

CRISTINA FERREIRA NEPOMUCENO

**PROPAGAÇÃO E CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE
Martianthus leucocephalus (MART. ex BENTH.) J.F.B.
PASTORE**

FEIRA DE SANTANA – BAHIA

2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA



**PROPAGAÇÃO E CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE
Martianthus leucocephalus (MART. ex BENTH.) J.F.B.
PASTORE**

CRISTINA FERREIRA NEPOMUCENO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Botânica da Universidade Estadual de Feira
de Santana como parte dos requisitos para a
obtenção do título de *Doutor em Botânica*

ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ RANIERE FERREIRA DE SANTANA (UEFS)
CO-ORIENTADOR: PROF. DR. LENALDO MUNIZ DE OLIVEIRA (UEFS)

FEIRA DE SANTANA – BA
2012

Ficha Catalográfica – Biblioteca Central Julieta Carteado

Nepomuceno, Cristina Ferreira

N362p Propagação e conservação *in vitro* de *Martianthus leucocephalus* (MART. ex BENTH.) J.F.B. PASTORE./ Cristina Ferreira Nepomuceno. – Feira de Santana, 2012.

179f. : il.

Orientador: José Raniere Ferreira de Santana

Co-Orientador: Lenaldo Muniz de Oliveira

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a. Dr.^a Ana Valéria Vieira de Souza

(Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Semiárido/Embrapa – Petrolina)

Prof.^a. Dr.^a Sandra Regina de Oliveira Domingos Queiroz

(Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira/CEPLAC)

Prof.^a. Dr.^a Moema Cortizo Bellintani

(Universidade Federal da Bahia/UFBA)

Prof. Dr Eurico Eduardo Pinto de Lemos

(Universidade Federal de Alagoas/UFAL)

Prof. Dr José Raniere Ferreira de Santana

(Universidade Estadual de Feira de Santana)

Orientador e Presidente da Banca

Aos meus queridos pais, Gildete e
Francisco, meus irmãos e sobrinhos,
pelo apoio, incentivo, compreensão e
paciência, com amor
DEDICO

“Eu aprendi que todos querem viver no
topo da montanha, mas toda felicidade e
crescimento ocorrem quando você está
escalando-a”.

William Shakespeare

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, pela saúde, pela minha família, pela força e persistência para atingir meus objetivos e conseguir chegar até aqui.

Aos meus pais, Gildete e Francisco pelo amor, esforço, dedicação, confiança, pelo exemplo de luta, perseverança e por acreditarem em mais este passo da minha vida.

Aos meus irmãos Carlos, Josélia, Francisco, Domingos, Jocélia, Genilde e Alexandre, como é bom saber que tenho vocês e que estaremos sempre juntos dividindo nossas alegrias e tristezas, por ter a certeza que continuarei dizendo sempre que vocês são o meu porto seguro. Muito obrigada pela força e apoio em todos os momentos.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Raniere pela orientação, amizade e sinceridade ao longo desses anos de convivência, apoio, incentivo e disponibilidade nos momentos de dificuldade.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Lenaldo Oliveira pelo profissionalismo, competência, amizade, atenção, disponibilidade e pela leitura criteriosa do manuscrito.

A Universidade Estadual de Feira de Santana e ao Programa de Pós-Graduação em Botânica pela realização do curso.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

À Unidade experimental Horto Florestal, Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais pela infraestrutura e suporte para a realização dos experimentos.

As minhas queridíssimas sobrinhas Ana Paula, Johanna, Danielle, Larissa, Júlia, Juliana (Dinda), Laura, Lavínia e Maria Clara, “amadinhas da titia” cada uma com seu jeitinho contribuiu para que eu pudesse terminar essa jornada.

Aos meus cunhados-irmãos José Newton, Arnaldo e Gerffeson pela imensa torcida e momentos de descontração.

A Ana Paula Rios por sua amizade e por me acolher tão bem em sua casa, em Campos dos Goytacazes, obrigada pela recepção calorosa e animada. Por nossas conversas, que sempre entravam pela madrugada, pelas palavras de conforto e incentivo.

As amigas Sandra Queiroz e Daniela Silveira pela força, companheirismo, pela paciência para escutar meus longos desabafos e por me tranquilizar nos momentos difíceis.

As alunas de Iniciação Científica do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais Isis Bugia, Milena Maia e Andressa Piancó pela ajuda na execução dos experimentos.

Aos amigos que conquistei durante esses anos e que ficarão para sempre guardados no meu coração. Obrigada, Mara Albuquerque, Bruno Alvim, Fernando Carneiro, Flávia Dionísio, Janilza Paixão, Alone Lima-Brito, Fábio Garcia, Ingrid Gutiérrez e em especial Tecla Silva e Priscila Tavares pela imprescindível ajuda na execução dos trabalhos. Obrigada a todos pelos momentos de alegrias e bom convívio.

Aos funcionários da Unidade Experimental Horto Florestal/UEFS Dona Zezé, Sued, Edna, Maria Nascimento, Márcio, Romoaldo e Seu Dino pelo carinho, disposição e alegria.

A prof^a Dr^a Claudete Santa-Catarina pela atenção e pelos momentos dedicados a mim, durante o período de trabalho na Universidade Estadual do Norte Fluminense e por permitir que realizasse, sob sua orientação, uma etapa importante desta pesquisa. Obrigada pela contribuição na construção do manuscrito.

Aos alunos do Laboratorio de Biologia Celular e Tecidual da Universidade Estadual do Norte Fluminense Bruno, Lucas, Vitor, Camila, Ana Paula, Jacqueline, Carol e Helen pela atenção dispensada. Obrigada, Bruno e Lucas por compartilhar o conhecimento e dispor do tempo de vocês auxiliando na execução das análises bioquímicas.

Ao Prof. Dr. Vanildo Silveira por disponibilizar o Laboratório de Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense para que fossem realizadas as análises bioquímicas.

As amigas Leiliane Carneiro, Edjane Santos, Cristiane Nunes e Leila Cristina, que estão sempre torcendo por mim e vibrando a cada conquista.

Aos amigos que não estiveram fisicamente próximos, mas presentes em cada lembrança.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----|
| INTRODUÇÃO GERAL | 1 |
| CAPÍTULO 1 | 11 |
| Estabelecimento <i>in vitro</i> de <i>Martianthus leucocephalus</i> (Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore | |
| CAPÍTULO 2 | 34 |
| Morfogênese <i>in vitro</i> e aclimatização de <i>Martianthus leucocephalus</i> (Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore | |
| CAPÍTULO 3 | 96 |
| Indução, caracterização bioquímica e morfo-anatômica de calos embriogênicos de <i>Martianthus leucocephalus</i> (Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore | |
| CAPÍTULO 4 | 128 |
| Conservação <i>in vitro</i> de <i>Martianthus leucocephalus</i> (Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore | |
| CONCLUSÕES GERAIS | 160 |
| RESUMO | 161 |
| ABSTRACT | 163 |
| APÊNDICES | |

INTRODUÇÃO GERAL

A família Lamiaceae possui distribuição cosmopolita, incluindo cerca de 6800 espécies, que se encontram distribuídas em 252 gêneros que representam a família. No Brasil ocorrem 28 gêneros e cerca de 350 espécies (Souza e Lorenzi, 2008; Judd et al., 2009), sendo que alguns possuem espécies endêmicas do semiárido nordestino, com destaque para o gênero *Hyptis* Jacquin, o qual possui um vasto potencial fitoquímico.

O gênero *Hyptis*, pertence à subfamília Nepetoidea, compreende cerca de 400 espécies ocorrendo prioritariamente na América tropical (Willis, 1973; Judd et al., 2009), distribuídas desde o sul dos Estados Unidos e Caribe até a Argentina, excluindo-se somente o extremo sul. O centro da diversidade do gênero se encontra nos campos cerrados do Brasil Central, mais especificamente nos Estados de Minas Gerais, Bahia e Goiás (Bordignon, 1990).

A importância econômica do gênero *Hyptis* decorre de seu alto teor de óleos essenciais aromáticos, que tem apresentado propriedades terapêuticas já comprovadas. Esses óleos além de apresentarem em sua constituição monoterpenos e sesquiterpenos, como o limoneno, cimenol, mentol, α -bergamoteno, α -humuleno, dentre outros, também é composto por outras substâncias, tais como, hidrocarbonetos, ácidos graxos e esteróides (Falcão e Menezes, 2003). Além dos óleos essenciais, o gênero produz também diterpenos, triterpenos, lignanas e pironas (Pereda-Miranda et al., 1990), sendo que esta última é reconhecida como marcador taxonômico, por ser encontrada em grande número de espécies de *Hyptis* spp (Marques et al., 2006).

Do ponto de vista farmacológico, aproximadamente 25 espécies foram estudadas, demonstrando a importância desse gênero na produção de fonte de compostos bioativos com propriedades citotóxica, antimicrobiana, antifúngica, anti-inflamatória, anti-HIV e inseticida (Falcão e Menezes, 2003). Outras atividades biológicas também foram citadas por outros autores como larvicida (Costa et al., 2005), antidepressiva (Bueno et al., 2006) e antinociceptiva (Silva et al., 2006).

Na região da Caatinga existem oito espécies deste gênero que são endêmicas, *H. calida*, *H. leptostachys* ssp. *caatingae*, *H. leucocephala*, *H. martiussi*, *H. pinheiroi*, *H. platanifolia*, *H. simulans* e *H. viaticum* (Sampaio et al., 2002). Recentemente, Harley e Pastore (2012) realizaram uma revisão taxonômica do gênero *Hyptis*, o qual estava

estabelecido em diversas secções. Os estudos foram realizados através de pesquisas morfológicas e moleculares, que permitiram definir uma nova classificação taxonômica, sendo a espécie *Hyptis leucocephala* (Mart. Ex Benth.) designada como *Martianthus leucocephalus* (Mart. Ex Benth.) J.F.B. Pastore.

Estudos fitoquímicos e farmacológicos realizados com a espécie *M. leucocephalus* revelou potencial medicinal bastante promissor, devido à produção de óleos essenciais que tem apresentado atividade biológica frente a alguns microrganismos patogênicos (Lucchese et al., 2006; Moreira, 2006; Rodrigues, 2007; Nobre, 2008; Santos et al., 2011).

A espécie *M. leucocephalus* é uma erva aromática decumbente de cerca de 20cm de altura, apresenta folhas cartáceas, flores com cálice esverdeado e corola arroxeadas. As folhas produzem óleos essenciais com rendimentos de 0,1 a 0,3%, composto por uma mistura de monoterpenos e sesquiterpenos, tendo o formiato de isorbonila como composto majoritário e possui atividade antimicrobiana contra *Bacillus cereus*, *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus* (Rodrigues, 2007), *Pseudomonas aeruginosa*, *S. schleiferi*, *Salmonella thypi*, *Escherichia coli*, *Burkholderia* sp. e *Klebsiella pneumoniae*, além de atividade contra alguns fungos fitopatogênicos, como *Sclerotinium rolfsii* e *Rhizoctonia solani* (Santos et al., 2011).

Como essa espécie possui grande potencial medicinal, devido às biomoléculas que compõem o óleo essencial, apresentarem ação contra microrganismos multiresistentes a antibióticos existentes no mercado farmacêutico mundial, constituindo-se como uma possível fonte de novos fármacos, a busca por técnicas alternativas que proporcione maior produção do biocomposto de interesse, é extremamente vantajoso, pois conduzirá a utilização de uma via sustentável dos recursos genéticos vegetais, contribuindo para a preservação e conservação do patrimônio genético, principalmente por se tratar de espécies endêmicas da região do semiárido brasileiro, as quais estão expostas a forte pressão antrópica.

Nesse sentido, os processos biotecnológicos que envolvem as técnicas de cultura de tecidos vegetais são de relevante importância para a indústria farmacêutica, pois permite a produção de mudas em escala comercial, uma vez que os metabólitos secundários produzidos pelas plantas em habitat natural são em proporções pequenas para atender a demanda industrial, outra vantagem do cultivo *in vitro* é o controle do ambiente físico, além da obtenção de mudas num espaço físico e temporal reduzido.

Dentre as técnicas de cultura de tecidos vegetais tem-se a micropropagação, que se dá via organogênese ou embriogênese somática. Ambos os processos podem ocorrer de

forma direta, quando se dá a partir de células diferenciadas de um tecido vegetal sem a proliferação de calos (massa de células não diferenciada, de proliferação contínua e desordenada), ou indiretamente, quando há prévia formação de calos antes do desenvolvimento de estruturas organizadas (Costa et al., 2006; Lemos, 2010).

Na organogênese ocorre a diferenciação de novas gemas e brotações (cauligênese) e raízes (rizogênese) durante o desenvolvimento vegetal (Grattapaglia e Machado, 1998; Lemos, 2010). A embriogênese somática envolve o desenvolvimento de embriões a partir de células somáticas, constituindo-se de estruturas bipolares que contam com seus meristemas caulinares e radiculares e, por sua vez, manifestam um sistema vascular fechado sem conexão vascular com os tecidos do explante inicial. Esta característica, aliada à bipolaridade diferenciam os embriões somáticos dos propágulos resultantes do processo de organogênese (Guerra et al., 1998; Zimmerman, 2010).

No entanto, a resposta morfo genética depende dos fatores endógenos, aqueles relacionados aos explantes (tipo e idade) e dos fatores exógenos, que são aqueles que estão associados ao meio de cultura e ao ambiente físico. Os processos que estão associados aos explantes dependem da capacidade das células para responder a um estímulo apropriado, que são denominadas de competentes. De acordo com Lemos (2010), a competência de uma célula pode não ser inata ou pode não estar presente no momento em que ela foi excisada da planta, mas pode ser induzida *in vitro* em meios de cultura enriquecidos com reguladores vegetais. Uma vez competentes essas células seguirão uma rota morfo genética específica, estando então, determinadas.

Quanto ao fator exógeno meio de cultura, estes fornecem substâncias essenciais para o crescimento e controlam em grande parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro*. O tipo e a concentração da fonte de carbono no meio de cultura tem influenciado a morfo gênese *in vitro*, pois atuam como fonte de energia, como fonte de carbono, além de funcionar como regulador osmótico (Thorpe, 2008).

Como as células, tecidos e plantas cultivadas *in vitro* não encontram condições adequadas de iluminação e concentração de CO₂ e, geralmente não apresentam teores de clorofila suficientes para realizar a fotossíntese que sustente o crescimento, é necessário a incorporação de uma fonte de carbono no meio de cultura. A sacarose é o carboidrato mais utilizado no cultivo *in vitro*, sendo que esse açúcar suporta as mais altas taxas de crescimento na maioria das espécies. Porém, outras fontes alternativas de carboidratos podem ser adicionadas ao meio de cultura como a frutose, galactose, maltose, lactose,

arabinose, dentre outros (Caldas et al., 1998; Thorpe et al., 2008; Costa et al., 2006; Lemos, 2010).

A composição e a concentração dos reguladores vegetais no meio de cultura são os fatores mais críticos e determinantes no processo de morfogênese *in vitro*, as citocininas e as auxinas são as classes de reguladores vegetais mais utilizadas. De acordo com Grattapaglia e Machado et al. (1998), a adição de reguladores vegetais tem o objetivo principal de suprir as possíveis deficiências dos teores endógenos de hormônios nos explantes que se encontram isolados das regiões produtoras da planta-matriz. As citocininas são indispensáveis no processo de divisão celular, contribui para a quebra da dominância apical, bem como na indução e proliferação de brotações adventícias.

As auxinas são mais frequentemente usadas na indução de calos a partir de um explante e no enraizamento (Cid e Teixeira, 2010). No entanto, a depender da espécie tem promovido a produção de brotações, possivelmente por proporcionar um balanço hormonal adequado. As auxinas mais frequentemente utilizadas são o ANA (ácido naftaleacético), AIA (ácido indolacético), AIB (ácido indolbutírico) e o 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), sendo este último o mais requerido no processo de indução da embriogênese somática (Caldas et al., 1998; Arnold, 2008).

Uma vez analisadas as respostas morfogenéticas durante o processo de multiplicação *in vitro*, geralmente segue-se para a etapa de enraizamento (rizogênese). Porém algumas espécies emitem raízes durante o processo de formação das brotações, sendo dispensável essa etapa. As brotações com raízes seguem para a etapa de aclimatização que é caracterizada pela transferência das plantas do ambiente *in vitro* para o *ex vitro*, o que finda o processo de micropropagação.

Contudo, algumas espécies precisam ser preparadas para o transplântio através de um processo denominado rustificação *in vitro*. Este processo consiste no desenvolvimento da fotoautotrofia, estimulada pela redução ou retirada da fonte de carbono do meio de cultura, aumento na concentração de CO₂ e da intensidade luminosa, além de mecanismos que proporcione as trocas gasosas, favorecendo a redução da umidade relativa nos recipientes de cultura, o que irá proporcionar uma adaptação mais rápida dos estômatos do que nas plantas transplantadas diretamente para a casa de vegetação, além de estimular a produção de cera e reduzir a perda de água no transplântio (Grattapaglia e Machado, 1998).

O cultivo *in vitro* tem sido também utilizado em programas de conservação com introdução de acessos em bancos de germoplasma *in vitro*. O processo de conservação *in vitro* de germoplasma, pode ocorrer de curto a médio prazo, através do crescimento lento,

que consiste em desacelerar o metabolismo das plantas, ou por períodos a longo prazo, pelo método da criopreservação em que o se dá por meio da supressão completa do crescimento por armazenamento em temperaturas ultra-baixas (Withers e Williams, 1998).

Para que ocorra o crescimento lento, é necessário que as plantas tenham sua atividade metabólica reduzida, contudo sem afetar sua viabilidade. Isto pode ser alcançado alterando-se o potencial osmótico do meio de cultura, reduzindo então a disponibilidade de água, ou utilizando retardantes de crescimento, especialmente inibidores da biossíntese de giberelinas, hormônio responsável pelo alongamento celular (Withers e Williams, 1998; Rademacher, 2000; Castro e Hilhorst, 2004).

Vários agentes osmóticos têm sido utilizados com o propósito da redução do crescimento *in vitro*. Os mais utilizados são sacarose, manitol e sorbitol, que ao serem adicionados ao meio de cultura agem externamente, reduzindo a água intracelular, por gradiente osmótico, fazendo com que o crescimento da cultura ocorra de forma mais lenta (Dumet et al., 1993). Os retardantes de crescimento, como ancimidol e paclobutrazol, agem bloqueando as reações de oxidação na etapa da conversão do ent-caureno a ácido caurenóico na rota biossintética de giberelinas, impedindo a formação do GA₁₂-aldeído que é oxidado a GA₁₂, a primeira giberelina da rota e precursora de todas as outras (Rademacher, 2000; Taiz e Zeiger, 2009).

Neste contexto, o cultivo *in vitro* de espécies medicinais possibilita a conservação de diferentes genótipos que podem ter diferentes índices na produção de metabólitos secundários, além de contribuir para a otimização da produção de princípios ativos vegetais. Uma vez que, a produção de compostos fitoquímicos frequentemente envolve a extração da planta viva, a qual necessita, muitas vezes, muito tempo para se desenvolver e pode levar à extinção de espécies nativas (Valle, 2003).

Não existem relatos na literatura até o momento sobre a propagação *in vitro* de *M. leucocephalus* espécie, o que demonstra a necessidade de estudos com as espécies medicinais, pois estas são fontes de importantes substâncias bioativas que poderão ser úteis à sociedade. Este trabalho teve como objetivo estudar a propagação *in vitro* da espécie *Martianthus leucocephalus* desenvolvendo um protocolo de micropropagação e conservação *in vitro*, o que viabilizará o desenvolvimento de estratégias para a sua preservação e exploração sustentável.

Referências Bibliográficas

ARNOLD, S. 2008. Somatic Embryogenesis. In: GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; KLERK, G-J. **Plant Propagation by Tissue Culture**. Dordrecht: Springer, 3rd Edition. p.:335-354.

BORDIGNON, S.A.L. 1990. **O gênero *Hyptis* Jacq. (Labiatae) no Rio Grande do Sul**. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação Botânica) - Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 123p.

BUENO, A.X.; MOREIRA, A.T.S.; SILVA F.T.; ESTEVAM, C.S.; MARCHIORO, M. 2006. Effects of the aqueous extract from *Hyptis pectinata* leaves on rodent central nervous system. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 16: 317-323.

CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. 1998. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Orgs.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, EMBRAPA-SPI/ EMBRAPA-CNPH. p.:87-132.

CASTRO, R.D.; HILHORST, H.W. 2004. Embebição e reativação do metabolismo. In: Ferreira, A.G.; Borghetti, F. (Orgs.). **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed. p.:149-162.

CID, L.P.B.; TEIXEIRA, J.B. 2010. Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. In: CID, L.P.B. (Org.). **Cultivo *in vitro* de plantas**. Brasília, EMBRAPA. p.:15-49.

COSTA, J.G.M.; RODRIGUES, F.F.G.; ANGÉLICO, E.C.; SILVA, M.R.; MOTA, M.C.; SANTOS, N.K.A.; CARDOSO, A.L.H.; LEMOS, T.L.G. 2005. Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzygium aromaticum* frente à larvas do *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 15:304-309.

COSTA, M.A.P.C.; SOUZA, A.S.; ALMEIDA, W.A.B. de. 2006. Morfogênese *in vitro*. In: SOUZA, A. da S.; JUNGHANS, T.G. **Introdução à Micropropagação de Plantas**. Cruz das Almas, Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. p.:113-130.

DUMET, D.; ENGELMANN, F.; CHABRILLANGE, N.; DUVAL, Y.; DEREUDDRE, J. 1993. Importance of sucrose for the acquisition of tolerance to desiccation and cryopreservation of oil palm embryos. **Cryo-Letters**. 14:243-250.

FALCÃO, D.Q.; MENEZES, F.S. 2003. REVISÃO ETNOFARMACOLÓGICA, FARMACOLÓGICA E QUÍMICA DO GÊNERO *Hyptis*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 84:69-74.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. 1998. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Orgs.). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: Embrapa – SPI / Embrapa – CNPH. p.:183-260.

GUERRA, P.G.; TORRES, A.C.; TEIXEIRA, J.B. 1999. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Orgs.). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: Embrapa – SPI / Embrapa – CNPH. p.:533-568.

HARLEY, R.M.; PASTORE, J.F.B. 2012. A generic revision and new combinations in the Hyptidinae (Lamiaceae), based on molecular and morphological evidence. **Phytotaxa**. 58:1-55.

JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOGG, E.A.; STEVENS, P.F.; DONOGHUE, M.J. 2009. **Sistemática Vegetal: Um enfoque filogenético**. 3ªed. Porto Alegre: Artmed, 632p.

LEMONS, E.E.P. 2010. Organogênese. In: CID, L.P.B. (Org.). **Cultivo *in vitro* de plantas**. Brasília, EMBRAPA. p.:103-127.

LUCCHESI, A.M.; ZAIM, C.Y.Z.; MACHADO, S.S.; RODRIGUES, O.S.; MOREIRA, J.S.; SANTOS, A.O.A.; ROCHA, M.B.; SOUZA, R.D.; UETANABARO, A.P.T. 2006. Comparação da atividade antimicrobiana de óleos essenciais extraídos de espécies do semi-árido baiano. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. **Anais...** Águas de Lindóia: Sociedade Brasileira de Química, p285.

MARQUES, M.F.; KATO, L.; OLIVEIRA, C.M.A.; SILVA, C.C. 2006. Metabólitos secundários de *Hyptis ovalifolia* Benth. (Lamiaceae). **Anais...** - Química é Energia: Transforma a vida e preserva o ambiente. 29ª Reunião Anual da sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia, SP.

MOREIRA, J.S. 2006. **Variabilidade sazonal da composição química e atividade antimicrobiana do óleo essencial extraído de *Hyptis platanifolia***. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual de Feira de Santana.

NOBRE, I.K.C. 2008. **Atividade Antimicrobiana de Extrato Bruto de Espécies do Gênero *Hyptis* da região do Semi- Árido Baiano**. Dissertação (Mestrado em Programa de Pós-graduação em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Feira de Santana. 78p.

PEREDA-MIRANDA, R.; DELGADO, G. 1990. Chemical studies on Mexican *Hyptis* species. Part 2. Triterpenoids and favonoids from *Hyptis albida*. **Journal of Natural Products**. 53:182-185.

RADEMACHER, W. 2000. Growth retardants: effects on gibberellin biosynthesis and other metabolic pathways. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. 51:501-531.

RODRIGUES, O.S. 2007. **Óleo essencial de *Hyptis leucocephala* Mart. ex Benth: composição química e atividade antimicrobiana**. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual de Feira de Santana.

SAMPAIO, E.S.B.; GIULIETTI, A.M.; VIRGÍNIO, J.; GAMARRA-ROJAS, C.F.L. 2002. **Vegetação & Flora da Caatinga**. Recife: Associação Plantas do Nordeste – APNE; Centro Nordestino de Informações sobre Plantas – CNIP. 176p.

SANTOS, S.N.; CASTANHA, R.F.; SILVA, J.L.; MARQUES, M.O.M.; SCRAMIN, S.; MELO, I.S. 2011. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de *Hyptis leucocephala*. In: VI Simpósio Brasileiro de Óleos Essenciais. **Anais...** Campinas, SP: Centro

Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA/UNICAMP), Embrapa Meio Ambiente e o Instituto Agrônômico (IAC), 70.

SILVA, A.B.L.; DIAS, K.S.; MARQUES, M.S.; MENEZES, I.A.C.; SANTOS, T.C.; MELLO, I.C.M.; LISBOA, A.C.C.D.; CAVALCANTI, S.C.H.; MARÇAL, R.M.; ANTONIOLLI, A.R. 2006. Avaliação do efeito antinociceptivo e da toxicidade aguda do extrato aquoso da *Hyptis fruticosa* Samz. ex Benth. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 16:475-479.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. 2008. **Botânica Sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II. 2ªed, Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 704p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. 2009. **Fisiologia Vegetal**. 4ª ed., Porto Alegre: Artmed, 848p.

THORPE, T.; STASOLLA, C.; YEUNG, E.C.; KLERK, G-J.; ROBERTS, A.; GEORGE, E.F. 2008. The Components of Plant Tissue Culture Media II: Organic Additions, Osmotic and pH Effects, and Support Systems. In: GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; KLERK, G-J. **Plant Propagation by Tissue Culture**. Dordrecht: Springer, 3rd Edition. p.:205-226.

VALLE, R.C.S.C. 2003. **Estratégias de cultivo de pimenta longa (*Piper hispidinervium*) e determinação de parâmetros cinéticos**. Tese de doutorado (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, 184p.

WILLIS, J. C. **Dictionary of Flowering Plants and Ferns**. Columbia University Press: London, 1973. 788p.

WITHERS, L.A.; WILLIAMS, J.T. 1998. Conservação *in vitro* de recursos genéticos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Orgs.). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: Embrapa – SPI / Embrapa – CNPH. p.:297-330.

ZIMMERMAN, M.J. 2010. Embriogênese somática. In: CID, L.P.B. (Org.). **Cultivo *in vitro* de plantas**. Brasília, EMBRAPA. p.:66-102.

CAPÍTULO 1

Estabelecimento *in vitro* de *Martianthus leucocephalus* (Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore¹

¹Parte deste capítulo foi submetido à publicação no periódico Revista Brasileira de Plantas Mediciniais.

Resumo

Martianthus leucocephalus (Lamiaceae) uma espécie vegetal aromática, endêmica do semiárido nordestino do Brasil, que tem importância econômica devido ao seu potencial farmacológico. O presente trabalho teve por objetivos obter um protocolo para o estabelecimento inicial de plantas *in vitro* da espécie *M. leucocephalus*. Para o estabelecimento *in vitro* foram realizados três experimentos: 1 – testou-se diferentes meios de cultura (MS, MS $\frac{1}{2}$, WPM, Agar e Papel *germtest*) na germinação *in vitro*; 2 - testou-se diferentes meio cultura (MS, MS $\frac{1}{2}$ e WPM) no crescimento *in vitro* e 3 – avaliou-se diferentes volumes de meio de cultura (em frascos de 500mL) no crescimento *in vitro* de *M. leucocephalus*. No experimento 1, o meio de cultura WPM promoveu maior porcentagem de germinação (96,81%), porém não diferiu estatisticamente dos resultados obtidos no MS $\frac{1}{2}$. No experimento 2, o tipo de meio de cultura não influenciou no número de brotações, comprimento de parte aérea e matéria seca de raiz. O meio MS promoveu incremento para o número de folhas, matéria seca de parte aérea e comprimento da maior raiz, e o meio MS $\frac{1}{2}$ foi mais adequado para a indução de raízes. No experimento 3, foi observado que as maiores médias para as variáveis analisadas ocorreram quando se utilizou 60mL de meio de cultura. O meio de cultura ideal para a germinação das sementes de *M. leucocephalus* é o MS $\frac{1}{2}$. O melhor meio de cultura para o crescimento *in vitro* é o MS e quando da utilização de frascos de 500mL, o volume de meio que pode ser utilizado é 60mL.

Palavras-chave: Meios de cultura; Germinação *in vitro*; Crescimento *in vitro*.

Abstract

Martianthus leucocephalus (Lamiaceae) an aromatic plant species, endemic to the semiarid of Northeast Brazil that, which has economic importance pharmacological potential. This study aimed to obtain a protocol to establish in vitro plants of the specie *M. leucocephalus*. To establish in vitro experiments were carried out: 1 – test of different culture media (MS, MS ½, WPM, Agar and Paper germtest) for in vitro germination; 2 - test of different medium culture (MS, MS ½ and WPM) for growth in vitro and 3 – assesment of different culture medium volumes (in 500mL flasks) for in vitro growth of *M. leucocephalus*. In experiment 1, the WPM promoted higher germination percentage (96.81%), though not significantly different results on MS½. In experiment 2, the type of culture medium did not influence the number of shoots, length of shoots and dry matter of the root. The MS medium an increased the number of leaves, dry weight of shoots and the length of the roots; MS ½ medium was more suitable for root induction. In experiment 3, it was observed that the best results for the variables evaluated occurred when using 60mL of culture medium. The optimal culture medium for germination of *M. leucocephalus* is MS½. The best culture medium for in vitro growth is 60mL of the MS when using vials 500mL.

Keywords: Culture medium, In vitro germination, In vitro growth.

1.0 Introdução

Os componentes da biodiversidade podem fornecer uma ampla gama de produtos de importância econômica. Dentre eles destacam-se os fitoterápicos e os fitofármacos, originados dos recursos genéticos vegetais, mais especificamente de plantas medicinais (Guerra e Nodari, 2007). A demanda por espécies medicinais tem crescido consideravelmente nos últimos anos. De acordo com Giulietti e Queiroz (2006), o semiárido brasileiro possui alta diversidade da flora com potencial para o uso sustentável, incluindo alta proporção de espécies com compostos ativos, para as quais já se obteve a descoberta de substâncias puras e a produção de semi-sintéticos com potencial de utilização em doenças que afetam a população local.

Entre essas espécies vegetais produtoras de biocompostos, têm-se espécies aromáticas, que possuem alto potencial antimicrobiano, como *Martianthus leucocephalus*. O óleo essencial obtido das folhas de *M. leucocephalus* possui atividade contra *Bacillus cereus*, *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus* (Rodrigues, 2007). Resultados como esses podem ser promissores, porque existe a necessidade de descoberta de novas substâncias bioativas para a produção de novos antibióticos, devido ao desenvolvimento da resistência microbiana às substâncias já existentes.

Diante do elevado potencial fitoquímico e econômico de *M. leucocephalus* para a população do semiárido, torna-se importante o desenvolvimento de pesquisas voltadas para a propagação e avaliação do potencial produtivo sob diferentes condições de cultivo. A propagação natural do gênero *Hypsis* se dá por sementes. Entretanto, a produção comercial de mudas por via sexual é limitada em virtude da dormência das sementes (Maia et al., 2008), além da sazonalidade na produção, com redução rápida da viabilidade (Oliveira et al., 2011). Não existem relatos na literatura científica sobre a germinação das sementes e crescimento de mudas da espécie em estudo. Em trabalho realizado recentemente por Oliveira et al. (2011), verificou-se a viabilidade da propagação vegetativa via estaquia, demonstrando que a propagação assexuada é um caminho viável a ser seguido para a propagação dessa espécie.

Neste contexto, o uso de técnicas biotecnológicas, como a cultura de tecidos vegetais, tem sido largamente utilizada na propagação de plantas medicinais, por possibilitar uma eficiente produção massal de mudas, através da micropropagação. Essa técnica também contribui para preservar populações naturais, pois para obtenção do óleo

essencial retira-se grande quantidade de plantas do ambiente natural, podendo ocasionar a extinção das espécies.

Para iniciar o processo de micropropagação é necessário estabelecer a espécie *in vitro*, ou seja, definir as melhores condições para a obtenção de material vegetal livre de contaminantes e com qualidade fisiológica adequada, de forma a viabilizar as demais etapas do cultivo *in vitro*. Para a maioria das espécies essa etapa tem sido o maior obstáculo, sobretudo para plantas com elevado número de tricomas nos caules e folhas, como é o caso das lamiaceas, o que dificulta a assepsia inicial.

A origem do explante e o meio nutritivo onde este será inoculado são fatores que mais frequentemente determinam o sucesso da propagação *in vitro*. Diversas formulações de meio de cultura têm sido empregadas no cultivo *in vitro*, os quais diferem entre si basicamente em relação à concentração dos sais. Entretanto, para cada tipo de explante, espécie e cultivar, o meio de cultura mais adequado e eficiente deve ser determinado experimentalmente, pois algumas espécies são acometidas por desordens morfofisiológicas, provocadas principalmente pelas condições físicas e químicas do cultivo *in vitro* ou devido às condições fisiológicas da espécie (Rezende et al., 2008).

Assim, o presente trabalho teve por objetivo obter o protocolo para o estabelecimento inicial de plantas *in vitro* da espécie *Martianthus leucocephalus*.

2.0 Material e Métodos

2.1 Obtenção do material vegetal e local de realização dos experimentos

As sementes de *M. leucocephalus* (\equiv *Hyptis leucocephala*) foram obtidas da coleção de plantas aromáticas da Unidade Experimental Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS) e a identificação botânica foi realizada no herbário da UEFS, onde as exsicatas encontram-se depositadas (Voucher número 131323). Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCTV), pertencente à Unidade Experimental Horto Florestal/UEFS, localizado no município de Feira de Santana, região do semiárido da Bahia.

2.2 Efeito do meio de cultura na germinação *in vitro* de *M. leucocephalus*

As sementes ficaram armazenadas em sacos de papel, os quais foram mantidos em frascos de vidro durante 90 dias. Após esse período, as sementes foram desinfestadas em álcool 70% por 1 minuto, seguido de solução de hipoclorito de sódio (Qboa®) a 2,5% de cloro ativo, acrescida de uma gota de detergente neutro por 15 minutos e, então, lavadas por quatro vezes em água destilada autoclavada. As mesmas foram inoculadas em meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962); em meio de cultura MS com a metade da concentração dos sais ($MS\frac{1}{2}$); em meio de cultura WPM (Lloyd e McCown, 1980); em meio contendo apenas agar e em placa de Petri contendo papel *germtest* umedecido com água destilada autoclavada (Controle). Os meios de cultura foram solidificados com 0,7% de ágar e suplementados com 87,64mM de sacarose (exceto para o meio de cultura que foi composto apenas por ágar).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, composto por cinco tratamentos (Meios de cultura: MS, $MS\frac{1}{2}$, WPM, ágar e controle), cada tratamento foi constituído por seis repetições e cada uma constou de quatro frascos onde foram inoculadas vinte sementes.

Avaliou-se a porcentagem de germinação semanalmente durante um período de 15 dias para *M. leucocephalus*.

2.3 Avaliação do meio de cultura no crescimento *in vitro* de *M. leucocephalus*

Utilizou-se como fonte de explante segmento nodal de plantas estabelecidas em meio de cultura MS½, os quais foram inoculados em tubos de ensaio contendo diferentes meios de cultura: MS, MS½ e WPM. Os meios foram suplementados com 87,64mM de sacarose e solidificados com 0,7% de agar.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, constituído de três tratamentos (Meios de cultura: MS, MS½ e WPM). Os tratamentos foram compostos por dez repetições, sendo que cada repetição constou de oito unidades experimentais (1 explante/tubo de ensaio).

Aos sessenta dias da inoculação foram avaliadas as seguintes variáveis: número de brotações por explante, número total de folhas e número de raízes, comprimento da maior brotação (cm) e da maior raiz (cm), matéria seca das brotações e das raízes (mg).

2.4 Influência do volume de meio de cultura no cultivo *in vitro* de *M. leucocephalus*

Foi utilizado como fonte de explante segmento nodal de plantas estabelecidas em meio de cultura MS½, os quais foram inoculados em frascos de 500mL contendo diferentes volumes de meio de cultura MS (20; 40; 60 e 80mL), suplementado com 87,64mM de sacarose e solidificado com 0,7% de ágar.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco repetições, cada uma composta por cinco unidades experimentais, contendo cinco explantes em cada. Após quarenta dias de cultivo *in vitro* avaliou-se: número de brotações por explante, número total de folhas, comprimento da maior brotação (cm) e matéria seca da parte aérea (mg).

2.5 Condições experimentais

As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas, umidade relativa de 60% e radiação fotossintética ativa de $60\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

2.6 Análise estatística

Os dados foram avaliados estatisticamente, mediante a análise de variância, testando-se as médias pelo Teste de Tukey e análise de Regressão, para os fatores

qualitativos e quantitativos, respectivamente. Os dados foram analisados usando o programa Sisvar (Ferreira, 2011).

3.0 Resultados e Discussão

3.1 Efeito do meio de cultura na germinação *in vitro* de *M. leucocephalus*

Observou-se efeito altamente significativo ($p \leq 0,01$) entre os meios de cultura para a porcentagem de germinação *in vitro* de *M. leucocephalus* durante o período de avaliação (Tabela 1).

Tabela 1: Resumo da análise de variância para porcentagem de germinação semanal de *M. leucocephalus* submetidas a diferentes meios de cultura. Feira de Santana, 2012.

| FV | GL | Quadrados Médios | |
|-----------------|----|------------------|-----------|
| | | 1ª semana | 2ª semana |
| Meio de cultura | 4 | 688,93** | 355,58** |
| Resíduo | 25 | 51,87 | 48,34 |
| CV (%) | | 8,51 | 7,74 |

**Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

A germinação das sementes de *M. leucocephalus* ocorreu em todos os meios de cultura testados, apresentando alta taxa de germinação, evidenciando que o tipo de meio de cultura não é um fator limitante para a germinação das sementes da referida espécie. Já na segunda semana, quando foi alcançada a estabilização da germinação, verificou-se que a maior porcentagem de germinação foi obtida quando as sementes foram inoculadas no meio WPM (96,81%), contudo este resultado não diferiu estatisticamente dos resultados promovidos pela utilização do agar, MS e MS½, superando o meio de cultivo contendo apenas água destilada (Controle), sendo que este apresentou resultado inferior em cerca de 22,70% (Figura 1). Resultados semelhantes foram observados para as espécies *Vanda coerulea* (Hossain et al., 2010) e *Cymbidium giganteum* (Roy et al., 2011).

Para iniciar o processo de germinação, a semente necessita apenas de água, caracterizando a primeira etapa do processo germinativo, que é a embebição ou absorção

de água, até atingir um nível de platô. Seguido a isso ocorre à fase de preparação e ativação do metabolismo, conhecida como a segunda etapa da germinação, em que acontecem diversas reações metabólicas, culminando no crescimento do embrião e na conclusão do processo germinativo, com a protrusão da radícula (Castro e Hilhorst, 2004). Diante dos resultados apresentados para *M. leucocephalus*, verificou-se aumento significativo na porcentagem de germinação quando as sementes foram inoculadas em pelo menos um dos tipos de meio de cultura em relação ao controle.

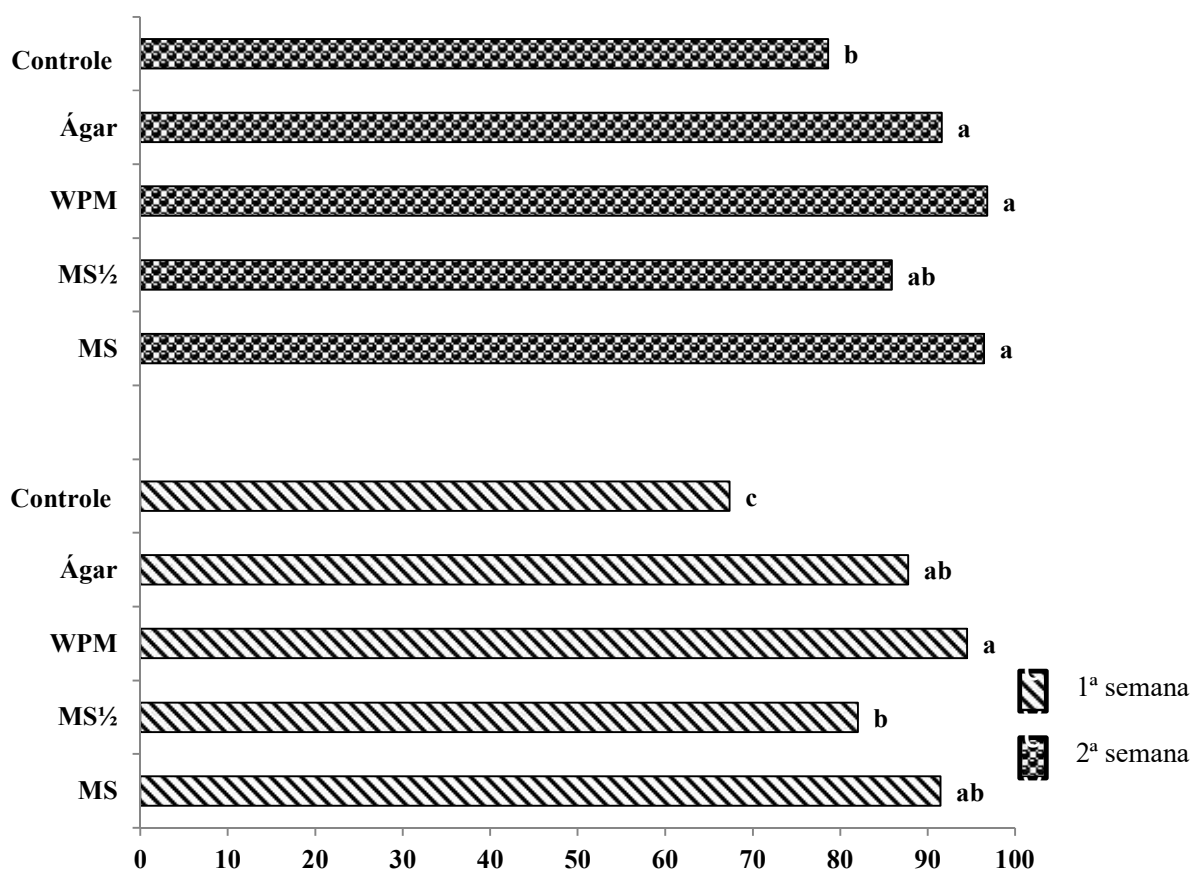


Figura 1: Porcentagem de germinação *in vitro* de *M. leucocephalus* em diferentes tipos de meio de cultura. Feira de Santana, 2012.

Embora em todos os meios de cultura tenha ocorrido alta taxa de germinação *in vitro* para *M. leucocephalus*, em observações visuais verificou-se que as plantas no meio de cultura WPM e MS apresentaram a formação de “roseta” na base das plantas, seguida do alongamento de apenas um broto por roseta (Figura 2A e B). As plantas provenientes da

germinação no meio contendo apenas agar não alongaram (Figura 2C). As sementes que germinaram em meio MS $\frac{1}{2}$ não formaram roseta na base da planta, alongando-se de forma normal (Figura 2D). Já aquelas que germinaram em placa de Petri (água destilada), foram transferidas para meio de cultura, mas não sobreviveram.

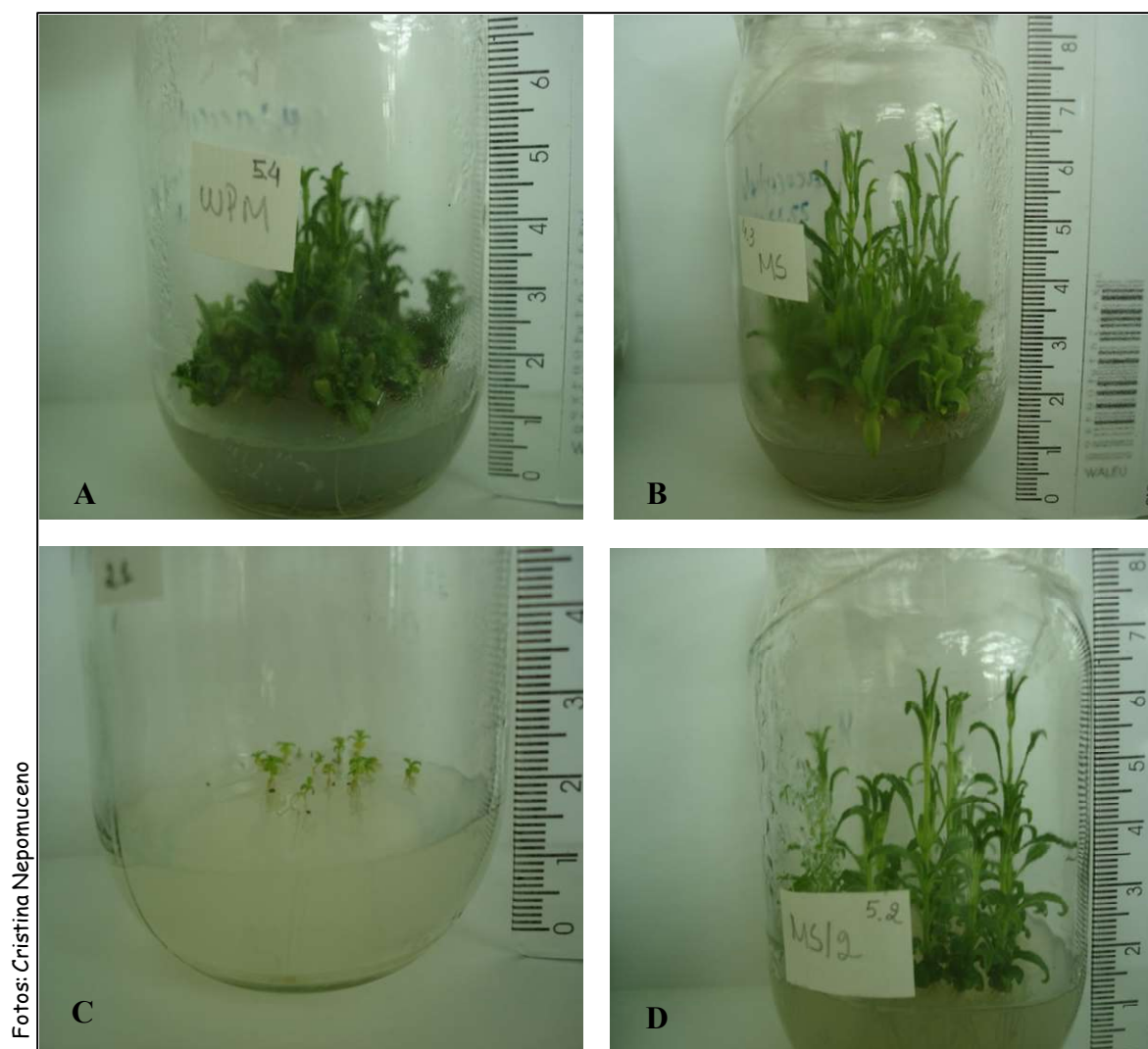


Figura 2: Cultivo *in vitro* de *M. leucocephalus*. A – Plantas em meio de cultura WPM; B - Plantas em meio de cultura MS; C - Plantas em meio de cultura Agar; D – Plantas em meio de cultura MS $\frac{1}{2}$. Feira de Santana, 2012.

3.2 Avaliação do meio de cultura no crescimento *in vitro* de *M. leucocephalus*

Observou-se efeito significativo ($p \leq 0,05$) para número total de folhas e matéria seca de parte aérea, e altamente significativo ($p \leq 0,01$) para número e comprimento de raiz (Tabela 2).

Tabela 2: Resumo da análise de variância para NB (número de brotos), NF (número total de folhas), CB (comprimento da maior brotação), NR (número de raízes), CR (comprimento da raiz), MSPA (matéria seca da parte aérea) e MSR (matéria seca da raiz) de *M. leucocephalus* estabelecidas em diferentes meios de cultura. Feira de Santana, 2012.

| FV | GL | Quadrados Médios | | | | | | |
|------------------------|----|--------------------|----------|--------------------|---------|----------|-------------------|---------------------|
| | | NB | NF | CPA | NR | CR | MSPA ^z | MSR |
| Meio de cultura | 2 | 1,23 ^{ns} | 1820,12* | 4,33 ^{ns} | 35,48** | 110,85** | 9,46* | 14,71 ^{ns} |
| Resíduo | 26 | 3,37 | 383,69 | 6,02 | 2,92 | 15,75 | 2,65 | 64,05 |
| CV (%) | | 29,91 | 28,85 | 43,15 | 19,21 | 39,59 | 21,97 | 59,36 |

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F. * Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F. ^{ns} Não significativo. ^z Dados transformados $\sqrt{x+1}$.

A maior média para número total de folhas por explante (83,30) foi obtida em meio de cultura MS, a qual diferiu significativamente dos resultados obtidos com a utilização do meio MS com a metade da concentração dos sais minerais e do meio WPM, que apresentaram as menores médias (60,93; 58,78) (Figura 3A). Resultados semelhantes foram observados por Rezende et al. (2008) no cultivo *in vitro* de *Coffea arabica*, em que o meio de cultura MS promoveu incrementos no número de folhas ao comparar com os meios testados (WPM, Knudson e White), assim como ocorreu para a espécie *Passiflora laurifolia* (Faria et al., 2007). Porém, resultados diferentes foram relatados para *Olea europaea*, em que os meios WPM e o MO (Rugini, 1984) foram mais eficientes para a produção de folhas desta espécie (Donini et al., 2008). Todavia, para *Calendula officinalis* o tipo de meio de cultura utilizado não influenciou no número de folhas (Bertoni et al., 2006).

Comportamento semelhante ao observado para número de folhas foi obtido para a matéria seca da parte aérea, em que foi possível observar que os resultados obtidos a partir do meio de cultura MS diferiu estatisticamente dos demais, proporcionando incrementos

em torno de 38,75% em relação aos meios de cultura WPM e MS½, que apresentaram médias de 47,07 e 45,79mg, respectivamente (Figura 3B). Resultados semelhantes foram obtidos para *Baccharis tridentata* (Kajiki e Shepherd, 2006) e *Mentha* sp (Tonietto et al., 2008).

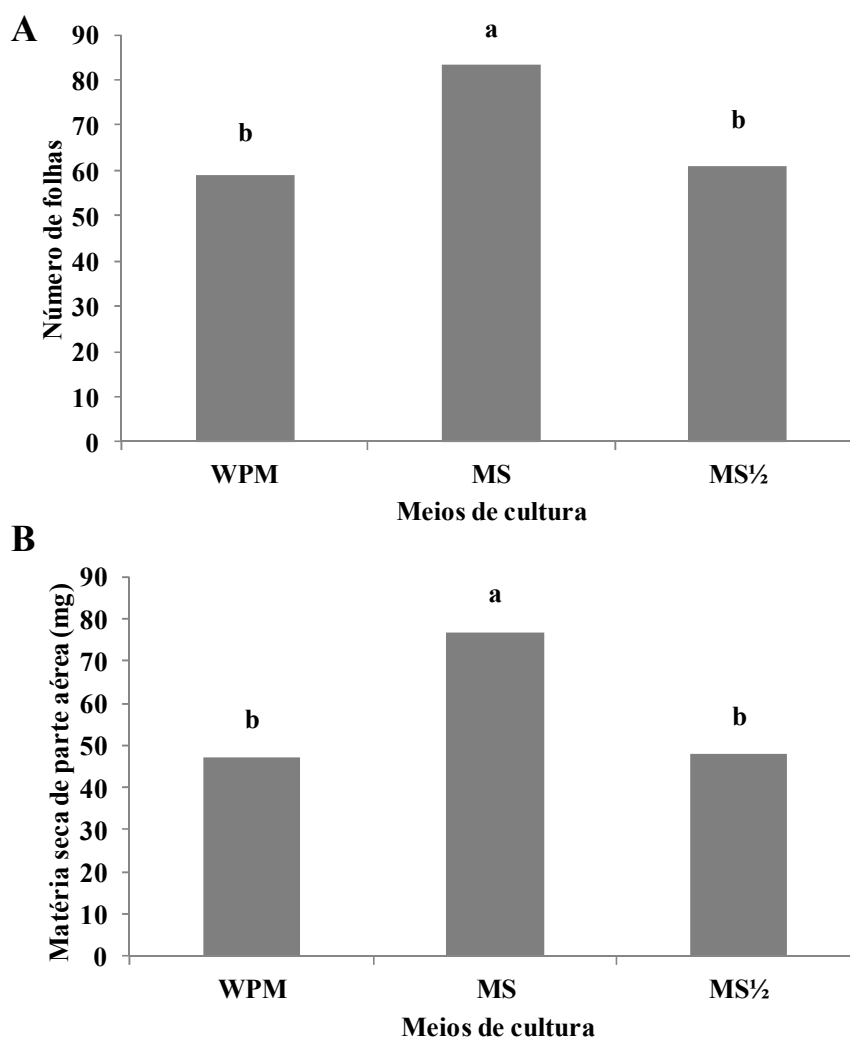


Figura 3: Médias do número total de folhas por explante (A) e matéria seca da parte aérea (B) obtidos em explantes de *M. leucocephalus* estabelecidas em diferentes meios de cultura. Feira de Santana, 2012.

As médias superiores para as variáveis analisadas proporcionadas pelo meio de cultivo MS para *M. leucocephalus*, podem estar associadas ao enriquecimento nutricional que este meio possui, o que lhe confere maior força iônica, suprindo os requerimentos

nutricionais que a espécie em estudo necessita. De acordo com Rocha et al. (2007), o meio nutritivo MS possui maior concentração de nitrogênio total (60mM) do que o WPM (14,7 mM), nas formas de nitrato (MS 40mM; WPM 9,7mM) e amônio (MS 20mM; WPM 4,9mM). Esse elemento mineral é considerado como um dos mais importantes para o crescimento e desenvolvimento do vegetal, já que está envolvido na síntese de aminoácidos e proteínas (Sodek, 2004; George e Klerk, 2008). Segundo Caldas et al. (1998) e George e Klerk (2008), o nitrogênio tem efeito marcante sobre o crescimento e desenvolvimento de culturas de tecidos vegetais. As formas nas quais o nitrogênio (nitrato e amônio) está disponível no meio de cultura são rapidamente assimiláveis e apresentam funções que são primordiais para o metabolismo celular, como a manutenção do balanço iônico intra e extracelular (George e Klerk, 2008).

Analisando o sistema radicular, verificou-se maior número de raízes (11,01) quando os explantes foram cultivados em meio de cultura MS $\frac{1}{2}$, diferindo estatisticamente dos resultados obtidos para os outros dois tipos de meio de cultura utilizados (Figura 4A). Resultados semelhantes foram reportados por Bertoni et al. (2006) para *Calendula officinalis*, que verificaram maior número de raízes quando utilizaram o meio de cultura MS $\frac{1}{2}$, o mesmo ocorreu para *Passiflora edulis* f. *edulis* (Faria et al., 2007). Contudo, resultados diferentes foram encontrados para *Lippia sidoides* (Costa et al., 2007) e *Luehea divaricata* (Flôres et al., 2011) pois o meio de cultura WPM foi mais eficiente para o enraizamento *in vitro*. Já para *Passiflora laurifolia* o meio de cultura MS proporcionou maior número de raízes (Faria et al., 2007). Enquanto que, para *Passiflora giberti*, o tipo de meio não influenciou no número de raízes (Faria et al., 2007), assim como ocorreu para *Prunus cerasifera* (Chaves et al., 2006).

Os resultados encontrados para número de raízes de *M. leucocephalus*, em meio MS $\frac{1}{2}$ ou WPM provavelmente se deu devido à concentração reduzida dos sais, que de acordo com Assis e Teixeira (1998) estimula a emissão e alongamento de raízes.

Para o comprimento das raízes, quando os explantes foram cultivados em meio de cultura MS, verificou-se aumento de duas vezes no comprimento em relação aos explantes cultivados em meio WPM. Contudo, os resultados promovidos pelo meio de cultura MS não diferiram estatisticamente dos obtidos a partir do meio de cultura MS $\frac{1}{2}$ (Figura 4B). Comportamento semelhante ocorreu para *Mentha* sp., que indicaram maior comprimento da raiz no meio de cultura mais concentrado, o MS (Tonietto et al., 2008). Entretanto, resultados diferentes foram observados por Chaves et al. (2006) nas culturas de *Prunus cerasifera*, em que o tipo de meio de cultura não influenciou no crescimento das raízes.

Segundo Faria et al. (2007) e Flôres et al. (2011), as espécies possuem características únicas, determinadas por fatores genéticos, levando a diferentes respostas *in vitro* e, portanto, as condições necessárias para o cultivo *in vitro* são diferenciadas e dependentes da espécie.

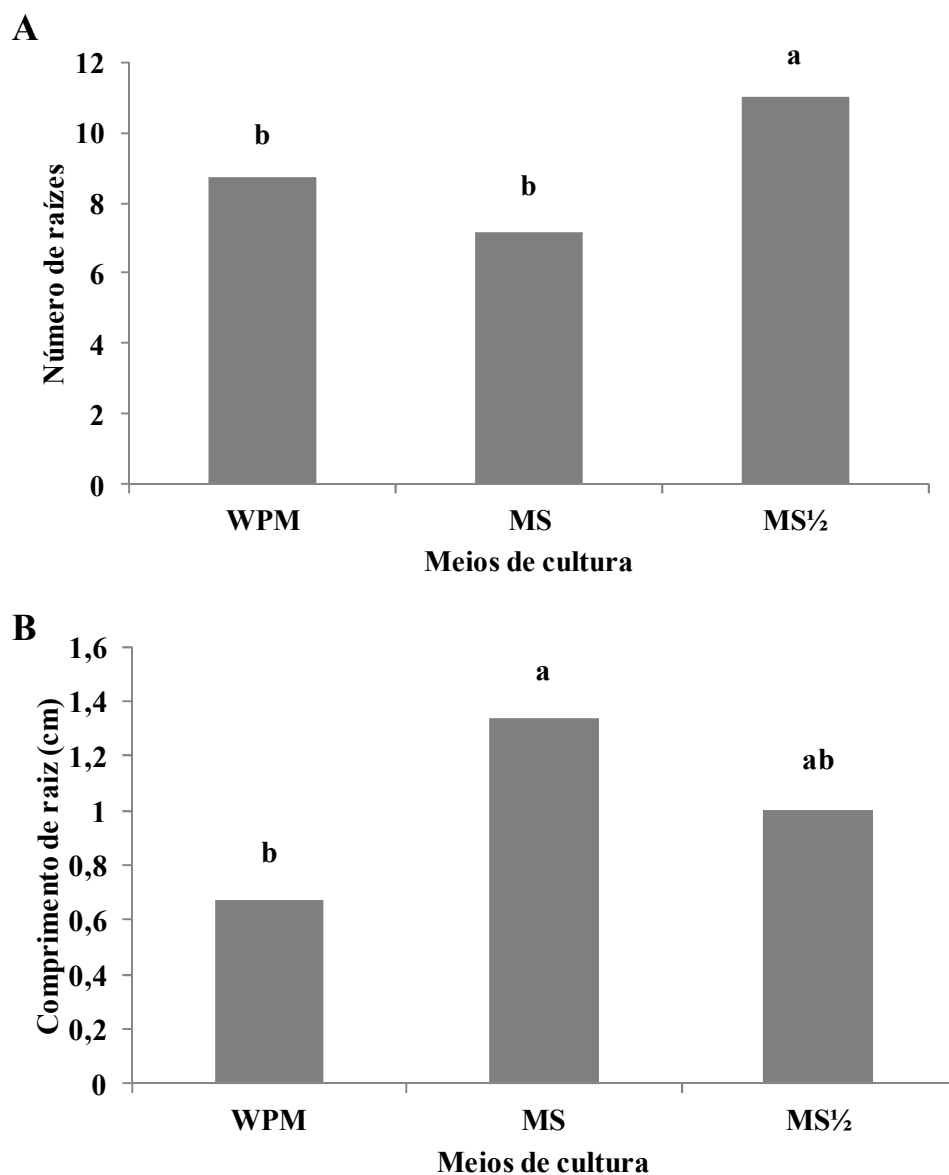


Figura 4: Médias do comprimento da raiz (A) e número de raízes (B) obtido em explante de *M. leucocephalus* estabelecidos em diferentes meios de cultura. Feira de Santana, 2012.

3.3 Influência do volume de meio de cultura no cultivo *in vitro* de *M. leucocephalus*

Verificou-se efeito significativo ($p \leq 0,05$) dos diferentes volumes de meio de cultura sobre o número de brotações e altamente significativo ($p \leq 0,01$) para número total de folhas, comprimento da maior brotação e matéria seca da parte aérea (Tabela 3).

Tabela 3: Resumo da análise de variância para número de brotos (NB), número de folhas (NF), comprimento da maior brotação (CB), matéria seca da parte aérea (MSPA) e número de raízes de brotos de *M. leucocephalus* submetidas a diferentes volumes de meio de cultura MS. Feira de Santana, 2012.

| FV | GL | Quadrados Médios | | | |
|----------------------------------|----|------------------|----------|----------|----------|
| | | NB | NF | CB | MSPA |
| Volume do meio de cultura | 3 | 0,26* | 342,25** | 380,70** | 347,12** |
| Resíduo | 16 | 0,06 | 22,47 | 42,45 | 40,39 |
| CV (%) | | 14,00 | 18,40 | 18,60 | 28,02 |

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F. * Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

Para o número de brotações a equação linear crescente foi o modelo matemático mais adequado para explicar os resultados, indicando que à proporção que aumenta o volume de meio de cultura existe tendência de aumento para esta variável. Com 60mL de meio de cultura produziu-se maior número de brotos (2,04) e com 20mL obteve-se o menor número de brotos (1,54) (Figura 5A). Resultados semelhantes foram reportados por Pereira et al. (2006) no cultivo *in vitro* de *Ananas erectifolius*, assim como ocorreu para a espécie *Psychotria ipecacuanha* (Reis et al., 2004). Entretanto, resultados diferentes foram reportados por Reis et al. (2007), que ao estudar a espécie *Melissa officinalis* verificaram que o volume do meio de cultura não influenciou no número de brotações.

De acordo com Pereira et al. (2006), o maior volume de meio disponibiliza mais nutrientes e diminui também a competição entre as plântulas, o que explicaria a tendência em obter maior número de brotos à medida que aumenta a quantidade do meio de cultura.

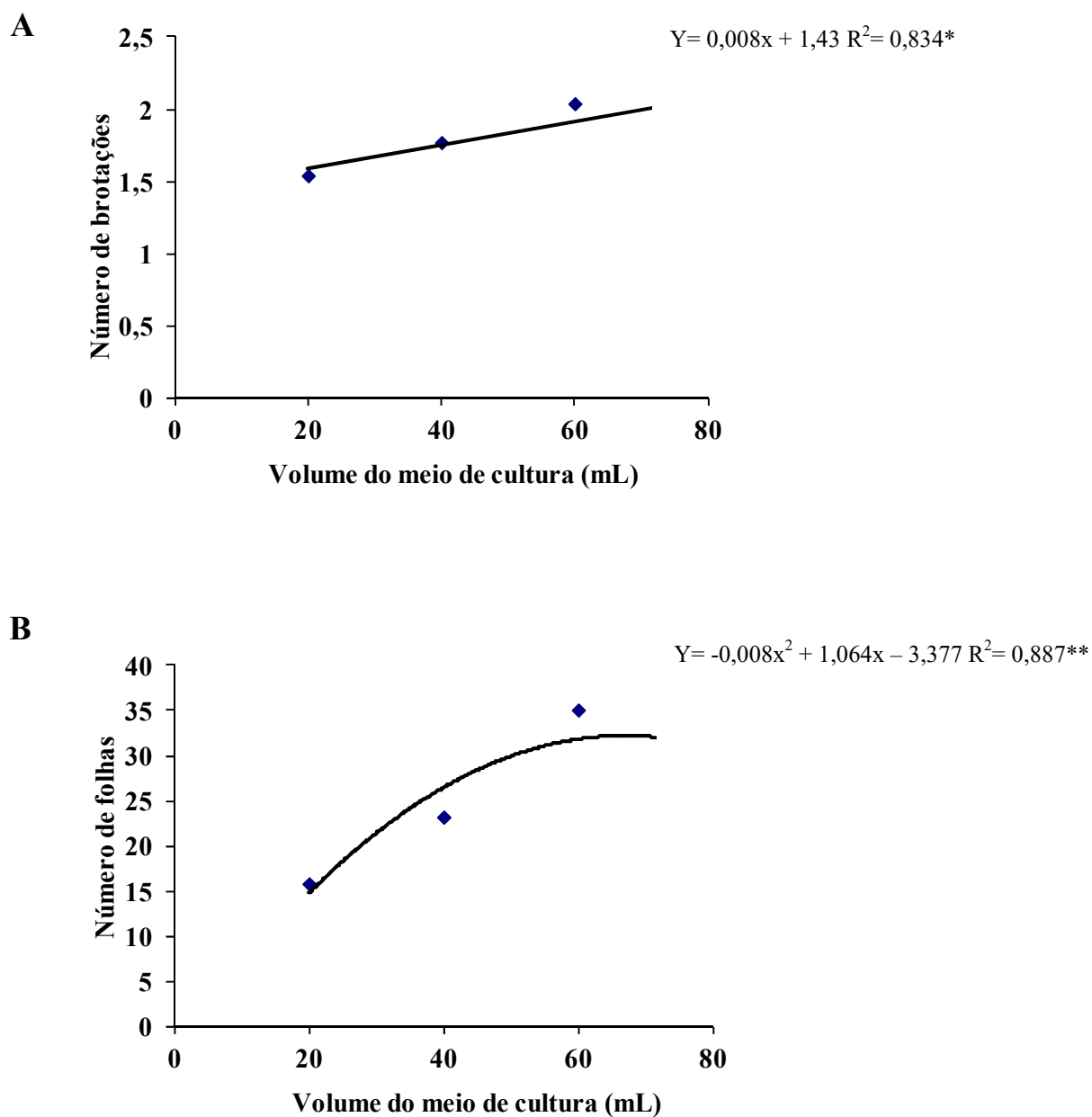


Figura 5: Número de brotações (A) e número total de folhas por explante (B) de *M. leucocephalus* estabelecidas em diferentes volumes de meio de cultura. Feira de Santana, 2012.

Analisando o número de folhas observou-se efeito quadrático ascendente, com ponto de máxima eficiência técnica calculada de 66,50mL de volume de meio de cultura, que atinge maior valor estimado do número de folhas por explante (32) (Figura 5B). Esses resultados diferem daqueles encontrados por Reis et al. (2007) para *Melissa officinalis* que, ao avaliar o número de nós, que obtiveram efeito linear em relação ao volume de meio

utilizado, variável comparada ao número de folhas de *M. leucocephalus*, por considerar que a cada par de folhas para esta espécie é produzido um nó.

Tanto para comprimento da parte aérea quanto para matéria seca de parte aérea, a análise de regressão indicou comportamento quadrático ascendente. O maior valor estimado (4,23cm) para comprimento de parte aérea pode ser obtido com a utilização de 75,42mL de meio de cultura. Já para a matéria seca da parte aérea o maior valor pode ser obtido com a utilização de 84,40mL de meio de cultura (Figura 6A e B). Esses dados revelam que a maior disponibilidade de nutrientes para os brotos proporcionados pelo volume de meio de cultura tem efeito positivo, pois as brotações apresentaram mais vigorosas, coloração verde e alta taxa de sobrevivência (dados não mostrados). Resultados diferentes foram observados para *Melissa officinalis* (Reis et al., 2007), que apresentou efeito linear para o comprimento das brotações e para *Ananas erectifolius*, o volume de meio de cultura não influenciou no comprimento das brotações (Pereira et al., 2006). Segundo Reis et al. (2007) o menor volume de meio pode agravar a competição entre plântulas, levando à redução do crescimento.

Observa-se que para as variáveis analisadas (número de folhas, comprimento da parte aérea e matéria seca da parte aérea), baseado no ponto de máxima, que a partir de um determinado volume, os valores médios para tais variáveis começam a decrescer, indicando ser prejudicial ao cultivo *in vitro* de *M. leucocephalus*, que pode ser devido à disponibilidade gasosa no microambiente, que é conseqüentemente reduzida pelo aumento do volume de meio de cultura no recipiente. De acordo com George e Davies et al. (2008), a absorção de oxigênio pelos tecidos em meio de cultura semi-sólido é, predominantemente, através das partes que estão expostas acima da superfície do meio de cultura (*headspace*). Assim, a taxa de crescimento pode ser diminuída pela limitação no suprimento de oxigênio, que poderá restringir a respiração e como consequência o crescimento e desenvolvimento do vegetal, além de afetar a absorção de sacarose, nitrato e outros íons nutrientes. Contudo, o nível ótimo ou mínimo tolerável de oxigênio varia de acordo com a espécie e o tipo de cultura no qual está crescendo.

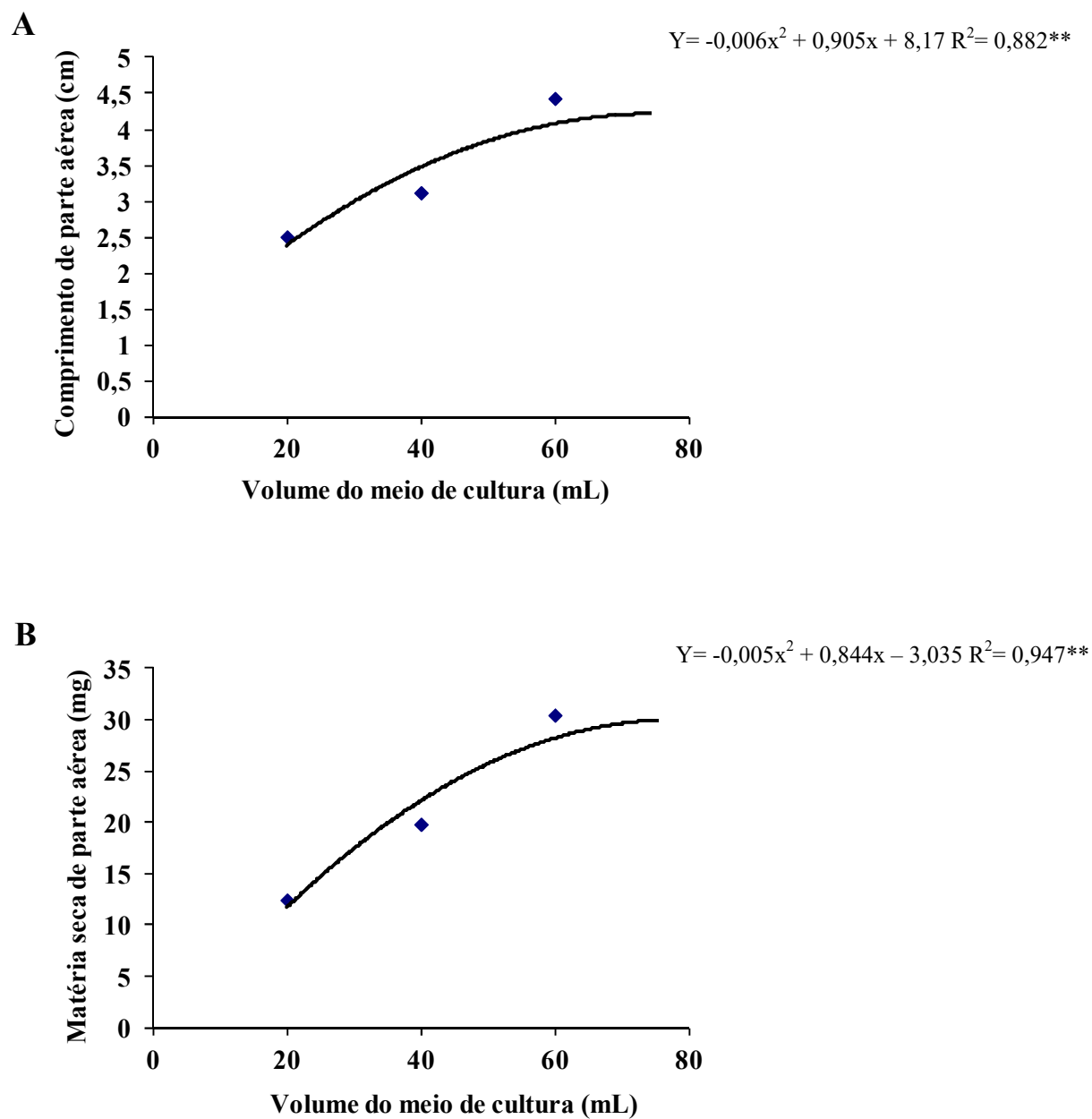


Figura 6: Comprimento da maior brotação (A) e matéria seca da parte aérea (B) de brotações de *M. leucocephalus* estabelecidas em diferentes volumes de meio de cultura. Feira de Santana, 2012.

4.0 Conclusões

O meio de cultura afeta a germinabilidade de sementes de *M. leucocephalus*; a maior taxa de germinação é obtida em meio MS com a metade da concentração de sais; o maior crescimento *in vitro* de *M. leucocephalus* é obtido com a utilização do meio MS, havendo influencia do volume do meio de cultura.

5.0 Referências Bibliográficas

- ASSIS, T.F.; TEIXEIRA, S.L. 1998. Enraizamento de lenhosas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Orgs.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, EMBRAPA-SPI/ EMBRAPA-CNPH. p.:261-296.
- BERTONI, B.W.; DAMIÃO-FILHO, C.F.; MORO, J.R.; FRANÇA, S.C.; PEREIRA, A.M.S. 2006. Micropropagação de *Calendula officinalis*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. 8(2):48-54.
- CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. 1998. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Orgs.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, EMBRAPA-SPI/ EMBRAPA-CNPH. p.:87-132.
- CASTRO, R.D.; HILHORST, H.W. 2004. Embebição e reativação do metabolismo. In: Ferreira, A.G.; Borghetti, F. (Orgs.). **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed. p.:149-162.
- CHAVES, A.C.; SCHUCH, M.W.; ERIG, A.C. 2006. Efeito do meio de cultura e concentrações de auxinas no enraizamento *in vitro* de *Prunus cerasifera* CV. MR. S. 1/8. **Plant Cell Culture & Micropropagation**. 2(1):43-47.
- COSTA, A.S.; ARRIGONI-BLANK, M.F.; BLANK, A.F.; MENDONÇA, A.B.; AMANCIO, V.F.; LEDO, A.S. 2007. Estabelecimento de alecrim-pimenta *in vitro*. **Horticultura Brasileira**. 25(1):68-72.
- DONINI, L.P.; SCHUCH, M.W.; RIBEIRO, M.F.; SOUZA, J.A.; SOARES, G.C. 2008. Estabelecimento *in vitro* de oliveira cv. "Arbequina" para início da micropropagação. **Ciência Rural**. 38(6):1769-1772.
- FARIA, G.A.; COSTA, M.A.P.C.; LEDO, C.A.S.; JUNGHANS, T.G.; SOUZA, A.S.; CUNHA, M.A.P. 2007. Meio de cultura e tipo de explante no estabelecimento *in vitro* de espécies de maracujazeiro. **Bragantia**. 66(4):535-543.

FERREIRA, D.F. 2011. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**. 35(6):1039-1042.

FLÔRES, A.V.; REINIGER, L.R.S.; CURTI, A.R.; CUNHA, A.C.M.C.M.; GOLLE, D.P.; BASSAN, J.S. 2011. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. **Ciência Florestal**. 21(1):175-182.

GEORGE, E.F.; DAVIES, W. 2008. Effects of the Physical Environment. In: GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; KLERK, G-J. **Plant Propagation by Tissue Culture**. Dordrecht: Springer, 3rd Edition. p.:423-464.

GEORGE, E.F.; KLERK, G-J. 2008. The Components of Plant Tissue Culture Media I: Macro- and Micro-Nutrients. In: GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; KLERK, G-J. **Plant Propagation by Tissue Culture**. Dordrecht: Springer, 3rd Edition. p.:65-114.

GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. 2007. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; MELLO, J.C.P; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Orgs.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6^aed., Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC. p.:13-28.

GIULIETTI, A.M.; QUEIROZ, L.P. 2006. **Plantas da Caatinga: perfil botânico, fitoquímica e atividade biológica**. Recife, Associação Plantas do Nordeste, v4, 497p.

HOSSAIN, M.M.; SHARMA, M., TEIXEIRA da SILVA, J.A.; PATHAK, P. 2010. Seed germination and tissue culture of *Cymbidium giganteum* Wall. ex Lindl. **Scientia Horticulturae**. 123:479-487.

KAJIKI, F.O.; SHEPHERD, S.L.K. 2006. Micropropagação da espécie native *Baccharis tridentata* Vahl. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. 8(2):42-47.

LLOYD, G.; McCOWN, B. 1980. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendronn* ssp. **HortScience**. 15(3):416-420.

MAIA, S.S.S.; PINTO, J.E.B.P.; OLIVEIRA, J.A.; SILVA, F.N.; SANTOS, F.M. 2008. Germinação de sementes de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (Lamiaceae) em função da luz e temperatura. **Caatinga**. 21(4):212-218.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for a rapid growth and bioassays with tabacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**. 15:493-497.

OLIVEIRA, L.M.; NEPOMUCENO, C.F.; FREITAS, N.P.; PEREIRA, D.M.S.; SILVA, G.C.; LUCCHESI, A.M. 2011. Propagação vegetativa de *Hyptis leucocephala* Mart. ex Benth. e *Hyptis platanifolia* Mart. ex Benth. (Lamiaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. 13(1):73-78.

PEREIRA, F.D.; PINTO, J.E.B.P.; RODRIGUES, H.C.A.; ROSADO, L.D.S.; BEIJO, L.A.; LAMEIRA, O.A. 2006. Proliferação *in vitro* de brotos de curauá utilizando diferentes volumes de meio. **Plant Cell Culture & Micropropagation**. 2(2):102-106.

REIS, E.S.; PINTO, J.E.B.P.; CORRÊA, R.M.; BERTOLUCCI, S.K.V.; LAMEIRA, O.A. 2004. Tamanhos e posições de explantes e volumes de meio de cultivo na multiplicação de ipeca (*Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes) *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**. 28(3):703-709.

REIS, E.S.; PINTO, J.E.B.P.; ROSADO, L.D.S.R.; CORRÊA, R.M. 2007. Tipos de explantes e volumes de meio de cultura no cultivo *in vitro* de *Melissa officinalis* L. **Plant Cell Culture & Micropropagation**. 1(2):83-88.

REZENDE, J.C.; PASQUAL, M.; CARVALHO, S.P.; PEREIRA, A.R.; VILLA, F. 2008. Influência do meio de cultura e concentração de agar no crescimento e desenvolvimento de plântulas de café oriundas da embriogênese somática direta. **Scientia Agraria**. 9(1):21-26.

ROCHA, S.C.; QUORIM, M.; RIBAS, L.L.F.; KOEHLER, H.S. 2007. Micropropagação de *Cabralea canjerana*. **Revista Árvore**. 31(1):43-50.

RODRIGUES, O.S. 2007. **Óleo essencial de *Hyptis leucocephala* Mart. ex Benth: composição química e atividade antimicrobiana.** Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual de Feira de Santana.

ROY, A.R.; PATEL, R.S.; PATEL, V.V.; SAJEEV, S.; DEKA, B.C. 2011. Asymbiotic seed germination, mass propagation and seedling development of *Vanda coerulea* Griff ex. Lindl. (Blue Vanda): An *in vitro* protocol for an endangered orchid. **Scientia Horticulturae**. 128:325-331.

RUGINI, E. 1984. *In vitro* propagation of some olive (*Olea europaea sativa* L.) cultivars with different root-ability, and medium development using analytical data from developing shoots and embryos. **Scientia Horticulturae**. 24(2):123-134.

SODEK, L. 2004. Metabolismo do nitrogênio. In: KERBAUY, G.B. **Fisiologia Vegetal**. Ed: Guanabara Koogan, Rio de Janeiro-RJ. p.:94-113.

TONIETTO, S.M.; PERINI, C.B.; TONIETTO, A. 2008. Concentrações e composição do meio de Murashige & Skoog na micropropagação da menta. **Plant Cell Culture & Micropropagation**. 4(1):42-47.

CAPÍTULO 2

Morfogênese *in vitro* e aclimatização de *Martianthus leucocephalus* (Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore

Resumo

A espécie *Martianthus leucocephalus* é uma erva aromática e medicinal da região do semiárido brasileiro, produtora de óleo essencial, o qual possui atividade antimicrobiana. Devido à sua importância econômica, estudos sobre a regeneração *in vitro*, que permitam a produção de grande quantidade de mudas com qualidade, se fazem necessários. Este trabalho objetivou avaliar a morfogênese *in vitro* e desenvolver protocolo de micropropagação para a espécie *M. leucocephalus*, por meio da determinação de fatores que afetam a indução, o crescimento e o desenvolvimento de brotações, além de avaliar o impacto do tipo de fechamento (aeração) dos tubos de ensaio na aclimatização. Para a multiplicação *in vitro* foram realizados cinco experimentos, em que se testou: 1- efeito de diferentes explantes (segmento de folha, internodal e nodal) e citocininas (BAP, KIN e TDZ); 2 - efeito de BAP e ANA; 3 - avaliação do tipo de explante (segmento apical, segmento nodal: mediano e basal); 4 - efeito de diferentes fontes de carbono (sacarose, maltose, frutose, glicose e lactose) e 5 - avaliação do efeito citocininas (BAP, KIN, TDZ e ZEA) sobre o pecíolo da folha. Na aclimatização avaliou-se a interferência do fechamento (PVC, tampa plástica e tampão de algodão) dos tubos de ensaio no percentual de sobrevivência das mudas. No primeiro experimento, apenas o segmento nodal apresentou resposta morfogenética, contudo, as citocininas promoveram baixa taxa de regeneração. No segundo experimento, quando o meio de cultura foi suplementado com 1,34 μ M de ANA, obteve-se incrementos no número de brotações e demais variáveis analisadas. Já no terceiro experimento, o segmento nodal (região mediana e basal) mostrou-se superior em relação ao segmento apical, para as variáveis: número de brotos; número de folhas; comprimento da parte aérea e porcentagem de sobrevivência das plantas. No quarto experimento, a fonte de carbono influenciou a resposta morfogenética, a maior média para número de brotações foi obtida quando se utilizou a maltose como fonte de carbono, porém os resultados não diferiram estatisticamente de quando se utilizou sacarose e lactose. Para a variável número de folhas, as maiores médias foram obtidas na presença de frutose e sacarose, respectivamente, sendo que o meio de cultura suplementado com maltose apresentou a menor média para esta variável. Já para a matéria seca das raízes, a maior média foi obtida na presença de sacarose, diferindo estatisticamente daqueles resultados obtidos para glicose. No quinto experimento, observou-se intumescimento dos explantes em todos os meios de cultura que continham regulador vegetal, sendo que os melhores resultados foram obtidos em meios de cultura contendo BAP (1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 μ M), KIN (2,0 e 3,0 μ M) ou TDZ (4,0 μ M). Embora ocorresse alta taxa de intumescimento e consequente formação de gemas adventícias, a porcentagem de formação de brotos foi relativamente baixa, em torno de 18% na presença de 3,0 μ M de BAP, seguido de 14% com 3,0 μ M de KIN e 3,0 e 4,0 μ M de TDZ. O tipo de fechamento dos tubos de ensaio não influenciou no processo de aclimatização das mudas de *M. leucocephalus*.

Palavras-chave: Lamiaceae; Tipo de explante; Reguladores vegetais; Fonte de carbono; Ventilação.

Abstract

The species *Martianthus leucocephalus* is an aromatic herb and medicinal plant from the Brazilian semi-arid region, produces an essential oil, with antimicrobial activity. Due to its economic potential, studies on regeneration in vitro to enable mass propagation is necessary. This study evaluated the in vitro morphogenesis and develop micropropagation protocol for the species *M. leucocephalus*, through the determination of factors affecting induction, growth and development of shoots, in addition to assessing the impact of closure type (aeration) of the test tubes in the acclimatization. For multiplication in vitro experiments were performed five, where tested: 1 - effect of different explants (leaf segment, nodal and internodal) and cytokinins (BAP, KIN and TDZ) 2 - Effect of NAA and BAP, 3 - Review the type of explant (apical segment, nodal segment: middle and basal) 4 - effect of different carbon sources (sucrose, maltose, fructose, glucose and lactose) and 5 - Evaluation of the effect cytokinins (BAP, KIN, TDZ and ZEA) on the leaf petiole. In acclimatization evaluated the interference of closure (PVC, plastic cover and cotton plug) of the test tubes in the percentage of seedling survival during acclimatization. In the first experiment, only the nodal segment showed morphogenetic response, however, cytokinins promoted low regeneration rate. In the second experiment, when the culture medium was supplemented with 1.34 μM NAA was obtained increments in the number of shootings and other variables. In the third experiment, the nodal segment (middle and basal area) was higher than the apical segment, the following variables: number of shoots, number of leaves, shoot length and percentage of plant survival. In the fourth experiment, the carbon source influenced morphogenetic response, the highest average number of shoots was obtained when using maltose as carbon source, but the results were not statistically different than when using sucrose and lactose. For variable number of shoots, the highest means were obtained in the presence of fructose and sucrose, respectively, and the culture medium with maltose had the lowest mean for this variable. As for the dry matter of the roots, the highest average was obtained in the presence of sucrose, differing from those findings for glucose. In the fifth experiment, it was observed swelling of the explants in all culture media containing growth regulators, and the best results were obtained in culture media containing BAP (1.0, 2.0, 3.0 and 4.0 μM), KIN (2.0 and 3.0 μM) or TDZ (4.0 μM). Although high rate of swelling occurred and the subsequent formation of adventitious buds, the percentage of shoot formation was relatively low, at around 18% in the presence of 3.0 μM BAP, followed by 14% with 3.0 μM of KIN and 3.0 and 4.0 μM TDZ. The closure type of test tubes did not affect the process of acclimatization of seedlings of *M. leucocephalus*.

Keywords: Lamiaceae; Explant type; Plant regulators; Carbon source; Ventilation.

1.0 Introdução

Dentre as várias plantas com potencial para a produção de metabólitos de interesse farmacológico destaca-se a espécie *Martianthus leucocephalus*, erva aromática, cujas folhas possuem rendimento de 0,1 a 0,3% de óleo essencial, composto por uma mistura de monoterpenos e sesquiterpenos, apresenta atividade antimicrobiana contra *Bacillus cereus*, *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus* (Rodrigues, 2007).

Esses microrganismos apresentam enormes danos à saúde humana, pois as infecções causadas por eles emergiram como uma das principais causas de morte em pacientes com algum tipo de imunodeficiência, além do que, a exemplo do *S. aureus* que tem resistência a diversos antibióticos, tornando-se um grande problema para a área de saúde. Existe então, a necessidade de descoberta de novas substâncias bioativas e como *M. leucocephalus* mostrou efeitos positivos contra esses microrganismos, faz-se necessário a realização de estudos que promovam uma eficiente produção massal de matéria-prima, uma vez que, para a obtenção do óleo essencial retira-se a planta do habitat natural.

As plantas no seu habitat natural estão expostas às variações temporais e espaciais que, conseqüentemente afetam a síntese dos metabólitos secundários. Portanto, a regeneração *in vitro* de espécies vegetais com potencial medicinal é de importância tanto a nível sócio-econômico quanto ambiental, uma vez que, é possível obter mudas em escala comercial, num espaço físico e temporal reduzido, evitando assim exploração indiscriminada. Além disso, essa técnica que envolve a cultura de tecidos vegetais poderá garantir a obtenção de plantas com características, tanto qualitativa quanto quantitativamente superiores em relação à produção de metabólitos bioativos de interesse, em qualquer época do ano.

Para o sucesso da regeneração *in vitro* de uma espécie existem vários fatores que precisam ser estudados, de forma a se buscar um eficiente protocolo de micropropagação, com a manutenção das características desejáveis, que no caso das plantas medicinais é a produção do metabólito secundário de interesse.

Dentre tais fatores, encontram-se os endógenos, relacionados ao explante, como tipo e idade, podendo apresentar diferentes tipos de células e graus de diferenciação, além do estágio fisiológico, quando se trata dos hormônios endógenos. Associado a esses fatores, têm-se os exógenos, que incluem o ambiente físico (caracterizado pela luminosidade, temperatura e umidade) e o meio de cultura utilizado (estado físico, variações quanto aos nutrientes minerais), bem como a fonte de carbono, tipo,

concentração e associação dos reguladores vegetais. Logo, esses fatores isolados ou agindo sinergicamente conduzirão a diferentes respostas morfogênicas (Handro e Floh, 1990; Grattapaglia e Machado, 1998; Kerbauy, 1999; Costa et al., 2006; Preece, 2008; Subotic et al., 2009; Li et al., 2011).

Efeitos significativos da manipulação dos fatores endógenos e exógenos na morfogênese *in vitro* têm sido verificados em várias espécies, tais como: a formulação do meio de cultura para *Echinacea purpurea* (Jones et al., 2007) e *Zingiber officinale* (Abbas et al., 2011); tipo e concentração da fonte de carbono para *Anacardium occidentale* (Gemas e Bessa, 2006) e *Crambe abyssinica* (Li et al., 2011); tipo e tamanho do explante para *Euphorbia heterophylla* (Colussi et al., 2008), *Aloe vera* (Singh e Sood, 2009), *Prunus microcarpa* (Nas et al., 2010) e *Bauhinia cheilantha* (Gutiérrez et al., 2011); diferentes genótipos para *Pfaffia glomerata* (Flores et al., 2009), *Castilleja applegatei* (Backes e Hoch, 2010) e *Pogostemon cablin* (Santos et al., 2010); luminosidade e tipo de fechamento dos tubos para *Castanea sativa* (Sáez et al., 2012). Para todas as espécies citadas, esses fatores estudados foram associados a diferentes tipos e concentrações de reguladores vegetais, que conduziram a diferentes respostas morfogênicas, durante o processo de multiplicação *in vitro*.

Uma vez realizada a multiplicação *in vitro*, faz-se necessário o estudo do enraizamento *in vitro* ou *ex vitro*. Algumas espécies, como *Salvia officinalis* (Avato et al., 2005) e *Lavandula pedunculata* (Zuzarte et al., 2010) não precisam passar por esta etapa, pois durante a multiplicação *in vitro* as brotações formam raízes. Em outras espécies, o enraizamento pode ser feito *ex vitro*, durante a etapa de aclimatização como é o caso de *Calendula officinalis* (Bertoni et al., 2006) e *Juniperus naviculares* (Castro et al., 2011).

As espécies que não precisam passar pela etapa de enraizamento *in vitro* oferecem vantagem ao processo de micropropagação, pois além da redução do tempo para a produção final das mudas, ainda existe a questão do ponto de vista econômico, pois o custo de produção também é reduzido. As brotações com ou sem raízes, seguem para a etapa de aclimatização que é caracterizada pela transferência das plantas do ambiente *in vitro* para o *ex vitro*, o que finda o processo de micropropagação e, para o sucesso deste, é necessário que a aclimatização seja bem sucedida.

Para o sucesso da aclimatização, muitas vezes, é necessário a rustificação *in vitro* das plantas micropropagadas. O processo consiste no desenvolvimento da fotoautotrofia, estimulada pela redução ou retirada da fonte de carbono do meio de cultura, aumento na concentração de CO₂ e da intensidade luminosa, além de mecanismos que proporcionem as

trocas gasosas, favorecendo a redução da umidade relativa nos recipientes de cultura, o que irá proporcionar uma adaptação mais rápida dos estômatos do que as plantas transplantadas diretamente do vidro para a casa de vegetação, além de estimular a produção de cera e reduzir as perdas de água no transplante (Grattapaglia e Machado, 1998).

O presente trabalho objetivou avaliar a morfogênese *in vitro* e estabelecer um protocolo de micropropagação para a espécie *Martianthus leucocephalus*, estudando alguns fatores que afetam a indução, o crescimento e o desenvolvimento de brotações, além de avaliar o impacto da ventilação na aclimatização.

2.0 Material e Métodos

2.1 Meio de cultura e condições experimentais

O meio de cultura utilizado em todos os experimentos foi o MS (Murashige e Skoog, 1962), suplementado com 87,64mM de sacarose e solidificado com 0,7% de ágar. O pH do meio de cultura foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$ (utilizando-se NaOH ou HCl 0,1N), antes da autoclavagem à temperatura de 121°C por 15 minutos.

As culturas foram mantidas em sala de crescimento à temperatura de $25 \pm 3^\circ\text{C}$, 60% de umidade relativa, fotoperíodo de 16 horas e radiação fotossintética ativa de $60\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

2.2 Morfogênese *in vitro* de *M. leucocephalus*

2.2.1 Efeito de diferentes tipos e concentrações de citocininas sobre diferentes explantes na indução de brotações de *M. leucocephalus*

Os explantes (segmento nodal, segmento internodal e folha) foram obtidos de plantas germinadas *in vitro* em meio de cultura MS½, com aproximadamente 80 dias de idade. O segmento nodal e internodal mediam cerca de 0,5cm de comprimento e o segmento de folha cerca de $0,5\text{cm}^2$ (seccionamento realizado apenas nas extremidades da folha) (Figura 1). Esses foram colocados em meio de cultura, suplementado com os seguintes reguladores vegetais: 6-benzilaminopurina (BAP), cinetina (KIN) e thidiazuron (TDZ) nas concentrações: 0,0; 1,11; 2,22; 4,44; 8,88µM.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 3 x 5 (explantes x tipos de citocinina x concentrações de citocinina), totalizando 45

tratamentos. Cada tratamento foi constituído de cinco repetições, sendo cada repetição composta por cinco unidades experimentais (1 explante/ tubo de ensaio).

Após 30 dias foram avaliadas as seguintes variáveis: número de brotações por explante, número de folhas por explante, comprimento da maior brotação (cm) e matéria seca das brotações (mg).

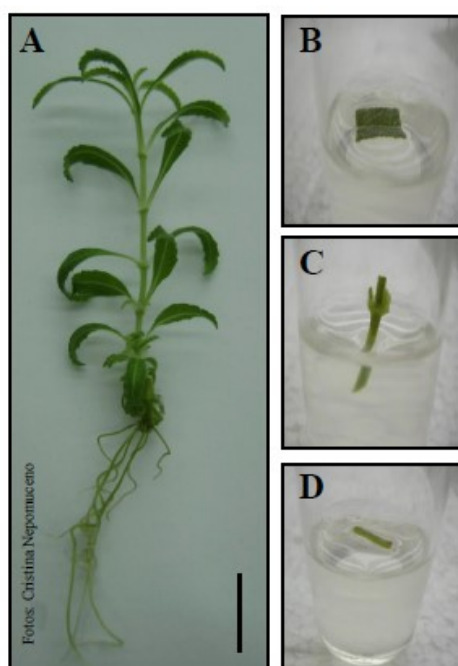


Figura 1: Esquema do seccionamento realizado para obtenção dos explantes utilizados na etapa de multiplicação *in vitro*: (A) planta de *M. leucocephalus* germinada *in vitro* em meio de cultura MS $\frac{1}{2}$, com 80 dias de idade; (B) segmento de folha; (C) segmento nodal; (D) segmento internodal. Barra = 1,0cm. Feira de Santana, BA, 2012.

2.2.2 Efeito da interação da citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) e da auxina ácido naftalenoacético (ANA) na indução de brotações de *M. leucocephalus*

Neste experimento foram utilizados segmentos nodais como fonte de explante, oriundos de plantas estabelecidas *in vitro* (germinação *in vitro* em meio MS $\frac{1}{2}$). Os segmentos nodais foram inoculados em meio de cultura, suplementado com os reguladores vegetais: BAP (0,0; 1,11; 2,22; 4,44 e 8,88 μ M) e ácido naftalenoacético – ANA (0,0; 1,34; 2,68; 5,36 e 10,72 μ M).

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado em arranjo fatorial 5 x 5 (concentrações de BAP x concentrações de ANA), totalizando 25 tratamentos, os quais foram constituídos por dez repetições, e cada repetição foi composta por oito unidades experimentais (1 explante/ tubo de ensaio).

A avaliação foi realizada após 60 dias, para as seguintes variáveis: número de brotações por explantes, número de folhas por explante, comprimento da maior brotação (cm) e matéria seca das brotações (mg).

2.2.3 Efeito do tipo de explante no cultivo *in vitro* de *M. leucocephalus*

Baseado nos resultados dos experimentos anteriores foi realizado este experimento, em que se utilizou como fonte de explante: segmento apical e segmento nodal (mediano e basal) originados de plantas estabelecidas *in vitro* (germinação *in vitro* em meio MS½) (Figura 2). Esses explantes foram cultivados em meio de cultura acrescido de 1,34µM de ANA.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, constituído por três tratamentos (apical, mediano e basal), composto por cinco repetições e cada repetição constou de quatro unidades experimentais (1 explante/ tubo de ensaio).

Após 60 dias foram avaliados as seguintes variáveis: número de brotações, número de folhas por explante, comprimento da maior brotação (cm), matéria seca das brotações (mg), porcentagem de sobrevivência dos brotos regenerados.

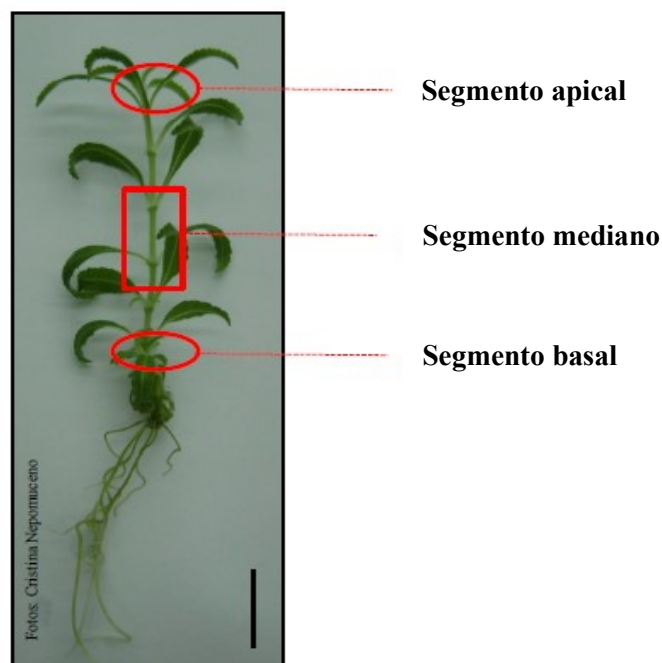


Figura 2: Esquema do seccionamento realizado para obtenção dos explantes utilizados na etapa de multiplicação *in vitro*: planta de *M. leucocephalus* germinada *in vitro* em meio de cultura MS½, com 80 dias de idade com os respectivos locais de seccionamento. Barra = 1,0cm. Feira de Santana, 2012.

2.2.4 Efeito de diferentes fontes de carbono no cultivo *in vitro* de *M. leucocephalus*

Segmentos nodais oriundos de plantas estabelecidas *in vitro* (germinação *in vitro* em meio MS½) foram cultivados em meio de cultura acrescido de 1,34µM de ANA, suplementado com diferentes fontes de carbono: monossacarídeos (glicose, frutose) e dissacarídeos (sacarose, maltose e lactose), com a concentração equivalente a 87,64mM.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, formado por cinco tratamentos, constituídos por dez repetições, compostos cada uma por cinco unidades experimentais (5 tubos de ensaio). Após 45 dias avaliou-se: número de brotações, número de folhas por explante, comprimento da maior brotação (cm), número de raízes, comprimento da maior raiz (cm) e a matéria seca da parte aérea e das raízes (mg).

2.2.5 Organogênese direta a partir de folhas de *M. leucocephalus*

Folhas com pecíolo, oriundas de plantas estabelecidas *in vitro* com 80 dias (germinação *in vitro*) foram utilizadas como fonte de explante, em meio de cultura contendo diferentes concentrações (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 μ M) e tipos de citocininas (BAP, KIN, TDZ e ZEA - zeatina). O meio de cultura foi submetido à esterilização química com hipoclorito de sódio e o pH foi ajustado para 5,7 conforme metodologia descrita por Teixeira et al. (2006).

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com arranjo fatorial 4 x 5 (tipos de citocinina x concentrações de citocininas), perfazendo um total de 20 tratamentos, compostos por dez repetições, cada uma constituída de cinco unidades experimentais. Após 30 dias foram avaliadas as seguintes variáveis: porcentagem de explantes intumescidos e de formação de brotos.

2.3 Ventilação e Aclimatização de *M. leucocephalus*

Segmentos nodais obtidos de material vegetal estabelecido *in vitro*, em meio de cultura sem regulador vegetal, foram inoculados em tubos de ensaio contendo 15 mL do meio de cultura acrescido com 1,34 μ M de ANA. Para o processo de rustificação foram testados diferentes fechamentos do tubo de ensaio (PVC, tampa plástica e tampão de algodão).

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, totalizando três tratamentos, constituído por dez repetições, cada uma composta por quinze unidades experimentais. Após 45 dias, 50 plantas de cada tratamento foram analisadas em relação ao número de brotações, número de folhas, comprimento (cm) e matéria seca de parte aérea (mg).

Para a aclimatização foram transferidas 25 plantas de cada tratamento para copos plásticos de 500 mL, contendo substrato terra vegetal e mantidos em casa de vegetação (70% de sombreamento). As plantas foram cobertas com garrafas tipo *pet* com tampa, de forma a manter a umidade relativa alta no microambiente. Depois de três dias as tampas das garrafas foram desenroscadas, no décimo dia retiradas e no vigésimo primeiro dia as garrafas foram totalmente retiradas (Figura 3), sendo após 24 dias avaliada a porcentagem de sobrevivência.

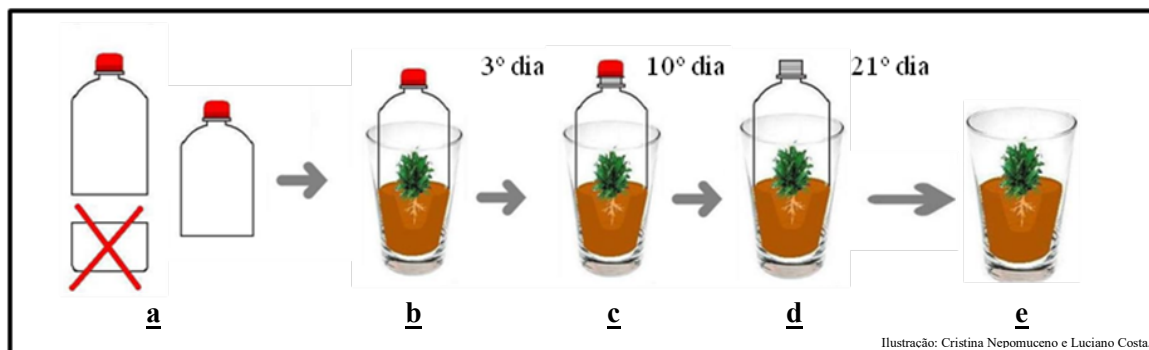


Figura 3: Esquema ilustrativo do processo de aclimatização em casa de vegetação. A – Garrafa tipo *pet*; B – Garrafa com tampa totalmente fechada; C – Garrafa com tampa desenroscada; D – Garrafa sem tampa e E – Sem garrafa após 21 dias. Feira de Santana, 2012.

2.4 Análise estatística

Os dados foram avaliados estatisticamente, mediante a análise de variância, testando-se as médias pelo Teste de Tukey e Análise de Regressão, para os fatores qualitativos e quantitativos, respectivamente. Os dados de percentagens foram transformados em arco seno da $\sqrt{\%}$ e os números de contagem em $\sqrt{x+1}$. Os dados foram analisados usando o programa SISVAR (Ferreira, 2011).

3.0 Resultados e Discussão

3.1 Morfogenese *in vitro* de *M. leucocephalus*

3.1.1 Efeito de diferentes tipos e concentrações de citocininas sobre diferentes explantes na indução de brotações de *M. leucocephalus*

Observou-se efeito altamente significativo ($p \leq 0,01$) da interação “tipo de citocininas x concentração de citocinina” para todas as variáveis analisadas (Tabela 1). De acordo com os resultados observados, os explantes de segmento internodal e de folha não apresentaram capacidade morfogenética, pois não foi constatada a formação de brotações, nem mesmo a formação de calos, em nenhum dos tratamentos testados (dados não mostrados). Essa resposta possivelmente ocorreu porque estes explantes apresentam-se com tecido diferenciado, e não possuem órgãos meristemáticos pré-existentes como no caso do segmento nodal, o qual possui a gema axilar ou lateral.

Tabela 1: Resumo da análise de variância para número de brotos por explante (NB), número de folhas total (NF), comprimento do maior broto (CPA) e matéria seca de parte aérea (MSPA) de brotações de *M. leucocephalus*, advindos dos explantes segmentos nodais submetidos a diferentes tipos e concentrações de citocininas em meio de cultura MS, aos 30 dias da inoculação *in vitro*. Feira de Santana, 2012.

| Quadrados Médios | | | | | |
|-------------------------|-----------|--------------------|---------------------|------------|-------------|
| FV | GL | | | | |
| | | NB | NF | CPA | MSPA |
| Citocininas (C) | 2 | 1,53** | 641,13** | 586,42** | 1,26** |
| Concentração (c) | 4 | 0,14 ^{ns} | 88,06 ^{ns} | 246,13** | 1,09** |
| C x c | 8 | 0,48** | 133,48** | 417,92** | 0,89** |
| Resíduo | 60 | 0,08 | 45,78 | 39,03 | 0,07 |
| CV (%) | | 13,63 | 33,43 | 23,90 | 24,19 |

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F. ^{ns} Não significativo.

De acordo com Mercier (2008), a gema axilar tem potencial suficiente para se desenvolver em novos ramos, porém a maioria delas permanece dormente por todo o ciclo de vida da planta. Isto significa que estes dois tipos de explantes (segmento internodal e de folha) necessitariam rediferenciar ou desdiferenciar, levando então, à formação de gemas adventícias ou meristemóides. Contudo, para a ocorrência desses processos, as células desses explantes deveriam ser competentes para responder aos estímulos que foram submetidas, as concentrações e tipos de citocininas.

Resultados diferentes dos observados para *M. leucocephalus* foram reportados para as espécies *Saussurea involucrata* (Guo et al., 2007), *Ophiorrhiza prostrata* (Beegum et al., 2007) e *Pogostemon cablin* (Santos et al., 2010) que apresentaram respostas morfogenéticas a partir de segmento internodal e/ ou folha ao utilizar diferentes citocininas, e quando foi adicionada uma auxina ao meio de cultura, verificaram elevadas taxas de regeneração *in vitro*. Diante disto, verifica-se que os tipos de reguladores vegetais, bem como as concentrações utilizadas não foram eficazes para a promoção da morfogênese *in vitro* em segmento internodal e de folha de *M. leucocephalus*, necessitando testar essas citocininas associadas a uma fonte auxínica.

Utilizando o segmento nodal no cultivo *in vitro* de *M. leucocephalus* foi possível verificar que estes apresentaram capacidade de regeneração em todos os tratamentos testados, mesmo no meio de cultura isento de regulador vegetal. Ao analisar o número de brotações, observou-se a maior média (2,35) em meio de cultura contendo TDZ, porém este resultado não diferiu estatisticamente ao ser utilizado BAP, que apresentou número médio de brotações igual a 2,16. No entanto, os resultados obtidos com TDZ e BAP diferiram estatisticamente dos obtidos em meio de cultura que continha a citocinina KIN, em que esta proporcionou a menor média (1,84) para número de brotações (Tabela 2). O incremento, ainda que baixo, promovido pelo uso de TDZ e BAP em relação à KIN, mostrou-se mais eficiente.

Os resultados encontrados para número de brotações por explante são semelhantes àqueles reportados para *Stevia rebaudiana* (Thiyagarajan e Venkatachalam, 2012) que produziu apenas 2,0 brotos por explante com a concentração de 4,44 μM de BAP. Todavia, resultados superiores foram relatados para as espécies *Salvia officinalis* (Avato et al., 2005) que apresentou 4,6 brotos por explante na presença de 2,22 e 4,44 μM de BAP, porém não ocorreu a formação de brotações na presença de KIN. Assim como relatado para quatro genótipos de *Rubus* (Wu et al., 2009), *Balanites aegyptiaca* (Siddique e Anis, 2009) em que os autores observaram 7,7 brotos por explantes com 12,5 μM de BAP, *Clitoria ternatea* (Singh e Tiwari, 2010) em torno de 10,10 brotos por explante utilizando 6,66 μM de BAP, *Achyranthes aspera* e *A. bidentata* (Gnanaraj et al., 2012) que apresentaram 10,60 e 9,50 brotos por explantes, respectivamente, com concentração de 22,20 μM de BAP. No cultivo *in vitro* de *Cannabis sativa*, o TDZ demonstrou superioridade quando comparado com as outras duas citocininas (BAP e KIN), apresentando 13 brotos por explante na presença de 0,5 μM (Lata et al., 2009).

Verificou-se também que os resultados obtidos para as concentrações utilizadas independente do tipo de citocinina, não apresentaram diferença estatística entre si para o número de brotações (Tabela 2), indicando que as concentrações de citocininas utilizadas não promoveram incrementos para essa variável, uma vez que o meio de cultura sem regulador vegetal apresentou média similar. Evidencia-se, portanto, que tal promoção deveu-se a uma característica importante do tipo de explante, que foi a presença da gema axilar, e no caso de *M. leucocephalus*, em cada segmento nodal, têm-se duas gemas axilares, que foram estimuladas a crescer, pela quebra da dominância apical, levando a retomada de crescimento da gema. Talvez as concentrações de citocininas tenham sido

Tabela 2: Médias para número de brotações, número de folhas e comprimento do maior broto de *M. leucocephalus* submetidos a diferentes concentrações de BAP, KIN e TDZ. Feira de Santana, 2012.

| CITOCININAS | | | | |
|--|------------|------------|------------|--------------|
| Concentrações (µM) | BAP | KIN | TDZ | |
| Nº de brotações | | | | Média |
| 0,00 | 2,03 aB | 1,96 aA | 2,08 aB | 2,02 A |
| 1,11 | 2,10 bB | 1,32 cB | 2,86 aA | 2,09 A |
| 2,22 | 2,03 aB | 1,96 aA | 2,14 aB | 2,04 A |
| 4,44 | 2,03 aB | 2,08 aA | 2,39 aAB | 2,17 A |
| 8,88 | 2,62 aA | 1,88 bA | 2,25 abB | 2,25 A |
| Média | 2,16 a | 1,84 b | 2,35 a | |
| Nº de folhas | | | | |
| 0,00 | 22,2 aA | 23,2 aAB | 14,9 aA | 20,1 A |
| 1,11 | 22,6 aA | 16,6 aB | 18,7 aA | 24,3 A |
| 2,22 | 22,4 bA | 35,4 aA | 15,4 bA | 19,3 A |
| 4,44 | 22,3 aA | 24,0 aAB | 11,9 bA | 19,4 A |
| 8,88 | 26,2 aA | 16,7 abB | 10,8 bA | 18,4 A |
| Média | 23,14 a | 23,18 a | 14,5 b | |
| Comprimento do maior broto (cm) | | | | |
| 0,00 | 2,41 aA | 2,48 aB | 2,63 aA | 2,51 B |
| 1,11 | 2,93 aA | 2,54 aB | 2,57 aA | 2,67 AB |
| 2,22 | 2,46 bA | 5,53 aB | 1,80 bA | 3,26 A |
| 4,44 | 2,46 aA | 2,87 aB | 1,95 aA | 2,43 B |
| 8,88 | 2,77 aA | 2,08 abB | 1,72 bA | 2,23 B |
| Média | 2,61 b | 3,10 a | 2,15 c | |

*Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas não diferem entre si estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

baixa para promover múltiplas brotações, nesse período de tempo. Fenômeno similar foi reportado no cultivo *in vitro* de *Labisia pumila* (Hartinie e Jualang, 2007) e de *Mandevilla illustris* (Biondo et al., 2004) a respeito do fraco efeito das citocininas utilizadas, produzindo apenas 1,1 – 1,3 brotos por explante, quando utilizaram *seedlings* com 1,0cm de comprimento e segmento nodal, respectivamente.

Outro fator que poderia promover a formação de múltiplos brotos seria a adição de auxina ao meio de cultura, porque, embora as citocininas estejam envolvidas na divisão celular, regulando a atividade de ciclinas (proteínas que controlam a divisão celular) é necessário em alguns casos à adição de auxina. A auxina está envolvida com a síntese dessas proteínas, mais especificamente com a ciclina que atua na transição da fase na qual os núcleos já sofreram duplicação do DNA (fase G2) para a entrada da mitose (M) propriamente dita. Porém, para a ativação dessa ciclina é necessário a presença de citocinina (Peres e Kerbaui, 2008; Taiz e Zeiger, 2009). Diante disso, verifica-se a necessidade de um balanço entre citocininas e auxinas de forma a aumentar o número de brotações.

Comportamento semelhante ao número de brotações foi observado para a variável número de folhas, em que as concentrações, independente do tipo de citocinina não variaram estatisticamente entre si. Ao comparar o tipo de citocinina utilizada no meio de cultura, verificou-se que as maiores médias (23,14 e 23,18), ocorreram na presença de BAP e KIN, respectivamente, as quais não diferiram estatisticamente. Porém diferiram dos resultados obtidos para o meio de cultura suplementado com TDZ, que apresentou a menor média (14,5) (Tabela 2). Esses resultados são superiores àqueles relatados para as espécies *Labisia pumila* (Hartinie e Jualang, 2007) onde se obteve 7,7 folhas por explante, quando utilizaram ZEA (zeatina); *Syringa x hyacinthiflora* (Cui et al., 2009) em meio de cultura contendo, associação de duas citocininas: BAP (4,44 μ M) + ZEA (0,45 μ M) e BAP (0,44 μ M) + ZEA (0,09 μ M) obtendo em média 11,0 folhas por explante.

Já para o comprimento do maior broto, a maior média (3,10cm) foi observada quando o meio de cultura foi suplementado com KIN, diferindo estatisticamente dos resultados obtidos com as citocininas BAP e TDZ, que apresentaram médias inferiores, 2,61 e 2,15cm, respectivamente. Em relação às concentrações de citocininas utilizadas, a maior média (3,26cm) foi observada na presença de 2,22 μ M, diferindo dos resultados apresentados nas demais concentrações (Tabela 2). Portanto, observa-se que com o uso de KIN, quando comparado com BAP e TDZ houve maior investimento no alongamento das brotações em torno de 18,77 e 44,18%, respectivamente. Esses resultados devem estar

relacionados à maior produção de brotos nos tratamentos com BAP e TDZ em relação à KIN, e provavelmente isso gerou uma maior competição pelo substrato (nutrientes). Os brotos não alongaram conforme aqueles que se encontravam no meio de cultura contendo KIN, que teve em média cerca de 15 e 22% menos brotos quando os meios foram suplementados com BAP e TDZ, respectivamente.

De acordo com Mercier (2008), quando a gema lateral inicia o crescimento, começa a produzir sua própria auxina, aumentando assim o seu alongamento. Isso pode ser relacionado com a produção do número de folhas, em que o meio de cultura que continha TDZ promoveu o menor número de folhas, e conseqüentemente, menor número de gemas, e foi também neste meio de cultura que ocorreu o menor crescimento dos brotos.

Resultados semelhantes foram relatados por Gnanaraj et al. (2012) ao obterem maior comprimento de parte aérea (5,40cm) para *A. bidentata* quando utilizaram KIN em relação ao BAP. Ao contrário do ocorrido para *M. leucocephalus*, Singh e Tiwari (2010) observaram que KIN foi a citocinina que menos contribuiu para o crescimento das brotações (2,22cm), sendo o BAP superior com média em torno de 8,6cm de comprimento para as brotações de *Clitoria ternatea*. Já para *Balanites aegyptica*, Siddique e Anis (2009), verificaram que na presença de 12,5 μ M de BAP as brotações tiveram 7,7cm de comprimento, contudo, não diferiram de KIN (5,3cm) com igual concentração. Porém para *Cannabis sativa*, o TDZ mostrou-se altamente eficiente para a promoção do crescimento, o qual apresentou 7,1cm em meio de cultura suplementado com 0,5 μ M (Lata et al., 2009), enquanto que para o híbrido *Mentha x Piperita* foi observado que o maior comprimento da parte aérea (7,05cm) ocorreu na ausência das citocininas testadas (Asmar et al., 2011).

Para matéria seca de parte aérea foi possível observar que os resultados obtidos no tratamento com KIN diferiram estatisticamente dos encontrados para as demais citocininas, e apresentaram incrementos de 2,8 vezes na presença de 2,22 μ M de KIN em relação ao controle. Analisando-se as concentrações de citocininas utilizadas, na presença de 2,22 e 4,44 μ M no meio de cultura, os resultados obtidos não apresentaram diferenças estatísticas entre si (Tabela 3). Esses resultados corroboram aqueles reportados por Asmar et al. (2011), na multiplicação *in vitro* de *Mentha x Piperita*, em que as citocininas promovem incremento para a matéria seca, sendo o maior incremento favorecido pelo BAP.

Tabela 3: Médias para matéria seca de parte aérea (mg) de brotações de *M. leucocephalus* submetidos a diferentes concentrações de BAP, KIN e TDZ. Feira de Santana, 2012.

| CITOCININAS | | | | |
|---------------------------|------------|------------|------------|--------------|
| Concentrações (µM) | BAP | KIN | TDZ | Média |
| 0,00 | 7,29 aC | 8,34 aC | 6,24 aB | 7,15 D |
| 1,11 | 6,76 bC | 15,24 aB | 12,11 aA | 11,20 C |
| 2,22 | 14,02 bB | 23,80 aA | 6,57 cB | 13,84 AB |
| 4,44 | 19,92 aA | 15,05 Bb | 9,76 cAB | 14,62 A |
| 8,88 | 8,92 aBC | 11,39 abBC | 13,44 aA | 11,36 BC |
| Média | 11,37 b | 14,76 a | 9,62 b | |

*Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas não diferem entre si estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

As citocininas possuem grande influência para o estabelecimento de drenos, e segundo Peres e Kerbauy (2008), para que gemas sejam formadas, é necessário também que haja um aporte de nutrientes, pois novos brotos funcionam como drenos. Então, as citocininas atuam de modo direto em, pelo menos, duas proteínas (invertase e transportador de hexoses), as quais são necessárias para o descarregamento apoplástico do floema. A enzima invertase diminui a concentração da sacarose na região do descarregamento, favorecendo uma chegada contínua desse nutriente. Ao mesmo tempo, o transportador de hexose é necessário para que os açúcares entrem nas células do dreno. Tal fato pode ser observado através dos resultados obtidos para *M. leucocephalus*, em que ao acrescentar as citocininas, ocorreram incrementos na matéria seca das brotações comparando-se com o controle, sendo que a KIN apresentou maior eficiência para a absorção e assimilação de nutrientes, acumulando maior quantidade de esqueletos de carbono.

3.1.2 Efeito da interação da citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) e da auxina ácido naftalenoacético (ANA) na indução de brotações de *M. leucocephalus*

Observou-se a ocorrência de efeito altamente significativo ($p < 0,01$) da interação “BAP x ANA” para todas as variáveis analisadas (Tabela 4).

Tabela 4: Resumo da análise de variância para número de brotações (NB), número de folhas total (NF), comprimento do maior broto (CPA) e matéria seca de parte aérea (MSPA) de brotações de *M. leucocephalus* submetidas a diferentes concentrações de BAP e ANA. Feira de Santana, 2012.

| FV | GL | Quadrados Médios | | | |
|------------------|-----|------------------|------------|------------------|---------|
| | | NB | NF | CPA ^z | MSPA |
| BAP | 4 | 47,50** | 9773,35** | 8,95** | 0,006** |
| ANA | 4 | 77,43** | 10532,75** | 6,95** | 0,078** |
| BAP X ANA | 16 | 6,26** | 1211,63** | 0,72** | 0,020** |
| Resíduo | 225 | 0,70 | 63,62 | 0,09 | 0,0007 |
| CV (%) | | 27,81 | 32,74 | 18,52 | 35,69 |

**Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F. ^zDados transformados em $(x + 1)^{0,5}$.

As concentrações de ANA provocaram efeitos com tendência quadrática ascendente ($p < 0,01$) para a variável número de brotações na ausência de BAP e descendente ($p < 0,01$) quando o meio de cultura foi suplementado com BAP. A curva de resposta obtida na ausência de BAP indica que a utilização de ANA na concentração calculada de $1,63\mu\text{M}$, atinge o maior valor estimado de 5,18 brotos por explante. Portanto, incrementos de ANA superior à concentração calculada ($1,63\mu\text{M}$) tendem a desfavorecer a formação das brotações (Figura 4). Resultados superiores aos encontrados para *M. leucocephalus* foram relatados na multiplicação *in vitro* das espécies *Tripterygium wilfordii* (Chen, 2009), *Balanites aegyptica* (Siddique e Anis, 2009), *Stevia rebaudiana* (Jain et al., 2009; Thiyagarajan e Venkatachalam, 2012) e para o híbrido *Vaccinium x covilleianum* (Litwinczuk e Wadas, 2008).

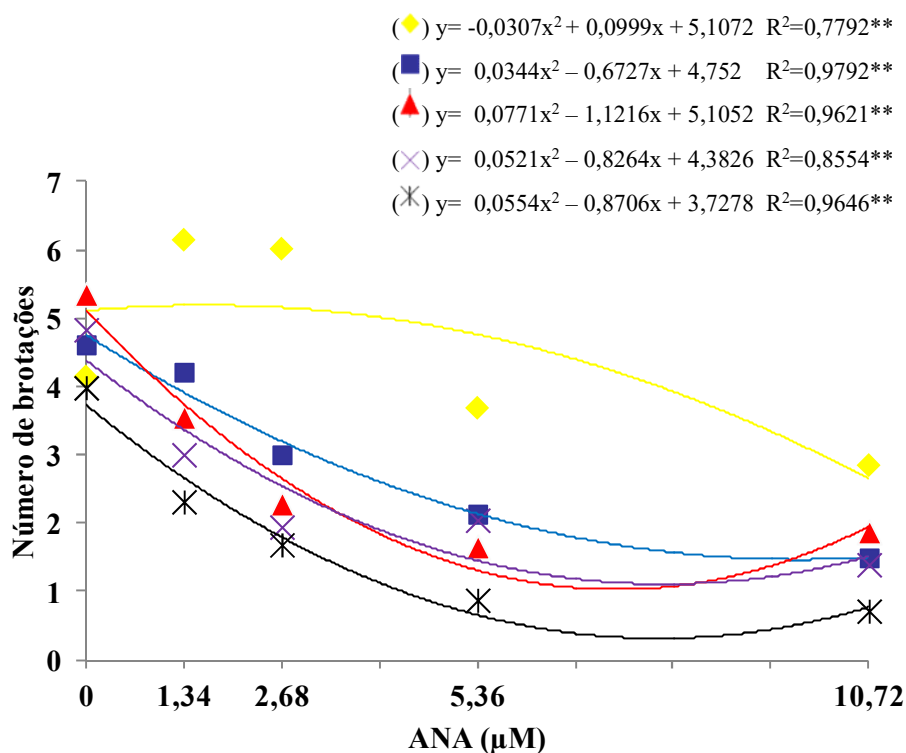


Figura 4: Número de brotações de *M. leucocephalus* submetidos a diferentes concentrações de ANA e BAP (◆ 0,0; ■ 1,11; ▲ 2,22; × 4,44 e ✱ 8,88µM). Feira de Santana, 2012.

O maior número de brotações observado (6,01 brotos/explante) para *M. leucocephalus* ocorreu em meio de cultura suplementado com 1,34µM de ANA na ausência de BAP, seguido de 5,36 brotos/explante na presença de 2,22µM de BAP sem a adição de ANA no meio de cultura. Portanto, pôde-se observar que a adição de 1,34µM de ANA foi favorável a produção de brotações, uma vez que proporcionou aumento de 50% nas brotações quando comparado ao meio de cultura isento de regulador vegetal (Figura 4). Os resultados obtidos são semelhantes àqueles reportados para as espécies *Pfaffia tuberosa* (Flores e Nicoloso, 2007) e *Melissa officinalis* (Silva et al., 2006) que apresentaram maior número de brotações quando o meio de cultura foi suplementado com ANA (5,0µM e 0,5µM, respectivamente) na ausência de BAP.

Uma possível explicação para a maior produção de brotações na presença de 1,34µM de ANA está na produção de raízes a partir dos brotos (Figura 5). Como as raízes são locais da biossíntese de citocininas, provavelmente ao longo do período de incubação,

os explantes/ brotos tenham adquirido níveis endógenos suficientes para estabelecer um balanço auxina/citocinina e ativar as ciclinas, e assim promover a divisão celular, que é um dos fatores essenciais para o crescimento e desenvolvimento das múltiplas brotações. De acordo com van Staden et al. (2008), os tecidos são capazes de crescer sem a adição de citocininas no meio de cultura, porque as células podem produzir quantidades suficientes de citocinina para proceder a divisão celular. Além disso, Peres e Kerbauy (2008), afirmam que, não há propriamente uma classe hormonal responsável pela formação de cada tipo de órgão, e sim um controle da formação destes através das proporções relativas entre diferentes classes hormonais.



Figura 5: Planta de *M. leucocephalus* com 60 dias de cultivo *in vitro* em meio de cultura MS com $1,34\mu\text{M}$ de ANA. Seta – indica a presença de raízes a partir das brotações. Barra = 1,0cm. Feira de Santana, 2012.

Portanto, acredita-se que um dos possíveis pontos de interação poderia ser encontrado no próprio metabolismo de ambos os hormônios, em que uma dessas classes hormonais influenciaria a atividade de enzimas envolvidas na biossíntese ou inativação da outra (Peres e Kerbauy, 2008; Mercier, 2008; Taiz e Zeiger, 2009). Esses mesmos autores, ainda enfatizam que, com relação ao efeito morfogenético desse balanço, sob condições normais, a concentração da citocinina, imprescindível à formação de gemas, não precisa ser necessariamente superior ao da auxina.

Uma vez que, a utilização de $1,34\mu\text{M}$ de ANA favoreceu o maior número de brotações, este pode ser utilizado no processo de multiplicação *in vitro* de *M. leucocephalus*. Na presença desta concentração, as brotações emitiram raízes (dados não mostrados) (Figura 5), fato que otimiza o tempo para o estabelecimento de um protocolo de micropropagação, pois as brotações não precisarão passar pela etapa de enraizamento *in vitro*, como foi verificado para as espécies *Melissa officinalis* (Silva et al., 2006) e *Salvia stenophylla* (Musarurwa et al., 2010). Além disso, em diversas culturas a citocinina pode ser um entrave durante a etapa de enraizamento *in vitro*, podendo inibir a produção de raízes adventícias, como reportado para as espécies *Pfaffia glomerata* (Flores et al., 2009), *Juniperus naviculares* (Castro et al., 2011) e *Etilingera eliator* (Yunus et al., 2012).

Ainda observando os resultados referentes ao número de brotações, nota-se que ao aumentar à concentração de ANA a produção de brotações é inibida, mesmo na presença de BAP, que também se apresentou como um fator fitotóxico aos explantes em altas concentrações (Figura 4). Isso é verificado para várias espécies, sejam lenhosas ou herbáceas, após um nível considerado ótimo para o regulador vegetal, mais especificamente as citocininas. Pode ocorrer inibição na resposta morfogenética, como a redução do número e do alongamento das brotações ou até mesmo não as produzem, a exemplo das espécies *Aspidosperma polyneuron* (Ribas et al., 2005), *Clitoria ternatea* (Singh e Tiwari, 2010) e *Stevia rebaudiana* (Thiyagarajan e Venkatachalam, 2012).

A análise de regressão indicou modelo matemático quadrático ascendente ($p < 0,01$) das concentrações de ANA para a variável número de folhas totais na ausência de BAP, enquanto que, ao adicionar esse regulador vegetal no meio de cultura, a equação matemática apresentou tendência quadrática descendente ($p < 0,01$). A curva de resposta em $0,0\mu\text{M}$ de BAP indica que a utilização de ANA na concentração calculada de $2,96\mu\text{M}$ promove o maior valor estimado de 57,36 folhas por explante. O maior número de folhas totais observados (67,09 folhas por explante) foi verificado quando adicionado $1,34\mu\text{M}$ de ANA ao meio de cultura na ausência de BAP (Figura 6A). Resultados inferiores foram reportados por Blank et al. (2008) para *Lippia sidoides* (10,8 folhas com $17,76\mu\text{M}$ de BAP).

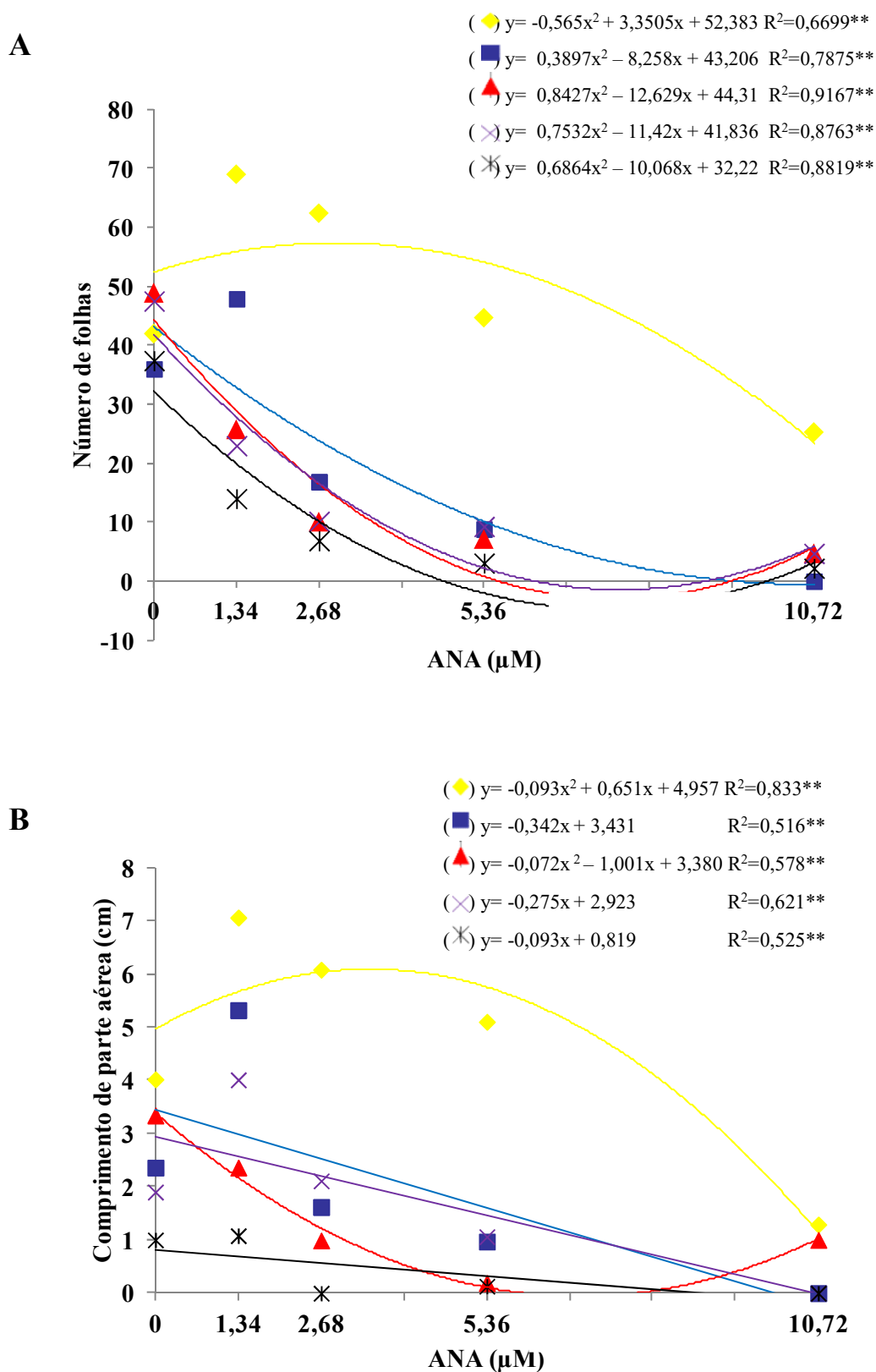


Figura 6: Número de folhas (A) e comprimento do maior broto (B) de *M. leucocephalus* submetidos a diferentes concentrações de ANA e BAP (\blacklozenge 0,0; \blacksquare 1,11; \blacktriangle 2,22; \times 4,44 e \ast 8,88 μ M de BAP). Feira de Santana, 2012.

Para otimização de um protocolo de micropropagação o acréscimo de folhas por planta é favorável, uma vez que estas podem ser utilizadas como fonte de explante. Além disso, sabe-se que na inserção de cada folha existe pelo menos uma gema axilar, que pode ser utilizada paralelamente para a produção de mudas, aumentando a taxa de multiplicação.

Em relação ao comprimento do maior broto, o modelo matemático que melhor se ajustou foi o quadrático ascendente ($p < 0,01$) para as concentrações de ANA na ausência de BAP e descendente ($p < 0,01$) quando se utilizou $2,22\mu\text{M}$ de BAP, enquanto que nas demais concentrações a tendência foi linear decrescente ($p < 0,01$). Ao observar a curva de resposta em $0,0\mu\text{M}$ de BAP, verifica-se que a utilização de ANA na concentração calculada de $3,5\mu\text{M}$ atingiu o maior valor estimado de $6,08\text{cm}$ de comprimento de parte aérea. Porém, a maior média observada para esta variável ($7,05\text{cm}$) foi na presença de $1,34\mu\text{M}$ de ANA na ausência de BAP (Figura 6B). Resultados semelhantes foram encontrados para a espécie lenhosa *Erythrina velutina*, em relação à concentração de $1,34\mu\text{M}$ de ANA na ausência de BAP, por ter proporcionado o maior comprimento de parte aérea ($2,99\text{cm}$) (Costa et al., 2010).

O crescimento se dá principalmente via alongamento ou expansão celular, o qual é caracterizado pelo aumento irreversível de seu volume. Diversos fatores influenciam a taxa de expansão/ alongamento da parede celular, alguns relacionados com a idade, tipo de célula e também a presença de hormônios como a auxina e a giberelina, além de fatores ambientais (Mercier, 2008). A auxina avaliada, representada por ANA, mostrou forte influência para o aumento em comprimento da parte aérea das brotações.

Segundo Mercier (2008), para que as células se expandam, a parede celular deve ser afrouxada, a auxina promoveria a indução da acidificação da parede celular, resultante da extrusão de prótons através da membrana plasmática. Esse afrouxamento é essencial para uma célula vegetal em crescimento, sob condições hídricas satisfatórias tem seu turgor e o seu potencial hídrico reduzidos, permitindo a absorção de água e, em consequência, a expansão/ alongamento celular.

Além de induzir a acidificação da parede celular e o afrouxamento, a auxina induz outros processos importantes que proporcionam a continuidade do crescimento da célula, como: o aumento na absorção de solutos osmóticos, a atividade de certas enzimas relacionadas com a biossíntese de polissacarídeos de parede, a indução do ajustamento osmótico (de forma a compensar a diluição do conteúdo vacuolar causado pela entrada de água), bem como pode induzir a síntese de outros hormônios, como o ácido giberélico, que também atua no alongamento celular (Mercier, 2008).

Foi possível observar no cultivo *in vitro* de *M. leucocephalus* que ao suplementar o meio de cultura com BAP combinado com ANA, ocorreu inibição do comprimento da parte aérea (Figura 6B). Resultados semelhantes foram observados para *Lippia sidoides* (Blank et al., 2008) e *Lavandula pedunculata* (Zuzarte et al., 2010). De acordo com Peres e Kerbauy (2008), tanto as auxinas como as citocininas, quando aplicadas em concentrações supra-ótimas, apresentam efeito marcante na inibição do crescimento de órgãos vegetativos.

Em relação ao acúmulo de matéria seca de parte aérea observou-se comportamento quadrático ascendente ($p < 0,01$) das concentrações de ANA na ausência de BAP e tendência linear decrescente ($p < 0,01$) em relação às concentrações de BAP. A curva de resposta obtida em $0,0\mu\text{M}$ de BAP mostrou que a utilização de ANA na concentração calculada de $0,055\mu\text{M}$ de ANA proporcionou o maior valor estimado (39,48mg) de matéria seca de parte aérea. Sendo que, o maior valor observado (50mg) ocorreu quando se utilizou $4,44\mu\text{M}$ de BAP combinado com $1,34\mu\text{M}$ de ANA (Figura 7).

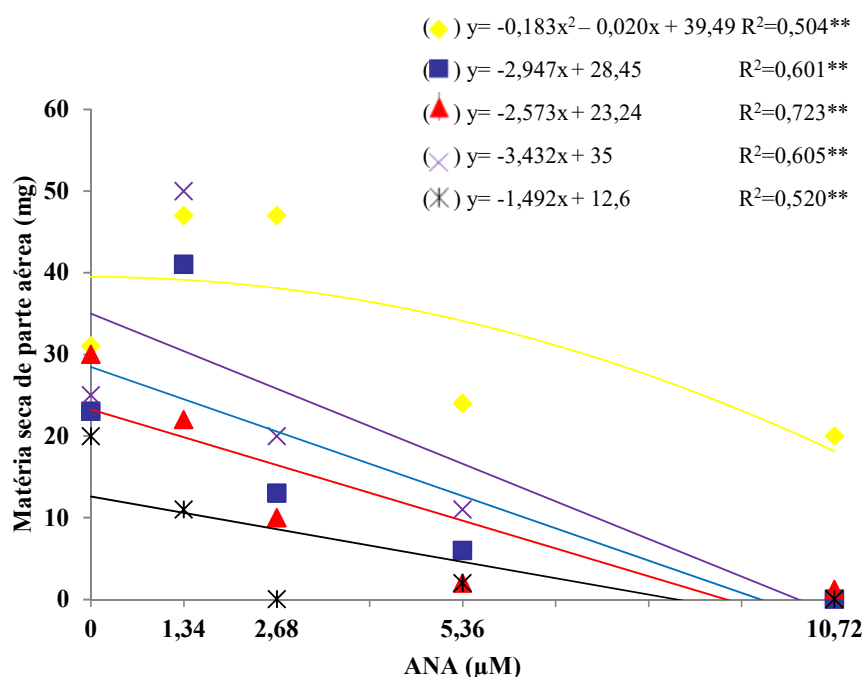


Figura 7: Matéria seca de parte aérea de *M. leucocephalus* submetidos a diferentes concentrações de ANA e BAP (◆ 0,0; ■ 1,11; ▲ 2,22; ✕ 4,44 ✕ 8,88µM de BAP). Feira de Santana, 2012.

A adição de $1,34$ e $2,68\mu\text{M}$ de ANA ao meio de cultura, também promoveram incrementos na matéria seca em torno de $56,7\%$ (47mg) quando comparado ao meio de

cultura isento de regulador vegetal, que apresentou 30mg de matéria seca de parte aérea das brotações de *M. leucocephalus* (Figura 7). Ao trabalhar com a espécie *Lippia sidoides*, Blank et al. (2008) obtiveram resultados semelhantes, pois a maior média para matéria seca (37mg) foi encontrada quando utilizaram baixas concentrações de ANA (0,54 μ M). Já Costa et al. (2010), reportaram para *Erythrina velutina* maior matéria seca (35,56mg) quando o meio de cultura WPM foi suplementado com 2,68 μ M de ANA.

Em concentrações elevadas de BAP e ANA, ocorreu formação de calos (dados não mostrados), nestas concentrações a taxa de regeneração de brotações foi baixa por via direta, todavia essas concentrações e combinações entre estes dois reguladores vegetais, poderão ser utilizadas em sistemas de regeneração por via indireta, na fase de indução.

3.1.3 Efeito do tipo de explante no cultivo *in vitro* de *M. leucocephalus*

Observou-se efeito significativo ($p < 0,05$) do tipo de explante para a variável número de brotações e altamente significativo ($p < 0,01$) para número de folhas, comprimento de parte aérea e porcentagem de sobrevivência (Tabela 5).

Tabela 5: Resumo da análise de variância para número de brotações (NB), número de folhas total (NF), comprimento da maior brotação (CPA), matéria seca de parte aérea (MSPA) e porcentagem de sobrevivência (%S) de brotações de *M. leucocephalus* a partir de diferentes tipos de explantes em meio de cultura MS. Feira de Santana, 2012.

| FV | GL | Quadrados Médios | | | | |
|-------------------------|-----------|------------------|-----------|---------|----------------------|-----------|
| | | NB ^z | NF | CPA | MSPA | %S |
| Tipo de explante | 2 | 0,57* | 3232,62** | 64,46** | 618,21 ^{ns} | 1004,46** |
| Resíduo | 11 | 0,14 | 336,95 | 7,24 | 198,58 | 113,64 |
| CV (%) | | 17,64 | 26,71 | 29,92 | 22,44 | 11,71 |

**Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F. *Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F. ^{ns} Não significativo. ^z Dados transformados $(x + 1)^{0,5}$.

Avaliando o número de brotações, verificou-se que a maior média (5,63) foi obtida a partir do segmento nodal proveniente da região basal, o qual não diferiu estatisticamente dos resultados obtidos para segmento nodal da região mediana. O explante basal apresentou duas vezes mais brotos quando comparado ao explante segmento apical (2,55) (Figura 8A). Os resultados obtidos são semelhantes aos encontrados para as espécies *Melissa officinalis* (Reis et al., 2007), *Ginkgo biloba* (Sexto, 2005) e *Helichrysum italicum* (Morone-Fortunato et al., 2010) em que os explantes medianos e basais apresentaram maior capacidade regenerativa. Tal resposta pode ser atribuída a uma possível diferença na concentração de nutrientes e no balanço hormonal quando comparado com a porção apical, e esta diferença pode ter afetado a indução de gemas adventícias.

De acordo com George (1993), os níveis endógenos das substâncias de crescimento são frequentemente responsáveis pelo sucesso da cultura de tecidos e a resposta de proliferação da célula e morfogênese *in vitro* pode estar relacionada com a posição e/ou orientação do órgão ou tecido que foi retirado da planta-mãe. Ainda segundo esse autor, as gemas laterais com maior capacidade de crescimento ou proliferação pode não ser necessariamente os mais próximos ao ápice de um broto.

Em se tratando da espécie *M. leucocephalus*, o explante da região basal do segmento nodal possibilitou uma maior média, possivelmente por ser proveniente de planta obtida a partir de semente, ou seja, constituída de parte aérea e raiz, obviamente com concentrações endógenas de hormônios suficientes para sustentar o crescimento e desenvolvimento da planta. Na raiz ocorre a biossíntese de citocinina e o explante basal por estar mais próximo é o primeiro nó a receber o fluxo de citocinina translocada acropetamente, seguido do segmento mediano, estabelecendo balanço citocinina/auxina suficiente para promover maior número de brotações. O menor número de brotações promovido pelo segmento apical possivelmente se deu em razão do balanço hormonal entre auxinas e citocininas, que induz à forte dominância apical (Reis et al., 2007).

Como as auxinas são produzidas principalmente no ápice caulinar, o qual compreende o segmento apical, quando este tipo de explante é inoculado em meio de cultura contendo ANA, eleva-se o nível de auxina no explante, configurando um possível desbalanço com o nível de citocininas, de forma a proporcionar uma baixa produção de brotos quando comparado aos outros dois explantes.

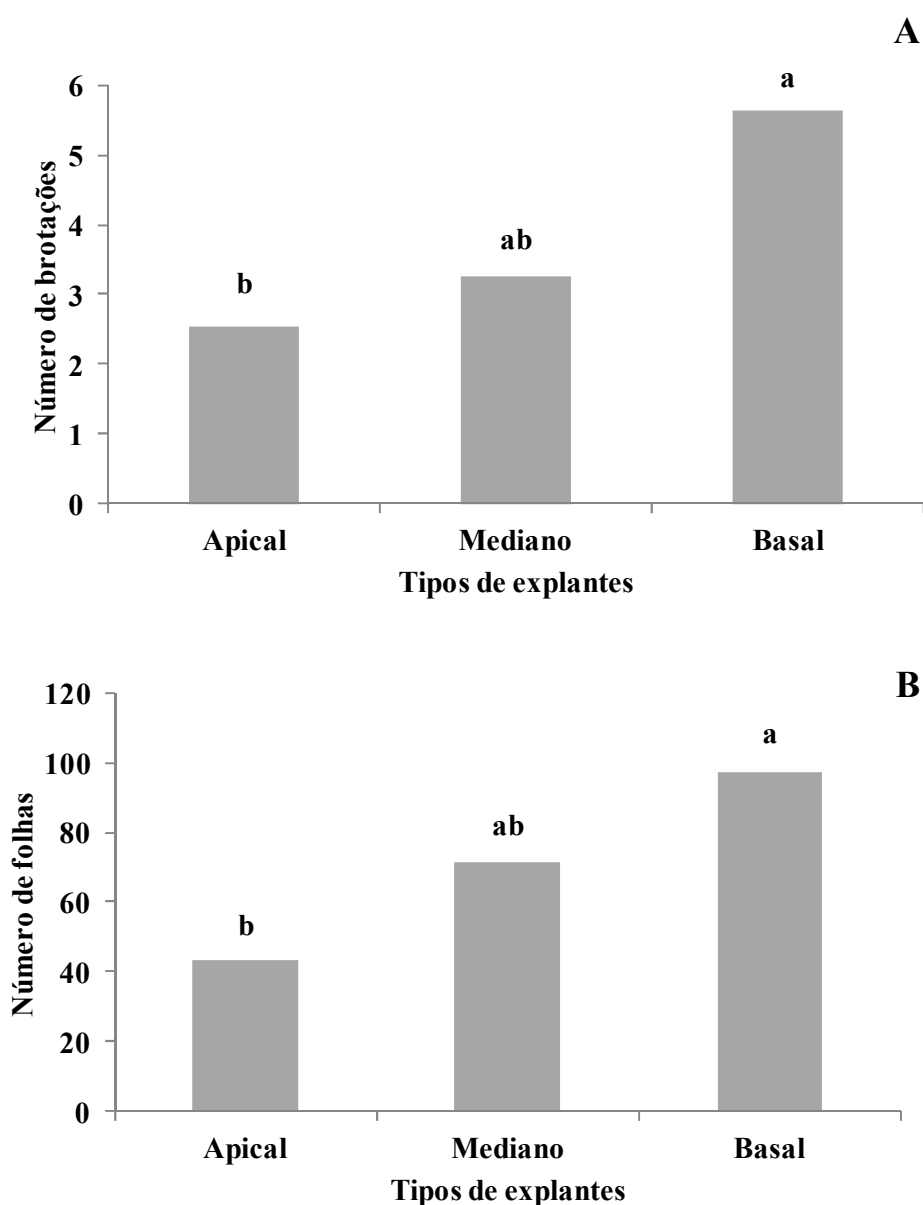


Figura 8: Médias para o número de brotações (A) e número de folhas (B) de *M. leucocephalus* a partir do tipo de explante em meio de cultura MS. As médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. Feira de Santana, 2012.

Comportamento semelhante foi observado para número de folhas, para o explante basal, os resultados obtidos diferiram estatisticamente e foram superiores quando comparados aos resultados obtidos para explante apical, verificando-se incremento superior a 100% na produção de folhas (Figura 8B). Resultados diferentes foram

encontrados para *M. officinalis*, que obteve o maior número de folhas a partir do segmento apical (Reis et al., 2007). Como já foi citado que a promoção no número de brotações deveu-se ao balanço estabelecido entre citocinina endógena/ auxina para o explante de origem basal de *M. leucocephalus*, esse balanço também influenciou o aumento no número de folhas, como consequência das intensas divisões celulares.

Para o comprimento de parte aérea, os resultados obtidos a partir do explante basal diferiram estatisticamente daqueles encontrados para o explante apical. O explante basal proporcionou aumento de 2,4 vezes no comprimento de parte aérea quando comparado com o explante apical (Figura 9A). Resultados diferentes foram reportados para *M. officinalis* (Reis et al., 2007) e para a espécie lenhosa *Malus* sp. (Dobránszki e Teixeira da Silva, 2010) que apresentaram maior comprimento das brotações quando foi utilizado o explante apical.

A maior porcentagem de sobrevivência foi verificada com os explantes mediano e basal (100%), os quais diferiram estatisticamente do explante apical, que apresentou 25% de mortalidade das brotações (Figura 9B). No cultivo *in vitro* de *Ginkgo biloba* também foi observado por Sexto (2005) alto índice de mortalidade dos ápices caulinares, em torno de 89%, demonstrando baixa taxa de sobrevivência. Dobránszki e Teixeira da Silva (2010), verificaram 60% de sobrevivência em explante apical de *Malus* sp. Enquanto que Mitsukuri et al. (2009) observaram 100% de sobrevivência a partir dos ápices caulinares de *Ponerorchis graminifolia*. Todavia, segundo George (1993), a sobrevivência e o crescimento de brotos a partir dos ápices dos ramos desenvolvidos são geralmente melhores do que aqueles das gemas laterais, embora este último possa ser empregado com maior frequência de forma satisfatória.

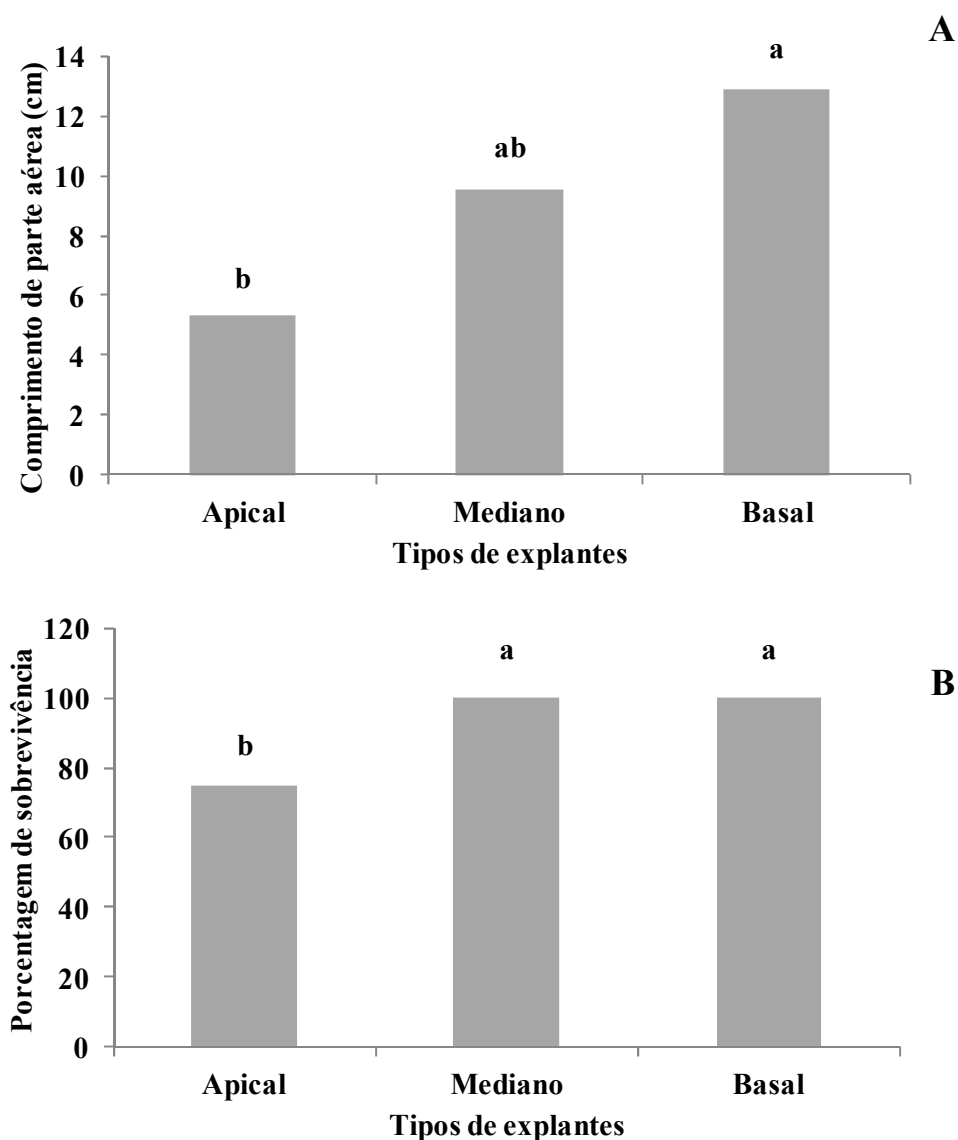


Figura 9: Médias para o comprimento da parte aérea (A) e a porcentagem de sobrevivência (B) de *M. leucocephalus* a partir do tipo de explante em meio de cultura MS. As médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. Feira de Santana, 2012.

3.1.4 Efeito de diferentes fontes de carbono no cultivo *in vitro* de *M. leucocephalus*

Observou-se efeito altamente significativo ($p < 0,01$) da fonte de carbono para todas as variáveis analisadas (Tabela 6).

Tabela 6: Resumo da análise de variância para número de brotos (NB), número de folhas total (NF), comprimento da maior brotação (CPA), número de raízes (NR), comprimento da raiz (CR), matéria seca de parte aérea (MSPA) e de raiz (MSR) de brotações de *M. leucocephalus* submetidas a diferentes tipos de fonte de carbono em meio de cultura MS. Feira de Santana, 2012.

| FV | GL | Quadrados Médios | | | | | | |
|-------------------------|----|------------------|----------|-----------|---------|-----------|----------|---------|
| | | NB | NF | CPA | NR | CR | MSPA | MSR |
| Fonte de carbono | 4 | 6,55** | 772,74** | 5798,61** | 16,68** | 3116,38** | 316,75** | 13,29** |
| Resíduo | 45 | 0,46 | 43,13 | 264,49 | 0,92 | 322,68 | 12,95 | 1,28 |
| CV (%) | | 18,99 | 14,93 | 20,91 | 22,72 | 28,75 | 13,49 | 23,33 |

**Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

O número de brotações foi influenciado pela fonte de carbono, e as maiores médias foram obtidas com a utilização de maltose, sacarose e lactose. A glicose foi a fonte de carbono que promoveu o menor (2,28) incremento no número de brotações, cerca de duas vezes menos que a maltose e a sacarose (3,9) (Figura 10A). Esses resultados diferem dos encontrados por Jain et al. (2009) para a espécie *Harpagophytum procumbes* que teve o número de brotações drasticamente reduzidos quando adicionaram-se maltose ao meio de cultura. Contudo, assemelham-se aos dados

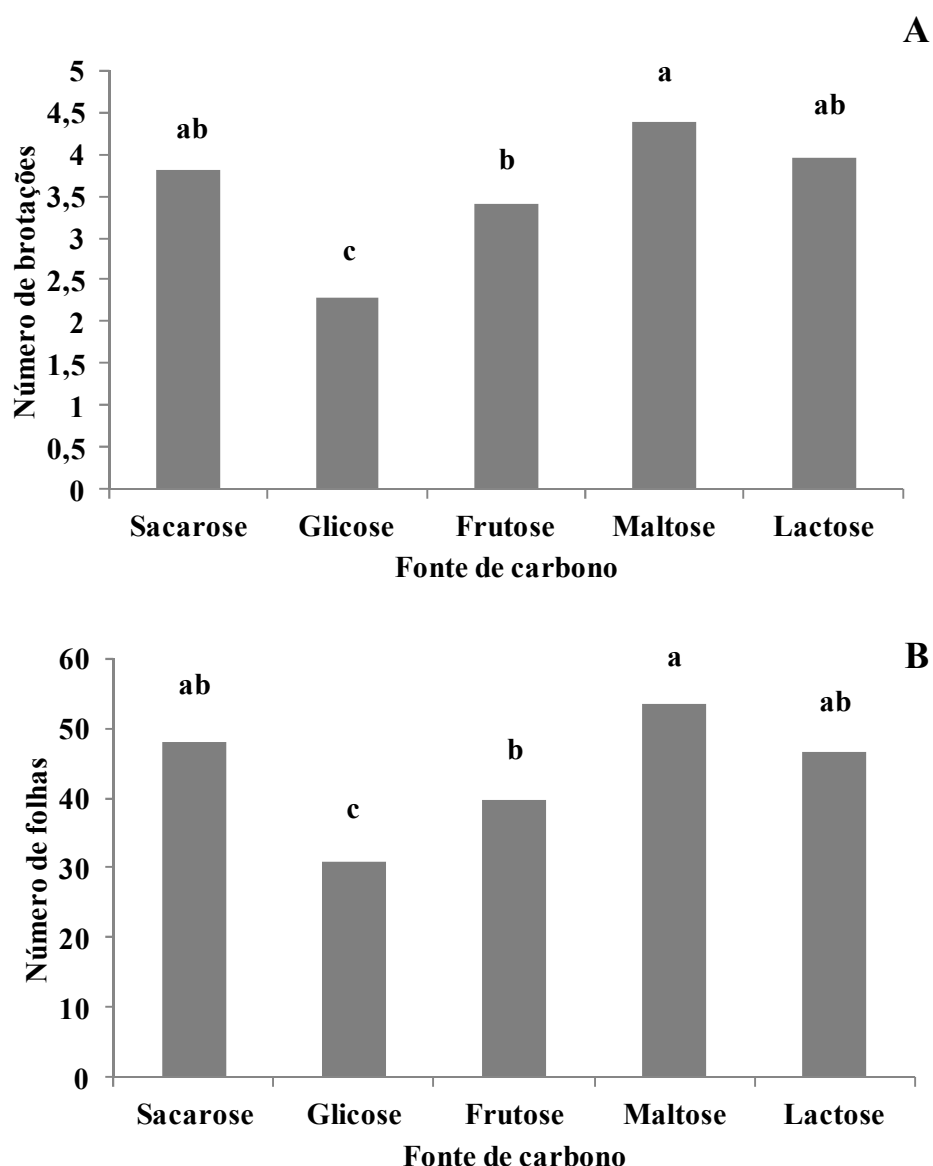


Figura 10: Médias para o número de brotações (A) e número de folhas (B) de *M. leucocephalus* submetidas a diferentes fontes de carbono em meio de cultura MS. As médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. Feira de Santana, 2012.

reportados para as espécies *Pfaffia glomerata* (Nicoloso et al., 2003) e *Ricinus communis* (Aires et al., 2007) que tiveram a maltose e/ ou a sacarose como as fontes de carbono, que proporcionaram o maior número de brotações. Todavia, para a espécie lenhosa *Phoenix dactylifera*, o tipo da fonte de carbono teve pouco efeito sobre o número de brotações (Al-Khateeb, 2008).

Comportamento semelhante ao número de brotações de *M. leucocephalus* foi observado para o número de folhas. Os resultados obtidos quando se utilizou a maltose não diferiram estatisticamente daquelas quando o meio foi suplementado com sacarose e lactose. Quando foi utilizada a glicose, esta apresentou a menor média, levando a uma redução em torno de 35,53% ao comparar com a utilização da sacarose no meio de cultura (Figura 10B). Resultados diferentes foram reportados para *Ocimum basilicum* (Ribeiro et al., 2007), *Miltonia flavescens* (Besson et al., 2010) e algumas espécies lenhosas de *Annona* (Santana et al., 2011), uma vez que a fonte de carbono não interferiu para o incremento no número de folhas.

Pôde-se observar que no cultivo *in vitro* de *M. leucocephalus*, tanto para o número de brotações quanto para o de folhas, a fonte de carbono sacarose pode ser substituída pela maltose ou lactose. De acordo com Dennis e Blakeley (2000), Smeekens (2000) e Rolland et al. (2006), os carboidratos possuem função sinalizadora, podendo provocar alteração na expressão gênica similar aos efeitos atribuídos aos hormônios. A percepção ocorre através de sensores protéicos que desencadeiam uma cascata de eventos em nível celular, alterando a expressão gênica e as atividades enzimáticas, influenciando no crescimento.

Para o comprimento de parte aérea, a fonte de carbono frutose superou estatisticamente às demais fontes de carbono utilizadas. Verificou-se que a frutose foi a mais efetiva, proporcionando o maior comprimento médio (11,46cm), com acréscimos em torno de 24,56% em relação à sacarose, que apresentou 9,2cm de comprimento da parte aérea da maior brotação de *M. leucocephalus*. O menor comprimento das brotações foi mais pronunciada com a utilização da maltose, glicose e lactose (Figura 11). Esses resultados discordam daqueles encontrados para *H. procumbens* (Jain et al., 2009), bem como para a espécie *P. glomerata* (Nicoloso et al., 2003), pois a frutose inibiu totalmente o crescimento das brotações, e a sacarose comportou-se como a melhor fonte de carbono. Contudo, são semelhantes aos dados encontrados para o cultivo *in vitro* de *P. dactylifera* (Al-Khateeb, 2008) e de *Solanum nigrum* (Sridhar e

Naidu, 2011), em que a frutose proporcionou aumento no comprimento das brotações, enquanto a glicose se comportou como a fonte de açúcar que promoveu menor crescimento das brotações. Todavia, Santana et al. (2011), em cultivos de espécies de *Annona*, não observaram diferença estatística com o uso das fontes de carboidratos (glicose, sacarose, maltose, frutose e galactose), para o comprimento das brotações.

A fonte de carbono frutose promoveu maior crescimento dos brotos, porém número de brotos menores do que quando foi utilizado à maltose, lactose e sacarose. É possível, que os meios de cultura contendo estes açúcares a competição por nutrientes tenha sido maior, já que a quantidade de brotos foi maior. Além disso, durante a autoclavagem esses carboidratos podem sofrer hidrólise, como ocorre para a sacarose, em torno de 10 - 15% (Thorpe et al, 2008), modificando o potencial osmótico do meio de cultura, o que pode ter contribuído para redução do potencial hídrico e consequentemente influenciando no alongamento celular, refletindo no crescimento dos brotos. A vantagem de ter uma planta mais alongada é que durante a repicagem poderá ocorrer maior aproveitamento do material vegetal. Além de dispensar o alongamento das brotações antes da etapa de enraizamento, otimizando assim o processo de micropropagação.

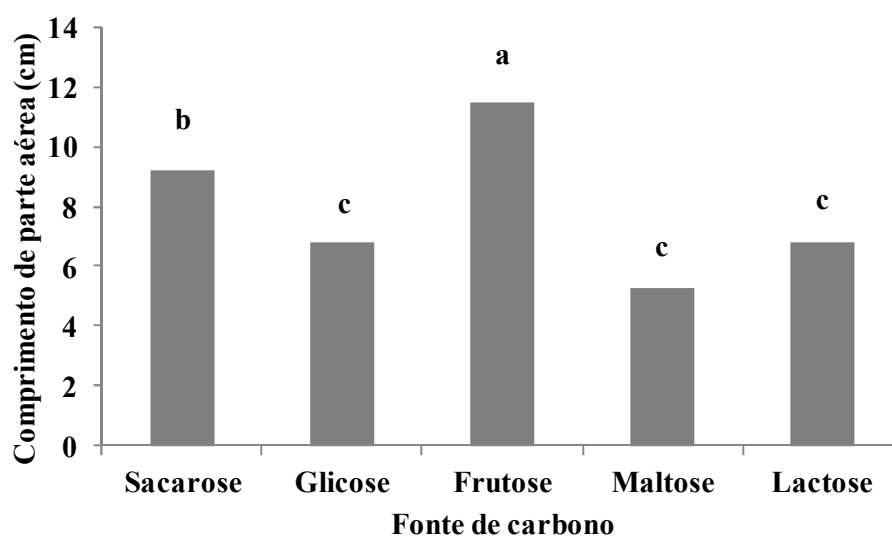


Figura 11: Médias para o comprimento de parte aérea de *M. leucocephalus* submetidas a diferentes fontes de carbono em meio de cultura MS. As médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. Feira de Santana, 2012.

Analisando o número de raízes, as maiores médias foram obtidas quando o meio foi suplementado com fontes de carbono lactose, sacarose e frutose. A glicose foi a fonte de carbono que menos contribuiu para a formação de raízes, gerando duas vezes menos raízes ao comparar com a sacarose (Figura 12A). Os resultados deste estudo são semelhantes àqueles obtidos para *Malus domestica* (Bahmani et al., 2009), que ao utilizar sacarose e/ou lactose promoveram maior número de raízes, contudo, em meio de cultura contendo frutose ou maltose, obteve brotações que não enraizaram.

Os resultados obtidos para comprimento da maior raiz a partir do meio suplementado com lactose e sacarose não apresentaram diferença estatística. Com a suplementação da lactose no meio de cultura observou-se incrementos de 8,6% em relação à fonte de carbono sacarose e duas vezes mais em relação à maltose que apresentou a menor média (4,28cm) para esta variável (Figura 12B). Assim como a sacarose proporcionou efeito benéfico à promoção do comprimento de raiz para *M. leucocephalus*, o mesmo foi observado por Bahmani et al. (2009) com a espécie *M. domestica*, quando comparado com outras fontes de carbono testadas (frutose, glicose, maltose e sorbitol).

Para avaliação da variável matéria seca de parte aérea o resultado obtido no tratamento com o açúcar frutose não diferiu estatisticamente do resultado encontrado a partir do meio que continha lactose. Verificou-se incrementos na matéria seca de parte aérea ao utilizar a frutose (33,61mg) e a lactose (30,50mg) quando comparado com a sacarose que apresentou média igual a 27,94mg, enquanto que a glicose e a maltose foram as fontes de carbono que menos contribuíram para o ganho de matéria seca de parte aérea para a espécie *M. leucocephalus* (Figura 13A). Resultados semelhantes foram encontrados em culturas da espécie *P. dactylifera* (Al-Khateeb, 2008), ao suplementar o meio de cultura com frutose. Porém discordam dos resultados reportados para *Pfaffia glomerata* que teve a sacarose como a melhor fonte de carboidrato (Nicoloso et al., 2003). Enquanto que, Santana et al. (2011), trabalhando com diversas espécies de *Annona*, verificaram que apenas o sorbitol e a galactose não foram eficientes para o incremento de matéria seca da parte aérea.

Na morfogênese *in vitro* de *M. leucocephalus*, embora a maltose tenha apresentado maior número de brotações, a maior incorporação de esqueletos de carbono ocorreu a partir do meio de cultura suplementado com frutose, seguida da lactose, sendo isto verificado a partir do incremento na matéria seca de parte aérea.

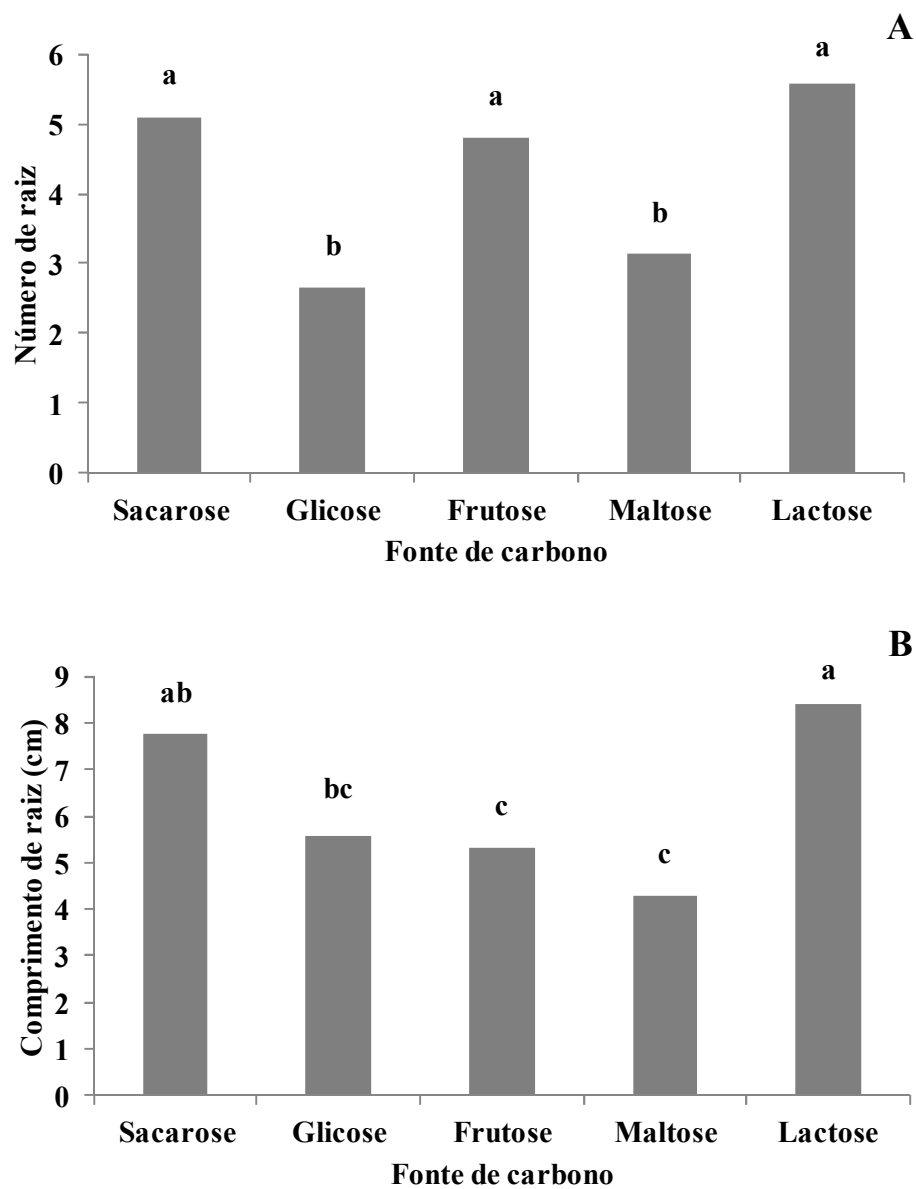


Figura 12: Médias para o número de raiz e comprimento de raiz de *M. leucocephalus* submetidas a diferentes fontes de carbono em meio de cultura MS. As médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. Feira de Santana, 2012.

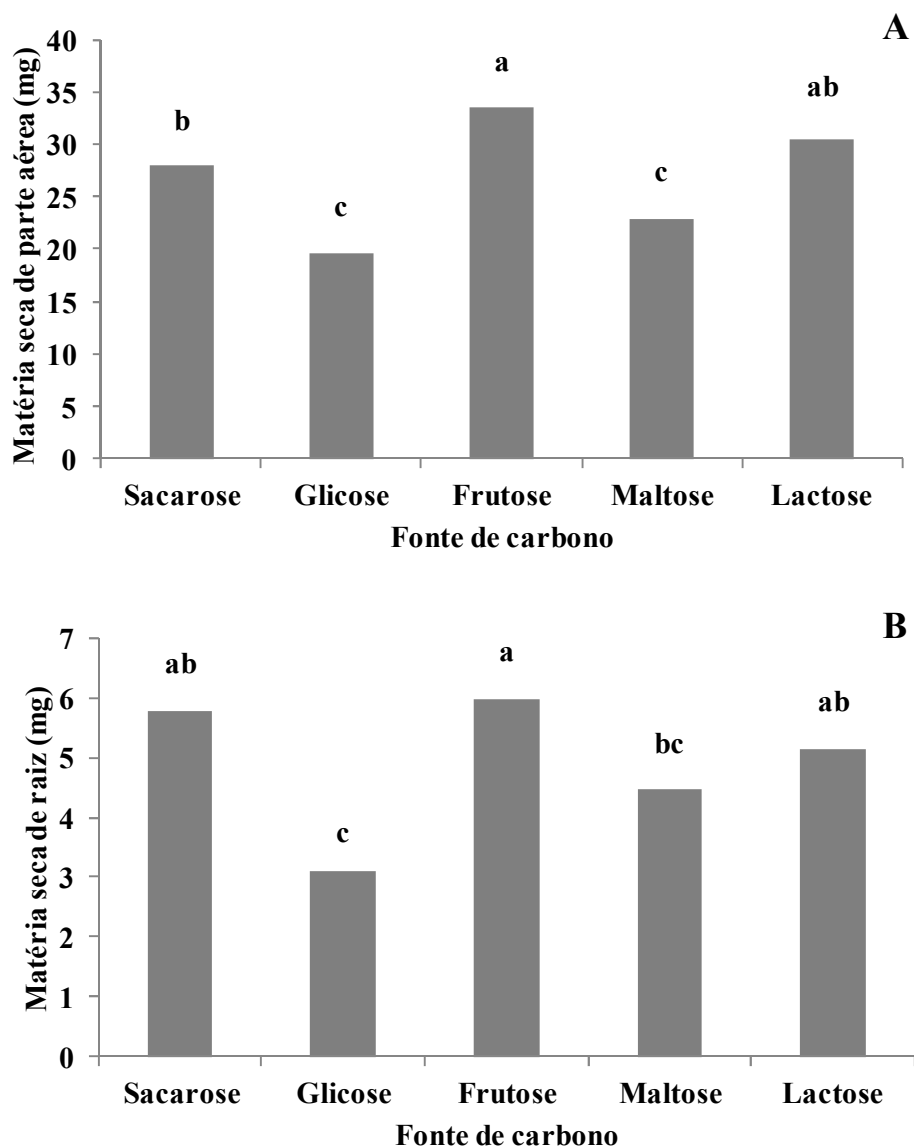


Figura 13: Médias para a matéria seca de parte aérea (A) e de raiz (B) de *M. leucocephalus* submetidas a diferentes fontes de carbono em meio de cultura MS. As médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. Feira de Santana, 2012.

Já para matéria seca de raiz, as maiores médias foram promovidas quando o meio foi suplementado com a frutose, sacarose ou maltose, sendo que os resultados não apresentaram diferença estatística entre si. A frutose promoveu maior média (5,98mg), seguida da sacarose (5,77mg) e da lactose (5,14mg), tendo a glicose como a fonte de carbono que proporcionou menor média (3,09mg) para a matéria seca de raiz das brotações (Figura 13B). Esses resultados diferem dos encontrados por Nicoloso et al. (2003) em cultura de *P. glomerata*, pois esses autores verificaram valores abaixo de 5,0mg com o uso de frutose e um valor em torno de 9,0mg com a utilização de sacarose, e levando-se em consideração a lactose, esta pouco contribuiu para o incremento da matéria seca de raiz.

Por conseguinte, as variáveis que estão associadas ao enraizamento *in vitro*, como o número de raízes, comprimento da raiz e matéria seca das raízes, possuem papel importante durante o processo de aclimatização, pois o sucesso desta etapa, em grande parte, deve-se a produção das raízes adventícias e a qualidade das mesmas. De acordo com os resultados observados, verificou-se que a fonte de carbono tem influência no processo de enraizamento, contudo, as fontes alternativas de carbono utilizadas não oferecem vantagens em caso de substituição da sacarose, já que este é um carboidrato menos dispendioso para a micropropagação.

De acordo com Santana et al. (2011), foi verificado a partir da multiplicação *in vitro* de *Annona* sp., que as diferentes fontes de carbonos testadas, exceto o sorbitol, apresentaram respostas similares, sendo assim, devido ao uso estabelecido da sacarose, a fácil disponibilidade e o baixo custo, deve ser o carboidrato mais indicado para a produção de mudas. Para *M. leucocephalus* em que a produção de brotações com as outras fontes de carbono não superou em pelo menos 50% da produção, talvez o custo/benefício não seja compensatório substituir a fonte de carbono.

3.1.5 Organogênese direta a partir de folhas de *M. leucocephalus*

Os explantes iniciaram o processo de intumescimento da base do pecíolo da folha aos nove dias da inoculação no meio de cultura independente do tratamento dado, exceto naquele em que estava isento de regulador vegetal. Segundo Paiva et al. (2006), intumescimento é um tipo de formação que precede a emissão de brotações.

Aos trinta dias de cultivo observou-se que no tratamento controle (meio isento de regulador vegetal) não ocorreu intumescimento e nem a formação de brotações. A

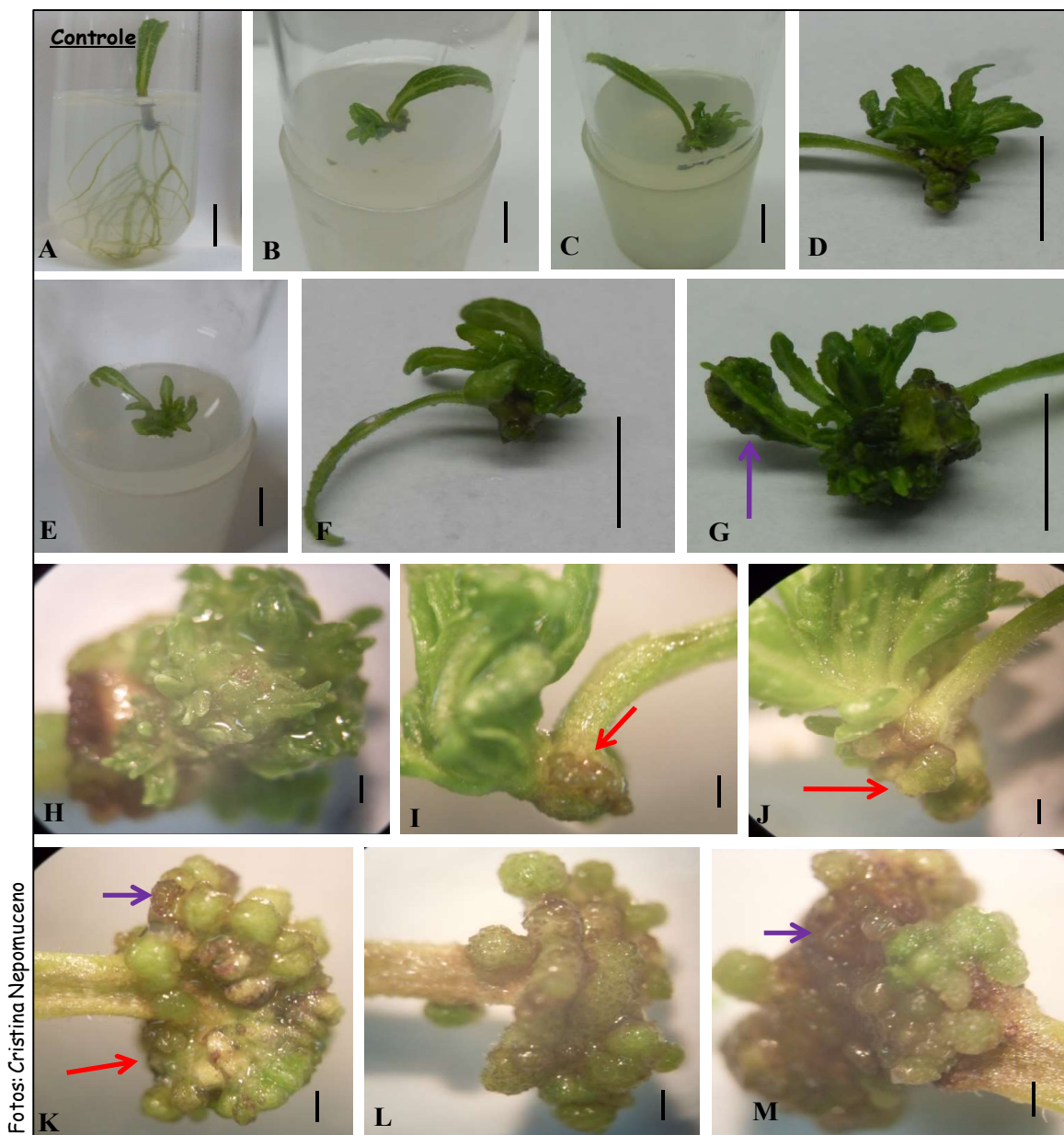
porcentagem de intumescimento variou de 76 a 100% nos tratamentos que continham as citocininas, sendo que o máximo de resposta foi alcançado com 1,0; 2,0; 4,0 μ M de BAP e 2,0; 3,0 μ M de KIN (Tabela 7). Diante desses resultados, verificou-se que a adição das citocininas é indispensável ao processo de iniciação da organogênese, em razão da promoção da divisão celular, podendo gerar células competentes ao processo de diferenciação celular. Resultados diferentes foram reportados para a espécie *Kalanchoe blossfeldiana*, em que o pecíolo não apresentou qualquer resposta morfogênica quando submetido a diferentes concentrações da citocinina BAP (Thomé et al., 2004), assim como ocorreu para *Maytenus senegalensis* ao utilizar BAP ou KIN (Matu et al., 2006).

Embora tenha ocorrido alta taxa de intumescimento e consequente formação de gemas adventícias, a porcentagem de formação de brotos para *M. leucocephalus* foi relativamente baixa, em torno de 18% na presença de 3,0 μ M de BAP, seguido de 14% com 3,0 μ M de KIN e 3,0 e 4,0 μ M de TDZ (Tabela 7). Resultados diferentes foram relatados para o cultivo *in vitro* das espécies *Pistacia vera* (Tilkat et al., 2009) e *Lysimachia nummularia* (Zheng et al., 2009), em que as citocininas isoladas não promoveram a regeneração *in vitro* de brotações a partir do pecíolo, mas o uso combinado com ANA proporcionou a regeneração das brotações. Costa e Aloufa (2006), trabalhando com *Phoenix dactylifera* verificaram que a utilização de diferentes concentrações de BAP resultou apenas no esverdeamento e intumescimento do pecíolo.

Tabela 7: Porcentagem de explantes intumescidos e de brotações de *M. leucocephalus* a partir de folhas com pecíolo submetidas a diferentes concentrações de citocininas. Feira de Santana, 2012.

| Citocininas (μM) | | | | | |
|---|------------|------------|------------|------------|------------|
| <u>BAP</u> | | | | | |
| | 0,0 | 1,0 | 2,0 | 3,0 | 4,0 |
| Porcentagem de intumescimento | - | 100,0 | 100,0 | 94,0 | 100,0 |
| Porcentagem formação de brotos | - | 6,0 | 6,0 | 18,0 | 12,0 |
| <u>KIN</u> | | | | | |
| | 0,0 | 1,0 | 2,0 | 3,0 | 4,0 |
| Porcentagem de intumescimento | - | 94,0 | 100,0 | 100,0 | 94,0 |
| Porcentagem formação de brotos | - | 4,0 | 8,0 | 14,0 | 6,0 |
| <u>TDZ</u> | | | | | |
| | 0,0 | 1,0 | 2,0 | 3,0 | 4,0 |
| Porcentagem de intumescimento | - | 88,0 | 82,0 | 94,0 | 92,0 |
| Porcentagem formação de brotos | - | 0,0 | 6,0 | 0,0 | 4,0 |
| <u>ZEA</u> | | | | | |
| | 0,0 | 1,0 | 2,0 | 3,0 | 4,0 |
| Porcentagem de intumescimento | - | 76,0 | 86,0 | 78,0 | 98,0 |
| Porcentagem formação de brotos | - | 4,0 | 6,0 | 14,0 | 14,0 |

Através de análises morfológicas, verificou-se que o controle apresentou apenas formação de raízes a partir do pecíolo (Figura 14A). Entre os tipos de citocininas



Fotos: Cristina Nepomuceno

Figura 14: Regeneração *in vitro* de *M. leucocephalus* a partir do pecíolo da folha submetidos a diferentes concentrações de BAP em meio de cultura MS. A – Emissão de raiz a partir do pecíolo em meio de cultura sem regulador vegetal; B, C, D, E, F, G – Brotos a partir do pecíolo (B – 1,0 μ M; C e D – 2,0 μ M; E e F – 3,0 μ M; G – 4,0 μ M); H – Múltiplos brotos (3,0 μ M); I, J – Brotações (1,0 e 2,0 μ M) e gemas adventícias (seta vermelha); K, L, M – Gemas adventícias (seta vermelha), gemas adventícias com produção de antocianina, coloração violeta (seta violeta) (K – 1,0 μ M; L – 2,0 μ M; M – 4,0 μ M). Barras: A, B, C, D, E, F, G = 1,0cm; H, I, J, K, L, M = 1,0mm. Feira de Santana, 2012.

e concentrações detectou-se diferenças morfológicas quanto à regeneração *in vitro* de *M. leucocephalus*. Ao utilizar o BAP, pôde-se observar a formação de brotos (Figura 14B, C, D, E, F, G) independente da concentração utilizada e de múltiplas brotações quando se fez uso de 3,0 μ M de BAP (Figura 14H). Além disso, foi possível observar que no mesmo explante que regenerou broto ocorreu também à formação de gemas adventícias, que se mostraram recalcitrantes e conseqüentemente não culminaram numa brotação (Figura 14I, J) e nos explantes que não formaram brotação foi também verificado alta produção de gemas adventícias, e muitas delas possuíam coloração arroxeada, que foi designada como uma possível produção de antocianina (Figura 14K, L, M).

Além da formação de gemas adventícias entre as brotações formadas (Figura 15A), também foi detectada na superfície do limbo foliar e do pecíolo, tanto na região adaxial (Figura 15B) quanto na região abaxial (Figura 15C e D). Resultados semelhantes foram observados para *Pistacia vera*, que a partir dos explantes intumescidos ocorreram à formação de estruturas globulares, tanto nas margens quanto na região da nervura das folhas (Tilkat e Onay, 2009).

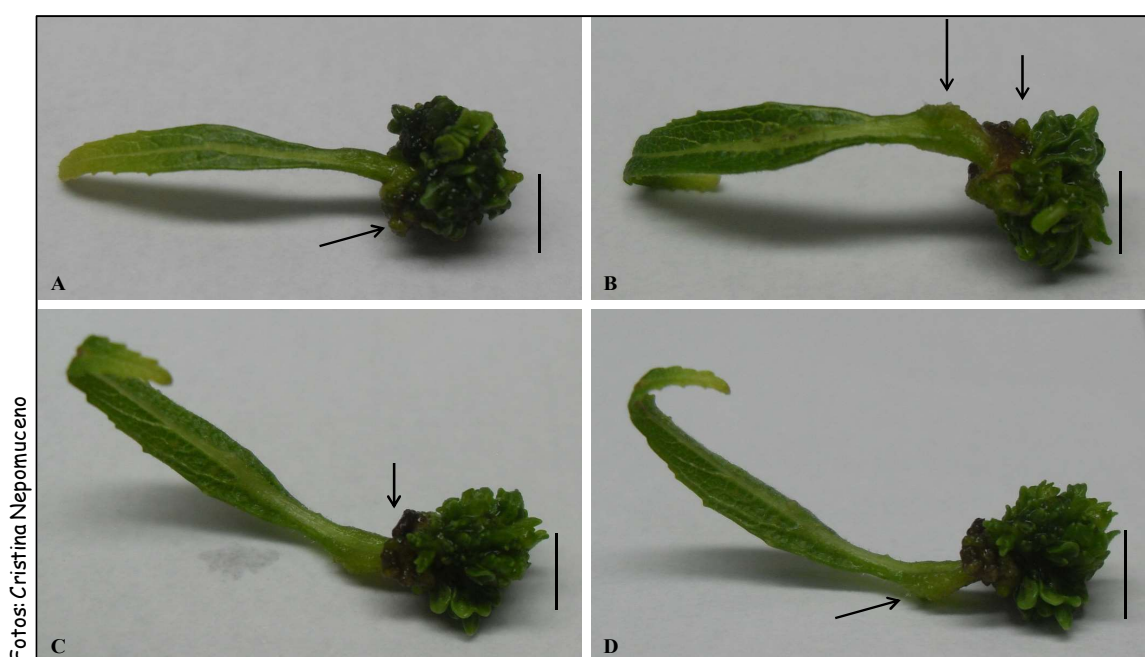
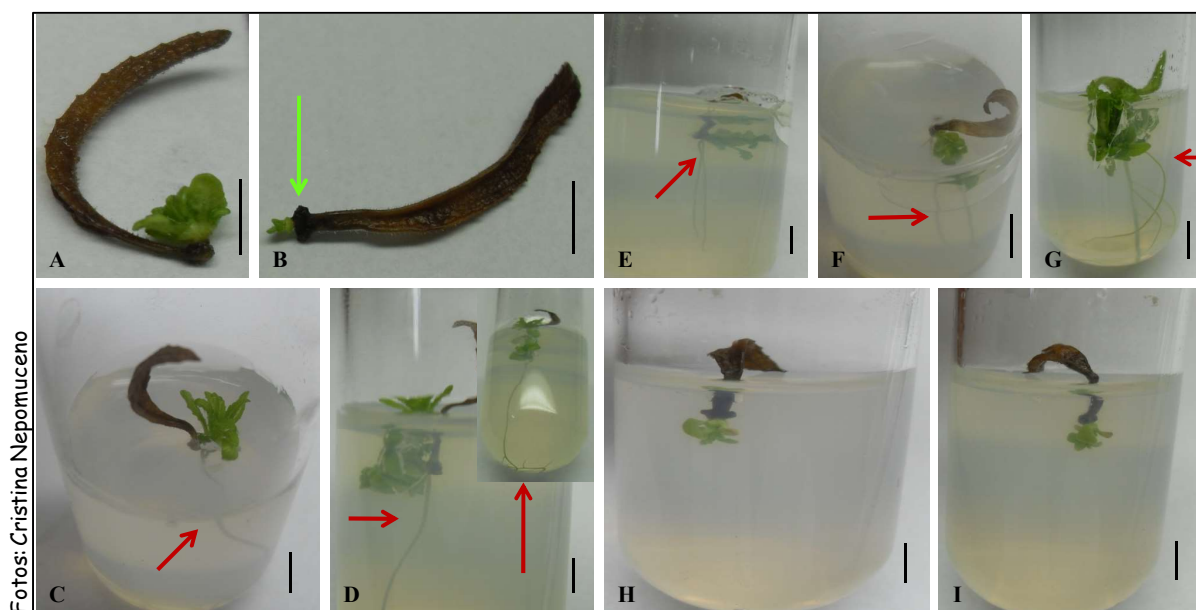


Figura 15: Regeneração *in vitro* de *M. leucocephalus* a partir de pecíolo de folhas submetidos em meio de cultura MS com 3,0 μ M de BAP. A – Gemas adventícias entre os brotos formados; B – Gemas adventícias no limbo foliar e na superfície do pecíolo (região adaxial); C – Gemas adventícias na superfície do pecíolo (região abaxial); D – Gemas adventícias no limbo foliar (região abaxial). Setas indicam gemas adventícias. Barra = 0,5cm. Feira de Santana, 2012.

Quando o meio de cultura foi suplementado com KIN, não se observou a formação de múltiplas brotações e os explantes entre 15-20 dias começaram a senescer, adquirindo aos 30 dias coloração marrom (Figura 16A-I). Nos tratamentos com 2,0 e 3,0 μ M de KIN ocorreu a formação de raízes a partir das brotações (Figura 16C-D; E-G).

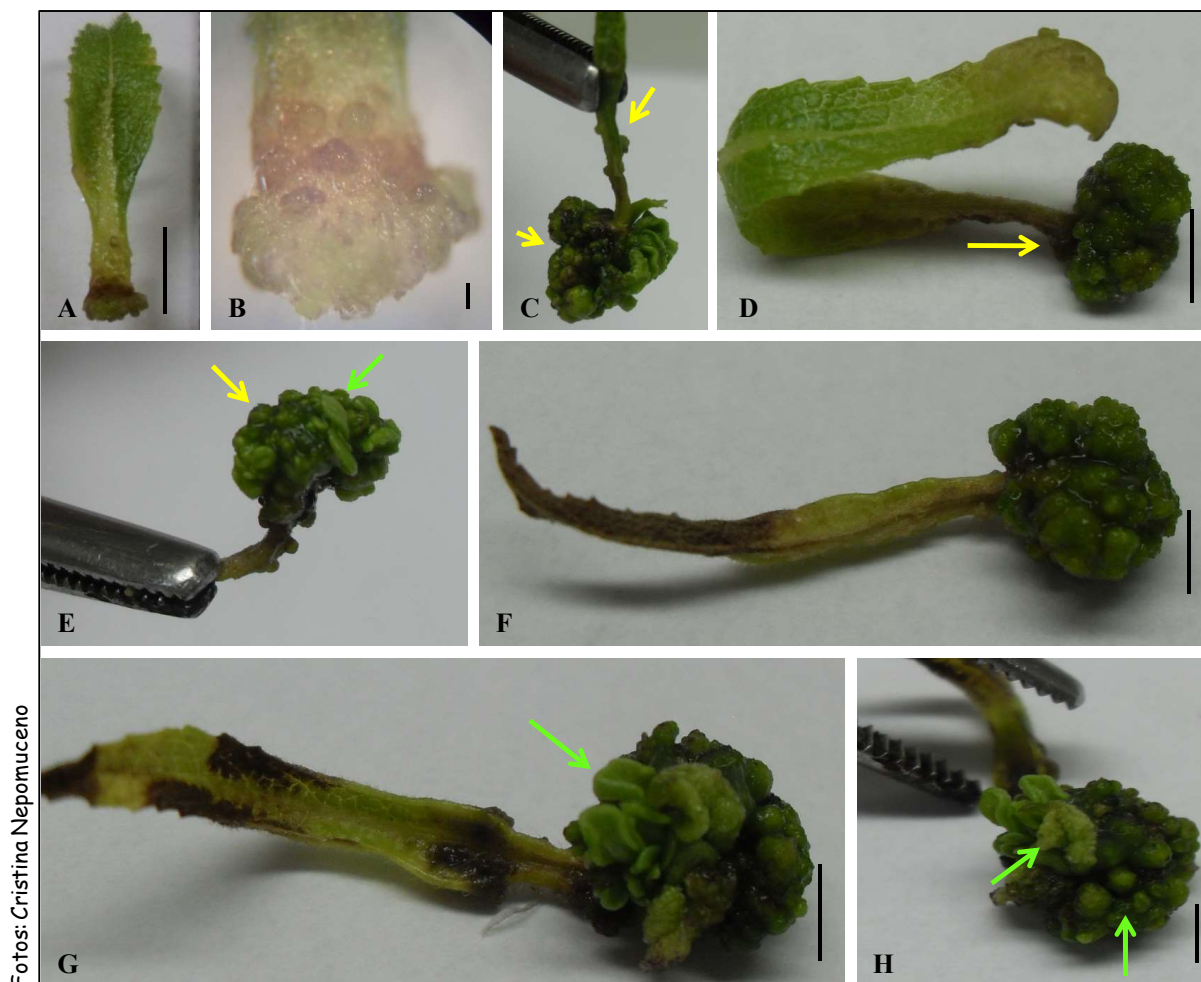


Fotos: Cristiana Nepomuceno

Figura 16: Regeneração *in vitro* de *M. leucocephalus* a partir de pecíolo de folhas submetidos a diferentes concentrações de KIN (A e B - 1,0 μ M; C e D - 2,0 μ M; E, F, G - 3,0 μ M; H e I - 4,0 μ M) em meio de cultura MS. Setas vermelhas indicam formação de raiz. Barra = 0,5cm (A e B); Barra = 1,0cm (C - I). Feira de Santana, 2012.

Ao utilizar 1,0 e 3,0 μ M de TDZ no meio de cultura não foi observada a formação de brotações, apresentando apenas a formação de gemas adventícias (Figura 17A-B, E-F). Nos tratamentos 2,0; 3,0 e 4,0 μ M de TDZ ocorreram a formação de calos e a formação de folhas pequenas (Figura 17E, G, H). Contrariamente, para *Embelia ribes*, o TDZ mostrou-se muito eficiente, produzindo brotações de forma direta e em concentrações abaixo de 0,5 μ M (83,6% de regeneração), enquanto que na presença de BAP e KIN o pecíolo não apresentou resposta regenerativa (Raghu et al., 2006). Em relação às folhas diminutas, Oliveira et al. (2008) verificaram que o tipo de citocinina interferiu na espessura do limbo foliar de *Annona glabra*, com maior espessura e diferenciação do limbo foliar quando em presença de BAP e KIN em relação ao TDZ.

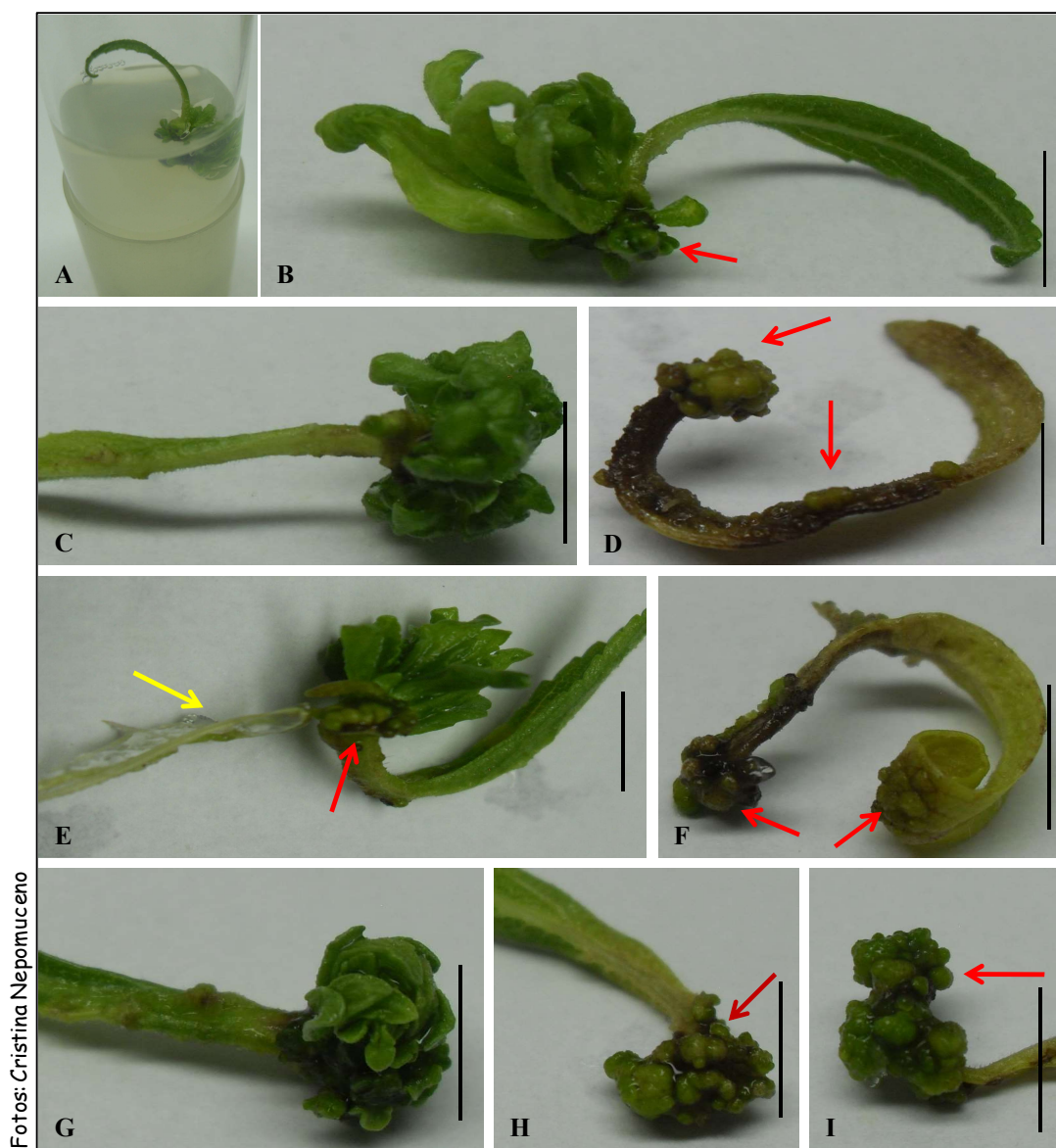
Esses autores verificaram ainda forte efeito inibitório do TDZ sobre a diferenciação do aparato fotossintético.



Fotos: Cristina Nepomuceno

Figura 17: Regeneração *in vitro* de *M. leucocephalus* a partir de pecíolo de folhas submetidos a diferentes concentrações de TDZ (A e B - 1,0 μ M; C e D - 2,0 μ M; E, F - 3,0 μ M; G e H - 4,0 μ M) em meio de cultura MS. Setas amarelas indicam gemas adventícias e setas verdes indicam folhas pequenas. Barra = 0,5cm (A - H); Barra = 1,0mm (B). Feira de Santana, 2012.

Assim como ocorreu para o BAP, quando foram utilizadas diferentes concentrações de ZEA, verificou-se que nos explantes que formaram brotações, também produziram gemas adventícias (Figura 18A, B, C, E, G). Tanto no pecíolo quanto na margem do limbo foliar (Figura 18D) e no próprio limbo foliar também formou gemas adventícias (Figura 18F). Foi visualizada intensa formação de gemas com a concentração de 4,0 μ M de ZEA (Figura 18H-I).



Fotos: Cristina Nepomuceno

Figura 18: Regeneração *in vitro* de *M. leucocephalus* a partir de pecíolo de folhas submetidos a diferentes concentrações de ZEA (A e B - 1,0 μ M; C e D - 2,0 μ M; E, F - 3,0 μ M; G, H e I - 4,0 μ M) em meio de cultura MS. Setas vermelhas indicam gemas adventícias e seta amarela indica produção de raiz. Barra = 1,0cm. Feira de Santana, 2012.

De maneira geral em todos os tratamentos foi observado baixa taxa de regeneração de brotações, apesar da formação de gemas adventícias, portanto sugere-se a transferência desse material para novos meios de cultura que possibilitem a regeneração dos brotos. De acordo com Santana et al. (2003) estas células existem em diferentes níveis de competência, requerendo períodos variados de exposição para que o agente regulador possa ser reconhecido, bem como a associação com outras classes hormonais.

3.2 Ventilação e Aclimatização de *M. leucocephalus*

Observou-se efeito altamente significativo ($p < 0,01$) do tipo de fechamento dos tubos de ensaio sobre todas as variáveis analisadas (Tabela 8).

Tabela 8: Resumo da análise de variância para número de brotos (NB), número de folhas (NF), comprimento de parte aérea (CPA), matéria seca de parte aérea (MSPA) de plantas de *M. leucocephalus* submetidas a diferentes tipos de fechamentos do tubo de ensaio. Feira de Santana, 2012.

| FV | GL | Quadrados Médios | | | |
|----------------------------|----|------------------|----------|-----------|-----------|
| | | NB | NF | CPA | MSPA |
| Tipos de fechamento | 2 | 4,37** | 225,97** | 1581,29** | 1241,04** |
| Resíduo | 27 | 0,05 | 12,91 | 69,77 | 17,98 |
| CV (%) | | 10,05 | 13,42 | 15,55 | 16,20 |

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Os resultados obtidos quando se utilizou o fechamento dos tubos de ensaio com tampa plástica diferiram estatisticamente daqueles encontrados para o fechamento com PVC e tampão de algodão para a variável número de brotações. Com a utilização da tampa plástica, verificou-se incrementos no número de brotos, pois nesta condição a média apresentada foi de 3,0 brotos por explante e com o fechamento PVC a média foi inferior, apresentando 1,68 brotos por explante (Figura 19A). Resultados semelhantes foram reportados para as espécies *Phillyrea latifolia* (Lucchesini e Mensuali-Sodi, 2004) e *Castanea sativa* (Sáez et al., 2012), ao apresentar maior número de brotos quando os tubos de ensaio foram aerados.

A promoção das trocas gasosas favoreceu o incremento no número de brotações para *M. leucocephalus*, e o fechamento com tampa plástica foi mais vantajoso do que aquele realizado por tampão de algodão, possivelmente porque com este último ocorre uma rápida evaporação de água do meio de cultura, modificando assim o potencial osmótico do mesmo, de forma a influenciar na resposta morfogénica.

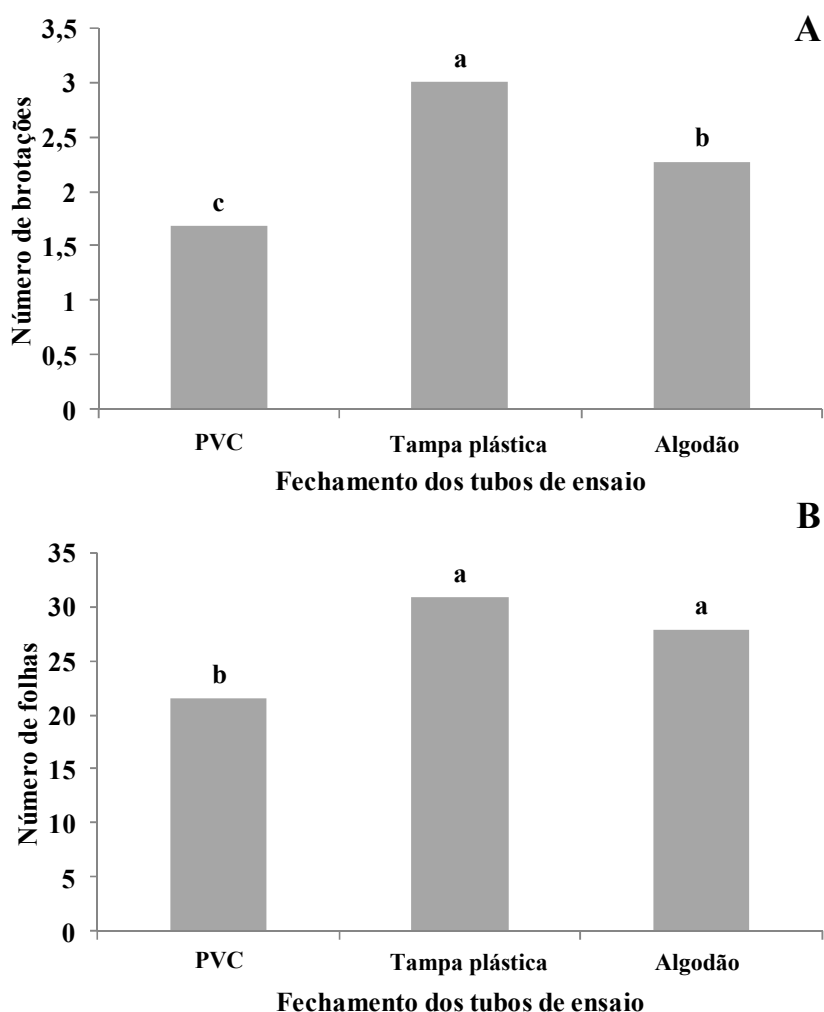


Figura 19: Médias para número de brotações (A) e número de folhas (B) de *M. leucocephalus* submetidas a diferentes fechamentos dos tubos de ensaio (PVC, tampa plástica e tampão de algodão). As médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. Feira de Santana, 2012.

Para número de folhas, as médias obtidas a partir do fechamento com tampa plástica, não indicaram diferença estatística em relação às médias proporcionadas quando foi utilizado o tampão de algodão. Esses dois tipos de fechamento dos tubos favoreceram o aumento no número de folhas (30,86; 27,92, respectivamente) em relação ao fechamento com PVC (21,56 folhas) (Figura 19B). Os resultados obtidos são semelhantes, àqueles reportados para as espécies *Ipomoea batatas* (Xiao e Kozai, 2006) e *Anadenanthera colubrina* (Nepomuceno et al., 2009), que apresentaram incrementos quando ocorreu a promoção da aeração dos recipientes de cultivo *in vitro*.

Para o comprimento de parte aérea, verificou-se que quando foi utilizada a tampa plástica para o fechamento dos tubos de ensaio, os resultados obtidos diferiram estatisticamente em relação aos encontrados quando utilizou-se os outros tipos de fechamento testados, apresentando incrementos de 2,19cm, o que correspondeu a 47,30% no comprimento da maior brotação ao comparar com o tipo de fechamento convencional, o PVC (Figura 20A). Resultados semelhantes foram observados para *Phillyrea latifolia* (Lucchesini e Mensuali-Sodi, 2004) e *Ipomoea batatas* (Xiao e Kozai, 2006) em que o crescimento dos brotos foi promovido pela aeração dos recipientes. Contudo, Mohamed e Alsadon (2010) verificaram que os recipientes ventilados apresentaram encurtamento dos entrenós para as brotações de *Solanum tuberosum*.

No caso de *M. leucocephalus*, o maior comprimento da parte aérea foi observado quando os tubos de ensaio foram fechados com tampa plástica, que se configura como um sistema intermediário (em termos de aeração dos tubos) em relação aos outros dois tipos de fechamento. Portanto, infere-se que o tampão de algodão não tenha contribuído para superar em crescimento, já que proporciona maior troca gasosa, porque ocorre intensa evaporação de água do meio de cultura, elevando a concentração dos sais e reduzindo a disponibilidade de água, implicando assim, na redução do alongamento celular. No caso do fechamento com PVC, é possível que o acúmulo de gases no interior dos tubos atue como um fator que impossibilite o rápido crescimento das brotações.

Os resultados indicaram para a variável matéria seca de parte aérea, que o fechamento dos tubos de ensaio com tampão de algodão, promoveu incrementos em torno de 143,02% na matéria seca quando comparado ao fechamento com PVC (Figura 20B). Resultados semelhantes foram encontrados para as espécies *Ipomoea batatas* (Xiao e Kozai, 2006), *Solanum tuberosum* (Mohamed e Alsadon, 2010) e *Castanea sativa* (Sáez et al., 2012), que apresentaram ganhos na matéria seca das brotações quando foi promovida a troca gasosa no microambiente de cultivo *in vitro*. Entretanto, para *Phillyrea latifolia*, o tipo de fechamento não indicou influência significativa para a matéria seca de parte aérea (Lucchesini e Mensuali-Sodi, 2004), assim como foi observado para a espécie *Simmondsia chinensis* (Mills et al., 2009).

O rápido fluxo transpiratório promovido pelo fechamento de tampão de algodão durante o processo de rustificação de *M. leucocephalus*, provavelmente favoreceu maior troca gasosa, e conseqüentemente absorção de nutrientes de forma mais intensa, levando

ao investimento em acúmulo de esqueletos de carbono de maneira mais eficiente, o que pode proporcionar maior taxa de sobrevivência durante a aclimatização, devido ao maior acúmulo de reservas. De acordo com Nepomuceno et al. (2009) cultivos em recipientes com fechamento que possibilite trocas gasosas reduzem o acúmulo de gases e aumentam o fluxo transpiratório, o que eleva a probabilidade das plantas sobreviverem durante a fase de aclimatização, uma vez que nessas condições elas apresentam melhor controle transpiratório.

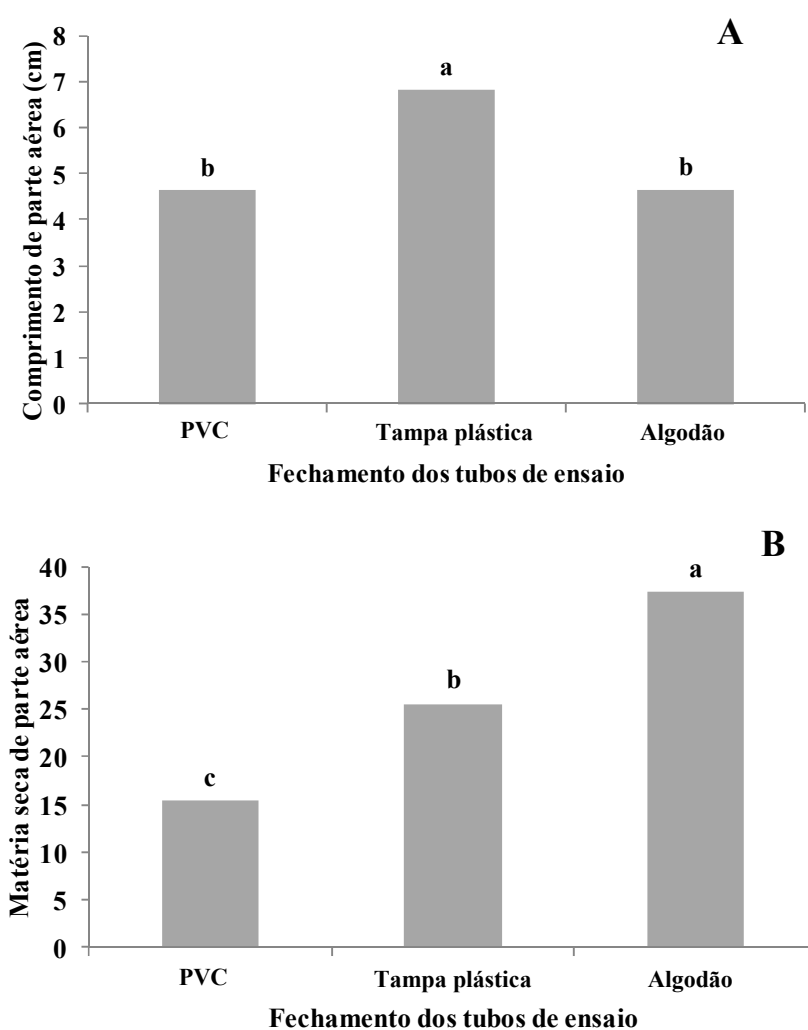


Figura 20: Médias para comprimento de parte aérea (A) e matéria seca de parte aérea (B) submetidas a diferentes fechamentos dos tubos de ensaio (PVC, tampa plástica e tampão de algodão). As médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. Feira de Santana, 2012.

Considerando as variáveis analisadas, as plantas de *M. leucocephalus* cultivadas em ambiente aerado (com tampa plástica sem filme de PVC ou tampão de algodão) tiveram crescimento mais vigoroso que aquelas cultivadas em ambiente totalmente fechado (com filme de PVC). Contudo, o tipo de fechamento não influenciou na aclimatização, pois a porcentagem de sobrevivência das plantas de *M. leucocephalus* foi em torno de 90% (Tabela 9), o que configura uma taxa alta para este processo quando comparado com diversas espécies, tais como *Cyclea peltata* (Abraham et al., 2010) que indicou 56% de sobrevivência, 68% de sobrevivência para as espécies *Achyranthes aspera* e *A. bidentata* (Gnanaraj et al., 2012).

Os fatores que podem ter contribuído para a promoção dessa elevada taxa de sobrevivência foram à qualidade das plantas transplantadas, pois se encontravam com coloração verde sem sintomas de senescência e o tratamento dado durante a fase de aclimatização, em que foi inicialmente mantida a umidade elevada dentro do microambiente no qual as plantas foram transplantadas e gradativamente a umidade relativa foi reduzida, evitando a perda excessiva de água através das plantas. Diante disso, pode-se inferir que as plantas de *M. leucocephalus* possuem a capacidade para se adaptarem as novas condições de forma rápida sem causar prejuízos ao processo de micropropagação (Figura 21).

Os resultados obtidos são semelhantes àqueles reportados para outras espécies, tais como: *Salvia officinalis* (Avato et al., 2005), *Saussurea involucrata* (Guo et al., 2007), *Euphorbia heterophylla* (Colussi et al., 2008), *Vernonia condensata* (Vicente et al., 2009), *Tripterygium wilfordii* (Chen, 2009), *Cannabis sativa* (Lata et al., 2009); *Balanites aegyptica* (Siddique e Anis, 2009), *Pogostemon cablin* (Santos et al., 2010); *Clitoria ternatea* (Singh e Tiwari, 2010) e *Zingiber officinalis* (Abbas et al., 2011) que apresentaram alto índice de sobrevivência durante o processo de aclimatização.

Tabela 9: Porcentagem (%) de sobrevivência de *M. leucocephalus* após 45 dias em casa de vegetação. Feira de Santana, 2012.

| Tipo de fechamento do tubo de ensaio | % de sobrevivência |
|---|---------------------------|
| PVC | 95 |
| Tampa plástica | 90 |
| Tampão de algodão | 90 |



Figura 21: Micropropagação de *M. leucocephalus*. A – Sementes; B – Germinação *in vitro*; C – Plantas germinadas; D – Explante de segmento nodal; E – Múltiplas brotações; F-H – Processo de aclimatização; I – Planta aclimatizada. Feira de Santana, 2012.

4.0 Conclusões

A produção de mudas vigorosas via cultivo *in vitro* para a espécie *M. leucocephalus*, é possível com a utilização do explante segmento nodal, cultivado em meio de cultura suplementado com ANA (1,63 μ M) e com a fonte de carbono sacarose. A organogênese direta pode ser uma alternativa morfogênética viável para a multiplicação rápida dessa espécie. Contudo, devem-se buscar meios de cultura mais adequados à regeneração dos brotos. Mudas obtidas *in vitro* podem ser aclimatizadas sem a necessidade do processo de rustificação.

5.0 Referências Bibliográficas

- ABBAS, M.S.; TAHA, H.S.; ALY, U.I.; HATTEM, M.E-S.; GABER, E-S.I. 2011. *In vitro* propagation of ginger (*Zinger officinale* Rosco). **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**. 9:165-172.
- ABRAHAM, J.; CHERUVATHUR, M.K.; MANI, B.; THOMAS, T.D. 2010. A rapid *in vitro* multiplication system for commercial propagation of pharmaceutically important *Cyclea peltata* (Lam) Hool & Thoms. Based enhanced axillary branching. **Industrial Crops and Products**. 31:92-98.
- AIRES, P.S.R.; CARVALHO, J.M.F.C.; PIMENTEL, N.W.; SILVA, H. 2007. Efeito da concentração de vitaminas e das fontes de carbono no superbrotamento da mamona utilizando o genótipo BRS Nordeste. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**. 7(2):1-6.
- AL-KHATEEB, A.A. 2008. Regulation of *in vitro* bud formation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Khanezi by different carbon sources. **Bioresource Technology**. 99:6550-6555.
- ASMAR, S.A.; RESENDE, R.F.; ARARUNA, E.C.; MORAIS, T.P.; LUZ, J.M.Q. 2011. Citocininas na multiplicação *in vitro* hortelã-pimenta (*Mentha x Piperita* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. 13(especial):533-538.
- AVATO, P.; FORTUNATO, I.M.; RUTA, C.; D'ELIA, R. 2005. Glandular hairs and essential oils in micropropagation plants of *Salvia officinalis* L. **Plant Science**. 169:29-36.
- BACKES, C.L.; HOCH, W.A. 2010. *In vitro* propagation of wavy-leaved Indian paintbrush (*Castilleja applegatei* Fern.). **Scientia Horticulturae**. 126:475-479.
- BAHMANI, R.; KARAMI, O.; GHOLAMI, M. 2009. Influence of carbon sources and their concentrations on rooting and hyperhydricity of apple rootstock MM.106. **World Applied Sciences Journal**. 6(11):1513-1517.

BEEGUM, A.S.; MARTIN, K.P.; ZHANG, C-H.; NISHITHA, I.K.; LIGIMOL; SLATER, A.; MADHUSOODANAN, P.V. 2007. Organogenesis from leaf and internode explants of *Ophiorrhiza prostrate* an anticancer drug (camptothecin) producing plant. **Journal of Biotechnology**. 10(1):114-123.

BERTONI, B.W.; DAMIÃO-FILHO, C.F.; MORO, J.R.; FRANÇA, S.C.; PEREIRA, A.M.S. 2006. Micropropagação de *Calendula officinalis*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. 8(2):48-54.

BESSON, J.C.F.; OLIVEIRA, L.K.; BONETT, L.P.; STEFANELLO, S. 2010. Fontes e concentrações de carboidratos no crescimento vegetativo e no enraizamento *in vitro* de *Miltonia flavescens* Lindl. **Revista Brasileira de Biociências**. 8(1):9-13.

BIONDO, R.; SOARES, A.M.; BERTONI, B.W.; FRANÇA, S.C.; PEREIRA, A.M.S. 2004. Direct organogenesis of *Mandevilla illustris* (Vell) Woodson and effects of its aqueous extract on the enzymatic and toxic activities of *Crotalus durissus terrificus* snake venom. **Plant Cell Reports**. 22:549-552.

BLANK, A.F.; COSTA, A.S.; ARRIGONI-BLANK, M.F.; MENDONÇA, A.B.; LEDO, A.S. 2008. *In vitro* establishment of pepper-rosmarin nodal segments. **Horticultura Brasileira**. 26(2):255-258.

BUENO, A.X.; MOREIRA, A.T.S.; SILVA F.T.; ESTEVAM, C.S.; MARCHIORO, M. 2006. Effects of the aqueous extract from *Hyptis pectinata* leaves on rodent central nervous system. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 16: 317-323.

CASTRO, M.R.; BELO, A.F.; AFONSO, A.; ZAVATTIERI, M.A. 2011. Micropropagation of *Juniperus navicularis*, an endemic and rare species from Portugal SW coast. **Plant Growth Regulation**. 65:223-230.

CHEN, B-H. 2009. *In vitro* propagation of a medicinal plant: *Tripterygium wilfordii* Hook f. **Forestry Studies in China**. 11(3):174-178.

COLUSSI, F.; DABUL, A.N.G.; AYUB, R.A. 2008. Regeneração de *Euphorbia heterophylla* L. **Ciência e Agrotecnologia**. 32(4):1317-1321.

COSTA, N.M.S.; ALOUFA, M.A.I. 2006. Organogênese direta de *Phoenix dactylifera* L. via pecíolo cotiledonar. **Pesquisa Agropecuária Tropical**. 36(3):195-198.

COSTA, M.A.P.C.; SOUZA, A.S.; A, W.A.B. de. 2006. Morfogênese *in vitro*. In: SOUZA, A. da S.; JUNGHANS, T.G. **Introdução à Micropropagação de Plantas**. Cruz das Almas, Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. p.:113-130.

COSTA, M.; NEPOMUCENO, C.F.; SANTANA, J.R.F. 2010. Propagação *in vitro* de *Erythrina velutina*. **Ciência Rural**. 40(5):1090-1096.

CUI, H.; GU, X.; SHI, L. 2009. *In vitro* proliferation from axillary buds and *ex vitro* protocol for effective propagation of *Syringa x hyacinthiflora* ‘Luo Lan Zi’. **Scientia Horticulturae**. 121:186-191.

DENNIS, D.T.; BLAKELEY, S.D. 2000. Carbohydrate Metabolism. In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. [Eds.]. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. American Society of Plant Physiologists. p.:630-675.

DOBRÁNSZKI, J.; TEIXEIRA DA SILVA, J.A. 2010. Micropropagation of apple – A review. **Biotechnology Advances**. 28:462-488.

FERREIRA, D.F. 2011. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**. 35(6):1039-1042.

FLORES, R.; NICOLOSO, F.T. 2007. Efeito de ANA e BAP na calogênese e organogênese de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. 9(4):92-96.

FLORES, R.; NICOLOSO, F.T.; MALDANER, J.; GARLET, T.M.B. 2009. Benzilaminopurina (BAP) e thidiazuron (TDZ) na propagação *in vitro* de *Pfaffia*

glomerata (Spreng.) Pedersen. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. 11(3):292-299.

GEMAS, V.; BESSA, A. 2006. Influence of various carbohydrates in shoot development in nodal culture of Guinean *Anacardium occidentale* genotypes. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 85:103-108.

GEORGE, E.F. 1993. **Plant Propagation by Tissue Culture**. Edington: Exegeties. 574p.

GNANARAJ, W.E.; ANTONISAMY, J.M.; MOHANAMATHI, R.B.; SUBRAMANIAN, K.M. 2012. *In vitro* clonal propagation of *Achyranthes aspera* L. and *Achyranthes bidentata* Blume using nodal explants. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. 1-5.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. 1998. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Orgs.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, EMBRAPA-SPI/ EMBRAPA-CNPH. p.:183-260.

GUO, B.; GAO, M.; LIU, C-Z. 2007. *In vitro* propagation of an endangered medicinal plant *Saussurea involucrata* Kar. et Kir. **Plant Cell Reports**. 26:261-265.

GUTIÉRREZ, I.E.M.; NEPOMUCENO, C.F.; LEDO, C.A.S.; SANTANA, J.R.F. 2011. Micropropagation and acclimatization of *Bauhinia cheilantha* (an important medicinal plant). **African Journal of Biotechnology**. 10(8):1353-1358.

HANDRO, W.; FLOH, E.I.S. 1990. Aspectos básicos do controle da morfogênese *in vitro*. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (Orgs.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília, ABCTP/EMBRAPA-CNPH. p.:203-212.

HARTINIE, M.; JUALANG. 2007. *In vitro* germination and plantlet establishment of *Labisia pumila* (Bl.) F. Vill. **Scientia Horticulturae**. 115:91-97.

JAIN, N.; BAIRU, M.W.; STIRK, W.A.; VAN STADEN, J. 2009. The effect of medium, carbon source and explant on regeneration and control of shoot-tip necrosis in *Harpagophytum procumbens*. **South African Journal of Botany**. 75:117-121.

JAIN, P.; KACHHWAHA, S.; KOTHARI, S.L. 2009. Improved micropropagation protocol and enhancement in biomass and chlorophyll content in *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertonii by using high copper levels in the culture medium. **Scientia Horticulturae**. 119:315-319.

JONES, M.P.A.; YI, Z.; MURCHI, S.J.; SAXENA, P.K. 2007. Thidiazuron-induced regeneration of *Echinacea purpurea* L.: Micropropagation in solid and liquid culture systems. **Plant Cell Reports**. 26:13-19.

KERBAUY, G.B. 1999. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Orgs.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPQ. p.:519-532.

LATA, H.; CHANDRA, S.; KHAN, I.; ELSOHLI, I. 2009. Thidiazuron-induced high-frequency direct shoot organogenesis of *Cannabis sativa* L. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**. 45:12-19.

LI, X.; AHLMAN, A.; LINDGREN, H.; ZHU, L-H. 2011. Highly efficient *in vitro* regeneration of the industrial oilseed crop *Crambe abyssinica*. **Industrial Crops and Products**. 33:170-175.

LITWINCZUK, W.; WADAS, M. 2008. Auxin-dependent development and habituation of highbush blueberry (*Vaccinium x covilleianum* But. Et Pl.) ‘Herbert’ *in vitro* shoot cultures. **Scientia Horticulturae**. 119:41-48.

LUCCHESINI, M. MENSUALI-SODI, A. 2004. Influence of medium composition and vessel ventilation on *in vitro* propagation of *Phillyrea latifolia* L. **Scientia Horticulturae**. 100:117-125.

MATU, E.N.; LINDSEY, K.L.; STADEN, J. van. 2006. Micropropagation of *Maytenus senegalensis* (Lam.) Excell. **South African Journal of Botany**. 72:409-415.

MERCIER, H. 2008. Auxinas. In: KERBAUY, G.B. **Fisiologia Vegetal**. Ed: Guanabara Koogan, Rio de Janeiro-RJ. p.:217-249.

MILLS, D.; YANQING, Z.; BENZIONI, A. 2009. Effect of substrate, medium composition, irradiance and ventilation on jojoba plantlets at the rooting stage of micropropagation. **Scientia Horticulturae**. 121:113-118.

MITSUKURI, K.; MORI, G. JOHKAN, M.; SHIMADA, Y.; MISHIBA, K-I.; MORIKAWA, T.; ODA, M. 2009. Effects of explant position and dark treatment on bud formation in floret culture of *Ponerorchis graminifolia* Rchb.f. **Scientia Horticulturae**. 121:243-247.

MOHAMED, M.A.-H., ALSADON, A.A. 2010. Influence of ventilation and sucrose on growth and leaf anatomy of micropropagation potato plantlets. **Scientia Horticulturae**. 123:295-300.

MORONE-FORTUNATO, I.; MONTEMURRO, C.; PERRINI, R.; SABETTA, W.; BLANCO, A.; LORUSSO, E.; AVATO, P. 2010. Essential oils, genetic relationships and *in vitro* establishment of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don ssp. *Italicum* from wild Mediterranean germplasm. **Industrial Crops and Products**. 32:639-649.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**. 15:493-497.

NAS, M.N. BOLEK, Y.; SEVGIN, N. 2010. The effects of explants and cytokinin type on regeneration of *Prunus microcarpa*. **Scientia Horticulturae**. 126:88-94.

NEPOMUCENO, C.F.; RIOS, A.P.S.; QUEIROZ, S.R.O.D.; PELACANI, C.R.; SANTANA, J.R.F. 2009. Respostas morfofisiológicas *in vitro* de plântulas de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. *cebil* (Griseb) Altschul. **Revista Árvore**. 33(3):481-490.

NICOLOSO, F. T.; ERIG, A.C.; RUSSOWSKI, D.; MARTINS, C.F. 2003. Efeito de doses e fontes de carboidratos no crescimento de plantas de ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] cultivadas *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**. 27(1):84-90.

OLIVEIRA, L.M.; PAIVA, R.; ALOUFA, M.A.I.; CASTRO, E.M.; SANTANA, J.R.F.; NOGUEIRA, R.C. 2008. Efeitos de citocininas sobre a anatomia foliar e o crescimento de *Annona glabra* L. durante o cultivo *in vitro* e *ex vitro*. **Ciência Rural**. 38(5):1447-1451.

PAIVA, P.D.O.; NAVES, V.C; PAIVA, R.; PASQUAL, M. 2006. Avaliação de diferentes formulações de sais minerais para a propagação de *Nidularium fulgens* Lam. **Plant Cell Culture & Micropropagation**. 2(1):9-14.

PERES, L.E.P; KERBAUY, G.B. 2008. Citocininas. In: KERBAUY, G.B. **Fisiologia Vegetal**. Ed: Guanabara Koogan, Rio de Janeiro-RJ. p.:250-278.

PREECE, J. 2008. Stock Plant Physiological Factors Affecting Growth and Morphogenesis. In: GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; KLERK, G-J. **Plant Propagation by Tissue culture**. Dordrecht: Springer, 3rd Edition. p.:403-422.

REIS, E.S.; PINTO, J.E.B.P.; ROSADO, L.D.S.; CORRÊA, R.M. 2007. Tipos de explantes e volumes de meio de cultura no cultivo *in vitro* de *Melissa officinalis* L. **Plant Cell Culture & Micropropagation**. 3(2):83-88.

RAGHU, A.V.; GEETHA, S.P.; MARTIN, G.; BALACHANDRAN, I.; RAVIDRAN, P.N.; 2006. Direct shoot organogenesis from leaf explants of *Embelia ribes* Burm. f.: a vulnerable medicinal plant. **Journal of Forest Research**. 11:57-60.

RIBAS, L.L.F.; ZANETTE, F.; KULCHETSCKI, L.; GUERRA, M.P. 2005. Micropropagação de *Aspidosperma polyneuron* (peroba-rosa) a partir de segmentos nodais de mudas juvenis. **Revista Árvore**. 29(4):517-524.

RIBEIRO, M.F.; DONINI, L.P.; SOUZA, J.A.; GUISSO, A.P.; FERREIRA-MOURA, I.; BOBROWISKI, V.L.; VIÉGAS, J. 2007. Influência de diferentes concentrações de sais de MS e açúcares no cultivo *in vitro* de manjeriço roxo (*Ocimum basilicum* L.). **Revista Brasileira de Biociências**. 5(2):57-59.

RODRIGUES, O.S. 2007. **Óleo essencial de *Hyptis leucocephala* Mart. ex Benth: composição química e atividade antimicrobiana.** Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual de Feira de Santana.

ROLLAND, F.; BAENA-GONZALEZ, E.; SHEEN, J. 2006. Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. **Annual Review Plant Biology**. 57:675-709.

SÁEZ, P.L.; BRAVO, L.A.; LATSAGUE, M.I.; SÁNCHEZ, M.E.; RÍOS, D.G. 2012. Increased light intensity during *in vitro* culture improves water loss control and photosynthetic performance of *Castanea sativa* grown in ventilated vessels. **Scientia Horticulturae**. 138(7):7-16.

SANTANA, J.R.F.; PAIVA, R.; SOUZA, A.V.; OLIVEIRA, L.M. 2011a. Effect of different carbon sources on the *in vitro* multiplication of *Annona* sp. **Ciência e Agrotecnologia**. 35(3):487-493.

SANTANA, J.R.F.; PAIVA, R.; OLIVEIRA, L.M.; NEPOMUCENO, C.F.; SILVEIRA, D.G. 2011b. Organogenesis in three species of *Annona* (Annonaceae). **Sitientibus. Série Ciências Biológicas**. 11(1):82-88.

SANTANA, J.R.F.; PAIVA, R.; OLIVEIRA, L.M.; PEREIRA, F.D.; SILVEIRA, D.G.; NEPOMUCENO, C.F. 2011c. Influence of flask sealing and activated charcoal on the morphogenesis and leaf anatomy of *Annona glabra* (Annonaceae) cultured *in vitro*. **Sitientibus. Série Ciências Biológicas**. 11(1):74-81.

SANTOS, A.V.; ARRIGONI-BLANK, M.F.; BLANK, A.F.; TAVARES, F.F.; FERNANDES, R.P.M.; JESUS, H.C.R.; ALVES, P.B. 2010. Mass multiplication of

Pogostemon cablin (Blanco) Benth genotypes and increase of essential oil and patchoulol yield. **Industrial Crops and Products**. 32:445-449.

SEXTO, P.A.S. 2005. **Cultivo *in vitro* e estaquia de *Ginkgo biloba* L.** Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Agronomia) – Universidade de Passo Fundo. 215p.

SIDDIQUE, I.; ANIS, M. 2009. Direct plant regeneration from nodal explants of *Balanites aegyptiaca* L. (Del.); a valuable medicinal tree. **New Forests**. 37:53-62.

SILVA, S.; LAGE, C.L.S.; ESQUIBEL, M.A.; GIL, R.A.S.S.; SATO, A. 2006. *In vitro* propagation of *Melissa officinalis* L. and production of essential oil. **Plant Cell Culture & Micropropagation**. 2(2):53-60.

SINGH, B.; SOOD, N. 2009. Significance of explant preparation and sinzing in *Aloe vera* L. – A highly efficient method for *in vitro* multiple shoot induction. **Scientia Horticulturae**. 122:146-151.

SINGH, J.; TIWARI, K.N. 2010. High-frequency *in vitro* multiplication system for commercial propagation of pharmaceutically important *Clitoria ternatea* L. – A valuable medicinal plant. **Industrial Crops and Products**. 32:534-538.

SMEEKENS, S. 2000. Sugar-induced signal transduction in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. 51(1):49-81.

SRIDHAR, T.M.; NAIDU, C.V. 2011. Effect of different carbon sources on *in vitro* shoot regeneration of *Solanum nigrum* (Linn.) – An important antiulcer medicinal plant. **Journal of Phytology**. 3(2):78-82.

SUBOTIC, A.; JEVREMOVIC, S.; GRUBISIC, D. 2009. Influence of cytokinins on *in vitro* morphogenesis in root cultures of *Centaureum erythraea* – Valuable medicinal plant. **Scientia Horticulturae**. 120:386-390.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. 2009. **Fisiologia Vegetal**. 4ª ed., Porto Alegre: Artmed, 848p.

THIYAGARAJAN, M.; VENKATACHALAM, P. 2012. Large scale *in vitro* propagation of *Stevia rebaudiana* (Bert) for commercial application: Pharmaceutically important and antidiabetic medicinal herb. **Industrial Crops and Products**. 37:111-117.

THOMÉ, G.C.H.; GRESSLER, P.D.; SANTOS, G. 2004. Propagação *in vitro* de *Kalanchoe blossfeldiana* Poelln., via organogênese. **Revista Brasileira de Agrociência**. 10(2):197-202.

THORPE, T.; STASOLLA, C.; YEUNG, E.C.; KLERK, G-J.; ROBERTS, A.; GEORGE, E.F. 2008. The Components of Plant Tissue Culture Media II: Organic Additions, Osmotic and pH Effects, and Support Systems. In: GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; KLERK, G-J. **Plant Propagation by Tissue culture**. Dordrecht: Springer, 3rd Edition. p.:205-226.

TILKAT, E.; ONAY, A.; YILDIRIM, H.; AYAZ, E. 2009. Direct plant regeneration from mature leaf explants of pistachio, *Pistachio vera* L. **Scientia Horticulturae**. 121:361-365.

TILKAT, E.; ONAY, A. 2009. Direct shoot organogenesis from *in vitro* – derived mature leaf explants of pistachio. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**. 45:92-98.

van STADEN, J.; ZAZIMALOVA, E.; GEORGE, E.F. 2008. Plant Growth Regulators II: Cytokinins, their Analogues and Antagonists. In: GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; KLERK, G-J. **Plant Propagation by Tissue culture**. Dordrecht: Springer, 3rd Edition. p.:205-226.

VICENTE, M.A.A.; ALMEIDA, W.A.S.; CARVALHO, Z.S. 2009. Multiplicação *in vitro* e aclimatização de *Vernonia condensata* Baker. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. 11(2):176-183.

WU, J-H.; MILLER, S.A.; HALL, H.K.; MOONEY, P.A. 2009. Factors affecting the efficiency of micropropagation from lateral buds and shoot tips of *Rubus*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 99:17-25.

XIAO, Y.; KOZAI, T. 2006. Photoautotrophic growth and net photosynthetic rate of sweet potato plantlets *in vitro* as affected by the number of air exchanges of the vessel and type of supporting material. **Tsinghua Science and Technology**. 11(4):481-489.

YUNUS, M.F.; AZIZ, M.A.; KADIR, M.A.; RASHID, A.A. 2012. *In vitro* propagation of *Etilingera elatior* (Jack) (torch ginger). **Scientia Horticulturae**. 135:145-150.

ZHENG, W.; XU, X-D.; DAI, H.; CHEN, L-Q. 2009. Direct regeneration of plants derived from *in vitro* cultured shoot tips and leaves of three *Lysimachia* species. **Scientia Horticulturae**. 122:138-141.

ZUZARTE, M.R.; DINIS, A.M.; CAVALEIRO, C.; SALGUEIRO, L.R.; CANHOTO, J.M. 2010. Trichomas, essential oils and *in vitro* propagation of *Lavandula pedunculata* (Lamiaceae). **Industrial Crops and Products**. 32:580-587.

CAPÍTULO 3

**Indução, caracterização bioquímica e morfo-anatômica
de calos embriogênicos de *Martianthus leucocephalus*
(Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore**

Resumo

Martianthus leucocephalus pertence à família Lamiaceae, é uma erva aromática endêmica da região da Caatinga que se destaca por sua importância como medicinal, pois apresenta em suas folhas óleo essencial, conferindo-lhe atividade antimicrobiana. O presente estudo teve como objetivo investigar o processo de indução e iniciação da embriogênese somática, bem como analisar bioquimicamente e anatomicamente os calos embriogênicos obtidos. Para a indução, segmentos de folha foram inoculados em meio de cultura MS com diferentes concentrações de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D -1; 2,5; 5; 10 e 20 μ M) e cinetina (KIN - 0; 0,5; 1; 2,5 e 5 μ M), sendo avaliados: porcentagem da área do explante recoberta por calos, coloração e textura dos calos. Para determinar a curva de crescimento, pesou-se a matéria fresca dos calos até o 90º dia de cultivo, em intervalos de 9 dias. Os carboidratos foram identificados e quantificados em HPLC. Para os estudos histológicos, as amostras foram fixadas FAA 70% e preparadas para análise em microscopia óptica, com emblocamento em historesina. As secções histológicas foram coradas com azul de toluidina (1%). Para a porcentagem da área do explante recoberta por calos, nos tratamentos contendo 20 μ M de 2,4-D + 1 μ M de KIN verificou-se que 100% dos explantes atingiram o máximo de formação de calos e 77,5% dos explantes quando o meio de cultura foi suplementado com 1 μ M de 2,4-D + 0,5 μ M de KIN. A maioria dos tratamentos apresentaram calos com coloração marrom. Calos friáveis foram observados na presença de 1 μ M de 2,4-D combinado as diferentes concentrações de KIN. Observou-se a formação de calos com aspecto embriogênico em meio de cultura contendo 1 μ M de 2,4-D + 0,5 μ M de KIN. A curva de crescimento apresentou-se na forma sigmoideal, com cinco fases distintas: lag, exponencial, linear, desaceleração e estacionária. Durante a incubação, identificou-se a ocorrência de três carboidratos: frutose, glicose e sacarose. Esses carboidratos tiveram seus teores mínimos no dia da inoculação, com pico máximo de frutose e glicose no 9º e 18º dia de cultivo, posteriormente mantendo-se constante, porém com incrementos de sacarose. Embriões globulares, foram constatados aos nove dias da inoculação, tendo sua formação a partir do sistema vascular, e devido ao tempo de exposição prolongado ao 2,4-D, os embriões somáticos iniciaram processo de desorganização celular.

Palavras-chave: Lamiaceae; Calogênese; Embrião somático; Carboidratos.

Abstract

Martianthus leucocephalus belongs to the family Lamiaceae, is an aromatic herb endemic to the Caatinga region that stands out for its importance as a medicinal, it presents the essential oil in its leaves, giving it antimicrobial activity. The present study aimed to investigate the process of induction and initiation of somatic embryogenesis, as well as analyze biochemically and anatomically the callus obtained. For the induction of leaf segments were inoculated on MS medium with different concentrations of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D – 1; 2.5; 5; 10 and 20 μ M) and kinetin (KIN – 0; 0.5; 1; 2.5 and 5 μ M), were evaluated: percentage of area covered by the explant callus, color and texture of the callus. To determine the growth curve, was weighed to fresh callus until the 90th day of cultivation, at intervals of nine days. Carbohydrates were identified and quantified by HPLC. For histological studies, samples were fixed 70% FAA and prepared for analysis by optical microscopy with embedment in historesin. The histologic sections were stained with toluidine blue (1%). For the percentage area covered by callus explant, in the treatments containing 20 μ M 2,4-D + 1 μ M KIN it was found that 100% of the explants reached maximum callus explant and 77.5% when using culture was supplemented with 1 μ M of 2,4-D + 0.5 μ M KIN. Most treatments showed callus with brown. Friable callus was observed in the presence of 1 μ M of 2,4-D combined different concentrations of KIN. It was observed the formation of embryogenic callus with features in culture medium containing 1 μ M of 2,4-D + 0.5 μ M KIN. The growth curve presented sigmoidal in shape, with five distinct phases: lag, exponential, linear deceleration and stationary. During incubation, we identified the occurrence of three carbohydrates: fructose, glucose and sucrose. These carbohydrates have their minimum levels on the day of inoculation, with peak of fructose and glucose in the 9th and 18th days of cultivation, after remaining unchanged, but increments of sucrose. Were found nine days after inoculation globular embryos, and its formation from the vascular system, and due to long exposure time to 2,4-D, somatic embryos started the process of cellular disorganization.

Keywords: Lamiaceae; Callogenesis, Somatic embryo; Carbohydrates.

1.0 Introdução

Martianthus leucocephalus é uma erva aromática endêmica da região da Caatinga, pertencente à família Lamiaceae, que apresenta em suas folhas a produção de óleo essencial, conferindo-lhe atividade antimicrobiana frente à *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* (Rodrigues, 2007), *Pseudomonas aeruginosa*, *S. schleiferi*, *Salmonella thypi*, *Escherichia coli*, *Burkholderia* sp. e *Klebsiella pneumoniae*, além de atividade contra alguns fungos fitopatogênicos, como *Sclerotinium rolfis* e *Rhizoctonia solani* (Santos et al., 2011). As espécies desse gênero se propagam sexuadamente, entretanto, a produção comercial de mudas via sementes é limitada em virtude da dormência (Maia et al., 2008), além da sazonalidade na produção (Oliveira et al., 2011).

Como esta espécie possui potencial medicinal, devido às biomoléculas que compõem o óleo essencial, apresentarem ação contra microrganismos multiresistentes a antibióticos existentes no mercado farmacêutico mundial, esta planta se constitui como uma possível fonte de novos fármacos. A busca por técnicas alternativas que proporcione maior produção, tanto quantitativa como qualitativamente do biocomposto de interesse, é extremamente vantajosa, pois conduzirá a utilização de uma via sustentável dos recursos genéticos vegetais.

Nesse sentido, a aplicação de técnicas biotecnológicas como a cultura de tecidos vegetais que promove sistemas eficientes para a produção de metabólitos de interesse, seja através da produção de mudas (organogênese ou embriogênese somática) ou via suspensão celular, conforme tem sido aplicado para as espécies medicinais *Cleome rosea* (Simões et al., 2009), *Clitoria ternatea* (Singh e Tiwari, 2010), *Cyclea peltata* (Abrahan et al., 2010), *Zingiber officinale* (Abbas et al., 2011) e *Stevia rebaudiana* (Thiyagarajan e Venkatachalam, 2012). Essas vias podem ser alcançadas diretamente, no caso da organogênese e embriogênese somática, ou indiretamente, por intermédio da formação de calos, que poderá levar tanto a formação de mudas quanto à suspensão celular.

No que se refere à embriogênese somática, este é um processo que se assemelha a embriogênese zigótica, porém ocorre a partir de células somáticas, sem que ocorra a fusão de gametas. A sequência de eventos para a embriogênese somática como fenômeno morfogênico é frequentemente expresso em etapas, caracterizadas por eventos moleculares e bioquímicos (Jiménez, 2005; Arnold, 2008; Zavattieri et al.,

2010), sendo os estádios de desenvolvimento do embrião somático similares ao da embriogênese zigótica, tais estádios são denominados de globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar (Zimmerman, 1993). A embriogênese somática inicia-se através do processo de indução, em que células somáticas diferenciadas adquirem competência embriogênica por meio de estímulos apropriados, resultando na expressão ou iniciação da embriogênese somática, na qual as células competentes iniciarão o desenvolvimento dos embriões somáticos. Finalmente, os embriões somáticos entram na etapa de maturação, caracterizada pela dessecação e acúmulo de reservas e, como consequência, na germinação (Jiménez, 2001). Vários fatores estão associados a estes eventos, como os reguladores vegetais (níveis endógenos e/ou exógenos), fatores de estresse como potencial osmótico, choques térmicos e alterações no pH do meio de cultura (Guerra et al., 1999; Fehér, 2005).

Existe ampla evidência que os reguladores vegetais possuem papel central na sinalização para a reprogramação das células somáticas levando a via embriogênica (Fehér et al., 2003; Fehér, 2005). As auxinas são utilizadas no processo de indução e iniciação dos embriões somáticos e, entre elas, o 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) tem sido a mais utilizada. São consideradas responsáveis pelo desencadeamento dos processos de desdiferenciação e rediferenciação celular, alterando a determinação e conferindo novas competências às células responsivas presentes nos explantes. Contudo, em alguns casos o uso de citocininas também tem favorecido a produção de calo embriogênico (Guerra et al., 1999).

Outros aditivos também possuem funções primordiais durante o processo embriogênico, tais como os carboidratos, que possuem papel importante no cultivo *in vitro* por constituir-se como fonte de energia e de esqueletos carbônicos, além de regular o potencial osmótico (Thorpe et al., 2008). De acordo com Lou et al. (1996), os carboidratos podem atuar como sinalizadores da resposta morfogênica, sendo importantes na formação e desenvolvimento do embrião somático. Contudo, a maioria dos estudos está associada com a adição no meio de cultura, e poucos analisam o seu metabolismo durante a resposta morfogênica.

Neste sentido é importante estudar como estas moléculas sinalizadoras podem atuar na modulação do processo de embriogênese somática, em especial a sua influência no crescimento, morfologia e metabolismo endógeno de carboidratos. Recentes trabalhos têm sido desenvolvidos analisando a relação entre os açúcares endógenos e as diferentes etapas da embriogênese somática de *Acca sellowiana* contribuindo assim,

para uma melhor compreensão dos processos fisiológicos que estão associados à rota embriogênica (Pescador et al., 2008; Mengarda et al., 2009).

A embriogênese somática oferece vantagens em relação à organogênese, por formar estrutura bipolar, ou seja, constituída de ápice caulinar e radicular. Além disso, é uma ferramenta valiosa, por atender a uma gama de objetivos como a propagação clonal, produção de sementes sintéticas, fonte de regeneração de sistema de protoplastos, transformação genética, síntese de metabólitos e conservação de recursos genéticos (Guerra et al., 1999). Apesar das vantagens deste tipo de cultivo, o processo de desenvolvimento e a conversão de embriões somáticos em plantas podem apresentar dificuldades, portanto, estudos complementares, como análises morfológicas, bioquímicas e histológicas, poderão elucidar as possíveis causas destes processos.

O presente estudo teve como objetivo investigar o processo de indução e iniciação da embriogênese somática, bem como analisar bioquimicamente e anatomicamente os calos embriogênicos da espécie *Martianthus leucocephalus*.

2.0 Material e Métodos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCTV), pertencente à Unidade Experimental Horto Florestal/UEFS. As análises bioquímicas foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia e as análises histológicas no Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, ambos da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF).

2.1 Material vegetal

As sementes de *M. leucocephalus* foram coletadas na coleção de plantas aromáticas da Unidade Experimental Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana (UNEHF/UEFS). Tais sementes foram desinfestadas em álcool 70% por 1 minuto, seguido de solução de hipoclorito de sódio (Qboa®) a 2,5% de cloro ativo, acrescida de uma gota de detergente neutro por 15 minutos. Posteriormente foram lavadas por quatro vezes em água destilada autoclavada. As mesmas foram inoculadas em meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962) com a metade da concentração dos sais ($MS\frac{1}{2}$), solidificado com 0,7% de ágar e suplementado com 87,64mM de sacarose. O pH do meio de cultura foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$ (utilizando-se NaOH ou HCl 0,1N),

antes da autoclavagem à temperatura de 121°C por 15 minutos. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 3^\circ\text{C}$, sob fotoperíodo de 16 horas, com umidade relativa de 60% e radiação fotossintética ativa de $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

2.2 Efeito do ácido 2,4-diclorofenoxiacético e da cinetina na calogênese

Após noventa dias da semeadura, as plantas serviram como fonte de explante, sendo utilizados segmentos de folhas, com aproximadamente $0,5 \text{ cm}^2$. Os explantes foram obtidos entre o primeiro e o terceiro par de folhas expandidas, contados a partir do ápice da planta. Esses explantes foram inoculados em meio de cultura MS suplementado com 3% de sacarose, com diferentes concentrações (1; 2,5; 5; 10 e 20 μM) de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) e de KIN (cinetina) (0; 0,5; 10; 2,5 e 5 μM), e solidificado com 0,7% de ágar. O pH do meio de cultura foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$ (utilizando-se NaOH ou HCl 0,1N), antes da autoclavagem à temperatura de 121°C por 15 minutos.

A inoculação dos explantes foi realizada em placa de Petri (90 mm x 15 mm) contendo 30 mL de meio de cultura. Em seguida, as culturas foram mantidas em câmara de incubação, tipo B.O.D, com temperatura de $25 \pm 3^\circ \text{C}$, na ausência de luz.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 5 x 5 (concentrações de 2,4-D e concentrações de cinetina) + controle (sem regulador vegetal), totalizando 26 tratamentos. Cada tratamento foi constituído de cinco repetições, sendo cada repetição composta por dez unidades experimentais (dez explantes por placa de Petri).

Após trinta dias de cultivo *in vitro* avaliou-se a porcentagem da área do explante recoberta por calos (de acordo com a seguinte escala: 0 – ausência de calos; 1 – 50%; 2 – 75% e 3 – 100% da área do explante recoberta por calos), coloração e textura (friável ou compacto).

Foi utilizado o melhor tratamento para a indução de calogênese dentre os citados acima, para realizar as análises da curva de crescimento, conteúdo de carboidrato e morfologia.

2.3 Curva de crescimento de calos embriogênicos

De acordo com os resultados obtidos no experimento anterior (item 2.2), a curva de crescimento foi realizada com o melhor tratamento observado, sendo aquele que resultou em calos embriogênicos. Os explantes foram inoculados em meio de cultura MS, suplementado com 1 μ M de 2,4-D + 0,5 μ M de KIN, 87,64mM de sacarose e 0,7% de agar, sob as mesmas condições experimentais do item (2.2).

A curva de crescimento dos calos embriogênicos foi determinada pela quantificação da matéria fresca (mg) dos calos formados, a partir do dia “zero” (explantes antes da inoculação) até 90 dias, em intervalos de 9 dias, totalizando 11 períodos. O percentual de crescimento dos calos foi determinado por meio da equação: $Pf - Pi / Pf \times 100$, onde Pi = Peso inicial e Pf = Peso final de calos (Lameira, 1997).

Foram utilizadas cinco repetições, sendo cada repetição constituída por três unidades experimentais (três calos).

2.4 Análises do conteúdo de carboidrato

As amostras para a determinação de carboidratos foram retiradas em cada período de incubação (em intervalos de 9 dias), contados a partir do dia “zero” (explantes antes da inoculação). Para a análise de carboidratos utilizou-se a metodologia proposta por Filson et al. (2009) com modificações. As amostras (300 mg de matéria fresca) foram maceradas em 1 mL de solução etanólica 80% contendo polivinilpirrolidona (PVPP) a 10% (p/v), ácido ascórbico 50 mM, em presença de nitrogênio líquido. Em seguida o macerado obtido foi colocado em microtubos. Estes foram vortexados e levados ao banho-maria a 70°C por 90 minutos. Após, foram centrifugados a 1300 rpm por 10 minutos e os sobrenadantes coletados e armazenados, e então, os pellets ressuspensos em 1 mL de etanol 80% e todo o procedimento repetido. Os sobrenadantes (1 e 2) foram homogeneizados, filtrados (0,2 μ m) e armazenados a -20°C para posterior análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

Os carboidratos foram identificados e quantificados em HPLC, usando um detector de espalhamento de luz (ELSD-LT II). A identificação dos carboidratos foi realizada em coluna Prevail Carbohydrate ES 5 μ m (250 x 4,6mm) e pré-coluna Prevail Carbohydrate ES 5 μ m (7,5 x 4,6mm), a temperatura de 25°C, com aplicação de 5 μ L da amostra. Os solventes utilizados foram água tipo milli'Q, como solvente A, e acetonitrila 100%, como solvente B. A corrida foi realizada em gradiente ajustado para

80% de solvente B durante 16 minutos, de 80 para 70% de solvente B entre 16 e 16:30 minutos e 70% de solvente B entre 16:30 e 23 minutos. O fluxo da corrida foi de $1\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

O detector ELSD foi ajustado para a temperatura de 40°C e pressão de 350 MPa, com ganho 9 e filtro 4S. As áreas e tempos de retenção dos carboidratos detectados foram avaliados por comparação com carboidratos padrão (Sigma-Aldrich®) em diferentes concentrações.

A quantificação dos carboidratos das amostras foi obtida através de regressão linear de \log_{10} área x \log_{10} concentração dos padrões. O ELSD não é linear para área x concentração. Para obtenção da concentração em mg g^{-1} de MF foi feito o antilog do resultado obtido na equação.

Foram identificados e quantificados os seguintes carboidratos: ribose, arabinose, xilose, frutose, manose, glicose, sacarose e maltose.

2.5 Análises histológicas

Para os estudos histológicos, foram obtidas amostras em cada período de incubação, a partir do 9º dia (em intervalos de 9 dias), totalizando 10 períodos, fixando-as em FAA 70%. Após a fixação, as amostras foram progressivamente desidratadas em série etanólica (70 – 100%), para cada série foram realizadas duas lavagens, por aproximadamente 1 hora em cada lavagem. Em seguida as amostras foram embebidas em historesina (Leica Microsystems®), de acordo com as instruções do fabricante. Secções longitudinais (com aproximadamente $5\mu\text{m}$) das amostras embebidas foram obtidas com micrótomo rotatório (Leica RM2235®), utilizando lâmina descartável (Leica 818®). As secções histológicas foram montadas em lâminas e coradas com azul de toluidina (1%) durante 1 minuto. As amostras foram observadas em microscópio óptico Axioplan (Zeiss), e as imagens foram obtidas com câmera Axioncam MRc5 (Zeiss) e processadas com auxílio de Software AxioVision LE Versão 4.8 (Zeiss).

2.6 Análises estatísticas

Alguns dados foram apresentados como média e desvio padrão, e outros foram avaliados estatisticamente, mediante a análise de variância, testando-se as médias pelo Teste de Tukey. Os dados foram analisados usando o programa Sisvar (Ferreira, 2011).

3.0 Resultados e Discussão

3.1 Efeito do ácido 2,4-diclorofenoxiacético e da cinetina na calogênese

Observou-se efeito altamente significativo ($p < 0,01$) da interação entre o 2,4-D e KIN para porcentagem de área do explante recoberta por calos. Após trinta dias da inoculação, a formação dos calos ocorreu sobre a superfície do explante em todos os tratamentos testados, exceto no meio de cultura isento de regulador vegetal que não foi observada a formação de calos, mostrando que esta espécie é dependente destas substâncias para a indução de calos (Tabela 1). Resultados semelhantes aos obtidos foram reportados para outras espécies, como *Rosa* sp. cultivar 'Livin' 'Easy' e *Chamelaucium repens*, em que foi também utilizado o 2,4-D (Estabrooks et al., 2007; Ratanasanobon e Seaton, 2010).

Para a porcentagem da área do explante recoberta por calos, os tratamentos que apresentaram explantes com 100% da área com formação de calos, foram: 20 μM de 2,4-D + 1 μM de KIN, em que 100% dos explantes atingiram o máximo de formação de calos, seguidos de 80% dos explantes com 2,5 μM de 2,4-D + 5 μM de KIN; 5 μM de 2,4-D + 5 μM de KIN e 77,50% dos explantes quando o meio de cultura foi suplementado com 1,0 μM de 2,4-D + 0,5 μM de KIN (Tabela 1). Resultados diferentes dos obtidos foram reportados por Rodrigues e Almeida (2010), ao verificar maior porcentagem de explantes com 100% da área com formação de calos para a espécie *Cissus sicyoides* na presença de 5,37 μM de ácido naftaleno acético (ANA) associado a 26,63 μM de 6-benzilaminopurina (BAP).

Quanto à coloração, os calos apresentaram-se marrom na maioria dos tratamentos, havendo uma clara relação entre a coloração e a textura dos calos, sendo que os calos brancos apresentavam-se mais compactos, exceto para o tratamento com 1 μM de 2,4-D associado a 5 μM de KIN (Tabela 1). Resultados semelhantes foram encontrados por Ratanasanobon e Seaton (2010) e Estabrooks et al. (2007) para as espécies *Chamelaucium uncinatum* e *Rosa* sp. cultivar 'Livin' 'Easy' que apresentaram calos com coloração marrom, e isto foi associado a presença do 2,4-D. Segundo esses autores, esta condição pode ser decorrente de um mecanismo de sobrevivência das células em resposta a uma condição de estresse, que pode resultar na produção de células capazes de desenvolver embriões somáticos. De acordo com Fehér et al. (2001;

Tabela 1: Porcentagem da área do explante recoberta por calos, coloração e porcentagem de calos friáveis obtidos a partir de segmentos de folhas *M. leucocephalus* em diferentes concentrações de 2,4-D e KIN, após 30 dias de incubação. Feira de Santana, 2012.

| Reguladores vegetais (μM) | | Porcentagem da área do explante recoberta por calos | | | | Coloração | Porcentagem de calos friáveis |
|--|------------|---|--------|-------|--------|---------------|-------------------------------|
| 2,4-D | KIN | 0 | 1 | 2 | 3 | | |
| 0,0 | 0,0 | - | - | - | - | - | - |
| | 0,0 | 12,50 | 10,00 | 32,50 | 45,00 | Marrom | 100,00 |
| | 0,5 | - | 7,50 | 15,00 | 77,50 | Marrom | 100,00 |
| 1,0 | 1,0 | - | 4,00 | 30,00 | 65,90 | Marrom | 90,00 |
| | 2,5 | - | 12,50 | 22,50 | 67,50 | Marrom | 87,50 |
| | 5,0 | - | 100,00 | - | - | Branco | 93,33 |
| | 0,0 | - | 57,50 | 37,50 | 5,00 | Marrom | 22,50 |
| | 0,5 | - | 36,67 | 36,67 | 26,66 | Marrom/Branco | 10,00 |
| 2,5 | 1,0 | - | 66,67 | 13,33 | 20,00 | Marrom/Branco | - |
| | 2,5 | - | 17,50 | 30,00 | 52,50 | Marrom/Branco | 20,00 |
| | 5,0 | - | - | 16,67 | 83,33 | Branco | 36,67 |
| | 0,0 | 30,00 | 40,00 | 17,50 | 12,50 | Marrom/Branco | - |
| | 0,5 | - | 26,67 | 30,00 | 53,33 | Branco | 33,33 |
| 5,0 | 1,0 | - | 22,50 | 34,00 | 44,00 | Marrom/Branco | - |
| | 2,5 | 27,50 | 22,50 | 37,50 | 12,50 | Marrom | - |
| | 5,0 | - | 10,00 | 10,00 | 80,00 | Marrom | - |
| | 0,0 | 60,00 | 33,33 | 16,67 | - | Marrom | - |
| | 0,5 | - | 57,50 | 22,50 | 20,00 | Marrom | - |
| 10,0 | 1,0 | - | 40,00 | 45,00 | 15,00 | Branco | - |
| | 2,5 | - | 72,50 | 5,00 | 22,50 | Branco | - |
| | 5,0 | - | 88,00 | 4,00 | 8,00 | Branco | - |
| | 0,0 | - | 90,00 | 10,00 | - | Branco | - |
| | 0,5 | 7,50 | 45,00 | - | 47,50 | Branco | - |
| 20,0 | 1,0 | - | - | - | 100,00 | Marrom | - |
| | 2,5 | 2,00 | 54,00 | 16,00 | 30,00 | Marrom/Branco | - |
| | 5,0 | 24,00 | 50,00 | 14,00 | 12,00 | Marrom/Branco | - |

Legenda para análise de porcentagem de explantes recobertos com calos: 0 – ausência de calos; 1 – 50%; 2 – 75% e 3 – 100% da área do explante recoberta por calos.

2003) alguns estudos tem revelado que o 2,4-D, além de atuar como auxina, possui também função como agente estressor.

Segundo Pasternak et al. (2002), as respostas relacionadas ao estresse dependem de vários fatores, dentre eles o nível de estresse em que as células foram expostas e o estado fisiológico destas células. Geralmente, níveis elevados de estresse podem causar a morte celular, por estas não serem capazes de tolerar esta condição. Para tolerar a condição de estresse em que as células foram expostas, as mesmas necessitam desencadear o mecanismo de adaptação, em que as células se reprogramam e modificam tanto fisiologicamente quanto metabolicamente, para se adaptar a nova condição. Zavattieri et al. (2010), relataram que o estresse não apenas promove a desdiferenciação das células do explante em cultura, mas pode também induzir a formação de embriões somáticos.

Em relação à friabilidade, verificou-se que a maior porcentagem de calos friáveis após 30 dias de incubação foi obtida quando o meio de cultura foi suplementado com 1 μM de 2,4-D sem KIN ou associado à 0,5 μM de KIN, com 100% de calos friáveis (Tabela 1). De forma diferente, *Chamelaucium repens*, verificou-se que em tratamento com as mesmas concentrações dos reguladores vegetais utilizados no presente trabalho, apresentou calos compactos e em concentrações mais elevadas tornaram-se com aspecto friável (Ratanasanobon e Seaton, 2010). Por outro lado, em *C. sicyoides*, os calos apresentaram-se com aspecto compacto quando utilizado o meio de cultura suplementado somente com 53,26 μM de BAP (Rodrigues e Almeida, 2010). Esses resultados sugerem que o tipo de regulador vegetal e a combinação entre eles afetam a resposta morfogênica *in vitro* nestas espécies.

Detectou-se através de análises morfológicas dos calos que o meio de cultura isento de regulador vegetal induziu a formação de raízes (Figura 1A). No meio de cultura suplementado com 1 μM de 2,4-D + 0,5 μM de KIN, observou-se a presença de estruturas globulares. Estas estruturas estavam localizadas abaixo de uma camada de células da superfície do calo (Figuras 1B, C), que dificultava a sua visualização, sendo visualizadas tais estruturas mais internamente aos 30 dias de incubação (Figura 1D). Após 72 dias, nesse mesmo meio de cultura visualizou-se estruturas que se assemelhavam a embriões somáticos nos estádio globular (EG) e cordiforme (EC), com origem na região interna dos calos (Figura 1E). Resultados semelhantes foram reportados por Raharjo e Litz (2007) em cultura de *Litchi chinensis*, ao produzir calos embriogênicos com a utilização de 2,4-D (4,52 μM) e KIN (9,30 μM). Contudo, a rota

embriogênica em explantes foliares de *Pfaffia tuberosa* foi induzida apenas em meio suplementado com 1 μM de 2,4-D (Flores et al., 2006).

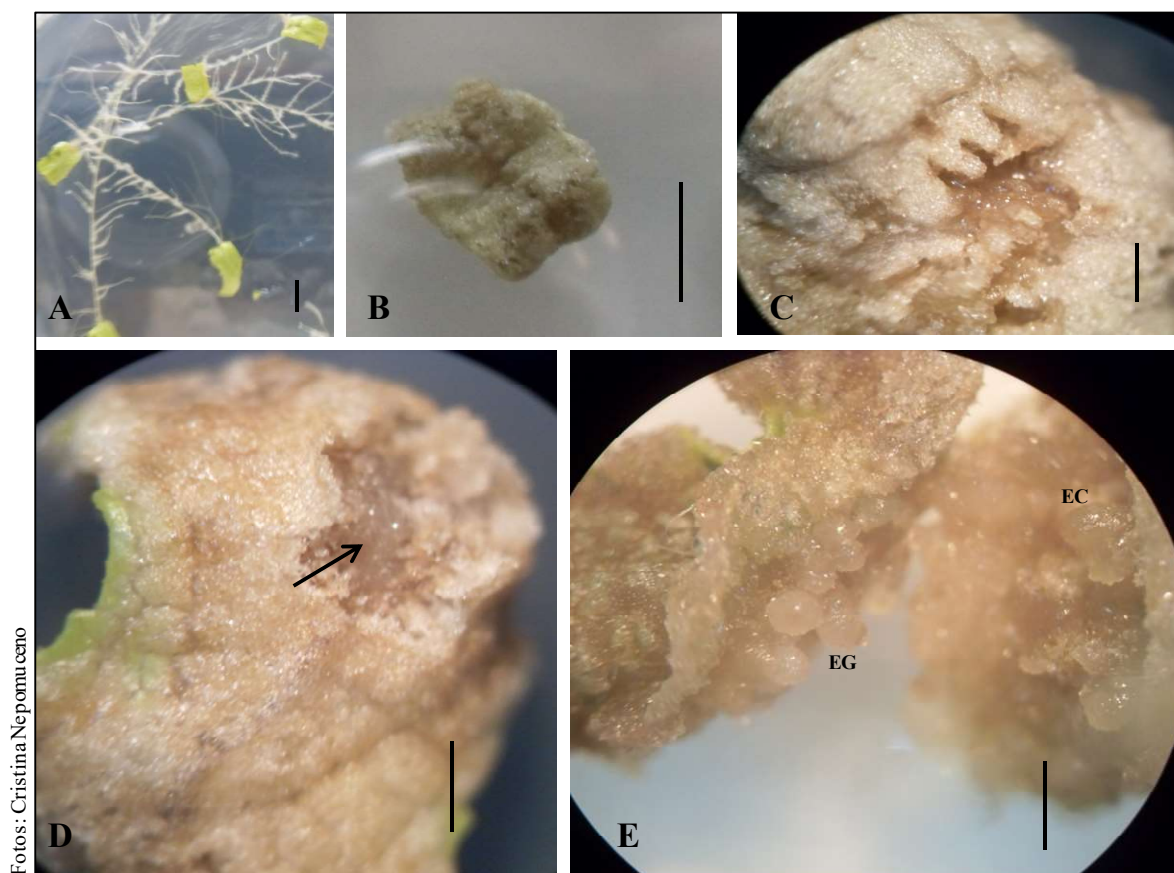


Figura 1: Aspectos morfológicos durante a obtenção de calos em *M. leucocephalus* na ausência (A) e em meio de cultura contendo 1 μM de 2,4-D + 0,5 μM de KIN (B-E) após 30 (A-D) e 72 (E) dias de incubação. A – Resposta em explante mantido no tratamento controle; B – Aspecto geral de calos obtidos a partir de segmento de folha; C – Aspectos morfológicos de calos evidenciando a friabilidade; D – Visualização de calos embriogênicos localizados abaixo da camada superior de células (seta); E – Visualização de embriões somáticos globulares (EG) e cordiforme (EC) em calos. Barras: 1cm (A, B); 1 mm (C – E) Feira de Santana, 2012.

De acordo com George et al. (2008), os processos que envolvem a formação de embriões somáticos são iniciados por um sistema de indução que pode ser mediado por reguladores vegetais. No presente estudo foi utilizada a associação de 2,4-D (1,0 μM) + KIN (0,5 μM). As auxinas são responsáveis pelo processo de desdiferenciação e

rediferenciação celular, alterando a determinação e conferindo novas competências a célula somática. Tem sido relatado que o 2,4-D, aumenta os níveis de auxina endógena nas células responsivas, estabelecendo um gradiente de auxina durante a fase de indução, sendo um dos sinais cruciais para determinar o destino das células embriogênicas. O estabelecimento de um gradiente de auxina durante essa fase é essencial para a iniciação da simetria bilateral durante a embriogênese (Jiménez, 2005; Fehér, 2005). De acordo com van Staden et al. (2008) e Arnold (2008) baixas concentrações de citocininas tem sido requerida com frequência para a indução de calos embriogênicos, embora estas estejam mais relacionadas com o crescimento das culturas dos calos do que com a competência embriogênica. Para *M. leucocephalus* o balanço entre esses dois compostos foi necessário para o desencadeamento do processo de indução da embriogênese somática.

3.2 Análise da curva de crescimento de calos embriogênicos

Foi possível observar que o crescimento dos calos embriogênicos segue com padrão sigmoidal, evidenciando cinco fases distintas: lag, exponencial, linear, desaceleração e estacionária (Figura 2).

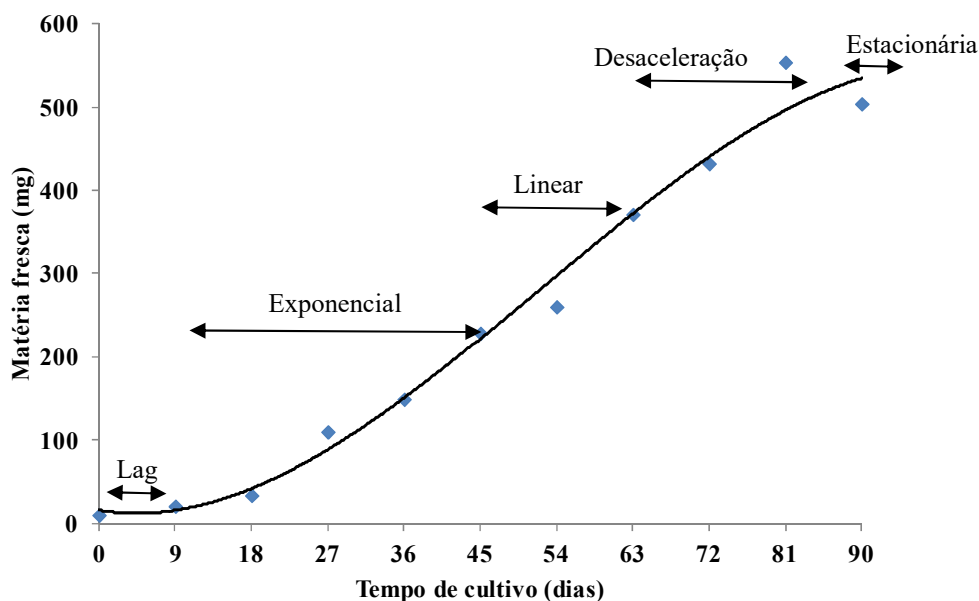


Figura 2: Curva de crescimento de calos formados a partir de explantes foliares de *M. leucocephalus* inoculados em meio de cultura MS suplementado com 1 μM de 2,4-D + 0,5 μM de KIN, aos 90 dias de incubação. Feira de Santana, 2012.

A fase lag, caracterizada pelo período no qual não tem ganho no número de células, ocorre o início da mobilização de metabólitos e a síntese de proteínas sem qualquer divisão celular (Guerra e Nodari, 2006). Para *M. leucocephalus* essa fase ocorreu antes do 9º dia de incubação.

O período de crescimento exponencial iniciou-se antes do 9º dia, se estendendo até o 45º dia após a inoculação, fase em que ocorreu intensa divisão celular, atingindo o máximo percentual de crescimento, cerca de 90,95%. Esse resultado permite inferir que o tecido apresentou intensa divisão mitótica promovendo rápido aumento no número de células. Resultado semelhante para o percentual de crescimento de calos foi reportado para *Coffea canephora*, contudo a fase exponencial só foi iniciada aos 28 dias e estendida até o 63º dia da inoculação do segmento foliar (Santos et al., 2008).

A fase de crescimento linear foi observada entre o 45º e 63º dia da inoculação, nesta fase o ciclo celular é ativo, porém ocorreu redução na divisão celular, como pôde ser verificado através da redução da porcentagem de crescimento dos calos para *M. leucocephalus* que apresentou 38,46%. Esse comportamento diferiu daquele verificado para a cultura de calos de *C. canephora*, que apresentou a fase linear entre 63º e 70º dia da inoculação, e baixo percentual de crescimento de calos (9 e 5%, para o segmento foliar e nodal, respectivamente) (Santos et al., 2008).

A repicagem dos calos para novo meio de cultura é realizada antes do final da fase linear de crescimento quando as células ainda estão em divisão. A repicagem tem por finalidade manter as culturas, podendo ser realizados sucessivos subcultivos, porém podem ocorrer mudanças genéticas ocasionando a variação somaclonal (George, 1993).

O intervalo de desaceleração do crescimento ocorreu entre 63º e 90º dia da inoculação, com 30,89% de crescimento dos calos. Nogueira et al. (2008), analisando a curva de crescimento de calos da espécie *Byrsonima intermedia*, verificaram período semelhante para a fase de desaceleração (60º até 80º dia), com taxa de crescimento de 22%. Contrariamente ao relatado, as espécies *Bertholletia excelsa* (Serra et al., 2000); *C. canephora* (Santos et al., 2008) e *Tabebuia roseo alba* (Abbade et al., 2010) apresentaram baixa taxa de crescimento dos calos variando entre 8 e 4%, nesta fase.

A fase estacionária foi iniciada aos 90 dias de incubação. Período semelhante foi verificado para a fase estacionária de *Byrsonima intermedia* (80 até 100 dias) (Nogueira et al., 2008). As culturas não devem ser mantidas nessa fase por um período longo, pois as células começaram a morrer, devido à exaustão do meio de cultura ou mesmo por ressecamento do meio, além do acúmulo de substâncias tóxicas (George, 1993).

O comportamento para o crescimento dos calos é específico às espécies, assim como as diferentes exigências no cultivo *in vitro*, que é atribuída ao balanço hormonal endógeno dos tecidos de cada explante, em contraste com o meio artificial (Lima et al., 2007).

3.3 Análises do conteúdo de carboidrato

Durante o tempo de cultivo *in vitro* dos calos a partir de segmentos de folhas de *M. leucocephalus*, detectou-se a presença de três carboidratos: frutose, glicose e sacarose (Figura 3).

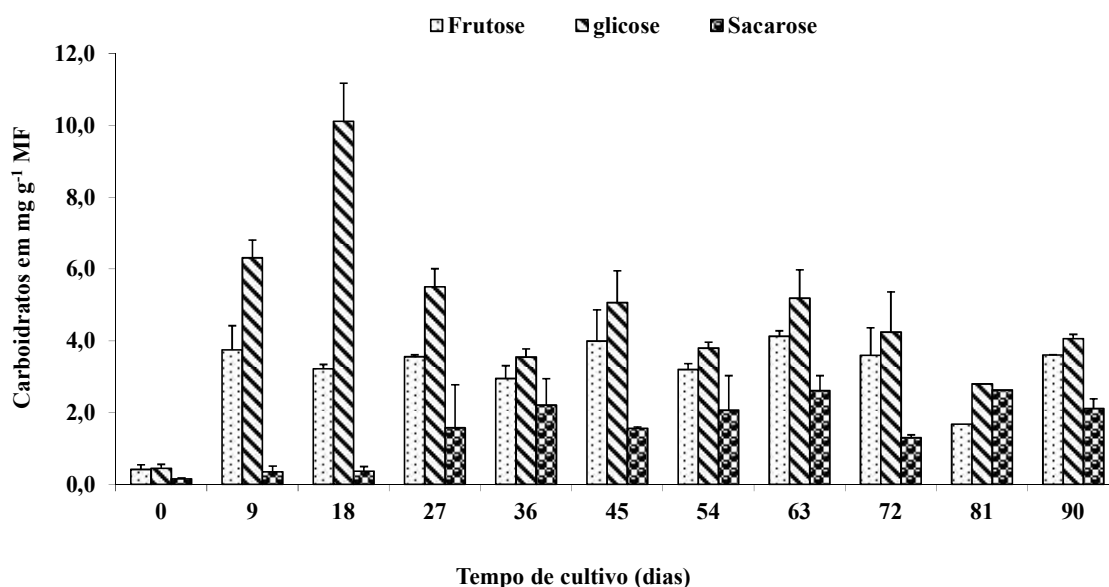


Figura 3: Conteúdo de carboidratos em calos de *M. leucocephalus* formados a partir de explantes foliares inoculados em meio de cultura MS, suplementado com 1 μ M de 2,4-D + 0,5 μ M de KIN, durante 90 dias de incubação. (média \pm desvio padrão, n= 3). MF = matéria fresca. Feira de Santana, 2012.

O menor conteúdo de carboidratos foi observado nos explantes no dia da inoculação (considerado dia zero) com acréscimo até o 18^o dia de incubação, que coincidiu com o início da fase exponencial. Nesse período, observou-se um aumento considerável para os carboidratos frutose e glicose, indicando que a sacarose absorvida

pelos explantes a partir do meio de cultura pode ter sido metabolizada e hidrolisada nesses carboidratos. Além disso, o incremento de frutose e glicose pode também ter sido proporcionado pela hidrólise da sacarose no meio de cultura durante o processo de autoclavagem, conforme sugerido previamente por Paiva Neto e Otoni (2003), sugerindo uma fase preparatória em que ocorre acúmulo de biomassa, através da incorporação de esqueletos de carbono, servindo também como fonte de energia para o desenvolvimento posterior. Resultados diferentes foram reportados para *Croton urucurana* (Lima et al., 2007) e *T. roseo alba* (Abbade et al., 2010), os quais verificaram maiores teores de carboidratos no dia "zero"

No 9º dia de incubação, que culminou com o início do período de crescimento exponencial e no 18º dia da inoculação, a taxa de glicose atingiu seu pico máximo, sendo verificada redução desse carboidrato até, o final deste período de crescimento exponencial (45º dia), com aumento da sacarose, enquanto que o teor de frutose se manteve constante. Sasaki et al. (2008), observaram em suspensões celulares de *Arabidopsis thaliana*, aumentos de sacarose e glicose na fase inicial da multiplicação celular, evidenciando a importância desses carboidratos para a diferenciação e o posterior desenvolvimento.

Tendo em vista a redução no teor de glicose (em torno de 40 – 60%), durante o intervalo do 18º ao 36º dia da inoculação, sugere-se que a ocorrência de degradação deste açúcar, possivelmente, está relacionada à utilização pelo explante (calo) como fonte de energia, pois de acordo com Santos et al. (2008), nessa fase de crescimento exponencial, ocorre aumento na divisão celular, resultando no maior percentual de crescimento. Resultados diferentes foram relatados para *Croton urucurana*, que apresentou teores crescentes de açúcares redutores durante a fase exponencial (Lima et al., 2007).

Após esse período (crescimento exponencial), verificou-se que os teores de frutose e glicose se mantiveram praticamente constantes, enquanto que o de sacarose continuou com aumento crescente, provavelmente devido ao efeito da sua incorporação a partir do meio de cultura. Ao contrário dos resultados aqui observados, em *Bertholletia excelsa* (Serra et al., 2000), *Byrsonima intermedia* (Nogueira et al., 2008) e *C. canephora* (Santos et al., 2008), os teores dos carboidratos apresentaram total declínio durante as fases de crescimento.

3.4 Análises histológicas

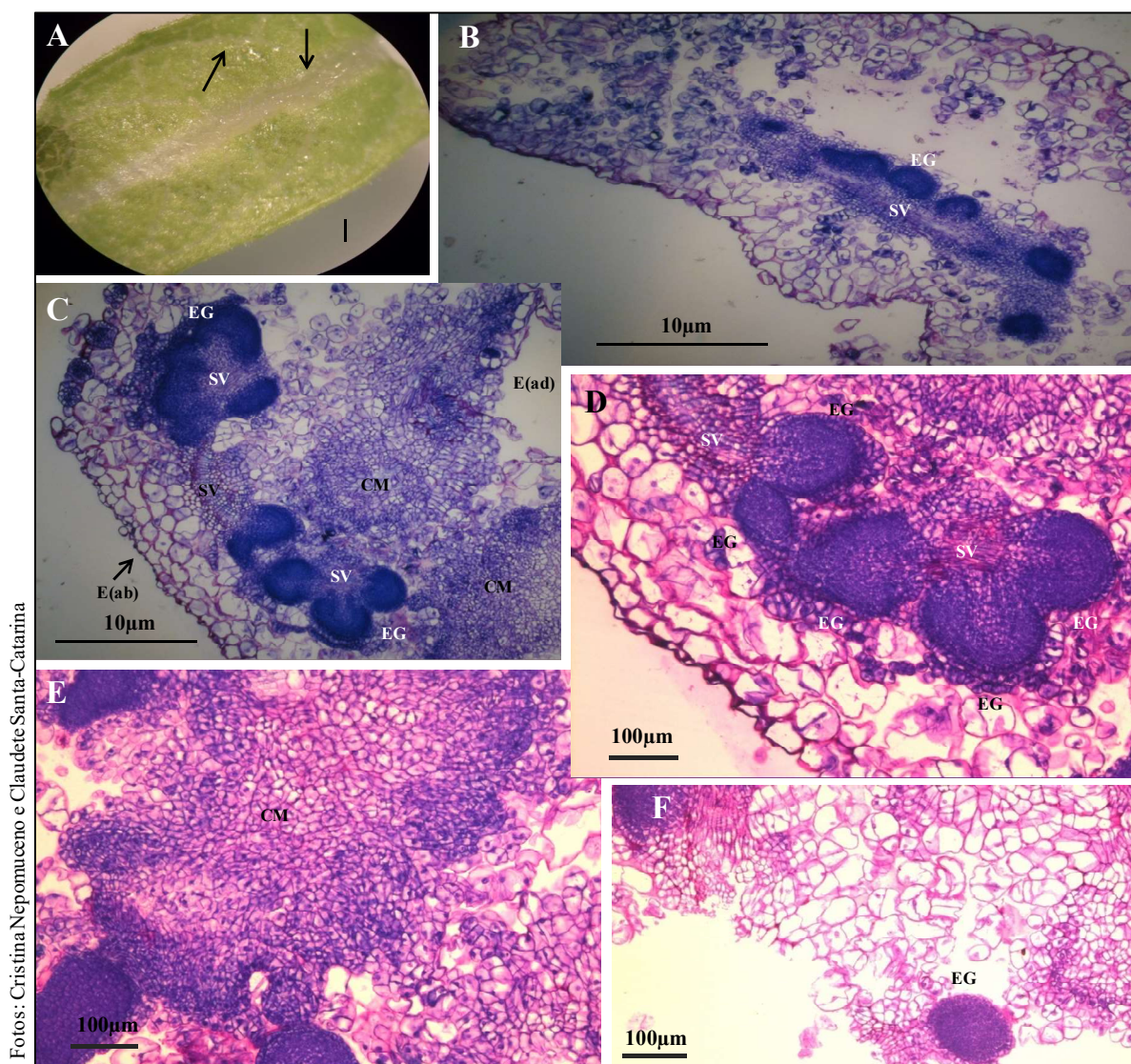
Aos nove dias da inoculação dos segmentos foliares, foi possível observar o início de formação de calos, principalmente a partir da nervura central (Figura 4A). Através de secções histológicas, verificou-se que na região do limbo foliar (mesofilo) iniciou a formação de embriões somáticos globulares, ao longo das nervuras secundárias (Figura 4B), sendo também visualizada a formação destes embriões na nervura central (Figuras 4C-D). Em ambos, os embriões somáticos foram originados internamente a partir do explante e não na superfície dos calos induzidos. Resultados diferentes foram abordados para *Colocasia esculenta* var. *esculenta* (Deo et al., 2010) e para *E. ofiuroides* (Liu et al., 2008), em que os embriões somáticos globulares foram formados a partir da terceira semana de cultivo até os dois meses da inoculação e a formação ocorreu na superfície dos calos induzidos.

A formação de embriões somáticos globulares aos 9 dias de inoculação para *M. leucocephalus* pode estar associada com a utilização de explantes foliares jovens, sendo utilizado até o terceiro par de folhas a partir do ápice. Resultados semelhantes foram reportados por Ratanasanobon e Seaton (2010), que obtiveram os embriões somáticos com apenas duas semanas de incubação para a espécie *Chamelaucium uncinatum*, com o mesmo tipo de explante utilizado no presente estudo. De forma contrária, foi verificado para *Acrocomia aculeata*, a produção de células embriogênicas apenas aos 60 dias de cultivo *in vitro* e embriões somáticos globulares após 120 dias da incubação, embora tenham sido utilizados embriões zigóticos como fonte de explante (Moura et al., 2009).

De acordo com Fehér et al. (2003), a indução da embriogênese somática depende do tipo e idade do explante e das condições as quais foram submetidos. Mudanças drásticas ocorrem a nível celular a partir dos explantes responsivos, pois estes são expostos a níveis elevados de nutrientes, bem como de reguladores vegetais, gerando um estresse significativo. Quando o nível de estresse é tolerável às células, estas aumentam o seu metabolismo e induzem um mecanismo de adaptação, que inclui a reprogramação gênica, assim como mudanças fisiológicas e no metabolismo celular. Portanto, essa condição de estresse em algumas espécies pode proporcionar a desdiferenciação celular, gerando células competentes, que seguirão para uma nova rota morfogênica e conseqüente diferenciação celular.

Desse modo, as células na região das nervuras do segmento de folha de *M. leucocephalus*, mostraram-se competentes ao responder o estímulo ao qual foram

submetidas, seguindo uma rota específica e diferenciando-se em embriões somáticos globulares.



Fotos: Cristina Nepomuceno e Claudete Santa-Catarina

Figura 4: Aspectos morfológicos da indução de embriões somáticos em segmentos foliares de *M. leucocephalus* após 9 dias da inoculação em meio de cultura MS, suplementado com $1\mu\text{M}$ de 2,4-D + $0,5\mu\text{M}$ de KIN. A – Morfologia do explante; B–D - Início da formação de embriões somáticos globulares, E – Conjunto de células com características meristemáticas localizadas na região central do calo induzido, F – Embrião somático globular. SV – Sistema vascular; EG – Embriões somáticos globulares; CM – Células meristemáticas; E(ad) – Epiderme adaxial; E(ab) – Epiderme abaxial. Feira de Santana, 2012.

Na região da nervura central do explante, observou-se a primeira evidência de formação de calos friáveis, verificando-se a epiderme rompida e a ocorrência de células

desprendidas nesta região (Figura 4C). Esse período de incubação que coincide com o início do crescimento exponencial é marcado para *M. leucocephalus*, também por promover intensa divisão celular de forma organizada, resultando em inúmeras células meristemáticas, caracterizadas pelo tamanho menor, de forma isodiamétrica e citoplasma denso (Figura 4E). Ainda nesse período foi identificada a presença de embrião somático globular isolado da região que compõem o sistema vascular (Figura 4F).

O período de 9 a 18 dias de incubação (primeiros dias da fase exponencial) em que se tem formação de embriões somáticos globulares e células meristemáticas, coincidiu com os teores mais elevados de glicose, evidenciando que este açúcar pode influenciar a morfogênese. Esses resultados corroboram Mengarda et al. (2009) e Pescador et al. (2008a) que, ao analisarem as culturas de *Acca sellowiana*, observaram maior teor de glicose nos primeiros dias da cultura (10-12 dias) em que os embriões se apresentavam na fase globular, diminuindo o conteúdo de glicose nas fases finais da embriogênese somática, mais especificamente na fase cotiledonar. Baud et al. (2002), também verificaram picos elevados de glicose e frutose nas fases iniciais da embriogênese zigótica de *Arabidopsis thaliana* com decréscimos na fase de maturação.

Em cultura de calos embriogênicos de *Saccharum* sp. cv. CP-5243 foi observado maior teor de frutose e glicose e menor de sacarose, de forma contrária ocorreu para os calos não embriogênicos dessa espécie (Nieves et al., 2003). Segundo Baud et al. (2002) e Gibson (2003), os carboidratos solúveis, como glicose e frutose, têm seus níveis mais elevados em células com divisão ativa, e decresce durante o desenvolvimento, sugerindo que esses açúcares juntamente com outras moléculas sinalizadoras (hormônios), atuam como mediadores dos processos de embriogênese.

Verificou-se a partir do 36º dia da incubação que os embriões somáticos globulares apresentaram na região interna de sua estrutura, células mais alongadas sem organização celular adequada (Figura 5), que podem indicar desorganização celular, levando a não evolução destes embriões para estádios mais avançados de desenvolvimento. Pescador et al. (2008b), detectaram vários embriões somáticos com anomalias a partir do 40º dia de cultivo *in vitro* em *Acca selowiana*. Esses autores associaram esta resposta ao efeito deletério do 2,4-D, o qual pode resultar em distúrbios nos processos genéticos e fisiológicos, levando a formação anômala do embrião.

Resultados semelhantes foram observados no desenvolvimento de embriões somáticos das espécies *Diospyros kaki* (Carvalho et al., 2004) e *Litchi chinesis* (Raharjo

e Litz, 2007), em que os embriões somáticos globulares não evoluíram para os estádios posteriores na presença do 2,4-D. Rai et al. (2007), observaram que o tempo de exposição ao 2,4-D reduzido (9 dias) influenciou positivamente nos estádios da embriogênese somática de *Psidium guajava*. Segundo Guerra et al. (1999), as auxinas, em particular o 2,4-D, após a iniciação da formação dos embriões somáticos tendem a inibir o desenvolvimento dos embriões para os estádios subsequentes, além do que períodos de exposição prolongada ao 2,4-D, podem ocasionar variações genéticas e epigenéticas que afetam o potencial embriogênico.

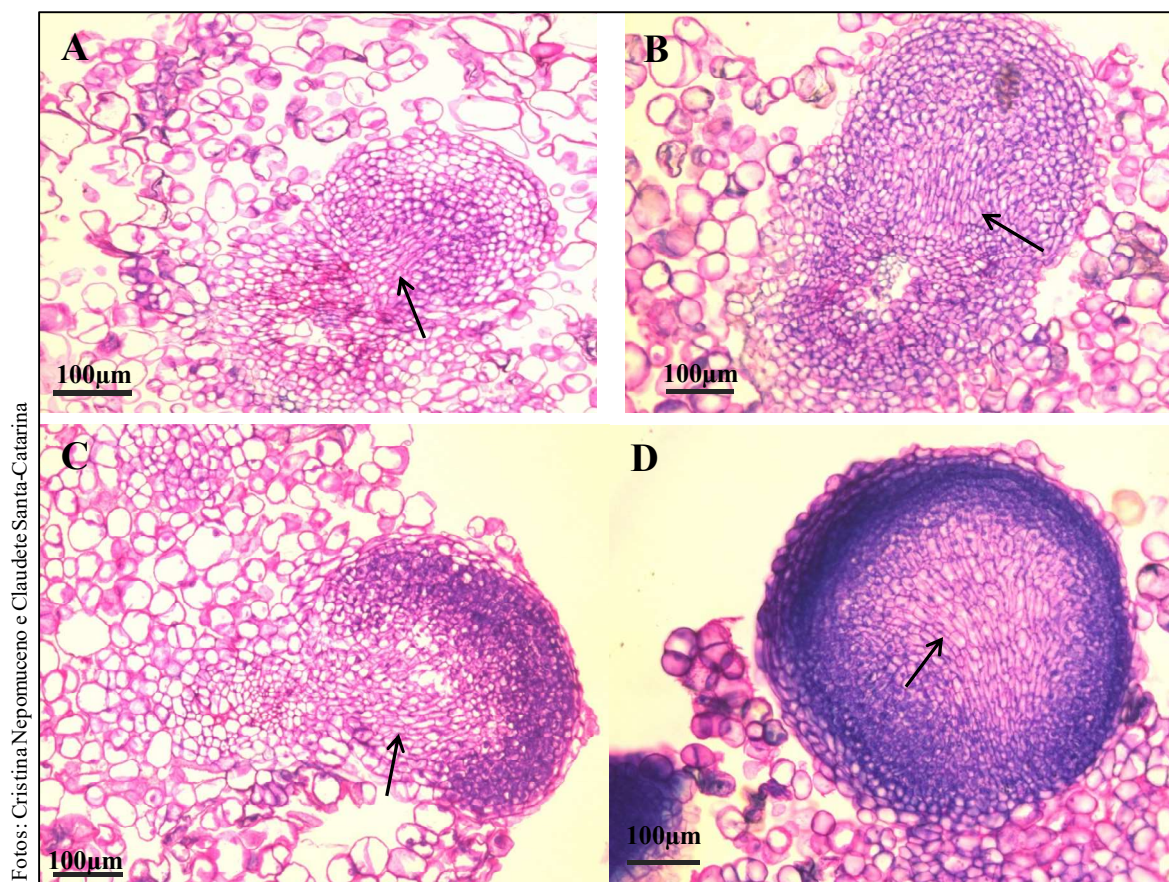


Figura 5: Aspectos morfológicos de embriões somáticos globulares obtidos a partir de segmentos foliares de *M. leucocephalus* incubados em meio de cultura MS suplementado com 1 μM de 2,4-D + 0,5 μM de KIN. Setas indicam a presença de células alongadas. Feira de Santana, 2012.

Aos 81 e 90 dias da inoculação observou-se a presença de embriões somáticos em *M. leucocephalus* em desorganização, onde suas células começam a se desprender da região basal do embrião (setas) e diversas células alongadas na região central,

descaracterizando o desenvolvimento normal (Figura 6). Esse resultado, conforme sugerido por outros autores, pode estar associado com a permanência do material em 2,4-D, levando a um efeito inibitório na evolução morfofogenética.

Nesse sentido, mostra-se necessário a transferência dos calos de *M. leucocephalus* para outro meio de cultura com ausência de auxina para que seja possível a evolução destes embriões no estágio globular para estádios mais avançados. Adicionalmente, pode ser necessária à adição de agentes promotores de maturação, como ácido abscísico, polietilenoglicol e maltose, ao meio de cultura para que possam estimular o desenvolvimento e evolução destes embriões somáticos para esta espécie.

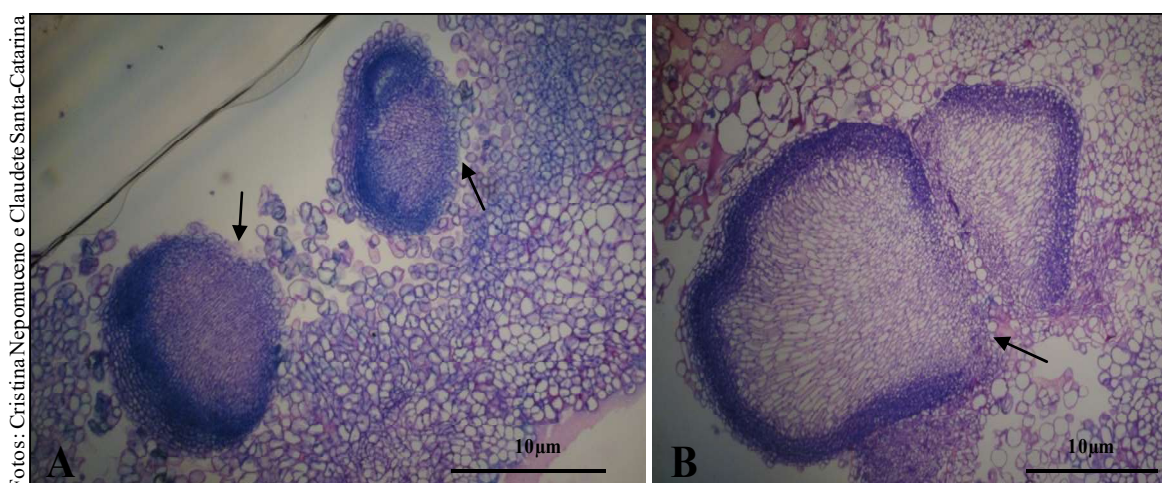


Figura 6: Aspectos morfológicos de embriões somáticos anormais obtidos em segmentos foliares de *M. leucocephalus* aos 81 (A) e 90 dias (B) de incubação em meio de cultura MS, suplementado com $1\mu\text{M}$ de 2,4-D + $0,5\mu\text{M}$ de KIN. Setas indicam células se desprendendo na região basal do embrião. Feira de Santana, 2012.

Pelas análises morfológicas, pode-se sugerir que a ontogenia dos embriões somáticos globulares teve sua principal ocorrência a partir de células do sistema vascular, que puderam ser observados aos 9, 18 e 27 dias de incubação (Figuras 7A – D). Isto pode estar relacionado ao fato de que essas células que compõem o sistema vascular estão comprometidas com o transporte de nutrientes, bem como de hormônios endógenos, e isto tenha favorecido um balanço hormonal com os reguladores vegetais, levando então a indução de células embriogênicas, com conseqüente formação de embriões somáticos globulares. Tal fato corrobora Kerbauy (1999), ao admitir que as

diferentes expressões morfológicas refletem-se na natureza e no grau de diferenciação dos tecidos.

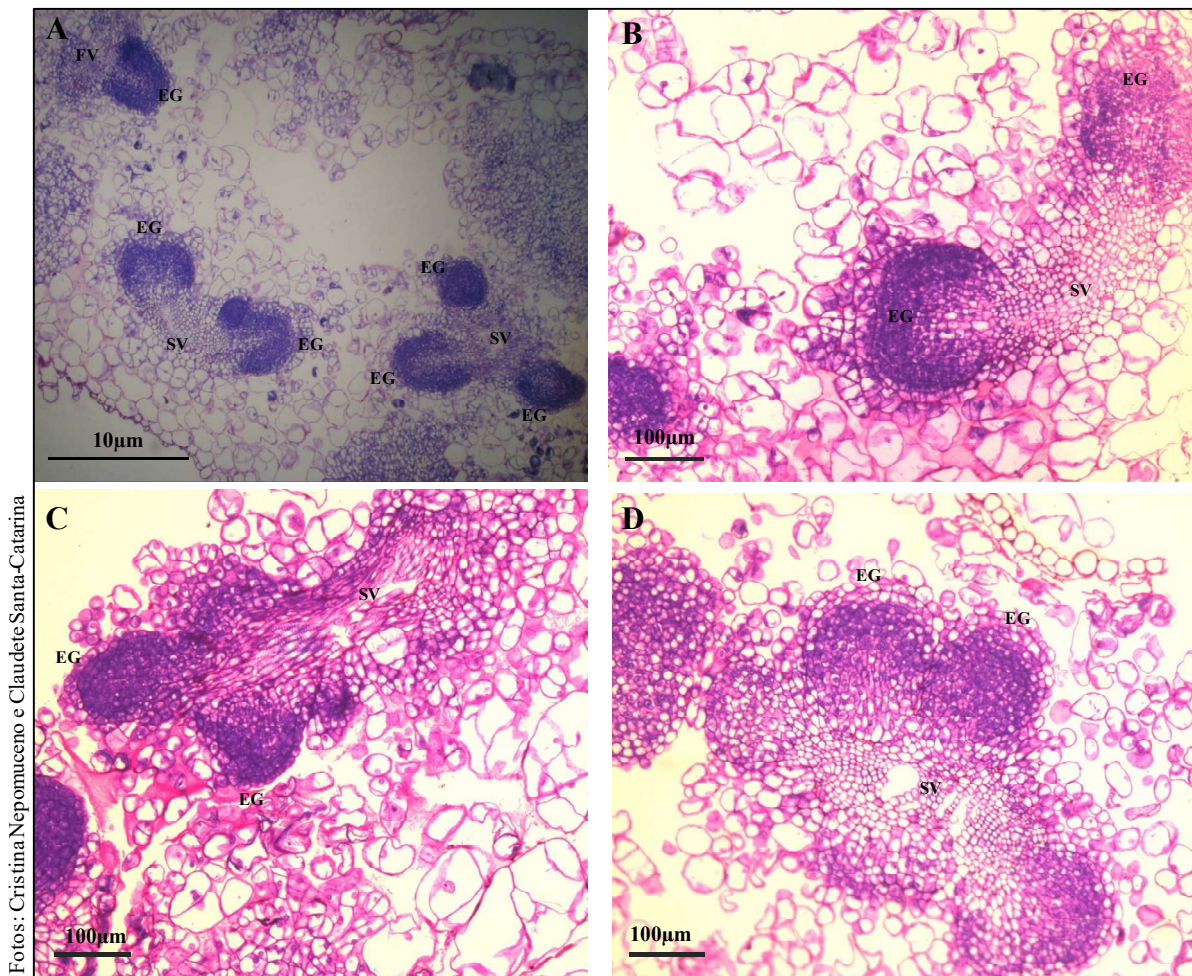


Figura 7: Aspectos morfológicos da ontogenia da embriogênese somática a partir da região do sistema vascular em segmentos foliares de *M. leucocephalus* incubados em meio de cultura MS, suplementado com 1 μM de 2,4-D + 0,5 μM de KIN, aos 9 dias (A e B); 18 dias (C) e 27 dias (D) de incubação. EG – Embriões somáticos globulares; SV – Sistema vascular. Feira de Santana, 2012.

A iniciação da formação dos embriões globulares coincidiu com o início até meados da fase exponencial, tendo-se como base a curva de crescimento realizada para o cultivo de calos a partir de segmentos foliares de *M. leucocephalus*. Portanto, o processo de indução de células embriogênicas ocorre nos primeiros dias de exposição aos reguladores vegetais 2,4-D e KIN. Comparativamente, nesse período, observou-se também conteúdos mais elevados de carboidratos, que provavelmente podem estar

associados com o processo de iniciação dos embriões somáticos globulares, bem como as intensas divisões celulares resultando na formação de células meristemáticas, que possivelmente adquirem potencial embriogênico para desenvolver os embriões somáticos em estágio globular.

De acordo com Smeekens (2000), Dennis e Blakeley (2000) e Rolland et al. (2006), os carboidratos possuem função sinalizadora, podendo provocar alteração na expressão gênica similar aos efeitos atribuídos aos hormônios. A percepção ocorre através de sensores protéicos que desencadeiam uma cascata de eventos em nível celular, alterando a expressão gênica e as atividades enzimáticas, influenciando no crescimento. Mengarda et al. (2009), tenham relatado que o papel preciso dos açúcares solúveis e sua contribuição para o desenvolvimento embrionário não são claramente conhecidos.

Diante dos resultados obtidos, sugere-se que as culturas embriogênicas sejam transferidas no intervalo entre o 9º e 27º dia de incubação para um novo meio sem a presença de 2,4-D, com o intuito de promover o desenvolvimento dos estádios subsequentes ao embrião somático globular e permitir o desenvolvimento de embriões somáticos normais e de forma otimizada. Segundo Guerra et al. (1999), deve-se fornecer estímulos fisiológicos, bioquímicos e ambientais para a diferenciação celular, para que os ciclos de desenvolvimento e de maturação originem um grande número de embriões maduros, de alta qualidade e aptos a converterem-se em plantas.

4.0 Conclusão

É possível a indução de calos embriogênicos a partir de segmentos foliares de *M. leucocephalus*, em meio de cultura MS suplementado com 1 μ M de 2,4-D associado a 0,5 μ M de KIN. Sugere-se que os calos embriogênicos sejam transferidos para novo meio de cultura desprovido de 2,4-D, entre o intervalo de 9 a 27 dias da inoculação.

5.0 Referências Bibliográficas

- ABBAS, M.S.; TAHA, H.S.; ALY, U.I.; HATTEM, M.E-S.; GABER, E-S.I. 2011. *In vitro* propagation of ginger (*Zinger officinale* Rosco). **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**. 9:165-172.
- ABBADE, L. C.; PAIVA, P.D.O.; PAIVA, R.; GRACIANO, M.H.P. 2010. Growth curve and biochemical analyses of callus of ipê-branco (*Tabebuia roseo alba* (Ridl.) Sand.). **Naturalia**. 33:45-56.
- ABRAHAM, J.; CHERUVATHUR, M.K.; MANI, B.; THOMAS, T.D. 2010. A rapid *in vitro* multiplication system for commercial propagation of pharmaceutically important *Cyclea peltata* (Lam) Hool & Thoms. Based enhanced axillary branching. **Industrial Crops and Products**. 31:92-98.
- ARNOLD, S. 2008. Somatic Embryogenesis. In: GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; KLERK, G-J. **Plant Propagation by Tissue Culture**. Dordrecht: Springer, 3rd Edition. p.:335-354.
- BAUD, S.; BOUTIN, J.P.; MIQUEL, M.; LEPINIEC, L.; ROCHAT, C. 2002. An integrated overview of seed development in *Arabidopsis thaliana* ecotype WS. **Plant and Biochemistry**. 40:151-160.
- CARVALHO, D.C.; BIASI, L.A.; RIBAS, L.L.F.; TELLES, C.A.; ZANETTE, F. 2004. Embriogênese somática do caquizeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**. 26(2):280-283.
- DENNIS, D.T.; BLAKELEY, S.D. 2000. Carbohydrate Metabolism. In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. [Eds.]. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. American Society of Plant Physiologists. p.:630-675.
- DEO, P.C.; TAYLOR, M.; HARDING, R.M.; TYAGI, A.P.; BECKER, D.K. 2010. Initiation of embryogenic cell suspensions of taro (*Colocasia esculenta* var. *esculenta*) and plant regeneration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 100:283-291.

ESTABROOKS, T.; BROWNE, R.; DONG, Z. 2007. 2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid promotes somatic embryogenesis in the rose cultivar 'Livin' 'Easy' (*Rosa* sp.). **Plant Cell Reports**. 26:153-160.

FEHÉR, A.; PASTERNAK, T.P.; MISKOLCZI, P.; AYAYDIN, F.; DUDITS, D. 2001. Induction of the embryogenic pathway in somatic plant cells. **Acta Horticulturae**. 560:293-298.

FEHÉR, A.; PASTERNAK, T.P.; DUDITS, D. 2003. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 74:201-228.

FEHÉR, A. 2005. Why somatic plant cells start to form embryos? In: MUJIB, A.; SAMAJ, J. [eds.]. **Somatic Embryogenesis: Plant Cell Monographs**. 2:85-101.

FERREIRA, D.F. 2011. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**. 35(6):1039-1042.

FLORES, R.; NICOLOSO, F.T.; VASCONCELLOS, N.J.S. 2006. Indução de calos e aspectos morfológicos de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. 8(3):89-95.

GEORGE, E.F. 1993. **Plant Propagation by Tissue Culture**. Edington: Exegetics. 574p.

GIBSON, S.I. 2003. Sugar and phytohormone response pathways: navigating a signaling network. **Journal of Experimental Botany**. 55:253-264.

GUERRA, M.P.; TORRES, A.C.; TEIXEIRA, J.B. 1999. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Orgs.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPQ. p.:533-568.

JIMÉNEZ, V.M. 2001. Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. 13(2):196-223.

JIMÉNEZ, V.M. 2005. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. **Plant Growth Regulation**. 47:91-100.

KERBAUY, G.B. 1999. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Orgs.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPQ. p.:519-532.

LAMEIRA, O.A. 1997. **Propagação *in vitro* e *in vivo*, dinâmica de crescimento de células, nutrição e identificação de flavonóides em erva baleeira (*Cordia verbenacea* L.)**. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras. 88p.

LIMA, E.C.; PAIVA, R.; SOARES, F.P. NOGUEIRA, R.C. EMRICH, E.B.; NICIOLI, P. M. 2007. Avaliação bioquímica do desenvolvimento de calos *in vitro* a partir de segmentos foliares de sangria d'água (*Croton urucurana* Baill.). **Magistra**. 19(3):184-190.

LIU, M.; YANG, J.; LU, S.; GUO, Z.; LIN, X.; WU, H. 2008. Somatic embryogenesis and plant regeneration in centipedegrass (*Eremochloa ophiuroides* [Munro] Hack.). **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**. 44:100-104.

LOU, H.; OBARAOKEYO, P.; TAMAKI, M.; KAKO, S. 1996. Influence of sucrose concentration on *in vitro* morphogenesis in cultured cucumber cotyledon explants. **Journal of Horticultural Science**. 71:497-502.

MAIA, S.S.S.; PINTO, J.E.B.P.; OLIVEIRA, J.A.; SILVA, F.N.; SANTOS, F.M. 2008. Germinação de sementes de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (Lamiaceae) em função da luz e temperatura. **Caatinga**. 21(4):212-218.

MENGARDA, L.H.; PESCADOR, R.; CHU, E.P.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. 2009. Efeito do frio sobre os carboidratos solúveis em culturas embriogênicas de *Acca sellowiana* O. Berg (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Botânica**. 32(2):307-317.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for a rapid growth and bioassays with tabacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**. 15:493-497.

MOURA, E.F.; MOTOIKE, S.Y.; VENTRELLA, M.C.; SÁ JÚNIOR, A.Q.; CARVALHO, M. 2009. Somatic embryogenesis in macaw palm (*Acrocomia aculeata*) from zygotic embryos. **Scientia Horticulturae**. 119:447-454.

NIEVES, N.; SEGURA-NETO, M.; BLANCO, M.A.; SÁNCHEZ, M.; GONZÁLEZ, A.; GONZÁLEZ, J.L.; CASTILLO, R. 2003. Biochemical characterization of embryogenic and non-embryogenic calluses of sugarcane. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**. 39:343-345.

NOGUEIRA, R.C.; PAIVA, R.; LIMA, E.C.; SOARES, G.A.; OLIVEIRA, L.M.; SANTOS, B.R. EMRICH, E.B.; CASTRO, A.H.F. 2008. Curva de crescimento e análises bioquímicas de calos de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. 10(1):44-48.

OLIVEIRA, L.M.; NEPOMUCENO, C.F.; FREITAS, N.P.; PEREIRA, D.M.S.; SILVA, G.C.; LUCCHESI, A.M. 2011. Propagação vegetativa de *Hyptis leucocephala* Mart. ex Benth. e *Hyptis platanifolia* Mart. ex Benth. (Lamiaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. 13(1):73-78.

PAIVA NETO, V.B.; OTONI, W.C. 2003. Carbon sources and their osmotic potential in plant tissue culture: does it matter? **Scientia Horticulturae**. 97:193-202.

PASTERNAK, T.P.; PRINSEN, E.; AYAYDIN, F.; MISKOLCZI, P.; POTTERS, G.; ASARD, H.; VANONCKELEN, H.A.; DUDITS, D.; FEHÉR, A. 2002. The role of auxin, pH, and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived cells of alfafa. **Plant Physiology**. 129(4):1807-1819.

PESCADOR, R.; KERBAUY, G.B.; KRAUS, J.E.; FERREIRA, W.M.; GUERRA, M.P.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. 2008a. Changes in soluble carbohydrates and starch amounts during somatic and zygotic embryogenesis of *Acca sellowiana* (Myrtaceae). **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**. 44:289-299.

PESCADOR, R.; KERBAUY, G.B.; VIVIANI, D.; KRAUS, J.E. 2008b. Anomalous somatic embryos in *Acca sellowiana* (O. Berg) Burret (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Botânica**. 31(1):155-164.

RAHARJO, S.H.T.; LITZ, R.E. 2007. Somatic embryogenesis and plant regeneration of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) from leaves of mature phase trees. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 89:113-119.

RAI, M.K.; AKHTAR, N.; JAISWAL, V.S. 2007. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Psidium guajava* L. cv. Banarase local. **Scientia Horticulturae**. 113:129-133.

RATANASANOBOON, K.; SEATON, K.A. 2010. Development of in vitro plant regeneration of Australian native waxflowers (*Chamelaucium* ssp.) via somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 100:59-64.

RODRIGUES, O.S. 2007. **Óleo essencial de *Hyptis leucocephala* Mart. ex Benth: composição química e atividade antimicrobiana**. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual de Feira de Santana.

RODRIGUES, F.R.; ALMEIDA, W.A.B. 2010. Calogênese em *Cissus sicyoides* L. a partir de segmentos foliares visando à produção de metabólitos *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. 12(3):333-340.

ROLLAND, F.; BAENA-GONZALEZ, E.; SHEEN, J. 2006. Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. **Annual Review Plant Biology**. 57:675-709.

SANTOS, C.G.; PAIVA, R.; PAIVA, P.D.O.; PAIVA, E. 2008. Indução e análise de calos em segmentos foliares e nodais de *Coffea canephora* L. Apoatã. **Magistra**. 20(1):22-29.

SANTOS, S.N.; CASTANHA, R.F.; SILVA, J.L.; MARQUES, M.O.M.; SCRAMIN, S.; MELO, I.S. 2011. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de *Hyptis leucocephala*. In: VI Simpósio Brasileiro de Óleos Essenciais. **Anais...** Campinas, SP: Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA/UNICAMP), Embrapa Meio Ambiente e o Instituto Agrônômico (IAC), 70.

SASAKI, Y.; TAKAHASHI, K.; OONO, Y.; SEKI, M.; YOSHIDA, R.; SHINOZAKI, K.; UEMURA, M. 2008. Characterization of growth-phase-specific responses to cold in *Arabidopsis thaliana* suspension-cultured cells. **Plant, Cell and Environment**. 31:354-365.

SERRA, A.G.P.; PAIVA, R.; PAIVA, P.D.O. 2000. Análises bioquímicas de calos formados de explantes foliares de castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa*). **Ciência e Agrotecnologia**. 24(4):833-840.

SINGH, J.; TIWARI, K.N. 2010. High-frequency *in vitro* multiplication system for commercial propagation of pharmaceutically important *Clitoria ternatea* L. – A valuable medicinal plant. **Industrial Crops and Products**. 32:534-538.

SIMÕES, C.; BIZARRI, CORDEIRO, L.S.; CASTRO, T.C.; COUTADA, L.C.M.; SILVA, A.J.R.; ALBARELLO, N.; MANSUR, E. 2009. Anthocyanin production in callus cultures of *Cleome rosea*: Modulation by culture conditions and characterization of pigments by means of HPLC-DAD/ESIMS. **Plant Physiology and Biochemistry**. 47:895-903.

SMEEKENS, S. 2000. Sugar-induced signal transduction in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. 51(1):49-81.

THIYAGARAJAN, M.; VENKATACHALAM, P. 2012. Large scale *in vitro* propagation of *Stevia rebaudiana* (Bert) for commercial application: Pharmaceutically

important and antidiabetic medicinal herb. **Industrial Crops and Products**. 37:111-117.

THORPE, T.; STASOLLA, C.; YEUNG, E.C.; KLERK, G-J. ROBERTS, A.; GEORGE, E.F. 2008. The components of plant tissue culture media II: organic additions, osmotic and pH effects, and support systems. In: GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; KLERK, G-J. **Plant Propagation by Tissue culture**. Dordrecht: Springer, 3rd Edition. p.:115-175.

van STADEN, J.; ZAZIMALOVA, E.; GEORGE, E.F. 2008. Plant Growth Regulators II: Cytokinins, their Analogues and Antagonists. In: GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; KLERK, G-J. **Plant Propagation by Tissue culture**. Dordrecht: Springer, 3rd Edition. p.:205-226.

ZAVATTIERI, M.A.; FREDERICO, A.M.; LIMA, M.; SABINO, R.; ARNHOLDT-SCHMITT, B. 2010. Induction of somatic embryogenesis as an example of stress-related plant. **Journal of Biotechnology**. 13(1):1-9.

ZIMMERMAN, J.L. 1993. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. **The Plant Cell**. 5:1411-1423.

CAPÍTULO 4

**Conservação *in vitro* de *Martianthus leucocephalus*
(Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore**

Resumo

A espécie *Martianthus leucocephalus* é endêmica da região da Caatinga, que se destaca devido a sua importância econômica, que decorre do seu alto teor de óleos essenciais aromáticos, com propriedades medicinais. Portanto, buscam-se estratégias para o uso sustentável, garantindo a preservação e a conservação do patrimônio genético. Objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito de reguladores vegetais e de agentes osmóticos sobre o crescimento *in vitro* de *M. leucocephalus*, espécie endêmica da Caatinga, visando à conservação *in vitro* por crescimento lento. Foram realizados dois experimentos para a conservação *in vitro*: 1- utilizou-se diferentes concentrações (0,0; 0,85; 1,7; 3,4; 6,8 μ M) e tipos de retardantes vegetais (ancimidol e paclobutrazol); 2 – utilizou-se diferentes agentes osmóticos (sacarose - Sac, manitol - Man e sorbitol - Sor) e diferentes concentrações (87,64; 131,46; 176,28; 219,10 e 262,92mM). Os agentes osmóticos manitol e sorbitol foram utilizados combinados com a sacarose. As variáveis analisadas para os dois experimentos foram: porcentagem de sobrevivência, comprimento de parte aérea, número de folhas, número de folhas senescentes, matéria seca de parte aérea e de raiz após 240 dias de incubação. No primeiro experimento, a maior porcentagem de sobrevivência foi alcançada com a utilização do ancimidol e para as demais variáveis apresentaram redução de suas médias independente do tipo de retardante vegetal utilizado. No segundo experimento, a maior porcentagem de sobrevivência foi observada nos tratamentos 43,82mM Sac + 43,82mM Man, 43,82mM Sac + 43,82mM Sor e 65,73mM Sac + 65,73mM Man. Para as variáveis comprimento de parte aérea, número de folhas e número de folhas senescentes, as menores médias foram promovidas a partir dos tratamentos suplementados com 43,82mM Sac + 43,82mM Man ou 65,73mM Sac + 65,73mM Man, além de promover ganho na matéria seca de parte aérea.

Palavras-chave: Crescimento mínimo; Agentes osmóticos; Ancimidol e Paclobutrazol.

Abstract

The species *Martianthus leucocephalus* is endemic to Caatinga region, which stands out due to its economic importance, which stems from its high content of essential oils with medicinal properties. Therefore, it is intended for use sustainable strategies, ensuring the preservation and conservation of genetic. The objective of this study was to evaluate the effect of plant growth regulators and osmotic agents on the in vitro growth of *M. leucocephalus*, a species endemic to the Caatinga, for conservation by slow growth in vitro. Two experiments were conducted for in vitro conservation: 1 - used different concentrations (0.0; 0.85; 1.7; 3.4; 6.8 μ M) and types of plant growth (ancimidol and paclobutrazol) 2 - to used different osmotic agents (sucrose - Sac, mannitol - Man and sorbitol - Sor) and different concentrations (87.64; 131.46; 176.28; 219.10 and 262.92mM). Osmotic agents are mannitol and sorbitol used in combination with sucrose. The variables analyzed for the two experiments were: survival rate, shoot length, leaf number, number of senescent leaves, dry matter shoot and root after 240 days of incubation. In the first experiment, the highest percentage of survival was achieved with the use of ancimidol and other variables decreased their average regardless of the type of retardant vegetable. In the second experiment, the highest percentage of survival was observed in the treatments (43.82mM Sac + 43.82mM Man), (43.82mM Sac + 43.82mM Sor) and (65.73mM Sac + 65.73mM Man). For variable length of shoot, leaf number and number of senescent leaves, the lowest averages were promoted from the treatments supplemented with 43.82mM Sac + 43.82mM Man or 65.73mM Sac + 65.73mM Man, and promote gain in dry matter of aerial part.

Keywords: Minimum growth, Osmotic agents; Ancymidol and Paclobutrazol.

1.0 Introdução

A espécie *Martianthus leucocephalus*, é uma planta endêmica do semiárido brasileiro, cujo óleo essencial produzido a partir das folhas apresenta atividade biológica frente à *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* (Rodrigues, 2007), *Pseudomonas aeruginosa*, *S. schleiferi*, *Salmonella thiphi*, *Escherichia coli*, *Burkholderia* sp., *Klebsiella pneumoniae* (Santos et al., 2011), sendo então, caracterizada como espécie medicinal.

Diante da importância econômica e social que esta espécie representa para o semiárido nordestino, visto que se constitui como possível fonte para a produção de novos fármacos, pois os compostos presentes no óleo essencial tem eficácia em relação a microrganismos que apresentam resistência a antibióticos existentes no mercado farmacêutico mundial, busca-se estratégias para o uso sustentável, garantindo a preservação e a conservação do patrimônio genético.

Logo, a possibilidade de utilização dos métodos de conservação de germoplasma *in vitro* é atrativa tanto por motivos econômicos quanto práticos, sendo um componente adicional importante do tratamento de recursos genéticos (Withers e Williams, 1998), incluindo as plantas medicinais, e de espécies ameaçadas de extinção, pois permite que o material vegetal de uma determinada espécie esteja disponível para sua utilização futura.

A conservação *in vitro* é uma estratégia que possibilita a manutenção de grande número de acessos em um pequeno espaço físico, livre das intempéries e riscos que existem no campo, a manutenção da fidelidade genética e facilita a disponibilidade de material para o melhoramento genético e para o intercâmbio de germoplasma. Além disso, a conservação *in vitro* tem grande importância econômica visto que o cultivo *in vitro* é bastante oneroso requerendo troca do meio de cultura com frequência, muitas vezes, mensal e com este processo as trocas podem ser reduzidas para uma ao ano (Withers e Williams, 1998; Faria et al., 2006).

O processo de conservação *in vitro*, baseia-se em controlar o crescimento dos explantes viáveis, reduzindo-o ou paralisando-o, manipulando tanto a constituição do meio de cultura como as condições de manutenção das culturas *in vitro*. A conservação da espécie pode ocorrer de curto a médio prazo, através do crescimento mínimo, também chamado de crescimento lento, que consiste em desacelerar o metabolismo fisiológico do vegetal, e por períodos em longo prazo, pelo método da criopreservação

em que o material vegetal é armazenado em temperaturas ultra-baixas, mas para isso é necessário à supressão completa do crescimento, de forma a evitar a deterioração do material vegetal (Withers e Williams, 1998).

Para que ocorra o crescimento lento, é necessário que as plantas tenham sua atividade metabólica reduzida, contudo sem afetar sua viabilidade. Isto pode ser alcançado alterando-se o potencial osmótico do meio de cultura, reduzindo então a disponibilidade de água, ou utilizando retardantes vegetais (especialmente inibidores da biossíntese de giberelinas). Pode-se também reduzir a luminosidade e a temperatura da sala de incubação, de tal maneira a obter o crescimento mínimo *in vitro* (Withers e Williams, 1998; Rademacher, 2000; Castro e Hilhorst, 2004).

Vários agentes osmóticos têm sido empregados com o propósito da redução do crescimento *in vitro*, os mais utilizados são sacarose, manitol e sorbitol, que segundo Dumet et al. (1993), ao serem adicionados ao meio de cultura agem externamente, removendo o excesso da água intracelular, por gradiente osmótico, fazendo com que o crescimento da cultura ocorra de forma mais lenta.

Os retardantes vegetais são conhecidos por reduzir o comprimento dos brotos, pelo encurtamento dos internós das plantas sem mudança no padrão de desenvolvimento, sem diminuir a produtividade ou ser fitotóxico. Isto é conseguido principalmente por redução do alongamento celular, mas também através da redução na taxa de divisão celular. A maioria deles age inibindo a biossíntese da giberelina, hormônio responsável pelo alongamento celular (Rademacher, 2000; Thakur et al., 2006; Taiz e Zeiger, 2009).

Dentre os antagonistas de giberelinas tem-se o ancimidol e paclobutrazol que agem inibindo a ação das enzimas monoxigenases P-450, bloqueando as reações de oxidação na etapa da conversão do ent-caureno a ácido caurenóico na rota biossintética de giberelinas, impedindo a formação do GA₁₂-aldeído que é oxidado a GA₁₂, a primeira giberelina da rota e precursora de todas as outras (Rademacher, 2000; Taiz e Zeiger, 2009).

Diversas espécies medicinais têm sido conservadas *in vitro*, através do crescimento lento, por meio da manipulação de fatores químicos (mudanças no meio de cultura, uso de agentes osmóticos e retardantes vegetais) e físicos (luminosidade e temperatura), a exemplo das espécies *Podophyllum hexandrum* (Nadeem et al., 2000), *Mentha* spp. (Islam et al., 2003), *Dioscorea bulbifera* (Narula et al., 2007), *Rauvolfia serpentina* (Ray e Bhattacharyaa, 2008), *Cochlospermum regium* (Camillo et al., 2009),

Mandevilla velutina (Souza et al., 2011), *Piper hispidinervum* e *Piper aduncum* (Silva e Scherwinski-Pereira, 2011), *Macrosyphonia velame* (Martins et al., 2011) e *Cannabis sativa* (Lata et al., 2012). De acordo com Sá et al. (2011), embora os resultados sejam promissores, não existe protocolo padrão de conservação que possa ser aplicado para todas as espécies, pois as respostas podem variar em função da espécie, tipo de explante dentre outros fatores.

Objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito de retardantes vegetais e de agentes osmóticos sobre o crescimento lento *in vitro* de *Martianthus leucocephalus*, visando à sua conservação.

2.0 Material e Métodos

2.1 Meio de cultura e condições experimentais

O meio de cultura utilizado em todos os experimentos foi o MS (Murashige e Skoog, 1962), suplementado com 87,64mM de sacarose (exceto no experimento que testou-se os agentes osmóticos) e solidificado com 0,7% de ágar. O meio de cultura foi esterilizado utilizando-se o hipoclorito de sódio (Qboa®) conforme metodologia descrita por Teixeira et al. (2006) com modificações.

A esterilização química iniciou-se com a lavagem da vidraria e tampas plásticas utilizadas no preparo do meio de cultura, sendo enxaguadas em água destilada, seguida de enxague em solução contendo 10 gotas de cloro ativo a 2% para 1L de água destilada. Após a esterilização, as vidrarias foram armazenadas na bancada. Antes do uso da vidraria e das tampas plásticas, estas foram novamente lavadas em solução contendo 0,0003% de cloro ativo, sendo que os recipientes que acondicionaram o meio de cultura foram enxaguados 15min antes da distribuição do meio de cultura. A solução utilizada para preparar o meio de cultura, conteve três gotas de cloro ativo a 2% para 1L de água destilada. Após colocar todas as substâncias do meio de cultura, adicionou-se 0,0005% de cloro ativo e depois de 15min ajustou-se o pH para $5,7 \pm 0,1$ (utilizando-se NaOH ou HCl 0,1N). A distribuição do meio de cultura (15mL) nos tubos de ensaio foi realizada na câmara de fluxo laminar.

Após a inoculação os tubos foram fechados com filme de Policloreto de Vinila (PVC), mantidos em sala de crescimento, a temperatura de $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$, 60% de umidade relativa, fotoperíodo de 16 horas e radiação fotossintética ativa de $60\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

2.2 Avaliação da ação de retardantes vegetais na conservação *in vitro* de *M. leucocephalus*

Os segmentos nodais (1,0cm de comprimento) obtidos de plantas germinadas *in vitro* em meio de cultura MS½, com aproximadamente 80 dias de idade, foram utilizados como fonte de explante. Os explantes foram inoculados em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações (0,0; 0,85; 1,70; 3,40; 6,80µM) e tipos de retardantes vegetais (paclobutrazol e ancimidol).

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 5 (tipos de retardantes vegetais x concentrações), totalizando 10 tratamentos. Cada tratamento foi composto por dez repetições, cada uma constituída de cinco unidades experimentais (5 tubos de ensaio contendo 1 explante/tubo).

2.3 Efeito dos agentes osmóticos na conservação *in vitro* de *M. leucocephalus*

Segmentos nodais (1,0cm de comprimento) obtidos de plantas germinadas *in vitro* em meio de cultura MS½, com aproximadamente 80 dias de idade, foram utilizados como fonte de explante. Os explantes foram inoculados em meio de cultura suplementado com diferentes tipos (sacarose, sorbitol e manitol) e concentrações (87,64; 131,46; 176,28; 219,10 e 262,92mM) de agentes osmóticos, proporcionando diferentes potenciais osmóticos (-0,2170; -0,3255; -0,4340; -0,5425; -0,6510MPa), os quais foram calculados através da equação Van't Hoff's (Paiva Neto e Otoni, 2003).

Equação:

$$\Psi_o = -CiRT$$

onde,

C – Concentração do soluto

i – Constante de ionização

R – Constante de gases (0,00831 kg MPa mol⁻¹ K⁻¹)

T – Temperatura (°C).

Os agentes osmóticos manitol e sorbitol foram utilizados combinados com a sacarose. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, totalizando 15 tratamentos (Tabela 1), composto por dez repetições, cada uma constituída de cinco unidades experimentais (5 tubos de ensaio contendo 1 explante/tubo).

Tabela 1: Tratamentos utilizados na conservação *in vitro* de *M. leucocephalus* e seus potenciais osmóticos obtidos a partir de diferentes concentrações dos agentes osmóticos sacarose, sorbitol ou manitol. Feira de Santana, BA. 2012.

| Tratamentos | Agentes osmóticos (mM) | | | Total | Potencial osmótico (MPa) |
|-------------|------------------------|---------|----------|--------|--------------------------|
| | Sacarose | Manitol | Sorbitol | | |
| 1 | 87,64 | - | - | | |
| 2 | 43,82 | 43,82 | - | 87,64 | -0,2170 |
| 3 | 43,82 | - | 43,82 | | |
| 4 | 131,46 | - | - | | |
| 5 | 65,73 | 65,73 | - | 131,46 | -0,3255 |
| 6 | 65,73 | - | 65,73 | | |
| 7 | 175,28 | - | - | | |
| 8 | 87,64 | 87,64 | - | 175,28 | -0,4340 |
| 9 | 87,64 | - | 87,64 | | |
| 10 | 219,10 | - | - | | |
| 11 | 109,55 | 109,55 | - | 219,10 | -0,5425 |
| 12 | 109,55 | - | 109,55 | | |
| 13 | 262,92 | - | - | | |
| 14 | 131,46 | 131,46 | - | 262,92 | -0,6510 |
| 15 | 131,46 | - | 131,46 | | |

2.4 Variáveis analisadas

Após 240 dias foram avaliadas as seguintes variáveis: porcentagem de sobrevivência, comprimento de parte aérea (cm), número de folhas, número de folhas senescentes, matéria seca de parte aérea (mg) e de raiz (mg). A porcentagem de sobrevivência das plantas foi analisada bimestralmente.

2.5 Análise estatística

Os dados foram avaliados estatisticamente, mediante a análise de variância, testando-se as médias pelo Teste de Scott-Knott e através de Regressão, para os fatores qualitativos e quantitativos, respectivamente. Os dados de percentagens foram transformados em arco seno da $\sqrt{\%}$ e os números de contagem em $\sqrt{x+1}$. Os dados foram analisados usando o programa SISVAR (Ferreira, 2011).

3.0 Resultados e Discussão

3.1 Avaliação da ação de retardantes vegetais na conservação *in vitro* de *M. leucocephalus*

Foi verificado que aos 60 e 120 dias de cultivo em meio de cultura suplementado com os retardantes vegetais, a taxa de sobrevivência foi de 100%. Observou-se efeito altamente significativo ($p \leq 0,01$) do tipo de retardante vegetal para a percentagem de sobrevivência aos 180 dias ($p \leq 0,05$) e significativo da interação “retardante vegetal x concentração” para a mesma variável aos 240 dias de incubação (Tabela 2).

Tabela 2: Resumo da análise de variância para percentagem de sobrevivência de plantas de *M. leucocephalus* submetidas a diferentes retardantes vegetais (ancimícol e paclobutrazol) em meio de cultura MS aos 240 dias de cultivo *in vitro*. Feira de Santana, 2012.

| FV | GL | Quadrados Médios | |
|------------------|----|----------------------|----------------------|
| | | de sobrevivência | |
| | | 180 dias | 240 dias |
| Retardantes (R) | 1 | 2,7889** | 0,1128 ^{ns} |
| Concentração (C) | 4 | 0,0662 ^{ns} | 0,1010 ^{ns} |
| R x C | 4 | 0,1678 ^{ns} | 0,2223* |
| Resíduo | 90 | 0,0708 | 0,0662 |
| CV (%) | | 21,03 | 37,20 |

**Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F. *Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F. ^{ns}Não significativo.

Aos 180 dias de incubação, o retardante de crescimento ancimidol, promoveu a maior porcentagem de sobrevivência (93,60%), independente da concentração utilizada (Tabela 3). Analisando a taxa de sobrevivência aos 240 dias, foi constatada tendência quadrática ($p \leq 0,01$) na presença de ancimidol, atingindo o maior valor estimado de 56,23% de sobrevivência das plantas a partir da concentração calculada de $3,57 \mu\text{M}$ de ancimidol. Enquanto que ao suplementar o meio de cultura com paclobutrazol verificou-se comportamento linear decrescente, indicando que à medida que aumentou as concentrações desta substância ocorreu o declínio da taxa de sobrevivência das plantas (Figura 1). Resultados semelhantes aos obtidos foram verificados para *Garcinia mangostana* quando cultivado em meio contendo paclobutrazol, contudo para *Lansium domesticum* a taxa de sobrevivência das plantas foi de 90% (Keatmetha et al., 2006) na presença de paclobutrazol.

Tabela 3: Porcentagem de sobrevivência de plantas de *M. leucocephalus* aos 180 dias submetidas a diferentes retardantes vegetal: ancimidol e paclobutrazol. Feira de Santana, 2012.

| Retardantes de crescimento vegetal | Porcentagem de sobrevivência |
|------------------------------------|------------------------------|
| Paclobutrazol | 73,60b |
| Ancimidol | 93,60a |

*Médias seguidas pelas mesmas letras diferem entre si estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

De acordo com Rademacher (2000), os retardantes vegetais agem como antagonistas de giberelinas, sem diminuir a produtividade e sem apresentar fitotoxidez às plantas. No entanto, o efeito destas substâncias sintéticas parece estar associado à espécie, ao tipo e a concentração do inibidor de crescimento, pois se verificou para *M. leucocephalus* que, a partir dos 180 dias de incubação em meio de cultura contendo paclobutrazol, houve elevada taxa de mortalidade, acima de 25%, o que indica efeito fitotóxico deste retardante vegetal. Embora, o paclobutrazol e o ancimidol atuem bloqueando a biossíntese das giberelinas no mesmo local da rota biossintética, eles possuem estrutura química distinta e ao serem degradados durante o período de incubação podem gerar produtos finais que causam diferentes prejuízos a planta. Observou-se que até os 120 dias de incubação as plantas submetidas aos dois tipos de

inibidores de crescimento apresentaram 100% de sobrevivência, que é uma característica importante para o processo de conservação de germoplasma *in vitro*. Portanto, o paclobutrazol pode ser utilizado até os 120 dias da inoculação com o intuito de prolongar o intervalo entre os subcultivos para esta espécie.

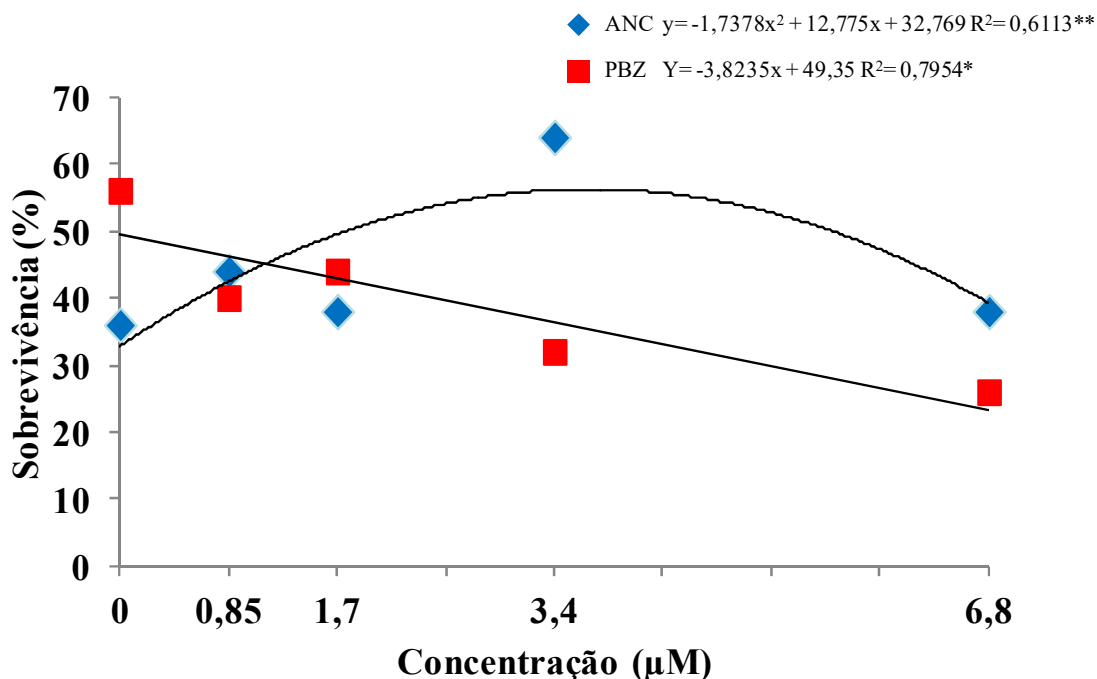


Figura 1: Porcentagem de sobrevivência de plantas de *M. leucocephalus* aos 240 dias submetidos a diferentes concentrações de retardantes vegetais: ancimidol (ANC) e paclobutrazol (PBZ). Feira de Santana, 2012.

Observou-se efeito altamente significativo ($p \leq 0,01$) do fator isolado “retardante vegetal” para número de folhas senescentes e do fator isolado “concentração” do retardante vegetal para comprimento de parte aérea e significativo ($p \leq 0,05$) para matéria seca de parte aérea e de raiz. A variável número de folhas não apresentou diferença significativa (Tabela 4).

As concentrações dos retardantes de crescimento vegetal, independente do tipo utilizado, mostraram tendência quadrática descendente ($p \leq 0,01$) para o comprimento de parte aérea. Foi constatado que a utilização destas substâncias promoveram menor crescimento das plantas quando comparado com o controle. Ao suplementar o meio de cultura com $3,4 \mu\text{M}$ do inibidor de crescimento promoveu uma redução de 2,15 vezes no comprimento de parte em relação ao controle (Figura 2). Resultados semelhantes foram obtidos para a espécie *Anadenanthera colubrina* var *cebil*, uma espécie lenhosa

(Nepomuceno et al., 2007), sendo também observado em espécies ornamentais como *Lilium longiflorum* (Thakur et al., 2006), *Syngonanthus mucugensis* subsp. *mucugensis* (Lima-Brito, 2009), *Cattleya labiata* e *C. eldorado* (Righeto et al., 2012).

Tabela 4: Resumo da análise de variância para comprimento de parte aérea (CPA), número de folhas (NF), número de folhas senescentes (NFS), matéria seca de parte aérea (MSPA) e matéria seca de raiz (MSR) de plantas de *M. leucocephalus* submetidas a diferentes retardantes vegetais (ancimidol e paclobutrazol) em meio de cultura MS aos 240 dias de cultivo *in vitro*. Feira de Santana, 2012.

| FV | GL | Quadrados Médios | | | | |
|-------------------------|----|---------------------|----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | | CPA | NF | NFS | MSPA | MSR |
| Retardantes (R) | 1 | 0,248 ^{ns} | 8,746 ^{ns} | 16,936** | 0,168 ^{ns} | 0,003 ^{ns} |
| Concentração (C) | 4 | 1,706* | 10,900 ^{ns} | 3,924 ^{ns} | 0,240* | 0,003* |
| R x C | 4 | 0,812 ^{ns} | 11,544 ^{ns} | 4,547 ^{ns} | 0,062 ^{ns} | 0,002 ^{ns} |
| Resíduo | 90 | 0,374 | 9,105 | 2,280 | 0,058 | 0,001 |
| CV (%) | | 26,47 | 30,12 | 40,40 | 49,78 | 48,79 |

**Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F. *Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F. ^{ns}Não significativo.

A redução no crescimento *in vitro* de *M. leucocephalus* ocorreu devido à ação do paclobutrazol e ancimidol, que agem impedindo a biossíntese de giberelinas. Esses retardantes vegetais bloqueiam as reações de oxidação na passagem do ent-caureno para ácido ent-caurenóico, e como consequência não se tem a formação do GA₁₂ – aldeído que é a primeira giberelina da rota e precursora de todas as outras. A giberelina é o hormônio responsável pelo alongamento celular vegetal, proporcionando o crescimento longitudinal dos caules, com o uso de um inibidor da síntese de giberelina, embora ocorram divisões celulares mesmo que de forma reduzida, estas novas células não alongam e, conseqüentemente tem-se o crescimento reduzido das culturas (Rademacher, 2000).

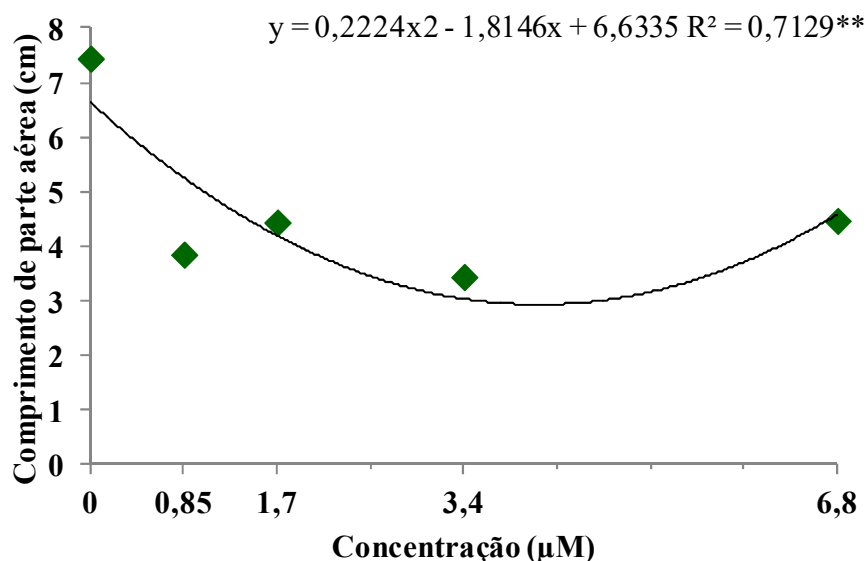


Figura 2: Comprimento de parte aérea de plantas de *M. leucocephalus* aos 240 dias submetidas a diferentes concentrações de retardantes de crescimento. Feira de Santana, 2012.

A análise da variável número de folhas senescentes é importante para os trabalhos de conservação *in vitro*, uma vez que serve como indicativo do estágio fisiológico da planta. Na conservação *in vitro* as plantas mantidas por períodos de tempo prolongados, muitas vezes, iniciam a senescência, que pode ocorrer devido a várias causas, como a exaustão do meio de cultura, produção de etileno ou mesmo devido ao efeito fitotóxico do inibidor de crescimento, que pode culminar na morte das plantas. Neste trabalho foi possível observar que o paclobutrazol promoveu maior número de folhas senescentes em comparação ao ancimídol independente da concentração utilizada (Tabela 5).

Tabela 5: Número de folhas senescentes de plantas de *M. leucocephalus* aos 240 dias submetidas a diferentes retardantes vegetais: ancimídol e paclobutrazol. Feira de Santana, 2012.

| Retardantes de crescimento vegetal | Número de folhas senescentes |
|------------------------------------|------------------------------|
| Paclobutrazol | 19,00a |
| Ancimídol | 12,06b |

*Médias seguidas pelas mesmas letras diferem entre si estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

Os retardantes vegetais utilizados também reduziram os valores médios das variáveis matéria seca da parte aérea e de raiz, observou-se tendência linear decrescente ($p \leq 0,01$; $p \leq 0,05$) para as duas variáveis (Figura 3 A e B). Para matéria seca de parte aérea foi observada redução de 38% na presença de $3,4 \mu\text{M}$ em relação ao controle, independente do retardante vegetal (Figura 2B). Maki et al. (2005), obtiveram resultados semelhantes para a espécie ornamental *Hosta* 'Blue Vision' quando cultivadas em presença de ancimidol. Todavia, Thakur et al. (2006), trabalhando com *Lilium longiflorum*, observaram incremento para matéria seca de parte aérea independente do tipo de retardante vegetal utilizado.

Já para matéria seca de raiz, a menor média (54,21mg) foi detectada na presença de $6,8 \mu\text{M}$ independente do retardante vegetal, representando redução média de 66% em relação ao controle (Figura 2C). A ação do produto parece depender da espécie, pois em *A. colubrina* (Nepomuceno et al., 2007), o retardante vegetal paclobutrazol na concentração de $1,7 \mu\text{M}$, provocou aumento na matéria seca das raízes.

A análise da matéria seca é uma variável indispensável para avaliar o crescimento das plantas. Quando as plantas de *M. leucocephalus* foram tratadas com os inibidores de giberelinas o incremento de matéria seca foi inferior àquele promovido pelo meio de cultura sem estas substâncias, indicando redução no metabolismo das plantas, o que é favorável quando se quer obter o crescimento mínimo das culturas.

Um dos efeitos secundários dos retardantes vegetais é a alteração da força-dreno da planta, ocorrendo como consequência maior partição de assimilados (Seleguini, 2007). No entanto, isso não foi observado para *M. leucocephalus*, visto que a matéria seca de parte aérea e de raiz apresentaram tendência linear decrescente em função do aumento das concentrações dos retardantes vegetais.

Embora o ancimidol e paclobutrazol tenham contribuído para a redução do crescimento *in vitro* de *M. leucocephalus*, eles não são indicados para a conservação *in vitro* desta espécie por períodos prolongados, pois promoveram baixa taxa de sobrevivência aos 240 dias da incubação. Porém o ancimidol pode ser utilizado até os 180 dias da incubação, pois resultou em 90% de sobrevivência das plantas.

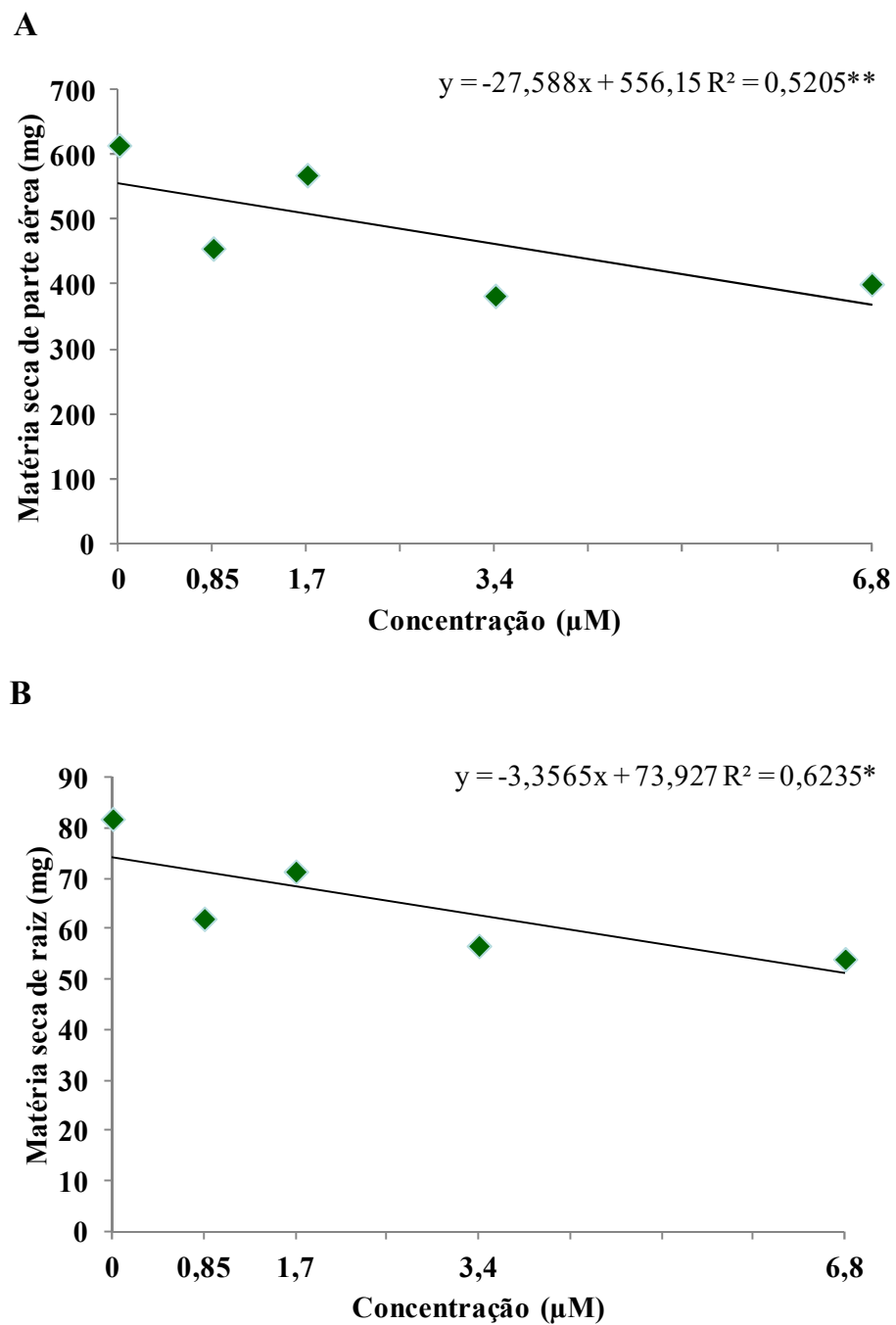


Figura 3: Matéria seca de parte aérea (A) e de raiz (B) de plantas de *M. leucocephalus* aos 240 dias submetidas a diferentes concentrações de retardantes vegetais. Feira de Santana, 2012.

3.2 Efeito dos agentes osmóticos na conservação *in vitro* de *M. leucocephalus*

Observou-se efeito altamente significativo ($p \leq 0,01$) dos tratamentos para porcentagem de sobrevivência durante o período de incubação, exceto quando esta variável foi avaliada aos 60 dias de cultivo *in vitro* (Tabela 6).

Tabela 6: Resumo da análise de variância para porcentagem de sobrevivência de plantas de *M. leucocephalus* submetidas a diferentes agentes osmóticos em meio de cultura MS. Feira de Santana, 2012.

| FV | GL | Quadrados Médios | | | |
|--------------------|-----|------------------------------|----------|----------|----------|
| | | Porcentagem de Sobrevivência | | | |
| | | 60 dias | 120 dias | 180 dias | 240 dias |
| Tratamentos | 14 | 0,0344 ^{ns} | 0,4225** | 1,1914** | 1,1092** |
| Resíduo | 135 | 0,0246 | 0,0535 | 0,0631 | 0,1062 |
| CV (%) | | 10,37 | 18,09 | 23,56 | 50,84 |

**Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F. ^{ns} Não significativo.

Os brotos regenerados a partir dos tratamentos que contiveram as maiores concentrações de manitol e sorbitol [tratamentos: 8 (87,64mM Sac + 87,64mM Man); 9 (87,64mM Sac + 87,64mM Sor); 11 (109,55mM Sac + 109,55mM Man); 12 (109,55mM Sac + 109,55mM Sor); 14 (262,92mM Sac + 262,92mM Man) e 15 (262,92mM Sac + 262,92mM Sor)], apresentaram-se hiperídricos, e por isso estes tratamentos foram descartados.

Para a porcentagem de sobrevivência foi verificado que aos 120 dias as maiores taxas obtidas foram nos tratamentos 2 (43,82mM Sac + 43,82mM Man); 3 (43,82mM Sac + 43,82mM Sor); 4 (131,46mM Sac); 5 (65,73mM Sac + 65,73mM Man); 6 (65,73mM Sac + 65,73mM Sor), sendo que os resultados apresentados por estes tratamentos diferiram estatisticamente dos demais. Constatou-se que durante este período de conservação *in vitro* para *M. leucocephalus*, o tipo e a concentração do agente osmótico, proporcionando os potenciais osmóticos -0,2170 MPa e -0,3255MPa não promoveram a mortalidade dos brotos de forma intensa, exceto no tratamento 1

(Figura 3). De modo semelhante ocorreu para a *Podophyllum peltatum*, que em potenciais osmóticos similares aos utilizados neste trabalho, apresentou alta porcentagem de sobrevivência (Lata et al., 2010).

Aos 180 dias de cultivo *in vitro*, observou-se que para os tratamentos 2, 3, 4, 5 e 6, apenas aquele em que o meio de cultura foi suplementado apenas com sacarose (tratamento 4) teve a taxa de sobrevivência reduzida (Figura 3). Os resultados do presente trabalho discordam daqueles reportados por Silva e Scherwinski-Pereira (2011) em estudos com *Piper aduncum* e *P. hispidinervum*, que observaram 100% de sobrevivência em meio suplementado com igual concentração de sacarose e com o mesmo período de avaliação.

Aos 240 dias a maior taxa de sobrevivência (88%) foi observada no tratamento 2 (43,82mM Sac + 43,82mM Man), seguido dos tratamentos 3 (43,82mM Sac + 43,82mM Sor) e 5 (65,73mM Sac + 65,73mM Man), os quais promoveram 78 e 70% de plantas vivas, respectivamente (Figura 3). Durante esse período, foi observado que ao reduzir o potencial osmótico de -0,2170 para -0,3255MPa, no meio suplementado com sacarose + sorbitol (tratamento 6), a taxa de sobrevivência foi reduzida de forma mais acentuada quando comparado aos tratamentos 2; 3 e 5, os quais não diferiram estatisticamente entre si (Figura 3).

Esses dados evidenciam que o sorbitol em concentrações mais elevadas reduz a taxa de sobrevivência das plantas de *M. leucocephalus*, corroborando os resultados obtidos para *Cannabis sativa* (Lata et al., 2012). Resultados diferentes foram reportados por Silva e Scherwinski-Pereira (2011) para a espécie *Piper aduncum* (0,0% de sobrevivência) e *P. hispidinervum* (2,4% de sobrevivência), ao serem cultivados em meio de cultura com manitol (54,89mM) mesmo com período de incubação inferior ao observado para *M. leucocephalus*.

As menores porcentagens de sobrevivência foram detectadas nos tratamentos 7 (175,28mM Sac); 10 (219,10mM Sac) e 13 (262,92mM Sac), os quais apresentavam os menores potenciais osmóticos (-0,4340; -0,5425 e -0,6510MPa) do meio de cultura (Figura 3). De acordo com Caldas et al. (1998) e Grattapaglia e Machado (1998), concentrações acima de 117,16mM de sacarose podem incorrer na redução do potencial osmótico do meio de cultura, limitando a disponibilidade de água para a planta/ broto, o que irá afetar o metabolismo celular e implicar na redução do crescimento das plantas. Constatou-se que para *M. leucocephalus*, o aumento da concentração de sacarose no

meio de cultura proporcionou efeito depressivo no metabolismo das brotações levando à morte das plantas.

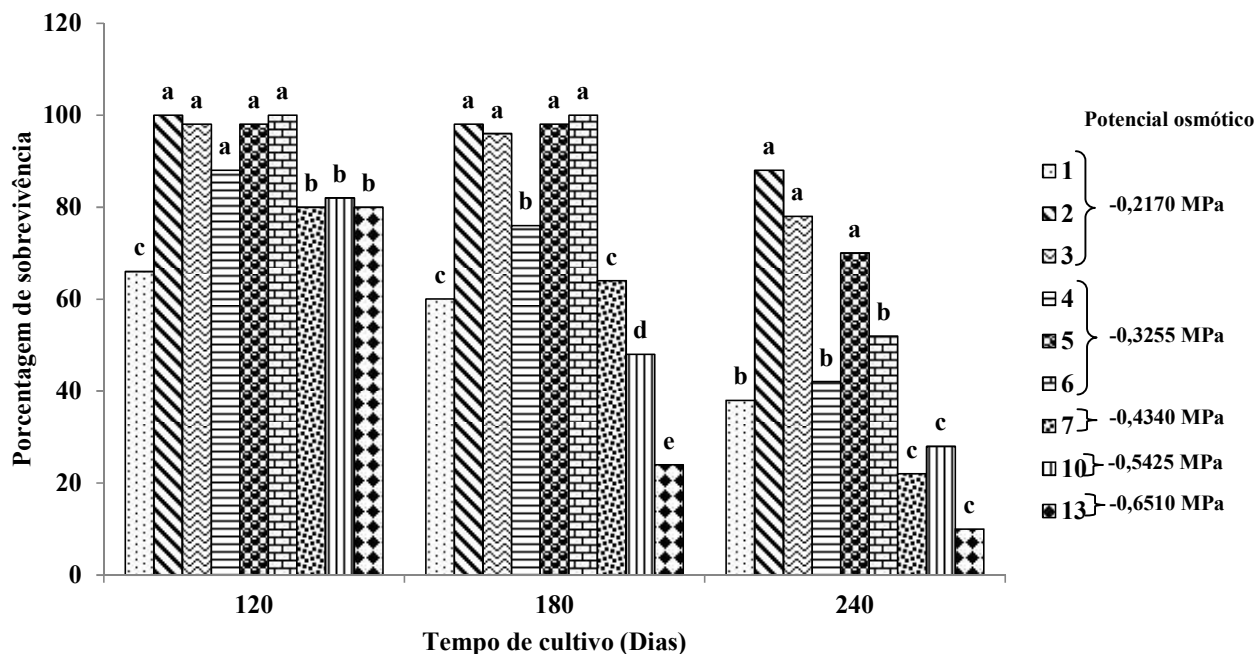


Figura 3: Porcentagem de sobrevivência de plantas de *M. leucocephalus* aos 240 dias submetidas a diferentes agentes osmóticos: sacarose (Sac), manitol (Man) e Sorbitol (Sor). Tratamentos: 1 – 87,84mM Sac; 2 – 43,82mM Sac+43,82mM Man; 3 – 43,82mM Sac+43,82mM Sor; 4 – 131,46mM Sac; 5 – 65,73mM Sac+65,73mM Man; 6 – 65,73mM Sac+65,73mM Sor; 7 – 175,28mM Sac; 10 – 219,10mM Sac; 13 – 262,92mM Sac. As médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott. Feira de Santana, 2012.

Observou-se efeito altamente significativo ($p \leq 0,01$) dos tratamentos para comprimento de parte aérea, número de folhas, matéria seca de parte aérea (Tabela 7).

Tabela 7: Resumo da análise de variância para comprimento de parte aérea (CPA), número de folhas (NF), número de folhas senescentes (NFS), matéria seca de parte aérea (MSPA) e matéria seca de raiz (MSR) de plantas de *M. leucocephalus* submetidas a diferentes agentes osmóticos em meio de cultura MS. Feira de Santana, 2012.

| FV | GL | Quadrados Médios | | | | |
|--------------------|----|------------------|----------|----------|---------|----------|
| | | CPA | NF | NFS | MSPA | MSR |
| Tratamentos | 8 | 1,014** | 27,974** | 11,214** | 0,037** | 0,0005** |
| Resíduo | 67 | 0,067 | 4,61 | 1,188 | 0,004 | 0,0001 |
| CV (%) | | 15,35 | 26,26 | 37,25 | 5,77 | 1,25 |

**Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Ao analisar a variável comprimento de parte aérea foi verificado redução significativa no crescimento das plantas em resposta a utilização do manitol e do sorbitol, bem como devido ao aumento das concentrações dos carboidratos. As menores médias (1,4; 1,02; 2,26; 1,91cm) foram promovidas pelos tratamentos 2 (43,82mM Sac + 43,82mM Man); 5 (65,73mM Sac + 65,73mM Man); 7 (175,28mM Sac); 13 (262,92mM Sac), respectivamente, e os resultados obtidos a partir destes tratamentos não diferiram estatisticamente entre si (Figura 4A).

Os tratamentos 2 e 5 são compostos pela associação de sacarose + manitol, sendo que o tratamento 2 possui o mesmo potencial osmótico (-0,2170MPa) dos tratamentos 1 (87,84mM Sac) e 3. Assim como o tratamento 5, tem igual potencial osmótico (-0,3255MPa) aos tratamentos 4 e 6, neste caso constatou-se a influência do uso do manitol sobre o comprimento de parte aérea (Figura 4A). Resultados similares foram reportados por Lima-Brito et al. (2011), para *Syngonanthus mucugensis* subsp. *mucugensis* que tiveram menor crescimento na presença de manitol, bem como para as espécies *Piper aduncum* e *P. hispidinervum* (Silva e Scherwinski-Pereira, 2011). Contrariamente, no cultivo *in vitro* de *Pfaffia glomerata*, esse agente osmótico quando utilizado isolado, exerceu efeito prejudicial à manutenção das plantas *in vitro*, sendo que, os brotos apresentaram 0,2cm de comprimento (Alves et al., 2010).

A inibição do crescimento *in vitro* de *M. leucocephalus* na presença do manitol, se deu porque este é um açúcar álcool, assim como o sorbitol. Segundo Thorpe et al. (2008)

esses açúcares alcoóis geralmente não são metabolizados pelas plantas e, portanto, não estão disponíveis como fonte de carbono, funcionando apenas como agentes osmóticos no meio de cultura, restringindo a disponibilidade de água para as brotações, proporcionando o crescimento lento das culturas, devido à redução do metabolismo vegetal. Porém, algumas espécies conseguem absorver e metabolizar o sorbitol, como espécies da família Rosaceae (Bahmani et al, 2009). Isto pôde ser verificado para *M. leucocephalus*, visto que na presença do sorbitol as plantas apresentaram maior eficiência no crescimento em relação à adição do manitol.

Os tratamentos 2 – 3 e 5 – 6 possuíam a metade da concentração de sacarose em relação aos tratamentos 1 e 4, respectivamente, o que, possivelmente, associado ao uso do manitol proporcionou maior redução no crescimento de parte aérea em relação ao sorbitol (Figura 4A). De acordo com George (1993) e Malaurie et al. (1998), a redução na concentração de sacarose e minerais também promovem o crescimento mínimo das culturas, como ocorreu para *Cochlospermum regium* (Camillo et al., 2009) que em concentrações reduzidas de nutrientes apresentou 90% de sobrevivência.

De acordo com os resultados apresentados para *M. leucocephalus*, verifica-se que as diferenças químicas existentes entre os agentes osmóticos podem acarretar diferenças nos resultados, mesmo em potenciais similares.

Observou-se também que o aumento da concentração de sacarose nos tratamentos 7 e 13, os quais tinham potenciais osmóticos $-0,4340\text{MPa}$ e $-0,6510\text{MPa}$, também promoveram as menores médias para o crescimento da parte aérea (Figura 4A), isso provavelmente ocorreu porque em potenciais osmóticos reduzidos, a disponibilidade de água é limitada, o que dificulta a absorção de água e nutrientes pelo explante e, como consequência, tem-se a redução do metabolismo, levando ao crescimento mínimo das brotações. Embora esses potenciais tenham proporcionado decréscimo no comprimento de parte aérea, não é recomendado para a conservação *in vitro* de *M. leucocephalus*, uma vez que reduziram significativamente a taxa de sobrevivência ao longo dos 240 dias.

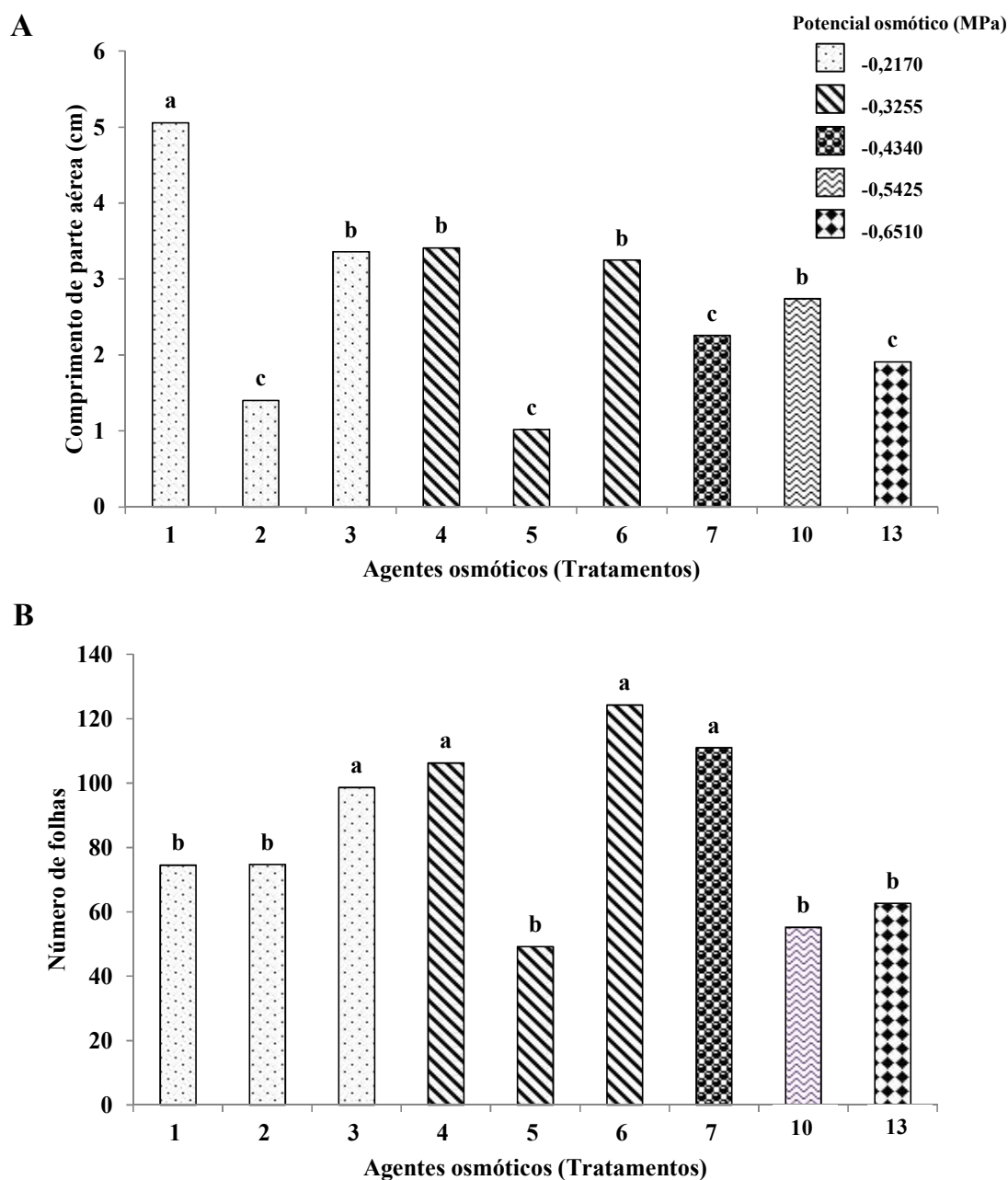


Figura 4: Comprimento de parte aérea (A) e número de folhas (B) de plantas de *M. leucocephalus* aos 240 dias submetidas a diferentes agentes osmóticos: sacarose (Sac), manitol (Man) e Sorbitol (Sor). Tratamentos: 1 – 87,84mM Sac; 2 – 43,82mM Sac+43,82mM Man; 3 – 43,82mM Sac+43,82mM Sor; 4 – 131,46mM Sac; 5 – 65,73mM Sac+65,73mM Man; 6 – 65,73mM Sac+65,73mM Sor; 7 – 175,28mM Sac; 13 – 262,92mM Sac. As médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott. Feira de Santana, 2012.

Em relação à variável número de folhas, as menores médias (74,52; 74,70; 49,22; 55,16; 62,63), foram registradas nos tratamentos 1 (87,84mM Sac), 2 (43,82mM Sac + 43,82mM Man), 5 (65,73mM Sac + 65,73mM Man), 10 (219,10mM Sac) e 13 (262,92mM Sac), respectivamente, sendo que entre esses tratamentos não houve diferença estatística (Figura 4B). Nos tratamentos com igual potencial osmótico (-0,2170MPa), onde o meio de cultura foi constituído apenas por sacarose (tratamento 1) e por sacarose + manitol (tratamento 2), observou-se redução no número de folhas quando comparadas aos resultados obtidos no tratamento constituído por sacarose e sorbitol (tratamento 3). Em relação ao tratamento 1, essa resposta pode está associada à alta incidência de folhas que sofreram abscisão foliar, possivelmente proporcionada devido à exaustão do meio de cultura, como consequência do rápido metabolismo das plantas, e tenha utilizado toda a sacarose para produzir energia necessária ao seu desenvolvimento, visto que neste tratamento o comprimento da parte aérea foi maior que os demais (Figura 4B).

No tratamento 2, o potencial osmótico é igual ao tratamento 3, portanto infere-se que a resposta está associada ao tipo de agente osmótico. Tal fato pode ser evidenciado, analisando os tratamentos 4 (131,46mM Sac); 5 (65,73mM Sac + 65,73mM Man) e 6 (65,73mM Sac + 65,73mM Sor), os quais possuem o mesmo potencial osmótico (-0,3255MPa), comprovando que o tipo de agente osmótico (manitol) influenciou diretamente no número de folhas de *M. leucocephalus* (Figura 4B). Esses resultados corroboram aqueles obtidos para *Syngonanthus mucugensis* que apresentaram a menor produção de folhas na presença do manitol (Lima-Brito et al., 2011). Todavia, Faria et al. (2006), obtiveram resultados diferentes para *Passiflora giberti*, espécie para qual verificaram redução no número de folhas ao suplementar o meio de cultura com sorbitol.

De acordo com Thorpe et al. (2008), o manitol tem ação apenas como agente osmótico na conservação a curto-prazo, enquanto que o sorbitol pode atuar como agente osmótico, além de ser absorvido e metabolizado por algumas espécies vegetais. Fato este, verificado para *M. leucocephalus*, que apresentou maior número de folhas com a utilização do sorbitol em detrimento ao uso do manitol.

Para o número de folhas senescentes, observou-se também a influência do tipo e concentração dos agentes osmóticos no meio de cultura, as menores médias foram promovidas pelos tratamentos 2 (43,82mM Sac + 43,82mM Man); 5 (65,73mM Sac + 65,73mM Man) e 13 (262,92mM Sac). A redução no número de folhas senescente é desejável quando se objetiva a conservação de germoplasma *in vitro*, pois no momento do

subcultivo a planta necessita recuperar o seu metabolismo e assim a capacidade de regeneração.

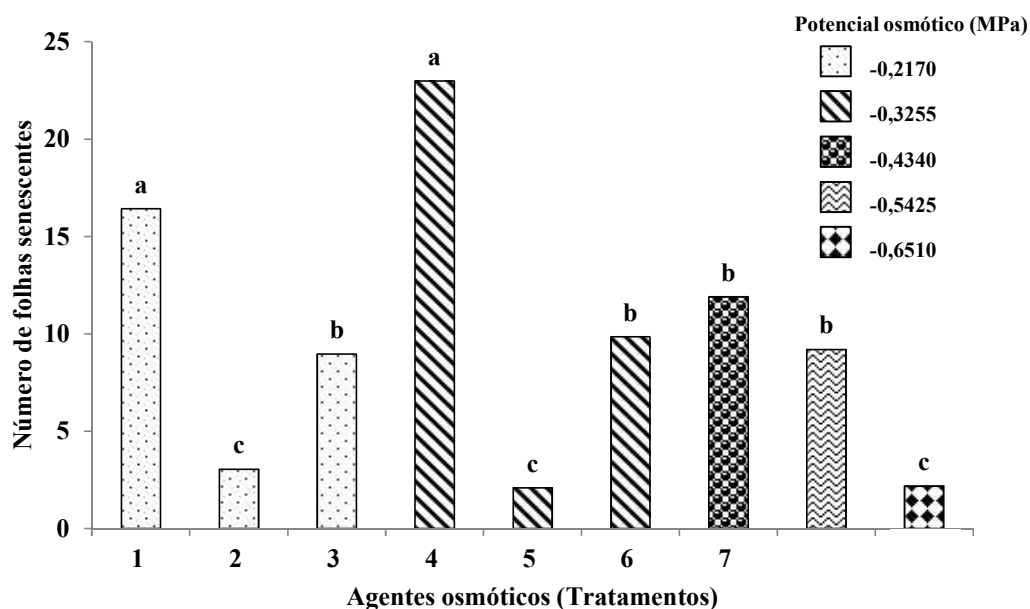


Figura 5: Número de folhas senescentes de plantas de *M. leucocephalus* aos 240 dias submetidas a diferentes agentes osmóticos: sacarose (Sac), manitol (Man) e Sorbitol (Sor). Tratamentos: 1 – 87,84mM Sac; 2 – 43,82mM Sac+43,82mM Man; 3 – 43,82mM Sac+43,82mM Sor; 4 – 131,46mM Sac; 5 – 65,73mM Sac+65,73mM Man; 6 – 65,73mM Sac+ 65,73mM Sor; 7 – 175,28mM Sac; 10 – 219,10mM Sac; 13 – 262,92mM Sac. As médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott. Feira de Santana, 2012.

Para matéria seca de parte aérea, as maiores médias foram obtidas a partir dos tratamentos 1 (87,84mM Sac); 2 (43,82mM Sac+43,82mM Man); 3 (43,82mM Sac+43,82mM Sor); 4 (131,46mM Sac) e 6 (65,73mM Sac+65,73mM Sor), sendo que os resultados promovidos por estes tratamentos não diferiram estatisticamente entre si. Observou-se que tanto o potencial osmótico -0,2170MPa quanto em -0,3255MPa proporcionaram incrementos na matéria seca de parte aérea, independente do tipo de agente osmótico utilizado, exceto o tratamento 5, composto por sacarose + manitol (Figura

6). Esses resultados são interessantes por indicar que houve incorporação de esqueletos de carbono, aumentando assim a energia disponível para as plantas, além da melhor qualidade das mesmas, possibilitando a utilização deste material vegetal como fonte de explante para multiplicação *in vitro*, bem como proporcionar melhores respostas durante a fase de avaliação da capacidade de regeneração, que é um dos aspectos mais importantes de um banco de germoplasma.

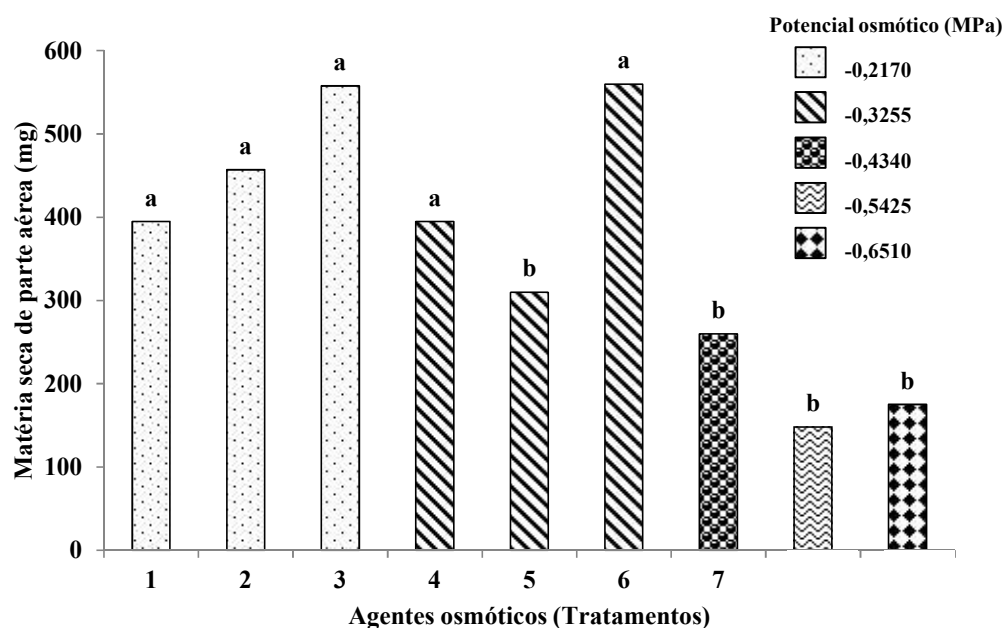


Figura 6: Matéria de parte aérea de plantas de *M. leucocephalus* aos 240 dias submetidas a diferentes agentes osmóticos: sacarose (Sac), manitol (Man) e Sorbitol (Sor). Tratamentos: 1 – 87,84mM Sac; 2 – 43,82mM Sac+43,82mM Man; 3 – 43,82mM Sac+43,82mM Sor; 4 – 131,46mM Sac; 5 – 65,73mM Sac+65,73mM Man; 6 – 65,73mM Sac+65,73mM Sor; 7 – 175,28mM Sac; 10 – 219,10mM Sac; 13 – 262,92mM Sac. As médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott. Feira de Santana, 2012.

Diante dos resultados apresentados para *M. leucocephalus*, sugere-se a conservação *in vitro* em meio de cultura suplementado com 43,82mM Sac + 43,82mM Man ou 65,73mM Sac + 65,73mM Man, uma vez que estes tratamentos promoveram taxa de sobrevivência em torno de 80%, além de provocar redução para o comprimento de parte

aérea, número de folhas, número de folhas senescentes e ter promovido ganho na matéria seca de parte aérea.

4.0 Conclusão

O ancimidol e o paclobutrazol não se mostraram eficientes para a conservação *in vitro* por períodos prolongados (240 dias). Contudo, a conservação de germoplasma *in vitro* de *M. leucocephalus* é viável utilizando-se sacarose combinada com manitol.

5.0 Referências Bibliográficas

- ALVES, R.B.N.; BERTONI, B.W.; VIEIRA, R.F.; FRANÇA, S.C.; MING, L.C.; PEREIRA, A.M.S. 2010. Influência de diferentes meios de cultura sobre o crescimento de *Pffafia glomerata* (Spreng.) Perdensen (Amaranthaceae) para conservação *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. 12(4):510-515.
- BAHMANI, R.; KARAMI, O.; GHOLAMI, M. 2009. Influence of carbon sources and their concentrations on rooting and hyperhydricity of apple rootstock MM.106. **World Applied Sciences Journal**. 6(11):1513-1517.
- CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. 1998. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Orgs.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, EMBRAPA-SPI/ EMBRAPA-CNPQ. p.:87-132.
- CAMILLO, J.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E.; VIEIRA, R.F. PEIXOTO, J.R. 2009. Conservação *in vitro* de *Cochlospermum regium* (Schrank) Pilg. – Cochlospermaceae sob regime de crescimento mínimo. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. 11(2):184-189.
- CASTRO, R.D.; HILHORST, H.W. 2004. Embebição e reativação do metabolismo. In: Ferreira, A.G.; Borghetti, F. (Orgs.). **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed. p.:149-162.
- DUMET, D.; ENGELMANN, F.; CHABRILLANGE, N.; DUVAL, Y.; DEREUDDRE, J. 1993. Importance of sucrose for the acquisition of tolerance to desiccation and cryopreservation of oil palm embryos. **Cryo-Letters**. 14:243-250.
- FARIA, G.A.; COSTA, M.A.P.C.; JUNGHANS, T.G.; LEDO, C.A.S.; SOUZA, A.S. 2006. Efeito da sacarose e do sorbitol na conservação *in vitro* de *Passiflora giberti* N. E. Brown. **Revista Brasileira de Fruticultura**. 28(2):267-270.

FERREIRA, D.F. 2011. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**. 35(6):1039-1042.

GEORGE, E.F. 1993. **Plant Propagation by tissue culture**. 2nd ed. Exegetic: Edington. 547p.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. 1998. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Orgs.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, EMBRAPA-SPI/ EMBRAPA-CNPQ. p.:183-260.

ISLAM, A.T.; LEUNUFNA, S. DEMBELE, D.P.; KELLER, E.R.J. 2003. In vitro conservation of four mint (*Mentha* spp.) accessions. **Plant Tissue Culture**. 13(1):37-46.

KEATMETHA, W.; SUKSA-ARD, P.; MEKANAWAKUL, M.; TE-CHATO, S. 2006. In vitro germoplasma Conservation of *Garcinia mangostana* L. and *Lansium domesticum* Corr. **Walailak Journal of Science and Technology**. 3(1):33-50.

LATA, H.; MORAES, R.M.; BERTONI, B.; PEREIRA, A.M.S. 2010. In vitro germoplasm conservation of *Podophyllum peltatum* L. under slow growth conditions. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**. 46:22-27.

LATA, H. CHANDRA, MEHMEDIC, Z.; KHAN, I.A.; ELSOHLY, M.A. 2012. In vitro germoplasm coservation of high Δ^9 -tetrahydrocannabinol yielding elite clones of *Cannabis sativa* L. under slow growth conditions. **Acta Physiologiae Plantarum**. 34(2):743-750.

LIMA-BRITO, A. 2009. **Micropropagação e conservação in vitro de *Syngonanthus mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis***. Trabalho de Tese de Doutorado (Programa de Pós-Graduação em Botânica) – Universidade Estadual de Feira de Santana. 119p.

LIMA-BRITO, A.; SAMPAIO, M.M.; ALVIM, B.F.M.; RESENDE, S.V.; BELLINTANI, M.C.; SANTANA, J.R.F. 2011. Agentes osmóticos e temperatura na conservação in vitro de sempre-viva. **Ciência Rural**. 41(8):1354-1361.

MALAURIE, B.; TROUSLOT, M-F.; BERTHAUD, J.; BOUSALEM, M.; PINEL, A.; DUBERN, J. 1998. Medium-term and long-term *in vitro* conservation and safe international exchange of yam (*Dioscorea* spp.) germplasm. **Journal Biotechnology**. 1(3):103-117.

MAKI, S.L.; DELGADO, M.; ADELBERG, J.W. 2005. Time course study of ancymidol for micropropagation of *Hosta* in a liquid culture system. **HortScience**. 40(3):764-766.

MARTINS, L.M.; PEREIRA, A.M.S.; FRANÇA, S.C. BERTONI, B.W. 2011. Micropropagação e conservação de *Macrosyphonia velame* (St. Hil.) Muell. Arg. em banco de germoplasma *in vitro*. **Ciência Rural**. 41(3):454-458.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for a rapid growth and bioassays with tabacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**. 15:493-497.

NADEEM, M.; PALNI, L.M.S.; PUROHIT, A.N.; PANDEY, H.; NANDI, S.K. 2000. Propagations and conservation of *Podophyllum hexandrum* Royle: an important medicinal herb. **Biological Conservation**. 92:121-129.

NARULA, A.; KUMAR, S.; SRIVASTAVA, P.S. 2007. Genetic fidelity of *in vitro* regenerants encapsulation of shoot tips and high diosgenin content in *Dioscorea bulbifera* L., a potential alternative source of diosgenin. **Biotechnology Letters**. 29:623-629.

NEPOMUCENO, C.F.; RIOS, A.P.S.; QUEIROZ, S.R.O.D.; PELACANI, C.R.; SANTANA, R.F. 2007. Controle da abscisão foliar e morfogênese *in vitro* em culturas de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. *cebil* (Griseb) Altschul. **Revista Árvore**. 31(5):967-975.

PAIVA NETO, V.B.; OTONI, W.C. 2003. Carbon sources and their osmotic potential in plant tissue culture: does it matter? **Scientia Horticulturae**. 97:193-202.

RADEMACHER, W. 2000. Growth retardants: effects on gibberellin biosynthesis and other metabolic pathways. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. 51:501-531.

RAY, A.; BHATTACHARYA, S. 2008. Storage and plant regeneration from encapsulated shoot tips of *Rauvolfia serpentine* – an effective way of conservation and mass propagation. **South African Journal of Botany**. 74:776-779.

RIGHETO, M.V.L.; ALMEIDA, L.V.; BRONDANI, G.E.; AMARAL, A.F.; ALMEIDA, M. 2012. Morfofisiologia de plântulas de *Cattleya labiata* Lindley e *Cattleya eldorado* Linden cultivadas *in vitro* sob influência de paclobutrazol. **Revista Brasileira de Biociências**. 10(1):20-25.

RODRIGUES, O.S. 2007. **Óleo essencial de *Hyptis leucocephala* Mart. ex Benth: composição química e atividade antimicrobiana**. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual de Feira de Santana.

SÁ, A.J.; LÉDO, A.S.; LÉDO, C.A.S. 2011. Conservação *in vitro* de mangabeira da região nordeste do Brasil. **Ciência Rural**. 41(1):57-62.

SANTOS, S.N.; CASTANHA, R.F.; SILVA, J.L.; MARQUES, M.O.M.; SCRAMIN, S.; MELO, I.S. 2011. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de *Hyptis leucocephala*. In: VI Simpósio Brasileiro de Óleos Essenciais. **Anais...** Campinas, SP: Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA/UNICAMP), Embrapa Meio Ambiente e o Instituto Agrônômico (IAC), 70.

SELEGUINI, A. 2007. **Uso de paclobutrazol na produção de mudas no crescimento, produção e qualidade de frutos de tomateiro em ambiente protegido**. Trabalho de Tese de Doutorado (Programa de Pós-Graduação e Agronomia) – Universidade Estadual Paulista. 101p.

SILVA, T.L.; SCHERWINSKI-PEREIRA. 2011. In vitro conservation of *Piper aduncum* and *Piper hispidinervum* under slow-growth conditions. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 46(4):384-389.

SOUZA, A.V.; BERTONI, B.W.; FRANÇA, S.C.; PEREIRA, A.M.S. 2011. Conservação e enraizamento *in vitro* de infalível (*Mandevilla velutina* K. Schum.), uma planta medicinal do Cerrado. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. 13(3):319-327.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. 2009. **Fisiologia Vegetal**. 4ª ed., Porto Alegre: Artmed, 848p.

TEIXEIRA, S.L.; RIBEIRO, J.M.; TEIXEIRA, M.T. 2006. Influence of NaClO on nutrient medium sterilization and on pineapple (*Ananas comosus* cv Smooth cayenne) behavior. **Plant Cell Tissue Organ Culture**. 86:375–378.

THAKUR, R.; SOOD, A.; NAGAR, P.K.; PANDEY, S.; SOBTI, R.C.; AHUJA, P.S. 2006. Regulation of growth of *Lilium* plantlets in liquid medium by application on paclobutrazol or ancimidol, for its amenability in bioreactor system: growth parameters. **Plant Cell Reports**. 25:382-391.

THORPE, T.; STASOLLA, C.; YEUNG, E.C.; KLERK, G-J.; ROBERTS, A.; GEORGE, E.F. 2008. The Components of Plant Tissue Culture Media II: Organic Additions, Osmotic and pH Effects, and Support Systems. In: GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; KLERK, G-J. **Plant Propagation by Tissue culture**. Dordrecht: Springer, 3rd Edition. p.:205-226.

WITHERS, L.A.; WILLIAMS, J.T. 1998. Conservação *in vitro* de recursos genéticos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: Embrapa – SPI / Embrapa – CNPH. p.:297-330.

CONCLUSÕES GERAIS

- O estabelecimento *in vitro* de *M. leucocephalus* pode ser realizado com a germinação em meio de cultura MS com a metade da concentração dos sais.
- A micropropagação de *M. leucocephalus* é viável utilizando como material de partida plantas germinadas em meio de cultura MS½, enquanto que a multiplicação deve ser realizada em meio de MS suplementado com ANA, utilizando como fonte de explante o segmento nodal.
- Não é necessária a etapa de enraizamento *in vitro* para *M. leucocephalus*, sendo possível a eliminação do processo de rustificação. As mudas podem ser aclimatizadas com sucesso, utilizando garrafa tipo *pet* com tampa para a manutenção da umidade relativa no microambiente.
- Foi possível a obtenção de embriões somáticos globulares em meio de cultura MS suplementado com 2,4-D e KIN.
- A conservação de germoplasma *in vitro* de *M. leucocephalus* pode ser realizada utilizando a combinação dos agentes osmóticos sacarose e manitol.

RESUMO GERAL

Martianthus leucocephalus (Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore (Lamiaceae) é uma espécie medicinal aromática, endêmica do semiárido nordestino, possui importância econômica devido ao seu potencial farmacológico. Este trabalho teve como objetivo estudar a propagação *in vitro* da espécie *Martianthus leucocephalus* desenvolvendo um protocolo de micropropagação e conservação *in vitro*, permitindo o estabelecimento de estratégias para a sua preservação e exploração sustentável. No estabelecimento *in vitro* foram testados: 1 – testou-se diferentes meios de cultura (MS, MS^{1/2}, WPM, Agar e Papel *germtest*) na germinação *in vitro*; 2 - testou-se diferentes meio cultura (MS, MS^{1/2} e WPM) no crescimento *in vitro* e 3 – avaliou-se diferentes volumes de meio de cultura (em frascos de 500mL) no crescimento *in vitro* de *M. leucocephalus*. No processo de morfogênese *in vitro*, testou-se: 1 - diferentes tipos de explantes (segmento de folha, segmento internodal e nodal) associado a diferentes citocininas (BAP, KIN e TDZ); 2 - combinação de diferentes concentrações de BAP e ANA; 3 - diferentes explantes quanto a posição deste no material de partida; 4 - diferentes fontes de carbono (sacarose, maltose, frutose, lactose e glicose); 5 - o potencial organogênico a partir de folhas com pecíolos submetidas a diferentes citocininas (KIN, BAP, TDZ e ZEA). Para aclimatização, as plantas passaram por um processo de rustificação, em que foram utilizados diferentes fechamentos dos tubos de ensaio. Na casa de vegetação as plantas foram transferidas para copos plásticos, contendo terra vegetal, sendo cobertas com garrafas tipo *pet* com tampa, depois de três dias as tampas foram desenroscadas, no décimo retiradas e no vigésimo primeiro dia as garrafas foram retiradas totalmente. Para o experimento de indução de calos embriogênicos, utilizou-se segmentos de folhas sob diferentes concentrações de 2,4-D e KIN, foi determinada a curva de crescimento a partir da matéria fresca dos calos até o 90º dia de cultivo, em intervalos de nove dias. Os carboidratos foram identificados e quantificados em HPLC. Para os estudos histológicos, as amostras foram fixadas FAA 70% e preparadas para análise em microscopia óptica, com emblocamento em historesina. As secções histológicas foram coradas com azul de toluidina (1%). Para conservação *in vitro* foram realizados dois experimentos: 1 – utilizou-se os retardantes vegetais: ancimidol ou paclobutrazol (0,0; 0,85; 1,7; 3,4 e 6,8µM) e 2 – avaliou-se diferentes agentes osmóticos (sacarose - Sac, manitol - Man e sorbitol - Sor) e diferentes concentrações (87,64; 131,46;

176,28; 219,10 e 262,92mM). Os agentes osmóticos manitol e sorbitol foram utilizados combinados com a sacarose. A germinação *in vitro* de *M. leucocephalus* deve ser realizada em meio de cultura MS $\frac{1}{2}$; a esterilização química é um método eficiente para o cultivo *in vitro* das duas espécies objeto de estudo desse trabalho; o meio de cultura MS é o mais indicado para o cultivo *in vitro* de *M. leucocephalus* e pode ser utilizado é 60mL de meio em frascos de 500mL. Apenas o segmento nodal apresentou resposta morfogênética, sendo que as citocininas promoveram baixa taxa de multiplicação. A multiplicação dos brotos pode ser realizada com 1,34 μ M de ANA, a partir de segmento nodal, a sacarose deve ser mantida como a melhor fonte de carbono para a morfogênese de *M. leucocephalus*, visto que, as fontes de carbonos alternativas de acordo as variáveis analisadas não superam a sacarose quanto à multiplicação dos brotos. Na organogênese a partir de folha com pecíolo, este mostrou potencial organogênico, porém é necessário testar outros meios de cultura de forma a favorecer maior regeneração dos explantes. As mudas obtidas podem ser aclimatizadas sem a necessidade de passar pelo processo de rustificação. Calos embriogênicos foram induzidos com 1 μ M de 2,4-D + 0,5 μ M de KIN, foi possível identificar as cinco fases de crescimento dos calos, durante o período de incubação dos calos embriogênicos, identificou-se três carboidratos: glicose, frutose e sacarose. Aos nove dias de incubação verificou-se a presença de embriões globulares, cuja ontogenia ocorreu a partir do sistema vascular e detectou-se o maior teor de glicose aos 9 e 18 dias de incubação. O ancimidol e o paclobutrazol promoveram decréscimos no crescimento das plantas, contudo a taxa de sobrevivência aos 240 dias foi inferior aos resultados obtidos com os agentes osmóticos. A conservação *in vitro* de *M. leucocephalus* pode ser realizada em meio de cultura suplementado com 43,82mM Sac + 43,82mM Man ou 65,73mM Sac + 65,73mM Man, uma vez que estes tratamentos promoveram taxa de sobrevivência em torno de 80%, além de reduzir o comprimento de parte aérea, número de folhas, número de folhas senescentes e promoveu ganho na matéria seca de parte aérea.

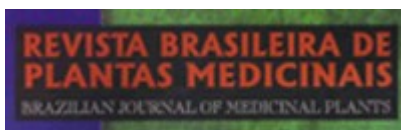
GENERAL ABSTRACT

Martianthus leucocephalus (Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore (Lamiaceae) is an aromatic medicinal specie, endemic to the semiarid Northeast, has economic importance due to their pharmacological potential. This work aimed to study the in vitro propagation of the specie *Martianthus leucocephalus* developing a protocol for in vitro micropropagation and conservation, allowing the establishment of strategies for their conservation and sustainable. In vitro establishment were carried out: 1 - test of different culture media (MS, MS ½, WPM, Agar and Paper *germtest*) in vitro germination; 2 - test of different medium culture (MS, MS ½ and WPM) on growth In vitro and 3 – assesment of different volumes of culture medium (in 500mL flasks) on in vitro growth of *M. leucocephalus*. In the process of morphogenesis in vitro, test: 1 - different types of explants (leaf segment, segment internodal and nodal) associated with different cytokinins (BAP, KIN and TDZ) 2 - combination of different concentrations of BAP and NAA; 3 - different explants at this position as the starting material, 4 - carbon sources (sucrose, maltose, fructose, lactose and glucose); 5 - organogenic potential from petioles sheets subjected to different cytokinins (KIN, BAP , TDZ and ZEA). For acclimatization, the plants have undergone a hardening process, which were used in various closures for tubes. In the greenhouse, plants were transferred to plastic cups containing potting soil, being covered with type pet bottles with lids, three days after the covers were desenroscadas, taken in the tenth and twenty-first day the bottles were removed completely. For the experiment of induction of somatic embryogenesis, we used segments of leaves under different concentrations of 2,4-D and KIN was determined from the growth curve of the fresh callus until the 90th day of culture at intervals of nine days. Carbohydrates were identified and quantified by HPLC. For histological studies, samples were fixed 70% FAA and prepared for analysis by optical microscope, with embedment in historesin. Histological sections were stained with toluidine blue (1%). For in vitro conservation Two experiments were conducted: 1 - we used the plant growth: ancymidol or paclobutrazol (0.0, 0.85, 1.7, 3.4 and 6.8 µM) and 2 - was evaluated different agents osmotic (sucrose - Sac, mannitol - Man and sorbitol - Sor) and different concentrations (87.64, 131.46, 176.28, 219.10 and 262.92 mM). Osmotic agents mannitol and sorbitol were used in combination with sucrose. The in vitro

germination of *M. leucocephalus* should be performed in culture medium MS^{1/2}; chemical sterilization is an effective method for the in vitro culture of two species object of study of this work, the MS medium is the most suitable for the in vitro culture of *M. leucocephalus* and can be used is 60mL of medium in 500 ml flasks. Only the nodal segment showed morphogenetic response, and cytokinins promoted low rate of multiplication. The multiplication of shoots can be performed with 1.34 μ M of ANA from nodal segment, sucrose should be maintained as the best carbon source for the morphogenesis of *M. leucocephalus*, since the alternative carbon sources according to variables not outweigh sucrose as the multiplication of shoots. Organogenesis from leaf petiole with this potential organogenic shown, but it is necessary to test other culture media to favor higher regeneration of explants. The seedlings can be acclimatized without having to go through the process of hardening. Embryogenic calli were induced with 1 μ M 2,4-D + 0.5 μ M KIN, it was possible to identify the five stages of callus growth during the incubation period of embryogenic calli identified three carbohydrates: glucose, fructose and sucrose . At nine days incubation verified the presence of globular embryos whose ontogeny occurred from the vascular system and detected the greatest glucose content at 9 and 18 days of incubation. The paclobutrazol and ancymidol promoted decrease in plant growth, however the rate of survival at 240 days was below the results obtained with the osmotic agents. The conservation in vitro *M. leucocephalus* can be carried out in culture medium supplemented with Sac + 43.82 43.82 mM mM mM Man or Sac + 65.73 65.73 mM Man, since these treatments promoted survival rate of approximately 80%, while reducing the length of shoots, number of leaves, number of senescent leaves and promoted gain in dry matter of the shoot.

APÊNDICES

Instruções para publicação.



INSTRUÇÕES AOS AUTORES

ISSN 1516-0572 *versão impressa*
 ISSN 1983-084X *versão on-line*

- [Escopo e política](#)
- [Forma e preparação de manuscritos](#)
- [Envio de manuscritos](#)

Escopo e política

Trabalhos científicos originais, revisões bibliográficas e notas prévias, que deverão ser inéditos e contemplar as grandes áreas relativas ao estudo de plantas medicinais, tais como, Anatomia e Morfologia Vegetal; Bioensaios; Biotecnologia; Conservação de Recursos Genéticos; Ecofisiologia; Etnobotânica; Etnofarmacologia; Farmacognosia; Farmacologia; Fisiologia Vegetal; Fitoquímica; Fitotecnia; Fitoterapia, Tecnologia de Alimentos e uso de plantas medicinais na Medicina Veterinária.

Os manuscritos são analisados por pelo menos dois pareceristas, segundo roteiro de análise, baseado principalmente no conteúdo científico. Os pareceristas recomendarão a aceitação, com ou sem necessidade de retornar; recusa ou sugerir reformulações, que neste caso, o artigo reformulado retornará aos pareceristas para avaliação final. Quando no mínimo 2 pareceristas aprovarem, sem necessidade de retornar, o artigo estará pronto para ser publicado. Os nomes dos pareceristas permanecerão em sigilo, omitindo-se também perante estes os nomes dos autores. Manuscritos que envolvam ensaios clínicos deverão vir acompanhados de autorização de Comissão de Ética constituída, para realização dos experimentos. **Observação:** São de exclusiva responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos. Contudo, reserva-se ao Conselho Editorial, o direito de sugerir ou solicitar modificações que julgarem necessárias.

Forma e preparação de manuscritos

Ensaio Clínicos

Os artigos podem ser redigidos em português, inglês ou

espanhol, sendo sempre obrigatória a apresentação do resumo em português e em inglês, independente do idioma utilizado. Utilizar letra Arial 12, espaço duplo, margens de 2 cm, em Word for Windows. Artigos muito extensos, fotografias e gráficos coloridos podem ser publicados, a critério do Corpo Editorial, se o autor se comprometer, mediante entendimentos prévios, a cobrir parte das despesas de publicação. No e-mail, enviar telefone para contatos mais urgentes.

REVISÕES BIBLIOGRÁFICAS E NOTAS PRÉVIAS

Revisões e Notas prévias deverão ser organizadas basicamente em: Título, Autores, Resumo, Palavras-chave, Abstract, Key words, Texto, Agradecimento (se houver) e Referência.

ARTIGO

CIENTÍFICO

Os artigos deverão ser organizados em: **TÍTULO:** Deverá ser claro e conciso, escrito apenas com a inicial maiúscula, negrito, centralizado, na parte superior da página. Se houver subtítulo, deverá ser em seguida ao título, em minúscula, podendo ser precedido de um número de ordem em algarismo romano. Os nomes comuns das plantas medicinais devem ser seguidos pelo nome científico entre parênteses, verificado em www.tropicos.org e www.ipni.org.

AUTORES: Começar pelo último sobrenome dos autores por extenso (nomes intermediários somente iniciais, sem espaço entre elas) em letras maiúsculas, negrito e 2 linhas abaixo do título. Após o nome de cada autor deverá ser colocado um número sobrescrito que deverá corresponder instituição e endereço (CEP: cidade-país). Indicar o autor que deverá receber a correspondência, com e-mail. Os autores devem ser separados com ponto e vírgula.

RESUMO: Deverá constar da mesma página onde estão o título e os autores, duas linhas abaixo dos autores. O resumo deverá ser escrito em um único parágrafo, contendo objetivo, resumo do material e método, principais resultados e conclusão. Não deverá apresentar citação bibliográfica.

Palavras-chave: Deverão ser colocadas uma linha abaixo do resumo, na margem esquerda, podendo constar até cinco palavras, separadas com vírgula.

ABSTRACT: Apresentar o título e resumo em inglês, no mesmo formato do redigido em português, com exceção do título, em negrito, apenas com a inicial em maiúscula, que virá após a palavra **ABSTRACT**.

Keywords: Abaixo do abstract deverão ser colocadas as

palavras-chave em inglês, podendo constar até cinco palavras, separadas com vírgula.

INTRODUÇÃO: Na introdução deverá constar breve revisão de literatura e os objetivos do trabalho. As citações de autores no texto deverão ser feitas de acordo com os seguintes exemplos: Silva (1996); Pereira & Antunes (1985); (Souza & Silva, 1986) ou quando houver mais de dois autores Santos et al. (1996).

MATERIAL E MÉTODO: Deverá ser feita apresentação completa das técnicas originais empregadas ou com referências de trabalhos anteriores que as descrevam. As análises estatísticas deverão ser igualmente referenciadas. Na metodologia deverão constar os seguintes dados da espécie estudada: nome científico com autor; nome do herbário onde a excicata está depositada e o respectivo número (*Voucher Number*).

RESULTADO E DISCUSSÃO: Poderão ser apresentados separados ou como um só capítulo, podendo conter no final conclusão sumarizada.

AGRADECIMENTO: deverá ser colocado neste capítulo (quando houver).

REFERÊNCIA: As referências devem seguir os exemplos:

Periódicos:

AUTOR(ES) separados por ponto e vírgula, sem espaço entre as iniciais. Título do artigo. **Nome da Revista, por extenso**, volume, número, página inicial-página final, ano. KAWAGISHI, H. et al. Fractionation and antitumor activity of the water-insoluble residue of *Agaricus blazei* fruiting bodies. **Carbohydrate Research**, v.186, n.2, p.267-73, 1989.

Livros

AUTOR. **Título do livro**. Edição. Local de publicação: Editora, Ano. Total de páginas. MURRIA, R.D.H.; MÉNDEZ, J.; BROWN, S.A. **The natural coumarins: occurrence, chemistry and biochemistry**. 3.ed. Chinchester: John Wiley & Sons, 1982. 702p.

Capítulos de livros:
 AUTOR(ES) DO CAPÍTULO. **Título do Capítulo**. In: AUTOR (ES) do LIVRO. Título do livro: subtítulo. Edição. Local de Publicação: Editora, ano, página inicial-página final. HUFFAKER, R.C. Protein metabolism. In: STEWARD, F.C. (Ed.). **Plant physiology: a treatise**. Orlando: Academic Press,

1983. p.267-33.

Tese ou Dissertação:
 AUTOR. **Título em destaque:** subtítulo. Ano. Total de páginas. Categoria (grau e área de concentração) - Instituição, Universidade, Local.
 OLIVEIRA, A.F.M. **Caracterização de Acanthaceae medicinais conhecidas como anador no nordeste do Brasil.** 1995. 125p. Dissertação (Mestrado - Área de Concentração em Botânica) - Departamento de Botânica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

Trabalho de Evento:
 AUTOR(ES). Título do trabalho. In: Nome do evento em caixa alta, número, ano, local. **Tipo de publicação em destaque...** Local: Editora, ano. página inicial-página final.
 VIEIRA, R.F.; MARTINS, M.V.M. Estudos etnobotânicos de espécies medicinais de uso popular no Cerrado. In: INTERNATIONAL SAVANNA SYMPOSIUM, 3., 1996, Brasília. **Proceedings...** Brasília: Embrapa, 1996. p.169-71.

Publicação Eletrônica:
 AUTOR(ES). Título do artigo. **Título do periódico em destaque,** volume, número, página inicial-página final, ano. Local: editora, ano. Páginas. Disponível em: <<http://www.....>>. Acesso em: dia mês (abreviado) ano.
 PEREIRA, R.S. et al. Atividade antibacteriana de óleos essenciais em cepas isoladas de infecção urinária. **Revista de Saúde Pública**, v.38, n.2, p.326-8, 2004. Disponível em: <<http://www.scielo.br>>. Acesso em: 18 abr. 2005.

Não citar resumos e relatórios de pesquisa a não ser que a informação seja muito importante e não tenha sido publicada de outra forma. Comunicações pessoais devem ser colocadas no rodapé da página onde aparecem no texto e evitadas se possível. Devem ser, também, evitadas citações do tipo Almeida (1994) citado por Souza (1997).

TABELAS: Devem ser inseridas no texto, com letra do tipo Arial 10, espaço simples. A palavra TABELA (Arial 12) deve ser em letras maiúsculas, seguidas por algarismo arábico, quando citadas no texto devem ser em letras minúsculas (Tabela). O título da Tabela em Arial 12 e os dados em Arial 10.

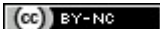
FIGURAS: As ilustrações (gráficas, fotográficas, desenhos, mapas) devem ser em letras maiúsculas seguidas por algarismo arábico, Arial 12, inseridas no texto. Quando citadas no texto devem ser em letras minúsculas (Figura). As legendas e eixos devem ser em Arial 10, enviadas em arquivos separados, com

resolução 300 DPI, 800 x 600, com extensão JPEG, para impressão de publicação.

Envio de manuscritos

Os artigos devem ser enviados por e-mail: rbpm@ibb.unesp.br

[\[Home\]](#) [\[Sobre a revista\]](#) [\[Corpo editorial\]](#) [\[Assinaturas\]](#)

 Todo o conteúdo do periódico, exceto onde está identificado, está licenciado sob uma [Licença Creative Commons](#)

Instituto de Biociências - UNESP 18610-307

CEP 18.618.000 Botucatu SP Brasil

Tel.: 55 14 3811-6559

Fax: 55 14 3815-3744



rbpm@ibb.unesp.br