HISTODIFERENCIAÇÃO DE EMBRIÕES SOMÁTICOS DE *Psychotria nuda* (RUBIACEAE) EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE E DE ÁCIDO ABSCÍSICO

Autores: Karina Pope Mion, Warley Costa Silva, Lara Aparecida de Sá Morais, Geisiele Silva Martins, Gustavo Fernandes Marian, Milene Miranda Praça Fonte, Elias Terra Werner.

[1]Universidade Federal do Espírito Santo, Alto Universitário, S/N Guararema, 29500-000 - Alegre-ES, Brasil, karina.mion@edu.ufes.br, warley.costa.545@gmail.com, lara.morais@edu.ufes.br, martinsgeisiele@gmail.com, gustavo123mariano@hotmail.com, milenemiranda@yahoo.com.br, elias.werner@ufes.br.

Resumo

Psychotria nuda (Cham. & Schltdl.) Wawra, espécie nativa da Mata Atlântica de valor ecológico, medicinal e ornamental, carece de protocolos de propagação por embriogênese somática. Este estudo objetivou estabelecer um protocolo de embriogênese somática indireta *in vitro*. Calos radiculares friáveis, obtidos sem reguladores de crescimento, foram cultivados sob agitação em meio líquido com 3 mg L^{-1} de 2,4-D e 1,5 mg L^{-1} de BAP. Avaliou-se a histodiferenciação quanto à origem do cultivo (líquido e semissólido) e combinações de ABA e sacarose. Os calos apresentaram elevada competência embriogênica, com maior resposta naqueles pré-subcultivados em meio semissólido. O meio MS suplementado com 1 mg L^{-1} de ABA promoveu os maiores índices de indução, histodiferenciação e rendimento de embriões somáticos, seguido do meio com 60 g L^{-1} de sacarose. Análises histológicas confirmaram o desenvolvimento embrionário normal nos estágios cordiforme, torpedo e cotiledonar. Estudos complementares são sugeridos direcionados à regeneração de embriões somáticos.

Palavras-chave: Cultura de tecidos vegetais; propagação vegetativa; regeneração vegetal.

Área do Conhecimento: Ciências Biológicas – Botânica.

Introdução

A família Rubiaceae compreende cerca de 650 gêneros e aproximadamente 13.000 espécies (Robbrecht *et al*., 2012), com ampla distribuição em regiões tropicais (chiquieri *et al*., 2004; Ferreira, 2013). Seu maior gênero, *Psychotria*, reúne cerca de 2.000 espécies (TAYLOR *et al*., 2007), com importância ecológica (Almeida; Alves, 2000), medicinal (Farias, 2006, Leal, 1994) e ornamental (Cabral, 2012; Putri *et al*., 2021). *Psychotria nuda* (Cham. & Schltdl.) Wawra, espécie nativa brasileira típica de florestas ombrófilas densas e ambientes sombreados (Gorenstein, 2007; Prata *et al*., 2011), apresenta flores e frutos importantes para polinizadores e dispersores de sementes (Ferreira, 2013), além de potencial ornamental devido à floração e frutificação constantes e aos frutos de coloração azul-anil (Almeida; Alves, 2000).

A escassez de descrições sobre a propagação e a germinação de sementes do gênero dificulta o reconhecimento desse potencial pela indústria ornamental. Espécies próximas apresentam baixa eficiência germinativa: em *P. ipecacuanha* (Brot.) Stokes a germinação é lenta (até 3 meses) e perde viabilidade após estocagem (Lameira, 2002); em *P. hoffmannseggiana* (Willd. ex Roem. & Schult.) Müll. Arg. ocorre após 88 dias, e em *P. leiocarpa* Cham. & Schlecht o sucesso germinativo é de apenas 66% (Rosa; Ferreira, 2001).

Diante dessas limitações, técnicas de propagação *in vitro*, sobretudo a embriogênese somática, surgem como alternativas promissoras, amplamente empregadas na propagação em larga escala, na conservação de germoplasma e na regeneração de plantas completas (Von Arnold *et al*., 2002; Souza *et al*., 2015), com elevada aplicabilidade para espécies de baixa eficiência germinativa (Giraldo; Trujillo; Gómez, 2015; Zuta-Puscan *et al*., 2025). Para *P. nuda*, os estudos disponíveis concentram-se na propagação por estaquia (Ferreira *et al*., 2013; Nery; Ribas; Koehler, 2014); quanto ao cultivo *in vitro* e à embriogênese somática, as informações restringem-se a outras espécies do gênero, como *P.*

ipecacuanha (Giraldo; Trujillo; Gómez, 2015), *P. acuminata* (Lara; Valverde; Gómez, 2003) e *P. umbellata* (Paranhos *et al*., 2005), que relatam dificuldades na desinfestação e no estabelecimento *in vitro*, mas resultados promissores na indução de calos embriogênicos após essa etapa.

Diante da ausência de protocolos estabelecidos para a embriogênese somática de *P. nuda*, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver um protocolo de histodiferenciação de embriões somáticos da espécie, etapa fundamental para o estabelecimento futuro de um sistema eficiente de embriogênese somática indireta.

Metodologia

O material vegetal utilizado foram calos surgidos de raízes de *P. Nuda*, previamente germinadas *in vitro* no laboratório de Citogenética e Cultura de Tecidos Vegetais da UFES. Foram mantidas em subcultivo em potes contendo 2,2 g L^{-1} de meio de cultivo MS (MS½; Sigma-Aldrich-USA; Murashige, Skoog 1962), acrescido de 15 g L^{-1} de sacarose, 0,1 g L^{-1} de ácido ascórbico e solidificado com 2,8 g L^{-1} de Phytagel® (Sigma-Aldrich-USA), em sala de crescimento e em condições de luz, sob fotoperíodo de 16/8 h (claro/escuro), irradiância de 65 µmol m^{-2} s^{-1} fornecida por duas lâmpadas fluorescentes (20 W, Osram®), a 25 ± 2 °C e cobertas com sombrite 40%.

Para indução da embriogênese somática, calos friáveis de raízes foram transferidos para meio líquido ½ MS suplementado com 15 g L^{-1} de sacarose, 0,1 g L^{-1} de ácido ascórbico, 3 mg L^{-1} de 2,4-D e 1,5 mg L^{-1} de BAP, sob agitação orbital (120 rpm), no escuro, a 25 ± 2 °C, por 60 dias. Após esse período, os explantes foram então divididos em dois tratamentos. Parte do material foi transferida para meio de cultura semissólido, contendo a mesma composição do meio líquido anterior e solidificados com 2,8 g L^{-1} de Phytagel®, sendo mantido no escuro a 25 ± 2 °C, e a outra metade, mantida nas condições supracitadas por 45 dias.

As massas embriogênicas formadas foram então submetidas a meios MS (4,4 g L^{-1}), acrescidos de 0,1 g L^{-1} de ácido ascórbico, 2 g L^{-1} de carvão ativado e 2,8 g L^{-1} de Phytagel, em quatro tratamentos: T1 (45 g L^{-1} de sacarose), T2 (60 g L^{-1} de sacarose), T3 (30 g L^{-1} de sacarose + 1 mg L^{-1} de ABA) e T4 (30 g L^{-1} de sacarose + 2 mg L^{-1} de ABA), com quatro repetições de duas massas embriogênicas por placa, mantidas no escuro a 25 ± 2 °C. O desenvolvimento foi avaliado aos 20 dias quando a indução e aos 40 dias quanto a histodiferenciação a estágio cotiledonar.

Amostras de massas embriogênicas em diferentes estágios foram coletadas para análises histológicas, fixadas em FAA, desidratadas em série alcoólica (30, 50, 70, 90, 100%), infiltradas e emblocadas em historesina Leica. Os cortes de 5 µm foram corados com azul de metileno e fotografados em microscópio óptico ZEISS Axio Scope.A1, com imagens editadas no GIMP e mensuradas no ImageJ. Os dados estatísticos foram submetidos à ANOVA seguida do teste de Scott-Knott ($P < 0,05$), no software RStudio (versão 2025.5.0, pacote "ExpDes.pt" 1.2.2).

Resultados

Os calos friáveis obtidos de raízes cultivadas *in vitro* apresentaram potencial de desenvolvimento em meio líquido, originando massas embriogênicas e embriões somáticos em estágios iniciais após cerca de três semanas. A manutenção do cultivo por dois meses promoveu a proliferação das massas embriogênicas, sem avanço na histodiferenciação nesse período. Após a divisão do material entre meio líquido e semissólido, não foram observadas diferenças morfológicas evidentes entre as condições, indicando que a mudança do estado físico do meio, isoladamente, não foi suficiente para promover a histodiferenciação.

Ao submeter os materiais aos quatro tratamentos de histodiferenciação, observou-se que tanto a origem dos calos quanto a composição do meio influenciaram o desenvolvimento embriogênico (Figura 1). As massas do meio líquido apresentaram desenvolvimento predominantemente restrito ao estágio de calo embriogênico (Figura 1A–E), com reduzida formação de ES. Já as massas do meio semissólido apresentaram maior progressão, evoluindo para embriões nos estágios cordiforme, torpedo e cotiledonar (Figura 1G–J), corroborado pelas análises histológicas (Figura 1K–N): calos embriogênicos com células pequenas e compactas, calos não embriogênicos com células maiores e desorganizadas, além de diferenciação de protoderme e procâmbio nos embriões.

Figura 1 – Desenvolvimento de calos embriogênicos de *P. nuda* após 20 dias em tratamentos de histodiferenciação (A–J) e aspectos anatômicos das diferentes fases do desenvolvimento embriogênico (K–N), observados por microscopia óptica (MO). A–E: calos previamente cultivados em meio líquido ½ MS suplementado com 3 mg L^{-1} de 2,4-D e 1,5 mg L^{-1} de BAP. F–J: calos previamente cultivados em meio semissólido ½ MS suplementado com 3 mg L^{-1} de 2,4-D, 1,5 mg L^{-1} de BAP e 2,8 g L^{-1} de Phytagel®. A e F: tempo inicial (0 dias). B e G: T1; C e H: T2; D e I: T3; E e J: T4. K: calo embriogênico (EC) e calo não embriogênico (NEC). L: embriões em estágio cordiforme (HSS) e torpedo (TS). M: embrião em estágio torpedo (TS). N: embrião em estágio cotiledonar (CS). Barras = 200 µm.



Fonte: Os autores, 2026.

Aos 20 dias, os tratamentos do meio semissólido apresentaram médias superiores aos do meio líquido, com T1, T2 e T3 sem diferença estatística entre si, destacando-se numericamente T3 (MS + 1 mg L^{-1} de ABA), com 16,25 ES/calo; T4 (semissólido) e todos os tratamentos do meio líquido apresentaram as menores médias (Tabela 1). Aos 40 dias, na histodiferenciação até o estágio cotiledonar, o meio semissólido também superou o líquido, com maiores valores em T2 e T3 (sem diferença estatística entre si), sendo o maior em T3 (3,12 ES cotiledonares/calo). T4 (semissólido) e T1, T2 e T4 (líquido) não produziram embriões cotiledonares (Tabela 1).

Tabela 1 – Número médio de embriões somáticos (ES) formados após 20 dias de cultivo e de embriões somáticos em estádio cotiledonar após 40 dias de cultivo, em calos embriogênicos derivados de raízes de *P. nuda* cultivados em meio MS líquido ou semissólido, suplementado com sacarose ou ácido abscísico (ABA). T1: MS + 45 g L^{-1} de sacarose; T2: MS + 60 g L^{-1} de sacarose; T3: MS + 1 mg L^{-1} de ABA; T4: MS + 2 mg L^{-1} de ABA.

Origem dos calos	Tratamento	Média de ES	Média de ES cotiledonares
Meio líquido	T1	0,50 b	0,0 b
Meio líquido	T2	1,50 b	0,0 b
Meio líquido	T3	0,50 b	0,87 b
Meio líquido	T4	2,37 b	0,0 b
Meio semissólido	T1	10,37 a	0,87 b
Meio semissólido	T2	11,00 a	3,00 a
Meio semissólido	T3	16,25 a	3,12 a
Meio semissólido	T4	2,25 b	0,0 b

Fonte: Os autores, 2026.

Discussão

A ocorrência de calos nas raízes na ausência de reguladores de crescimento indicou atividade de auxinas endógenas, padrão também relatado em estudos de propagação por estaquia de *P. nuda* (Ferreira, 2013). Os calos submetidos ao meio líquido apresentaram resposta rápida para a formação dos primeiros ES, a partir de três semanas — período inferior ao relatado para *P. ipecacuanha*, de 5 a 7 meses (Giraldo; Trujillo; Gómez, 2015) e para *P. acuminata*, com 6 semanas (Lara; Valverde; Gómez, 2003).

Contudo, a histodiferenciação exigiu um tratamento distinto daquele responsável pela indução inicial, sendo o cultivo prévio em meio semissólido determinante para maior competência embriogênica, possivelmente devido ao seu potencial osmótico mais negativo, que interfere na disponibilidade hídrica

e na difusão de nutrientes e reguladores pelo explante (Bartos *et al*., 2025; Pullman; Skryabina, 2007), fator também apontado para histodiferenciação de embriões somáticos de *Coffea arábica* (Almeida, Neofiti; Giomo, 2022).

Entre os tratamentos de histodiferenciação, os meios MS acrescido de 1 mg L^{-1} de ABA (T3), seguido do meio com 60 g L^{-1} de sacarose (T2), proporcionaram os melhores resultados, sobretudo a partir de calos do meio semissólido. O melhor desempenho observado no tratamento com meio suplementado com 1 mg L^{-1} de ABA se relaciona sua ação na modulação do balanço hormonal, reduzindo a influência dos efeitos residuais dos reguladores de crescimento, auxinas e citocinina, utilizados na etapa de indução, favorecendo a transição do estado proliferativo para a histodiferenciação dos embriões somáticos (Elhiti; Stasolla, 2022; Salaün; Lepiniec; Dubreucq, 2021). Já os resultados com maior concentração de sacarose podem estar associados a alterações no potencial osmótico do meio, com descrição na literatura em relação ao desenvolvimento embriogênico de *C. arábica*, onde o aumento nas concentrações de sacarose influenciou positivamente o número e tamanho dos embriões somáticos (Silva, *et al*., 2024).

Em conjunto, os tratamentos contendo 1 mg L^{-1} de ABA e 60 g L^{-1} de sacarose favoreceram a histodiferenciação por mecanismos distintos e complementares: enquanto o ABA promoveu alterações no balanço hormonal, favorecendo a diferenciação dos tecidos embrionários, a elevada concentração 37 de sacarose atuou por meio do ajuste físico do potencial osmótico do meio, criando condições fisiológicas favoráveis para a indução e histodiferenciação dos embriões somáticos

Conclusão

Este estudo demonstra que os calos friáveis originados de raízes de plântulas germinadas *in vitro* de *P. nuda* apresentam elevada competência embriogênica, evidenciando potencial para o estabelecimento de um protocolo eficiente de embriogênese somática indireta para a espécie. Observou-se que a origem dos calos foi um fator determinante para a resposta embriogênica, sendo o cultivo prévio em meio semissólido responsável por maior indução e histodiferenciação de embriões somáticos em comparação ao meio líquido. Associada a essa condição, a composição do meio utilizado na etapa de histodiferenciação também influenciou os resultados, destacando-se o meio MS suplementado com 1 mg L^{-1} de ABA, que proporcionou os maiores índices de indução, histodiferenciação e rendimento de embriões somáticos, seguido pelo meio acrescido de 60 g L^{-1} de sacarose. As análises histológicas confirmaram o desenvolvimento embrionário normal a partir dos calos, evidenciando a formação de embriões nos estágios cordiforme, torpedo e cotiledonar, com diferenciação de tecidos organizados, como protoderme e procâmbio, característicos da organização embriogênica. Os resultados obtidos representam uma etapa fundamental para o estabelecimento de um sistema eficiente de embriogênese somática indireta em *P. nuda*, reforçando o potencial da técnica para a propagação da espécie e evidenciando a necessidade de estudos complementares voltados à regeneração de plantas completas a partir dos embriões somáticos obtidos.

Referências

Almeida, E. M. de; Alves, M. A. S. Fenologia de *Psychotria nuda* e *P. Brasiliensis* (Rubiaceae) em uma área de Floresta Atlântica no Sudeste do Brasil. **Acta Botânica Brasílica**, v. 14, n. 3, p. 335-346, 2000.

Almeida, J. A. S. de; Neofiti, W. C. F.; Giomo, G. S. Osmotic potential intensity in the control of direct somatic embryogenesis in coffee tree. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 57, p. 1-4, 2022.

Bartos, P. M. C. *et al*. Integrated optimization of a multi-step somatic embryogenesis protocol enabling large-scale propagation of *Coffea arabica* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 163, n. 2, p. 1-16, 2025.

Bogdanović, M. D.; Ćuković, K. B.; Todorović, S. I. Hormonal and Environmental Factors Influencing Secondary Somatic Embryogenesis. **Agronomy**, v. 16, n. 1, p. 1-38, 2025.

Chiquieri, A.; Di Maio, F. R.; Peixoto, A. L. A distribuição geográfica da família Rubiaceae Juss. na Flora Brasileira de Martius. **Rodriguesia**, v. 55, n. 84, p. 47-57, 2004.

Elhiti, Mohamed; Stasolla, Claudio. Transduction of Signals during Somatic Embryogenesis. **Plants**, v. 11, n. 2, p. 1-16, 2022.

Farias, F. M. **Psychotria myriantha Müll. Arg. (Rubiaceae): caracterização dos alcaloides e avaliação da atividade antiquimiotáxica e sobre o sistema nervoso central**. 2006. 217p. Tese de doutorado em Ciências Farmacêuticas – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Porto Alegre, 2006. Disponível em: < https://lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/8532/000578863.pdf?sequence=1&isAllowed=y> Acesso em: 24 ago 2026.

Ferreira, B. G. *et al*. *Psychotria nuda* (Cham. & Schltdl.) Wawra: rooting of stock plants in different phenophases and environments. **Ciência Florestal**, v. 24, n. 2, p. 367-378, 2013.

Giraldo, C. B; Trujillo, A. I. U; Gómez, E. J. N. Potencial de regeneración de *Psychotria ipecacuanha* (Rubiaceae) a partir de capas delgadas de células. **Acta Biológica Colombiana**, v. 20, n. 3, p. 181-192, 2015.

Gorenstein, M. R. Estrutura populacional de *Psychotria nuda* (Cham & Schltdl.) Wawra, *Hyeronima alchorneoides* Allemão e *Marlierea obscura* Berg. em floresta Ombrófila Densa Submontana na Ilha do Cardoso, litoral sul de São Paulo. *In*: **Prática da Pesquisa em Ecologia da Mata Atlântica**. Cananéia-SP, s.n, 2007. p. 1-6.

Lameira, O. A. **Cultivo de Ipecacuanha** [*Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes]. Belém: Embrapa Amazônica, 2002. Disponível em: < https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/405771/1/Circ.tec.28.pdf> Acesso em: 14 jul 2026.

Lara, A; Valverde, R.; Gómez, L. Histología de embriones somáticos y brotes adventicios inducidos en hojas de *Psychotria acuminata*. **Agronomía Costarricense**, v. 27, n. 1, p. 37-48, 2003.

Leal, M. B. **Estudo psicofarmacológico de espécies de Psychotria (Rubiaceae) do Estado do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1994.

Paranhos, J. T. *et al.* Regeneration of *Psychotria umbellata* and production of the analgesic indole alkaloid umbellatine. **Tree Physiology**, v. 25, n. 2, p. 251-255, fev. 2005.

Prata, E. M. B.; Assis, M. A.; Joly, C. A. Composição florística e estrutura da comunidade arbórea na transição da Floresta Ombrófila Densa das Terras Baixas - Floresta Ombrófila Densa Submontana do Núcleo Picinguaba/PESM, Ubatuba, sudeste do Brasil. **Biota Neotropica**, v. 11, n. 2, p. 1-15, 2011.

Pullman, G. S.; Skryabina, A. Liquid medium and liquid overlays improve embryogenic tissue initiation in conifers. **Plant Cell Reports**, v. 26, n. 7, p. 873-887, 2007.

Robbrecht, E. *et al.* **Monographic and systematic studies in Rubiaceae**. [S. l.]: National Botanic Garden of Belgium, 2010.

Rosa, S. G. T.; Ferreira, A. G. Germinação de sementes de plantas medicinais lenhosas. **Acta Botânica Brasílica**, v. 15, n. 2, p. 147-154, 2001.

Salaün, Camille; Lepiniec, Loïc; Dubreucq, Bertrand. Genetic and Molecular Control of Somatic Embryogenesis. **Plants**, v. 10, n. 7, p. 1467, 2021.

Silva, L. O. da *et al.* **Efeito de sacarose no controle da embriogênese somática direta de Coffea arabica L.** *In:* IV Simpósio de Propagação de Plantas e Produção de Mudas, ISSN: 978-65-88904-12-1. Disponível em:

<https://anais.infobibos.com.br/simpmudas/4/Resumos/ResumoSimpMudas4_0093.pdf>. Acesso em: 14 jul 2026.

Souza, A. C. de *et al*. **Indução de calos embriogênicos em *Coffea arabica* L. cv. Catuaí Amarelo**. *In:* IX Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, 2015. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1041507/1/Inducaodecalos.pdf>. Acesso em: 14 jul 2026.

Taylor, C. M; Domínguez-Licona, E; Ochoterena, H. A new species of *Psychotria* subg. *Psychotria* (Rubiaceae, Psychotrieae) from West-Central Mexico. **Novon: A Journal for Botanical Nomenclature**, v. 17, p. 105-109, 2007.

Von Arnold, S. *et al.* Developmental pathways of somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 69, p. 233-249, 2002.

Zuta-Puscan, M. *et al*. **Standardization of micropropagation for four hybrids of Coffea arabica through direct somatic embryogenesis**. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/387715406.> Acesso em: 14 jul 2026.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro e a Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) e ao Laboratório de Citogenética e Cultura de Tecidos Vegetais (CCTV), campus de Alegre, pela infraestrutura disponibilizada para a realização deste estudo.