identidade nos materiais examinados (Lata *et al.*, 2010a; Ioannidis *et al.*, 2020; Ioannidis *et al.*, 2022; Dreger *et al.*, 2025). Em contraste, métodos de maior cobertura detectaram regiões de metilação polimórficas, hipometilação progressiva e acúmulo de variantes associado ao número de subcultivos (Boissinot *et al.*, 2024; Adamek *et al.*, 2024; Kastelec *et al.*, 2025; Lefebvre *et al.*, 2026). Portanto, a ausência de alterações detectadas por métodos convencionais não implica necessariamente estabilidade genômica e epigenética ampla.

Tabela 2 – Comparação dos estudos sobre estabilidade de *Cannabis sativa* cultivada ou regenerada *in vitro*.

Estudo	Material avaliado	Tempo/ subcultivos	Dimensão	Método	Resultado
Lata *et al.* (2010a)	Clone medicinal MX micropropagado	30 subcultivos e oito meses de aclimatização	Genética e fitoquímica	ISSR e GC-FID	115 bandas monomórficas e perfil de canabinoides semelhante à planta-matriz

Estudo	Material avaliado	Tempo/ subcultivos	Dimensão	Método	Resultado
Ioannidis *et al.* (2020)	Variedades com altos teores de CBD e CBG	Do estabelecimento *in vitro* à maturidade	Fitoquímica	RMN quantitativa de ^{1}H	Ausência de diferenças significativas em CBD/CBDA e CBG/CBGA
Ioannidis *et al.* (2022)	Plantas micropropagadas e regeneradas via calo	Após aclimatização	Genética	12 marcadores SSR	Perfis monomórficos em relação às plantas-matrizes
Boissinot *et al.* (2024)	78 clones de duas linhagens	Seis a 11 subcultivos	Epigenética	CREAM	2.272 regiões metiladas polimórficas, com padrões associados às linhagens
Adamek *et al.* (2024)	70 clones de cannabis medicinal tipo I	Seis a 11 subcultivos	Genética	3D-GBS	9.405 variantes; acúmulo positivamente associado ao número de subcultivos
Kastelec *et al.* (2025)	Cinco genótipos medicinais	Primeiro e quinto subcultivos	Epigenética	MSAP-Seq	Hipometilação progressiva durante a permanência *in vitro*
Dreger *et al.* (2025)	Linhagens de ‘Epsilon 68’, ‘Henola’ e ‘Carmagnola’ × ‘K 290’	Algumas mantidas por mais de seis anos	Genética e citológica	ISSR e citometria de fluxo	Ausência de variação detectável pelos métodos empregados
Lefebvre *et al.* (2026)	‘Critical Purple Kush’, ‘Green Crack’ e ‘Gelato’	60 semanas; subcultivos a cada três semanas	Genética e epigenética	3D-GBS e EM-seq	Alterações concentradas no estabelecimento e nos cinco primeiros subcultivos; padrões epigenéticos dependentes da cultivar

Fonte: Elaborado pelos autores.

Discussão

Os estudos analisados confirmam que a regeneração *in vitro* de *C. sativa* é fortemente condicionada pelo genótipo, pelo explante e pelas condições de cultivo. O elevado desempenho obtido por Lata *et al.* (2010b) em um único genótipo não foi reproduzido por Monthony *et al.* (2021a) em dez genótipos medicinais, apesar do uso de condições semelhantes, evidenciando a baixa transferibilidade de determinados protocolos. Essa dependência também foi observada por Galán-Ávila *et al.* (2020), enquanto Bennur *et al.* (2025) obtiveram regeneração *de novo* de 70–90% em nove materiais genéticos utilizando nós cotiledonares. Assim, embora combinações envolvendo TDZ e NAA sejam recorrentes, sua eficiência não pode ser considerada universal. Esse comportamento é coerente com os mecanismos gerais da regeneração vegetal, nos quais competência celular, estado de desenvolvimento do explante, sinalização hormonal e reprogramação transcricional e epigenética determinam a capacidade regenerativa (Ikeuchi *et al.*, 2019; Sugimoto *et al.*, 2019).

A maior competência observada em explantes juvenis, especialmente cotilédones, hipocótilos e nós cotiledonares, reforça a influência do estado de desenvolvimento do tecido sobre a regeneração (Cheng *et al.*, 2016; Galán-Ávila *et al.*, 2020; Bennur *et al.*, 2025). Entretanto, a formação de brotos associada

à preservação de gemas ou meristemas preexistentes deve ser distinguida da organogênese *de novo*, pois pode resultar do desenvolvimento de estruturas previamente determinadas, como observado por Sorokin e Kovalchuk (2025). Nesse sentido, a confirmação histológica da origem *de novo* dos brotos por Bennur *et al.* (2025) constitui um avanço relevante para a obtenção de sistemas regenerativos independentes de meristemas preexistentes.

Os resultados de estabilidade mostram que a ausência de variação depende da dimensão e da resolução do método empregado. ISSR, SSR, citometria de fluxo e análises fitoquímicas indicaram elevada uniformidade entre materiais micropropagados e suas plantas-matrizes (Lata *et al.*, 2010a; Ioannidis *et al.*, 2020; Ioannidis *et al.*, 2022; Dreger *et al.*, 2025). Em contraste, abordagens genômicas e epigenéticas de maior cobertura detectaram regiões diferencialmente metiladas, hipometilação progressiva e acúmulo de variantes associado aos subcultivos (Boissinot *et al.*, 2024; Adamek *et al.*, 2024; Kastelec *et al.*, 2025; Lefebvre *et al.*, 2026). Esses resultados não são necessariamente contraditórios, pois diferentes métodos avaliam níveis distintos de variação. Assim, a avaliação de protocolos para *C. sativa* deve integrar eficiência regenerativa, abrangência genotípica, origem dos brotos, reprodutibilidade e estabilidade genética e epigenética.

Conclusão

A regeneração *in vitro* de *C. sativa* permanece dependente do genótipo, do tipo de explante e das condições de cultivo, o que limita a aplicação universal de protocolos previamente descritos. Explantes juvenis e sistemas capazes de promover regeneração *de novo* apresentam maior potencial para ampliar a reprodutibilidade entre materiais genéticos. Além disso, a estabilidade do material cultivado *in vitro* deve ser avaliada de forma multidimensional, uma vez que métodos de maior resolução podem revelar alterações genéticas e epigenéticas não detectadas por marcadores convencionais. Assim, protocolos eficientes para *C. sativa* devem integrar alta capacidade regenerativa, abrangência genotípica, confirmação da origem dos brotos e avaliação adequada da estabilidade do material regenerado.

Referências

ADAMEK, K.; JONES, A. M. P.; TORKAMANEH, D. Somatic mutation accumulations in micropropagated cannabis are proportional to the number of subcultures. **Plants**, v. 13, n. 14, 1910, 2024. DOI: 10.3390/plants13141910.

BENNUR, P. L. *et al.* Genotype-independent *de novo* regeneration protocol in *Cannabis sativa* L. through direct organogenesis from cotyledonary nodes. **Plant Methods**, v. 21, 145, 2025. DOI: 10.1186/s13007-025-01468-4.

BOISSINOT, J. *et al.* Comparative restriction enzyme analysis of methylation (CREAM) reveals methylome variability within a clonal *in vitro* cannabis population. **Frontiers in Plant Science**, v. 15, 1381154, 2024. DOI: 10.3389/fpls.2024.1381154.

CHENG, C. *et al.* A rapid shoot regeneration protocol from the cotyledons of hemp (*Cannabis sativa* L.). **Industrial Crops and Products**, v. 83, p. 61–65, 2016. DOI: 10.1016/j.indcrop.2015.12.035.

DREGER, M. *et al.* Clonal propagation of hemp and assessment of genetic stability in long-term *in vitro* culture. **Industrial Crops and Products**, v. 232, 121242, 2025. DOI: 10.1016/j.indcrop.2025.121242.

GALÁN-ÁVILA, A. *et al.* Development of a direct *in vitro* plant regeneration protocol from *Cannabis sativa* L. seedling explants: developmental morphology of shoot regeneration and ploidy level of regenerated plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, 645, 2020. DOI: 10.3389/fpls.2020.00645.

HESAMI, M. *et al.* Advances and perspectives in tissue culture and genetic engineering of cannabis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 11, 5671, 2021. DOI: 10.3390/ijms22115671.

HESAMI, M. *et al.* Transcriptomic profiling of embryogenic and non-embryogenic callus provides new insight into the nature of recalcitrance in cannabis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 19, 14625, 2023. DOI: 10.3390/ijms241914625.

IKEUCHI, M. *et al.* Molecular mechanisms of plant regeneration. **Annual Review of Plant Biology**, v. 70, p. 377–406, 2019. DOI: 10.1146/annurev-arplant-050718-100434.

IOANNIDIS, K. *et al.* Biotechnological approaches on two high CBD and CBG *Cannabis sativa* L. varieties: *in vitro* regeneration and phytochemical consistency evaluation of micropropagated plants using quantitative ^{1}H-NMR. **Molecules**, v. 25, n. 24, 5928, 2020. DOI: 10.3390/molecules25245928.

IOANNIDIS, K. *et al.* Genetic evaluation of *in vitro* micropropagated and regenerated plants of *Cannabis sativa* L. using SSR molecular markers. **Plants**, v. 11, n. 19, 2569, 2022. DOI: 10.3390/plants11192569.

KASTELEC, D. *et al.* Optimization of micropropagation protocols and assessment of epigenetic changes in tissue cultures of diverse medical cannabis (*Cannabis sativa* L.) genotypes. **Industrial Crops and Products**, v. 229, 121015, 2025. DOI: 10.1016/j.indcrop.2025.121015.

LATA, H. *et al.* Assessment of the genetic stability of micropropagated plants of *Cannabis sativa* by ISSR markers. **Planta Medica**, v. 76, n. 1, p. 97–100, 2010a. DOI: 10.1055/s-0029-1185945.

LATA, H. *et al.* High frequency plant regeneration from leaf derived callus of high Δ9-tetrahydrocannabinol yielding *Cannabis sativa* L. **Planta Medica**, v. 76, n. 14, p. 1629–1633, 2010b. DOI: 10.1055/s-0030-1249773.

LEFEBVRE, V. *et al.* Micropropagation of *Cannabis sativa*: genetic and epigenetic stability assessment over multiple generations. **Journal of Cannabis Research**, v. 8, 43, 2026. DOI: 10.1186/s42238-026-00406-y.

MONTHONY, A. S. *et al.* Recalcitrance of *Cannabis sativa* to *de novo* regeneration: a multi-genotype replication study. **PLOS ONE**, v. 16, n. 8, e0235525, 2021a. DOI: 10.1371/journal.pone.0235525.

MONTHONY, A. S. *et al.* The past, present and future of *Cannabis sativa* tissue culture. **Plants**, v. 10, n. 1, 185, 2021b. DOI: 10.3390/plants10010185.

SOROKIN, A.; KOVALCHUK, I. Development of efficient and scalable regeneration tissue culture method for *Cannabis sativa*. **Plant Science**, v. 350, 112296, 2025. DOI: 10.1016/j.plantsci.2024.112296.

SUGIMOTO, K. *et al.* To regenerate or not to regenerate: factors that drive plant regeneration. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 47, p. 138–150, 2019. DOI: 10.1016/j.pbi.2018.12.002.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Laboratório de Citogenética e Cultura de Tecidos Vegetais (LABCITO) e à Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) pelo apoio acadêmico e institucional ao desenvolvimento deste trabalho, além das instituições CAPES, FAPES, CNPq pelo apoio financeiro.