



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA**  
**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS**  
**GENÉTICOS VEGETAIS**



**FLÁVIA PEREIRA DE SOUSA**

**MICROPROPAGAÇÃO DE *Hyptis ramosa* Pohl ex Benth.**  
**(LAMIACEAE)**

Feira de Santana - BA  
2015

**FLÁVIA PEREIRA DE SOUSA**

**MICROPROPAGAÇÃO DE *Hyptis ramosa* Pohl ex Benth.  
(LAMIACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador: Prof<sup>o</sup> Dr. Lenaldo Muniz de Oliveira.

Feira de Santana- BA

2015

**Ficha Catalográfica – Biblioteca Central Julieta Carteado**

Sousa, Flávia Pereira de

S696m Micropropagação de *Hyptis ramosa* Pohl ex Benth. (Lamiaceae) /

Flávia Pereira de Sousa. – Feira de Santana, 2015.

64 f. : il.

Orientador: Lenaldo Muniz de Oliveira.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Feira de Santana,  
Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, 2015.

1. *Hyptis ramosa* – Cultivo *in vitro*. 2. Planta medicinal. I. Oliveira,  
Lenaldo Muniz de, orient. II. Universidade Estadual de Feira de  
Santana. III. Título.

CDU: 582.949.2

*Aos meus pais pelo grande amor e companheirismo dedicados a mim no decorrer do  
mestrado.*

**Dedico**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família (meus pais Arnaldo e Adriana e minhas irmãs Rafaela e Daniela) por todo o amor, carinho e compreensão.

Ao senhor Dr. Daisaku Ikeda pelas belas palavras de incentivo dentre as quais a que mais gosto é: “Forte é quem mesmo numa situação difícil, decide lutar e cumprir sua missão aqui e agora. Esta é a chave - ser corajoso e enfrentar a vida. Isso é budismo, é lutar até vencer!”.

Aos meus colegas de curso pela amizade e convivência, em especial em especial a Luma Passos, Maiane Neves, Marcelo Araújo, Tamara Tanan, Kamilla Marcelino e Rita Mércia, os quais me incentivaram a todo momento.

As minhas lindas companheiras de laboratório por todo o carinho, amor, compreensão, parceria, ensinamentos nos momentos felizes e tristes, só tenho que agradecer muitíssimo a todas vocês Tecla Silva, Jéssica Vasconcelos, Andressa Piancó, Barbara Borges, Emile Lemos e Francisca Sá.

Aos professores da Universidade Estadual de Feira de Santana, por fazerem parte do meu convívio durante esses anos e por me ensinarem grandes lições. Em especial, a Professora Marilza Neves do Nascimento, por todos os ensinamentos e pelos seus conselhos valiosos dados a mim no decorrer da realização do meu curso.

Ao meu orientador, Professor Dr. Lenaldo Muniz de Oliveira, pelo exímio profissionalismo e atenção.

Aos funcionários do Horto Florestal pela receptividade e atenção nesses anos todos, em especial a dona Maria por sempre me receber com um sorriso no rosto e a Alone Lima Brito pelas palavras de incentivo e amizade.

A CAPES pela concessão da bolsa.

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

Obrigada!

*'O futuro existe, sim na determinação interior de cada um. Ele não será um mar de rosas se não houver esforço, será somente uma ilusão'. Daisaku Ikeda*

## RESUMO

*Hyptis ramosa* Pohl ex Benth (Lamiaceae) é uma espécie nativa e endêmica do semiárido nordestino, sendo sua constituição fitoquímica desconhecida até o momento. Considerando a importância farmacológica das espécies dessa família, o desenvolvimento de formas de propagação e cultivo *in vitro* poderá contribuir para a inserção dessas espécies em sistemas de produção sustentáveis e a conservação das mesmas. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi estudar a propagação *in vitro* da espécie *H. ramosa*, através de organogênese direta e calogênese, bem como a caracterização bioquímica dos calos obtidos, permitindo assim o estabelecimento de estratégias para a sua conservação e exploração sustentável. Para isso, sementes de *H. ramosa* foram desinfestadas e estabelecidas em meio de cultura MS/2. Na fase de multiplicação foi testada a influência das citocininas BAP, CIN e TDZ sobre diferentes explantes. As brotações obtidas foram individualizadas e transferidas para meio MS/2 contendo diferentes concentrações da auxina AIB e de carvão ativo para o enraizamento das mesmas. As microplantas regeneradas e enraizadas *in vitro* foram submetidas à pré-aclimatização em diferentes tipos de fechamento do recipiente de cultivo e, posteriormente, foram transferidas para a condição *ex vitro* em substrato comercial Plantmax®, sendo quantificada a taxa de sobrevivência das plantas aos 30 dias após a transferência. Para a indução de calos utilizou-se diferentes explantes e concentrações de 2,4-D e BAP, determinando-se a curva de crescimento a partir da matéria fresca dos calos até o 28º dia de cultivo, em intervalos de sete dias. Concomitante com a obtenção da curva de crescimento quantificou-se nos calos obtidos o teor de açúcares solúveis totais, açúcares redutores e proteína bruta. A propagação *in vitro* de *H. ramosa* é possível utilizando-se o segmento nodal como fonte de explante, em meio de cultura MS suplementado com BAP. O enraizamento *in vitro* ocorre, mesmo em meio isento de auxina. A espécie apresentou sobrevivência de 100%, independentemente da realização da fase de pré-aclimatização. Para indução de calos o melhor explante é o segmento nodal, sendo a combinação de 2,4-D e BAP favorável a formação dos mesmos. A curva de crescimento de calos mostrou comportamento quadrático com duas fases distintas e a análise bioquímica evidenciou o teor máximo de açúcares solúveis totais, açúcares redutores e proteína bruta aos 14º, 21º e 14º dias, respectivamente.

**Palavras-chave:** Plantas medicinais e Aromáticas; Cultivo *in vitro*; Reguladores vegetais; Organogênese direta; Calogênese.

## ABSTRACT

*Hyptis ramosa* Pohl ex Benth (Lamiaceae) is native and endemic to the semi-arid northeast, with its unknown phytochemical constitution so far. Considering the pharmacological importance of the species of this family, the development of forms of propagation and in vitro culture can contribute to the inclusion of these species in sustainable production systems and the conservation of the same. Thus, the objective of this work was to study the in vitro propagation of the species *H. ramosa*, through direct organogenesis and callus formation, and the biochemical characterization of the obtained calluses, thus allowing the establishment of strategies for their conservation and sustainable use. To this, *H. ramosa* seeds were disinfected and established in medium MS / 2 culture. In the multiplication phase was tested the influence of cytokinins BAP, CIN and TDZ on different explants. The obtained shoots were individualized and transferred to MS / 2 medium containing different concentrations of auxin IBA and activated carbon for rooting them. Regenerated and rooted in vitro microplants were subjected to pre-acclimatization in different cultivation container closure and then were transferred to ex vitro conditions in commercial substrate Plantmax® being quantified plant survival rate at 30 days after transfer. For callus induction, we used explants and different concentrations of 2,4-D and BAP, determining the growth curve from the fresh weight of callus until the 28th day of cultivation, at intervals of seven days. Concurrent with obtaining the growth curve it is quantified in calluses obtained the total soluble sugar content, reducing sugar and crude protein. The in vitro propagation of *H. ramosa* is possible using the nodal segment as a source of explants in MS medium supplemented with BAP. In vitro rooting occurs, even in free auxin. The species showed survival of 100%, regardless of the day of pre-acclimatization phase. For callus induction the best explant is the nodal segment, and the combination of 2,4-D and BAP favor the formation of the same. The callus growth curve showed quadratic behavior with two different phases and biochemical analysis showed the maximum level of total soluble sugars, reducing sugars and crude protein at 14 °, 21 ° and 14 ° days, respectively.

**Key-words:** Medicinal and Aromatic Plants; *In vitro* culture; Plant growth regulators; Direct organogenesis; Callogensis.



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b>	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>3</b>
2.1 Flora Medicinal do Semiárido	3
2.2 O Gênero <i>Hyptis</i>	5
2.3 Cultura de Tecidos Vegetais	7
<b>CAPITULO 1</b>	<b>16</b>
<b>ORGANOGENESE DIRETA DE <i>Hyptis ramosa</i> Pohl ex Benth. (LAMIACEAE)</b>	<b>16</b>
<b>RESUMO</b>	<b>17</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>18</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>19</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>21</b>
2.1 Obtenção e identificação do material vegetal	21
2.2 Estabelecimento <i>in vitro</i>	21
2.3 Multiplicação <i>in vitro</i>	21
2.4 Enraizamento <i>in vitro</i>	22
2.5 Aclimatização	22
2.6 Análise estatística	23
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>23</b>
<b>4 CONCLUSÕES</b>	<b>31</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>31</b>
<b>CAPITULO 2</b>	<b>35</b>

<b>INDUÇÃO E ANÁLISE BIOQUÍMICA DE CALOS DE <i>Hyptis ramosa</i> Pohl ex Benth.</b>	<b>35</b>
<b>RESUMO</b>	<b>36</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>37</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>38</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>39</b>
2.1 Local de realização dos experimentos	39
2.2 Indução de calos	40
2.3 Obtenção da curva de crescimento dos calos	40
2.4 Análises bioquímicas	40
2.5 Análise estatística	41
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>41</b>
<b>4 CONCLUSÕES</b>	<b>47</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>48</b>
<b>APÊNDICES</b>	<b>51</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é o país que detém a maior biodiversidade genética vegetal do planeta, abrangendo mais de 55 mil espécies, equivalendo a 25% de todas as espécies vegetais conhecidas em nível mundial (GUERRA; NODARI, 2001). Fazendo parte dessa riqueza, encontramos milhares de espécies com potencial medicinal, devido ao amplo número de moléculas bioativas, que representam fonte de saúde e renda para muitas populações locais. Apesar de toda essa biodiversidade vegetal catalogada, para a maioria das plantas medicinais nativas do Brasil ainda não se tem estudos científicos visando sua utilização como fonte de recursos terapêuticos e renda (FOGLIO et al., 2006).

Dentre essas espécies nativas brasileiras pouco estudadas destacam-se às pertencentes ao gênero *Hyptis* (Lamiaceae). As espécies desse gênero possuem amplo potencial fitoquímico, com propriedades terapêuticas comprovadas devido à presença de óleos essenciais aromáticos e diversos compostos fixos (FALCÃO; MENEZES, 2003) e, mesmo conhecendo-se a riqueza de biomoléculas desse gênero e considerando que muitas de suas espécies se encontram ameaçadas ou em risco de extinção, boa parte delas sequer foram estudadas sob aspectos botânicos, farmacológicos ou agrônômicos.

A exploração do potencial medicinal dessas espécies depende do desenvolvimento de sistemas de cultivo, que permitam a exploração racional e sustentável desses recursos. Para tanto, o desenvolvimento de métodos adequados de propagação representa o primeiro passo, sobretudo para espécies nativas e ainda não domesticadas. A propagação *in vitro* ou micropropagação tem sido uma técnica utilizada para a multiplicação de diversas espécies medicinais, em virtude de suas várias vantagens, como a rápida multiplicação a partir de pequena quantidade de material vegetal e/ou sementes, manutenção das características genéticas dos acessos ou cultivares, geração de mudas saudáveis, dentre outras (FERNANDES, 2008). Para espécies nativas, a propagação *in vitro* poderá contornar ainda algumas dificuldades inerentes à reprodução natural das espécies, como a baixa taxa de germinação e a dormência das sementes, além de reduzir o impacto ambiental devido à coleta de sementes e plantas no ambiente natural (SABÁ et al., 2002).

Adicionalmente, levando em consideração a ameaça de extinção a qual estão submetidas algumas espécies vegetais, tornam-se necessário o desenvolvimento de técnicas que contribuam para a conservação das mesmas. Para isso, o estabelecimento de protocolos de micropropagação é essencial, pois permitirá o aumento rápido do número de plantas,

possibilitando o cultivo da espécie, além de contribuir para o desenvolvimento de protocolos de conservação *in vitro*, essenciais para a salvaguarda de espécies ameaçadas.

Por fim, ressalta-se que até o momento não existem relatos sobre a propagação *in vitro* de *Hyptis ramosa*, demonstrando a necessidade de estudos com a espécie. Os estudos nessa área contribuirão para a ampliação da base de conhecimentos sobre a espécie, o que viabilizará o desenvolvimento de estratégias para a sua preservação e exploração de forma sustentável. Assim, este trabalho teve como objetivo estudar a propagação *in vitro* da espécie *Hyptis ramosa*, através de organogênese direta e calogênese, bem como a caracterização bioquímica dos calos obtidos.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Flora Medicinal do Semiárido

O Semiárido brasileiro ocupa uma extensão territorial de aproximadamente 970 km<sup>2</sup> abrangendo os Estados do Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Alagoas, Sergipe, Bahia e Minas Gerais (BRASIL, 2005). É caracterizado tanto pela irregularidade das precipitações pluviométricas, que variam de 400 a 800 mm anuais e longos períodos de estiagem, quanto pelas altas temperaturas, com médias anuais situadas na faixa de 23 a 27°C (BRASIL, 2009). Apresenta formações vegetacionais como a Caatinga, Cerrado, Florestas (estacionais e serranas), Campos Rupestres e Brejos (GIULIETTI et al., 2006).

Apesar de abrigar formações vegetacionais complexas, o Bioma Caatinga é predominante na região semiárida, sendo considerado o único exclusivamente brasileiro, ocupando cerca de 11% do território nacional (MMA, 2003). Sua vegetação é constituída por arbustos e arvoredos, abrangendo espécies de grande valor científico, como aroeira (*Astronium urundeuva* (Fr. & All.) Engl.), baracena (*Schinopsis brasiliensis* Engl.), faveleira (*Cnidoscolus quercifolius* Pohl), maniçoba (*Manihot glaziovii* Muell. Arg.), maracujá-do-mato (*Passiflora cincinnata* Mast.), mororó (*Bauhinia variegata* L.), quixabeira (*Bumelia sartorum* Mart.), umburana (*Amburana cearenses* (Allemão) A. C. Smith), umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arruda), entre outras; distinguíveis das demais espécies pela rusticidade e tolerância à salinidade, ao estresse hídrico e às altas temperaturas (MOURA et al., 2007).

A maioria das espécies nativas do bioma Caatinga apresenta ampla utilização na medicina popular, sendo esta utilização, muitas vezes, a principal ou até mesmo a única alternativa acessível no tratamento de doenças por parte das populações locais, devido ao fato de que muitas das comunidades desta região são economicamente carentes e não são atendidas por programas públicos de atenção básica à saúde (SAMPAIO, 2002). A diversidade de plantas medicinais existentes no semiárido, descrita em levantamentos etnofarmacológicos regionais, revela grande riqueza de espécies utilizadas popularmente para os mais diversos fins (MATOS, 1998; JÚNIOR et al., 2005; AGRA et al., 2007).

Dentre os vários levantamentos de plantas medicinais realizados em diferentes localidades da região semiárida, destaca-se o levantamento de plantas medicinais do Município de Assaréno, Estado do Ceará, em que Ribeiro et al. (2014) catalogaram 116 espécies pertencentes a 103 gêneros e 58 famílias. Esse número de espécies encontrado é

bastante expressivo quando comparado a outros levantamentos realizados em diferentes áreas da caatinga, em que o número de espécies variou de 57 a 119 (MORAIS et al., 2005, ALMEIDA et al. 2005, SILVA et al. 2006, ALBUQUERQUE; OLIVEIRA, 2007, CARTAXO et al., 2010, ROQUE et al., 2010, OLIVEIRA et al., 2010, MARINHO et al., 2011).

Segundo Ribeiro et al. (2014), as famílias mais representativas encontradas neste levantamento foram Fabaceae (10spp.), seguida de Asteraceae (7spp.) e Lamiaceae (6spp.). Ainda de acordo com os mesmos autores, essas famílias também foram citadas em outros estudos desenvolvidos em áreas de caatinga, tais como nos trabalhos de Albuquerque et al., 2005; Almeida et al., 2006; Agra et al., 2007; Mosca; Loiola, 2009 e Roque et al., 2010. Nesses estudos percebe-se que 66 diferentes espécies são utilizadas para o tratamento de mais de um tipo doença, enquanto 50 apresentam uma única utilidade. Dentre as enfermidades mais citadas tem-se, dores em geral, tosse e inflamações uterinas (RIBEIRO et al., 2014).

Apesar do grande potencial das espécies medicinais do semiárido, a principal forma de exploração de plantas da região tem sido, em sua grande maioria, por meio do extrativismo, realizado ao longo do tempo e sem nenhuma orientação a respeito do manejo e dos limites de coleta (SOUZA et al., 2013). O principal problema da prática extrativista é o risco de extinção das espécies coletadas (REIS; MARIOT, 1999; MARTINS et al., 2001) e, conseqüentemente, a perda de genes que codificam substâncias que poderão trazer a cura de muitos males da sociedade e com utilização potencial no melhoramento vegetal de espécies cultivadas e de estudos biossintéticos de novos produtos naturais. Uma possível solução para esse problema seria a exploração racional da diversidade vegetal, visto que a mesma é uma importante fonte de novos produtos para a humanidade (BOLZANI, 2001).

Em virtude do potencial medicinal e econômico desses recursos, bem como a importância da conservação de plantas nativas, a busca por trabalhos científicos que visem à identificação de compostos biologicamente ativos e que assegurem a eficácia das plantas medicinais utilizadas no semiárido vem se intensificando cada vez mais, logo, pesquisas que estabeleçam práticas agronômicas adequadas e possibilitem o cultivo e exploração destas espécies de forma sustentável trarão uma grande contribuição ao estudo e exploração dessas espécies.

## 2.2 O Gênero *Hyptis*

*Hyptis* Jacq. (Lamiaceae) pertence à subfamília Nepetoidea, sendo composto por aproximadamente 400 espécies, distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais desde os Estados Unidos até a Argentina (WILLIS, 1973; JUDD et al., 2009; SILVA- LUZ et al., 2012). Para o Brasil é registrado a ocorrência de 118 espécies, dentre elas 78 são endêmicas, sendo distribuídas em todas as regiões do país (HARLEY et al., 2015). As espécies de *Hyptis* em sua maioria são encontradas no Cerrado e raramente em áreas úmidas (SILVA- LUZ et al., 2012). Na região da Caatinga existem oito espécies que são endêmicas: *H. calida* Mart.; *H. leptostachys* ssp. *caatingae* Epling.; *H. leucocephala* Mart. ex Benth.; *H. martiussi* Benth.; *H. pinheiroi* Harley; *H. platanifolia* Mart. ex Benth.; *H. simulans* Epling e *H. viaticum* Harley (SAMPAIO et al., 2002).

A importância de *Hyptis* abrange diversas áreas do conhecimento, como ênfase na química e farmacológica, devido à produção de uma gama de classes de micromoléculas descritas, como triterpenos e flavonoides (PEREDA-MIRANDA; DELGADO, 1990), diterpenos com esqueleto do tipo labdano (OHSAKI et al., 2005) e esqueleto do tipo abietano (ARAÚJO et al., 2004; COSTA-LOTUFO et al., 2008; CHUKWUJEKWUA et al., 2005; URONES et al. 1998), lignanas e derivados  $\alpha$ -pirânicos (DENG et al. 2009; PEREDA- MIRANDA et al. 1993), além dos alcaloides (KUHNT et al., 1994). Contudo, a maior importância econômica do gênero é decorrente do elevado teor de óleos essenciais aromáticos em seus tecidos, que são utilizados pelas indústrias de cosméticos, alimentos e, mais recentemente, de medicamentos, sendo usados ainda como condimentos, apreciados pelo aroma e sabor que conferem aos alimentos, os quais possuem as mais diversas propriedades (PEREDA-MIRANDA; DELGADO, 1990; PEREDA-MIRANDA et al., 1993).

O uso das espécies de *Hyptis* para fins terapêuticos ocorre em diferentes países, além do Brasil, como México, Índia, China, Equador, Tailândia, Caribe, Panamá, Norte da Nigéria e em outras localidades da África (FALCÃO; MENEZES, 2003). A maioria desses usos medicinais tem encontrado respaldo na literatura, pois para as plantas desse gênero inúmeras atividades biológicas já foram comprovadas, como antiulcerogênica (BARBOSA; RAMOS, 1992), antibacteriana (SOUZA et al, 2003), antifúngica (OLIVEIRA et al, 2004), larvicida contra às larvas de *Aedes aegypti* (COSTA et al., 2005), antidepressiva (BUENO et al, 2006) e antinociceptiva (SILVA et al., 2006), comprovando e justificando a importância desse gênero como fonte de compostos bioativos, bem como a sua relevância farmacológica.

Dentre as espécies de *Hyptis* usadas para fins medicinais destacam-se *H. albida* Kunth., com propriedades antissépticas (FALCÃO; MENEZES, 2003); *H. capitata* Jacq, usada no combate a resfriados, febre e asma; *H. mutabilis* (Rich.) Briq., usada no tratamento de desordens gastrointestinais e malária; *H. verticillata* Jacq, com propriedades anti-infecciosas, antihelmíntica e expectorante, e *H. pectinata* com propriedade antibacteriana e anti-micótica (KUHNT et al., 1994).

A espécie *Hyptis ramosa* Pohl ex Benth é um arbusto, com caule ereto, ramosíssimo, folhas ovato-oblongas e sementes pequenas com diâmetro de aproximadamente 1mm (FIGURA 1). Essa espécie é nativa e endêmica do Brasil, distribuída nos estados da Bahia, Espírito Santo e Minas Gerais (HARLEY et al., 2015). Faz parte da vegetação natural dos campos rupestres da Chapada Diamantina, com ocorrência nas margens de riachos ou em locais sujeitos a alagamentos. Para esta espécie, até a presente data não há registro de estudos etnofarmacológicos, farmacológicos ou agronômicos.



FONTE: SOUSA, F.P (2015)

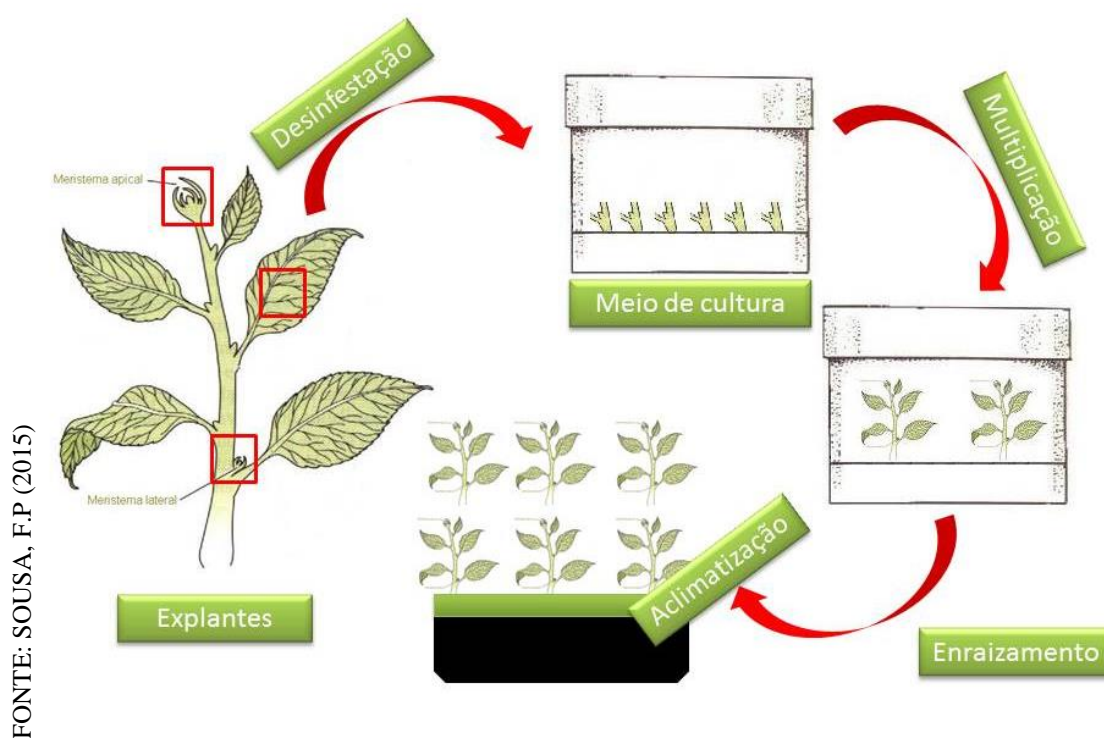
**FIGURA 1:** Planta adulta de *Hyptis ramosa* Pohl ex Benth (A) cultivada na Unidade Experimental Horto Florestal da UEFS; Aspecto da folha (B); Sementes (C). Barras A e B= 1cm e c=1mm UEFS, Feira de Santana/BA, 2015.



## 2.3 Cultura de Tecidos Vegetais

A cultura de tecidos vegetais é um conjunto de técnicas que apresenta grande aplicabilidade em sistemas vegetais e, dentre as suas técnicas, destaca-se a micropropagação, que é considerada uma de suas aplicações mais práticas. A micropropagação consiste basicamente em cultivar em ambiente asséptico, com temperatura e iluminação controlada, qualquer parte da planta, em frascos específicos contendo meio nutritivo adequado, o que proporciona a produção em larga escala de plantas inteiras e idênticas à planta mãe (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Para Murashige (1974) o sistema de micropropagação de plantas pode ser dividido em três etapas sucessivas. A primeira consiste na seleção do explante, sua desinfestação e a seleção do meio de cultura e das condições de cultivo a serem empregadas. Posteriormente, é realizada a indução de brotos a partir dos explantes através de estímulos específicos e subcultivos sucessivos (multiplicação). Finalmente, é feita a indução da formação de raízes (enraizamento) e a transferência das microplantas *in vitro* para o ambiente *ex vitro* (aclimatização) (FIGURA 2). Entretanto, a iniciação e o sucesso de um protocolo de micropropagação dependem do genótipo, da fonte de explantes e das condições de cultivo (CALDAS et al., 1998).



**FIGURA 2** - Esquema exemplificando as etapas do processo de micropropagação

Dependendo da fonte de explante e do tipo de reguladores vegetais escolhidos para dar início aos cultivos, a regeneração das microplantas *in vitro* ocorre por dois processos: organogênese e embriogênese somática (PASQUAL et al., 1997).

A organogênese consiste na formação de estruturas a partir de células e/ou tecidos, e pode ocorrer sob duas vias: via direta, através da regeneração de microplantas oriundas de tecidos meristemáticos, sem passar pelo estágio intermediário de calo, apresentando alta fidelidade genética; ou por via indireta, quando o processo de regeneração de gemas é precedido pela formação de um estágio intermediário de calo (massa amorfa de células não organizadas, formada pela intensa divisão das células do explante), a partir do qual surgem gemas adventícias que crescem e se desenvolvem em novas partes aéreas (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1988).

A embriogênese somática consiste no desenvolvimento de embriões a partir de células somáticas embriologicamente competentes *in vitro* e, como a organogênese, também pode ocorrer de forma direta ou indireta (AHUJA, 1992). A embriogênese somática indireta tem sido preconizada como a forma mais adequada para a multiplicação *in vitro*, pois possibilita elevada taxa de multiplicação. Contudo, a obtenção de calos friáveis, fase inicial de obtenção dos embriões somáticos, é uma etapa crucial a ser ajustada (LANDA et al., 2000).

Independentemente da via morfogênética utilizada, as condições de cultivo, em especial a composição do meio de cultura, são decisivos para o sucesso da regeneração *in vitro*. O meio de cultura é composto por sais minerais, fonte de carbono, vitaminas e reguladores vegetais, que são essenciais para a manutenção da divisão celular e proliferação dos explantes (KERBAUY, 1997). Os reguladores vegetais são considerados os principais controladores da morfogênese *in vitro*, atuando como mensageiros químicos capazes de promover, modificar e inibir quantitativamente o crescimento, além de ser capaz de alterar a produtividade e metabolismo secundário, afetando até mesmo o teor de óleos essenciais (SHUKLA; FAROOQI, 1990; MOURA et al., 2001). As classes de reguladores mais usadas em cultura de tecidos são as auxinas e as citocininas (SKOOG; MILLER, 1957).

As auxinas sintéticas são frequentemente utilizadas para induzir a formação de calos e de raízes adventícias, sendo o ácido indol-3-acético (IAA), ácido indol-3-butírico (IBA), ácido  $\alpha$ -naftalenoacético (NAA) e ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4 D) os mais utilizados no cultivo *in vitro* (CARVALHO, 1999). Já as citocininas induzem a divisão celular e, quando em elevadas concentrações, estimulam a formação de brotos adventícios

e inibem a formação de raízes; as mais frequentes são: kinetina (KIN), zeatina (ZEA) (citocinina natural), 6- benzilaminopurina (BAP) e isopentenil adenina (2ip) (CARVALHO, 1999). A disponibilidade e a interação dessas duas classes de reguladores vegetais regulam a formação de raiz, broto e calo em cultura de tecidos (SKOOG; MILLER, 1957).

O carvão ativado é outra substância geralmente incorporada ao meio de cultura, com a finalidade de melhorar o crescimento e desenvolvimento celular nas distintas etapas do cultivo *in vitro* (VIEITEZ et al., 2009). O efeito favorável do carvão se deve, em parte, a sua capacidade de adsorção. Desse modo, ele altera a composição e o pH do meio de cultura, podendo melhorar ou regular o crescimento *in vitro* (THOMAS, 2008). Além disso, o carvão proporciona uma condição de escuro favorável ao desenvolvimento das raízes adventícias, simulando as condições do solo (MOSHKOV et al., 2008).

Assim, a composição do meio de cultura aliada às demais condições de cultivo, tais como luz, temperatura e recipiente de cultivo são a base da tecnologia da cultura de tecidos vegetais (KERBAUY, 1997). Dessa forma, o domínio dos componentes do meio de cultura associado às condições de cultivo permitem o estabelecimento de protocolos que visem à otimização da produção de plantas em larga escala (KERBAUY, 1997), sendo que qualquer desordem entre esses fatores podem resultar em alterações morfofisiológicas prejudiciais ao desenvolvimento das microplantas cultivadas *in vitro*, como por exemplo, a hiperhidricidade.

A hiperhidricidade é uma desordem morfofisiológica que limita a proliferação e crescimento das microplantas, sendo a mais comum no cultivo *in vitro*. As principais características morfológicas de microplantas hiperhídricas consistem no aspecto translúcido, caules largos e engrossados em diâmetro e com entrenós mais curtos que os de plantas normais, órgãos menos verdes e facilmente quebráveis, menor formação de raízes ou o não enraizamento. Essas características aliadas a ausência de cera epicuticular, redução do desenvolvimento do tecido paliçádico (PICOLI et al., 2001) e o não funcionamento dos estômatos promovem a dessecação em microplantas transferidas para condições *ex vitro* (DEBERGH et al., 1992), afetando a sobrevivência das plantas durante a aclimatização (BERTONI et al., 2006).

Mesmo havendo inúmeras dificuldades, as vantagens da micropropagação para a multiplicação de espécies medicinais tem estimulado diversos trabalhos, buscando o desenvolvimento de protocolos de multiplicação *in vitro*, a exemplo dos trabalhos desenvolvidos com *Bauhinia cheilantha* (Bong.) Steud. (GUTIÉRREZ et al. 2011),

*Caesalpinia echinata* Lam. (ARAGÃO et al. 2011), *Plathymenia reticulata* Benth. (MOURA et al. 2012), *Amburana acreana* (Ducke) A.C.Sm. (FERMINO JUNIOR; SCHERWINSKI- PEREIRA 2012), *Amburana cearensis* (Allemão) A.C. Sm. (CAMPOS et al. 2013), *Tapirira guianensis* Aubl. (GUTIÉRREZ et al. 2013) e *Lippia alba* (Mill.) (LUZ et al. 2014).

Apesar das diversas vantagens e de uma série de protocolos de regeneração *in vitro* estabelecidos, as espécies nativas enfrentam inúmeras dificuldades durante as etapas da propagação *in vitro*, principalmente na fase de estabelecimento *in vitro*. Essa fase é uma das mais críticas, uma vez que, se não for concluída não se pode dar prosseguimento às etapas posteriores, sendo que o elevado grau de contaminação e oxidação dos explantes são responsáveis, às vezes, pelo insucesso do estabelecimento de uma cultura *in vitro* (SATO et al., 2001). Com a finalidade de superar as dificuldades encontradas no cultivo *in vitro* de espécies nativas e a baixa oferta de protocolos para espécies de *Hyptis*, torna-se necessário a realização de estudos mais específicos para a micropropagação, visando o desenvolvimento de metodologias que se adequem às exigências de cada espécie.

## REFERÊNCIAS

AGRA, M.F. et al. Medicinal and poisonous diversity of the flora of “Cariri Paraibano”, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, New York, v.111, p.383-395, 2007.

ALBUQUERQUE, U.P.; OLIVEIRA, R.F. Is the use-impact on native caatinga species in Brazil reduced by the high species richness of medicinal plants? **Journal of Ethnopharmacology**, New York, v. 113, p.156–170, 2007.

AHUJA, M. R. **Micropropagation of woody plants**. London: Kluwer Academic Publishers, 1992. v. 41, 507 p.

ALBUQUERQUE, U.P.; OLIVEIRA, R.F. Is the use-impact on native caatinga species in Brazil reduced by the high species richness of medicinal plants? **Journal of Ethnopharmacology**, New York, v. 113, p.156–170, 2007.

ALMEIDA, C.F.C.B.R. et al. Life strategy and chemical composition as predictors of the selection of medicinal plants from the caatinga (Northeast Brazil). **Journal of arid Environments**, Amsterdam, v.62, p.127-142, 2005.

ALMEIDA, C.F.C.B.R et al. Medicinal plants popularly used in the Xingó region - a semi-arid location in northeastern Brazil. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, London, v. 2, n.15, p. 1-7, 2006.

ARAGÃO, A.K.O.; ALOUFA, M.A.I.; COSTA, L.A. Efeito do BAP (6-Benzilaminopurina) sobre a indução de brotos em explantes de pau-brasil. **Revista Cerne**, Lavras, v,17, p. 339–345, 2011.

ARAÚJO, E. C. C.; LIMA, M. A. S.; SILVEIRA, E. R. Spectral assignments of new diterpenes from *Hyptis martiusii* Benth. **Magnetic Resonance Chemistry**, Estados Unidos v. 42, p. 1049-1052, 2004.

BARBOSA, P. P. P.; RAMOS, C. P. Studies on the antiulcerogenic activity of the essential oil of *Hyptis mutabilis* Briq in rats. **Phytotherapy Research**, London, v. 6, p. 114-115, 1992.

BERTONI, B.W et al. Micropropagação de *Calendula officinalis* L.. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, n. 2, p. 48-54, 2006.

BOLZANI, V. S. Conservação e uso sustentável da diversidade vegetal do cerrado e da mata atlântica: diversidade química e prospecção de novas drogas. **Anais: V Jornada Paulista de Plantas Mediciniais**. UNESP, 203p. 2001.

BRASIL. Ministério da Integração Nacional. **Nova delimitação do Semiárido brasileiro**. Brasília, DF, 2005. 32 p. il.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília: Regras para análise de sementes. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária, 2009.

BUENO, A. X et al. Effects of the aqueous extract from *Hyptis pectinata* leaves on rodent central nervous system. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 16, p. 317-323, 2006.

CALDAS, L. S. et al. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: SPI/Embrapa-CNPQ, v.1, 1998. p.87-132.

CAMPOS, V.C.A. et al. Micropropagação de umburana de cheiro. **Ciência Rural**, Lavras, v. 43, p.639–644, 2013.

CARTAXO, S.L. et al. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, New York, v.131, p. 326-342, 2010.

CARVALHO, J.M.F.C. de. **Técnicas de micropropagação**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 1999. 39p. (Embrapa Algodão. Documentos, 64).

CHUKWUJEKWU, J. C et al. Antiplasmodial diterpenoid from the leaves of *Hyptis suaveolens*. **Journal of Ethnopharmacology**, New York, v. 102, n.2, p. 295-297, 2005.

COSTA, J. G. M. et al. Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzigium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba v. 15, n.4, p. 304-309, 2005.

COSTA-LOTUFO, L. V et al. Genotoxic effects of tanshinones from *Hyptis martiusii* in V79 cell line. **Food and Chemical Toxicology**, Amsterdam, v. 46, p. 388-392, 2008.

DEBERGH, P. et al. Reconsideration of the term ‘vitrification’ as used in micropropagation. **Plant Cell Tissue Organ and Culture**, Dordrecht, v. 30, p. 135–140, 1992.

DENG, Y. E. et al. Bioactive 5,6-dihydro-r-pyrone derivatives from *Hyptis brevipes*. **Journal Natural Products**, India, v. 72, p. 1165-1169, 2009.

FALCÃO, D. Q.; MENEZES, F. S. Revisão etnofarmacológica, farmacológica e química do gênero *Hyptis*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v.84, n.3, p.69-74, 2003.

FERMINO JUNIOR, P.C. P; SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E. Germinação e propagação in vitro de cerejeira (*Amburana acreana* (Ducke) A.C. Smith - Fabaceae). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v.22, p.1–9, 2012.

FERNANDES, L.D.R. **Aplicação de técnicas de conservação in vitro para a conservação de espécies ameaçadas**. Dissertação (Mestrado integrado em Engenharia Biológica). Faculdade de Engenharia de Recursos Naturais. Universidade do Algarve, Faro, 2008.

FOGLIO, M. A. et al. Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos: um modelo multidisciplinar. **MultiCiência**, 2006

GIULIETTI, A. M. et al. Espécies endêmicas da caatinga. In: SAMPAIO, E. V. S. B.; GIULIETTI, A. M.; VIRGÍNIO, J.; GAMARRA-ROJAS, C. F. L. **Vegetação & Flora da Caatinga**. Associação plantas do nordeste – APNE. Centro Nordestino de Informações sobre plantas – CNIP. Recife, p.103-118. 2002.

GIULIETTI, A.M.; CONCEIÇÃO, A; QUEIROZ, L.P. **Riqueza de espécies e Caracterização das Fanerógamas do Semi-árido Brasileiro**. Recife, Associação Plantas do Nordeste, Ministério da Ciência e Tecnologia, 2006.

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.

GUTIÉRREZ, I.E.M. Regeneração *in vitro* via organogênese direta de *Bauhinia cheilantha*. **Ciência Rural**, Lavras, v.41, p. 260–265, 2011.

GUTIÉRREZ, I. E.M. et al. Multiplicação *in vitro* de *Tapirira guianensis* Aubl. (Anacardiaceae). **Revista Ceres**, Viçosa, n.60, p.143–151, 2013.

HARLEY, R. et al. Lamiaceae in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB142>>. Acesso em: 19 Fev. 2015.

JUDD, W.S. et al. 2009. **Sistemática Vegetal: Um enfoque filogenético**. 3aed. Porto Alegre: Artmed, 632p.

KERBAUY, G.B. Clonagem de plantas *in vitro*. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 1, n. 1, p. 30-33, 1997.

KUHNT, M. et al. Lignans and other compounds from the Mixe Indian medicinal plant *Hyptis verticillata*. **Phytochemistry**, Amsterdam, v. 36, n. 2, p. 485-489, 1994.

LANDA, F.S.L. et al. Crescimento inicial de mudas de Indução *in vitro* de calos em explantes foliares de pequizeiro mentrasto “forma florífera”. **Ciência Agronômica**, v. 34, n.1: (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, 5–10. 24(Edição Especial)p. 56–63, 2003.

LUZ, J.M.Q et al. Estabelecimento *in vitro* e aclimatização de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. Campinas, v.16, n.2, supl. I, p.444-449, 2014.

MARINHO, M.G.V.; SILVA, C.C.; ANDRADE, L.H.C. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais em área de caatinga no município de São José de Espinharas, Paraíba, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v.13, n.2, p.170-182, 2011.

MARTINS, H. M.; MARTINS, M. L.; DIAS, M. I. Evaluation of microbiology quality of medicinal plants used in natural infusions. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 68, p. 149-153, 2001.

MORAIS, S.M.; DANTAS, J.D.P.; SILVA, A.R.A.; MAGALHÃES, E.F. Plantas medicinais usadas pelos índios Tapebas do Ceará. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v.15, p.169-177, 2005.

MOSCA, V.P.; LOIOLA, M.I.B. Uso popular de plantas medicinais no Rio Grande do Norte, Nordeste do Brasil. **Revista Caatinga**, Mossoró, v.22, n.4, p.225-234, 2009.

MOSHKOV, I. E. et al. Plant Growth Regulators III: Gibberellins, Ethylene, Abscisic Acid, their Analogues and Inhibitors; Miscellaneous Compounds. In: GEORGE, E. F. et al. (Ed.), *Plant Propagation by Tissue Culture*, v. 1, 3.ed. Dordrecht: Springer, 2008. p. 277-282.

MOURA, T.L. et al. Organogênese *in vitro* de *Citrus* em função de concentrações de BAP e seccionamento do explante. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.23, n.2, p.240-245, 2001.

MOURA, M. S. B et al. **Balanco de energia na cana-de-açúcar irrigada no Submédio São Francisco**. In: Congresso Nacional de Irrigação e Drenagem, 27., 2007, Mossoró. Agricultura irrigada no Semi-árido: anais. Mossoró: ABID: Governo do Estado do Rio Grande do Norte, 2007. 1 CD-ROM.

MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue culture. **Annual Review Plant Physiology**, Cambridge, v.25, p.135-166, 1974.

OHSAKI, A. et al. New Labdane Diterpenoids from *Hyptis fasciculata*, **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, Tóquio, v. 53, n.12, p. 1577-1579, 2005.

OLIVEIRA, C. M. A. et al. Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of *Hyptis ovalifolia* Benth. (Lamiaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 15, n. 5, p. 756-759, 2004.

OLIVEIRA, C. B. A. et al. Composition and chemical variability in the essential oil of *Hyptis marrubioides* Epl. **Journal of Essential Oil Research**, Houndmills, v. 19, n. 6, p. 552-556, 2007.

OLIVEIRA, G.L.; OLIVEIRA, A.F.M.; ANDRADE, L.H.C. Plantas medicinais utilizadas na comunidade urbana de Muribeca, Nordeste do Brasil. **Acta Botânica Brasílica**, São Paulo, v.24, n.2, p.571-577. 2010.

OLIVEIRA, C. M. A. et al. Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of *Hyptis ovalifolia* Benth. (Lamiaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society** São Paulo, v. 15, n. 5, p. 756-759, 2008.

PASQUAL, M. et al. **Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicação**. Lavras: UFLA, 1997. 159p.

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

PEREDA-MIRANDA, R. et al. Structure and stereochemistry of pectinolides A-C, novel antimicrobial and cytotoxic 5,6-dihydro-pyrones from *Hyptis pectinata*. **Journal of Natural Products**, India, v. 56, p.583-587, 1993.

PICOLI, E.A.T. et al. Hyperhydricity in *in vitro* eggplant regenerated plants: structural characteristics and involvement of BiP (Binding Protein). **Plant Science**, Limerick, v. 160, p. 857-868, 2001.

REIS, M. S.; MARIOT, A. Diversidade natural e aspectos agronômicos de plantas medicinais. In: SIMÕES, C. M. O; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G. et al. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto alegre: UFRGS: UFSC, 1999, p. 39-60.

RIBEIRO, D.A. et al. Potencial terapêutico e uso de plantas medicinais em uma área de Caatinga no estado do Ceará, nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**. Campinas, v.16, n.4, p.912-930, 2014.

ROQUE, A.A.; ROCHA, R.M.; LOIOLA, M.I.B. Uso e diversidade de plantas medicinais da Caatinga na comunidade rural de Laginhas, município de Caicó, Rio Grande do Norte (Nordeste do Brasil). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v.12, n.1, p.31-42, 2010.

SABÁ, R.T. et al. Micropropagação do jaborandi. **Horticultura Brasileira**, v.20, n.1, p.106-9, 2002.

SAMPAIO, E.S.V.B. Uso de plantas da caatinga. In: SAMPAIO, E.S.V.B (Org) **Vegetação e flora da caatinga**. Recife: APNE/ CNIP, 49-68p. 2002.



SATO A.Y et al. Micropropagação da mandioca: influência da concentração de amônio com e sem BAP. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 48, p. 405-413, 2001.

SHUKLA A, FAROOQI AHAE. Review article: Utilization of plant growth regulators in aromatic plant production. **Current Research Medicinal & Aromatic Plants**, India, v. 12, n. 3, p. 152-7, 1990.

SILVA, V.A.; ANDRADE, L.H.C.; ALBUQUERQUE, U.P. Revising the Cultural Significance Index: The Case of the Fulni-ô in Northeastern Brazil. **Field Methods**, v.18, n.1, p.98–108, 2006.

SILVA-LUZ, C.L et al. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: Lamiaceae. **Boletim de Botânica**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 109-155, 2012.

SKOOG, F; MILLER, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultures *in vitro*. **Simpósio of the Society for Experimental Biology**, San Diego, 11, 118–131, 1957.

SOUZA, L. K. H. et al. Antimicrobial activity of *Hyptis ovalifolia* towards dermatophytes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 7, p. 963-965, 2003.

SOUZA, M.F et al. **Coleta e manejo de plantas medicinais por erveiros no município de Jequié, Bahia.** Disponível em: <[http://www.abhorticultura.com.br/biblioteca/arquivos/.../46\\_0658.pdf](http://www.abhorticultura.com.br/biblioteca/arquivos/.../46_0658.pdf)>. Acesso em 10 de Fevereiro de 2013.

THOMAS, T. D. The role of activated charcoal in plant tissue culture. **Biotechnology Advances**, Houndmills, v. 26, p. 618-631, 2008.

URONES, J. G. et al. Tricyclic diterpenes from *Hyptis dilatata*. **Phytochemistry**, Amsterdam v. 48, n.6, p. 1035-1038, 1998.

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

VIEITEZ, A. M. et al. *In vitro* regeneration of the important North American oak species *Quercus alba*, *Quercus bicolor* and *Quercus rubra*. **Plant Cell Tiss Organ Culture**, Amsterdam, v. 98, p. 135–145, 2009.

## CAPITULO 1

---

### **ORGANOGÊNESE DIRETA DE *Hyptis ramosa* Pohl ex Benth. (LAMIACEAE)**

## RESUMO

*Hyptis ramosa* Pohl ex Benth. é uma Lamiaceae nativa do Brasil, comum a margens de rios e ambientes sujeitos a alagamento. Apesar da maioria das espécies de Lamiaceae ainda ser desconhecida do ponto de vista fitoquímico o uso farmacológica das espécies dessa família é marcante, o que justifica a busca pelo desenvolvimento de formas de propagação e cultivo, o que poderá contribuir para a inserção dessas espécies em sistemas de produção sustentáveis ou para conservação das mesmas. Dessa forma, o presente trabalho objetivou desenvolver protocolo para a micropropagação da espécie *H. ramosa* por via organogênica direta. Para tanto, sementes foram desinfestadas e estabelecidas em meio de cultura MS/2. Na multiplicação *in vitro*, diferentes explantes retirados de plantas estabelecidas *in vitro* foram inoculados em meio de cultura MS com diferentes concentrações das citocininas BAP, CIN e TDZ. As brotações obtidas foram individualizadas e transferidas para meio MS/2 com diferentes concentrações de AIB e de carvão ativo, tendo em vista o enraizamento das mesmas. As microplantas foram submetidas à pré-aclimatização em diferentes tipos de vedação do recipiente de cultivo e, posteriormente, foram transferidas para a condição *ex vitro*, plantadas em substrato comercial e mantidas sob nebulização intermitente em casa de vegetação, quantificando-se a taxa de sobrevivência das plantas. A propagação *in vitro* de *H. ramosa* é possível a partir de segmento nodal, em meio de cultura MS suplementado com BAP. O enraizamento *in vitro* ocorre até mesmo em meio isento de auxina. Nas condições de cultivo a espécie apresenta elevada taxa de sobrevivência após a transferência para o ambiente *ex vitro*, independentemente da realização da fase de pré-aclimatização.

**Palavras-chave:** Plantas medicinais e aromáticas; Propagação de plantas; Cultura de tecidos vegetais; Regulador vegetal.

**ABSTRACT**

*Hyptis ramosa* Pohl ex Benth. Lamiaceae is a native of Brazil, common to riverbanks and environments subject to flooding. Although most species of Lamiaceae still be unknown to the phytochemical standpoint the pharmacological use of species of this family is remarkable, which justifies the search for the development of forms of propagation and cultivation, which may contribute to the inclusion of these species in systems sustainable production and conservation of the same. Thus, this study aimed to develop protocol for micropropagation of the species *H. ramosa* through direct organogenic. Therefore, seeds were disinfected and established in medium MS / 2 culture. *In vitro* multiplication, different explants taken from in vitro established plants were inoculated in MS medium with different concentrations of cytokinins BAP, CIN and TDZ. The obtained shoots were individualized and transferred to MS / 2 medium with different concentrations of AIB and activated carbon, with a view to rooting them. The microplants underwent pre-acclimatization in different types of sealing the cultivation of container and subsequently were transferred to ex vitro condition, planted in commercial substrate and kept under intermittent mist in a greenhouse, the survival rate was quantified plants. The in vitro propagation of *H. ramosa* is possible from nodal segment in MS medium supplemented with BAP. In vitro rooting occurs even in auxin-free medium. All culture conditions the species has a high survival rate after transfer to *ex vitro* environment regardless of achieving the pre-acclimatization phase.

**Key-words:** Medicinal and aromatic plants; Plant propagation; Plant tissue culture; Growth regulator.

## 1 INTRODUÇÃO

O gênero *Hyptis* Jacq. pertence à família Lamiaceae e inclui aproximadamente 400 espécies de ervas, subarbustos, arbustos ou árvores pequenas, ocorrentes desde o sul dos Estados Unidos até a Argentina (FALCÃO; MENEZES, 2003). No Brasil estima-se a ocorrência de 118 espécies, dentre elas 78 endêmicas, sendo distribuídas em todas as regiões do país e adaptando-se as mais variadas condições edafoclimáticas (HARLEY et al., 2015). Entre as espécies nativas do Brasil têm-se *Hyptis ramosa* Pohl ex Benth., uma planta de hábito arbustivo, cuja ocorrência é registrada nos estados da Bahia, Espírito Santo e Minas Gerais (HARLEY et al., 2015), ocorrendo principalmente nas margens de rios ou locais sujeitos a alagamentos.

A importância do gênero *Hyptis* é devido à produção de um grande número de classes de micromoléculas, existindo representantes da via do ácido acético, da via do ácido chiquímico e oriundos de biossíntese mista (FALCÃO; MENEZES, 2003), com grande aplicação química é farmacológica. Entre as principais moléculas encontradas nas espécies de *Hyptis* temos diterpenos, triterpenos, lignanas e pironas (PEREDA-MIRANDA et al., 1990). Ainda tem ampla utilização na indústria alimentícia, pois são comercializadas para o uso como importantes condimentos na culinária de diversas regiões, sendo apreciadas pelo aroma e sabor que atribuem aos alimentos. Contudo, atualmente a maior importância econômica advém do elevado teor de óleos essenciais aromáticos presentes em suas folhas, com propriedades terapêuticas comprovadas, sendo compostos basicamente por monoterpenos e sesquiterpenos (FALCÃO; MENEZES, 2003), sendo comercializados em diversas regiões do mundo. A utilização das espécies de *Hyptis* para fins medicinais não se restringe apenas ao Brasil, mas também é realizada em países como México, Índia, China, Equador, Tailândia, Caribe, Panamá, Norte da Nigéria e em outras localidades da África (FALCÃO; MENEZES, 2003). A maioria desses usos medicinais tem respaldo científico, demonstrando a presença de substâncias com potencial farmacológico muito interessante, principalmente com atividade antimicrobiana, antinociceptiva, antidematogênica, antisséptica, anticancerígena, antifúngica, citotóxica, antiinflamatória, anti-HIV e inseticida (FALCÃO; MENEZES, 2003).

Diante do valor medicinal do gênero, torna-se imprescindível o estudo de formas de propagação comercial para suas espécies. Apesar das mesmas se propagarem naturalmente, por meio da via sexuada, a propagação por sementes tem sido pouco utilizada, em virtude da sazonalidade da produção, tamanho reduzido das suas sementes, perda rápida da viabilidade das sementes produzidas, além de problemas relacionados à dormência (MAIA

et al., 2008). Ainda, quando o intuito é a propagação de genótipos selecionados, a variabilidade genética decorrente da multiplicação via sementes pode afetar a utilização desta espécie para fins farmacêuticos, em decorrência da variação na composição química dos metabólitos extraídos (OLIVEIRA et al., 2008).

Nesse contexto, a cultura de tecidos representa uma importante ferramenta para a multiplicação e conservação de espécies medicinais nativas. Dentre as suas técnicas, a micropropagação é a mais empregada e consiste basicamente em cultivar em ambiente asséptico, com temperatura e iluminação controlada qualquer parte da planta, em recipientes contendo meio nutritivo adequado (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). A multiplicação *in vitro* pode ser realizada por meio de dois processos distintos: organogênese e embriogênese. A organogênese consiste na formação de plantas inteiras a partir de células ou tecidos que originalmente não possuem essa forma ou estrutura, pode ocorrer sob duas vias: via direta, através da regeneração de microplantas oriundas de tecidos meristemáticos, sem passar pelo estágio intermediário de calo; ou por via indireta, quando o processo de regeneração de gemas é precedido pela formação de um estágio intermediário de calo (GAHAN; GEORGE, 2008).

A organogênese *in vitro* já vem sendo utilizada para a multiplicação de várias espécies de *Hyptis*, como *H. pectinata* (L.) Poit. (FEITOSA, 2012), *H. marrubioides* Epl. (BOTREL, 2013), *H. leucocephala* Mart. ex Benth (NEPOMUCENO, 2012) e *H. suaveolens* (L.) Poit. (MANDAL, 2013). No entanto, para o desenvolvimento de protocolos eficientes de propagação *in vitro* torna-se necessário o ajuste de protocolos já existentes para cada espécie, por conta das variações nas respostas obtidas.

Entre os fatores que afetam a resposta morfo genética *in vitro*, destacam-se a suplementação do meio de cultura com reguladores vegetais, sendo o que mais tem despertado interesse dos pesquisadores, em virtude da grande variação das respostas obtidas a depender da idade, origem e diferenciação do explante. Nesse aspecto, tem sido quase regra que o balanço auxina/citocinina favorável ao primeiro estimula o enraizamento; o balanço contrário favorece a formação de parte aérea, enquanto que concentrações equivalentes induzem a formação de calos (GUERRA; NODARI, 2006). Contudo, as concentrações endógenas dos hormônios dificultam a condução dessas rotas com base apenas na adição de reguladores ao meio de cultura.

Após a obtenção da microplantas torna-se necessário a transferência das mesmas para as condições *ex vitro*, a transferência das microplantas para o ambiente *ex vitro* apresenta várias limitações, sendo, na maioria das vezes, necessária uma etapa de

rustificação, na qual as microplantas desenvolvem características adaptativas ao ambiente *ex vitro*, estimulando-se o desenvolvimento da fotoautotrofia, através da redução de sacarose no meio de cultura e/ou do aumento da aeração dos recipientes, através do uso de tamponamentos alternativos, originando microplantas com características anátomo-fisiológicas mais adaptadas à aclimatização (THORPE et al., 2008).

Considerando a importância do gênero *Hyptis* e a ausência de estudos para a espécie *Hyptis ramosa*, o objetivo do presente estudo foi estabelecer um protocolo de micropropagação, através da organogênese direta para a espécie.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Obtenção e identificação do material vegetal

Sementes de *Hyptis ramosa* foram coletadas no município de Rio de Contas - Bahia (Latitude 13°31'519"S e Longitude 41°51'53,3"O). A identificação botânica foi realizada no Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), onde as exsicatas encontram-se depositadas (Voucher número 212750). Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, localizado na Unidade Experimental Horto Florestal (UEFS).

### 2.2 Estabelecimento *in vitro*

Sementes de *H. ramosa* (FIGURA 1A) foram desinfestadas em câmara de fluxo laminar em solução de álcool 70% (30s), seguido da imersão em hipoclorito de sódio a 2,5% acrescido de uma gota de detergente neutro (15 minutos) e lavagem por quatro vezes em água destilada autoclavada. Posteriormente, as sementes foram inoculadas individualmente em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1969) com metade das concentrações salinas (MS/2), suplementado com 87,64mM de sacarose e solidificado com 0,7% de ágar. O pH do meio 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  $25 \pm 3^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 16 horas, umidade relativa de 60% e radiação fotossintética ativa de  $40\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

### 2.3 Multiplicação *in vitro*

Para a multiplicação *in vitro* foram utilizadas plântulas oriundas da germinação *in vitro* com aproximadamente 60 dias (FIGURA 1B). A indução de brotos foi realizada a

partir de três tipos diferentes de explantes: segmento nodal, internodal e foliar. Os explantes com aproximadamente 1 cm de comprimento foram inoculados individualmente em tubos de ensaio contendo 10mL de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1969), suplementado com diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) ou cinetina (CIN) ou tidiazuron (TDZ) (0,0, 2,0, 4,0, 6,0 e 8,0  $\mu\text{M}$ ). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 3 x 5 (três tipos de explantes x três tipos de citocininas x cinco concentrações de citocininas), totalizando 45 tratamentos. Cada tratamento foi constituído de cinco repetições, sendo cada repetição composta por quatro tubos de ensaio contendo um explante cada.

Após 30 dias da inoculação, as brotações foram avaliadas, sendo quantificadas as seguintes variáveis: frequência de explantes responsivos, isto é, a porcentagem de explantes que formaram brotos, número de brotos por explante, número de folhas por explante, comprimento do maior broto, porcentagem de brotos com hiperhidricidade, porcentagem de explantes com formação de calos na base do explante e número de raízes por explante.

#### **2.4 Enraizamento *in vitro***

Para a indução de raízes foram utilizadas brotações provenientes do meio de cultura suplementado com 8  $\mu\text{M}$  de BAP (FIGURA 1C), baseados nos resultados do experimento anterior. Os brotos foram individualizados e transferidos para tubos de ensaio contendo 10mL de meio de cultura MS/2, suplementado com diferentes concentrações de ácido indolbutírico (AIB) (0,0; 1,0; 1,5; 2,0, $\mu\text{M}$ ), na presença (1,0 g. L<sup>-1</sup>) e ausência de carvão ativado. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 4 x 2 (quatro concentrações da auxina AIB x duas concentrações de carvão ativado), totalizando oito tratamentos. Cada tratamento foi constituído de cinco repetições, sendo cada repetição composta por quatro tubos contendo um broto cada (FIGURA 1F).

#### **2.5 Aclimatização**

Para rustificação das microplantas, após a etapa de enraizamento, as mesmas foram mantidas em tubos de ensaio com diferentes condições de vedação (filme de PVC e tampão de algodão) durante 45 dias, sendo, posteriormente, transferidas para tubetes plásticos (13cm de altura x 3cm de diâmetro) contendo o substrato comercial Plantmax®. Após o plantio as microplantas foram cobertas com copos plásticos transparentes (200 mL) e mantidas em casa-de-vegetação com nebulização intermitente (nebulizações de 5 minutos



com intervalos de 1 hora) (FIGURA 1H). Após 15 dias nessas condições os copos foram retirados, mantendo-se as microplantas por mais 15 dias no ambiente sob nebulização. Após 30 dias foi avaliada a taxa de sobrevivência das microplantas em condições *ex vitro*.

## 2.6 Análise estatística

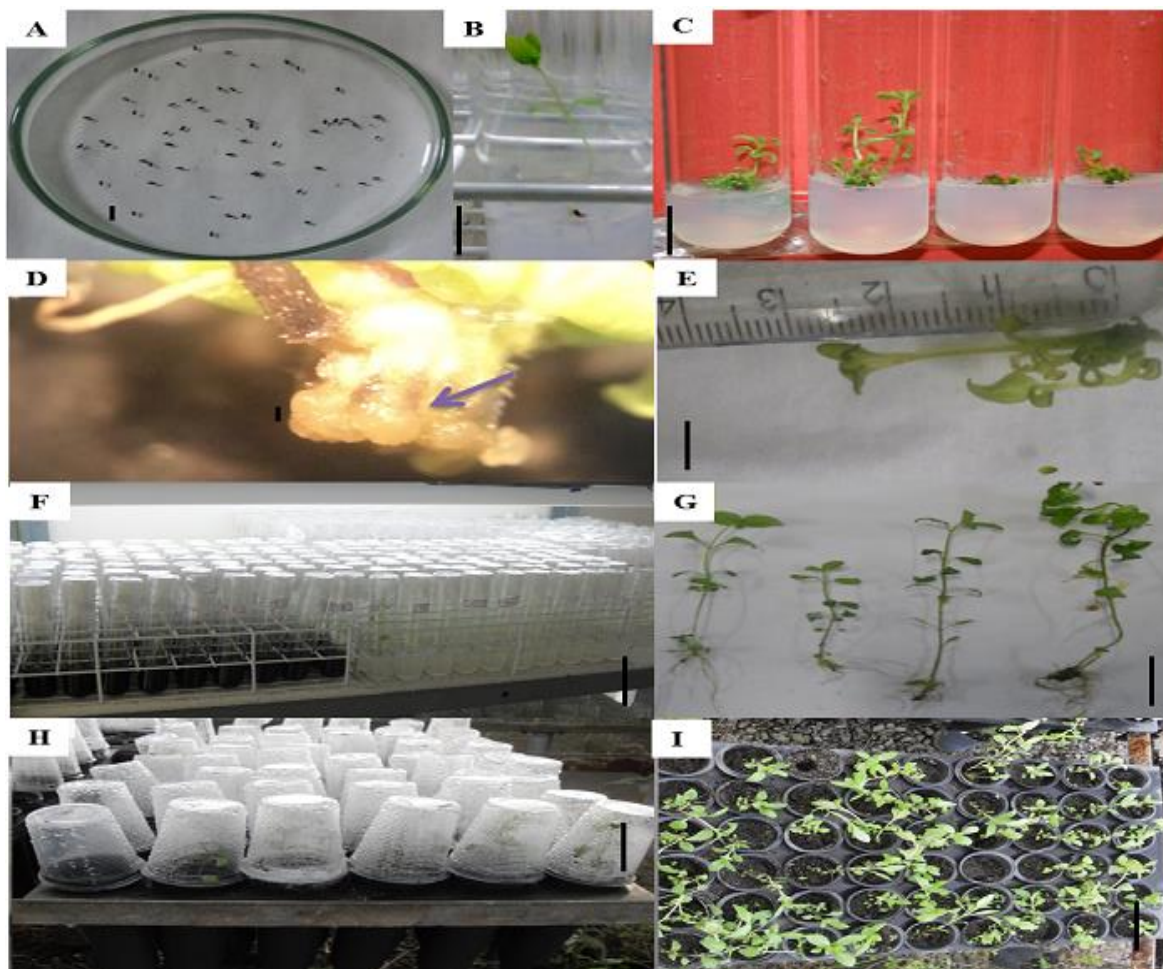
Os dados foram avaliados estatisticamente, mediante análise de variância, comparando-se as médias pelo Teste de Tukey a 1% de probabilidade de erro para os fatores qualitativos. Para os fatores quantitativos utilizou-se ajustes de equações de regressão polinomial. Os dados foram analisados com auxílio do programa SISVAR (FERREIRA, 2011).

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos demonstraram ser possível a micropropagação da espécie *Hyptis ramosa* Pohl *ex* Benth, obtendo-se microplantas viáveis após todas as etapas do processo (FIGURA 1). O estabelecimento *in vitro* da espécie apresentou baixa taxa de contaminação (19.50%), demonstrando eficiência do protocolo de desinfestação. Outras espécies submetidas ao mesmo tratamento de desinfestação de sementes apresentaram elevada taxa de contaminação, a exemplo de *Parapiptadenia rígida* (Benth) Brenan., em que apresentou 60% de contaminação (NASCIMENTO et al, 2007). A taxa de germinação foi de 47% decorrido 60 dias da inoculação das sementes. Alguns trabalhos têm demonstrado baixa taxa de germinação *in vitro* para os membros da família Lamiaceae, como foi observado para o alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), em que se obteve apenas 0,67% de germinação (COSTA; DROSTE, 2010).

A análise dos dados demonstrou efeito altamente significativo ( $p \leq 0,01$ ) da interação “tipo de citocininas x concentração de citocinina” para todas as variáveis analisadas (Apêndice - A). Os explantes segmento internodal e foliar não apresentaram processo morfogênico, pois não foi observada a formação de brotos ou de calos em nenhuma das concentrações testadas, diante disso, a análise estatística dos dados foi realizada apenas para as brotações originadas do segmento nodal. O comportamento observado para a espécie em estudo foi semelhante ao encontrado por Nepomuceno (2012) em estudos com *Martianthus leucocephalus* (Mart. *ex* Benth.) J.F.B. Pastore (Lamiaceae), cujos segmentos internodais e foliares também não apresentaram respostas morfogênicas frente aos tratamentos testados. A ausência de resposta morfogênica nos segmentos internodais e foliares pode estar associada à ausência de gemas pré-formadas nesses

tecidos, bem como à ineficiência dos tratamentos hormonais testados na rediferenciação dos mesmos (NEPOMUCENO, 2012).



**FIGURA 1:** Diferentes etapas da micropropagação de *Hyptis ramosa* Pohl ex Benth.; sementes utilizadas para o estabelecimento das culturas (A); plântula com 60 dias de cultivo (B); brotos em meio suplementado com BAP (C); calos na base do explante (D); Brotação hiperhídrica em meio suplementado com TDZ (E); brotos individualizados e inoculados em meio de enraizamento (F); microplantas cultivadas em meio MS/2 na ausência de regulador (G) plantas em fase de aclimatização (H); e microplantas aclimatizadas em casa de vegetação (I). Barras (A) e (D) = um mm e as demais um cm. UEFS, Feira de Santana/ BA, 2015.

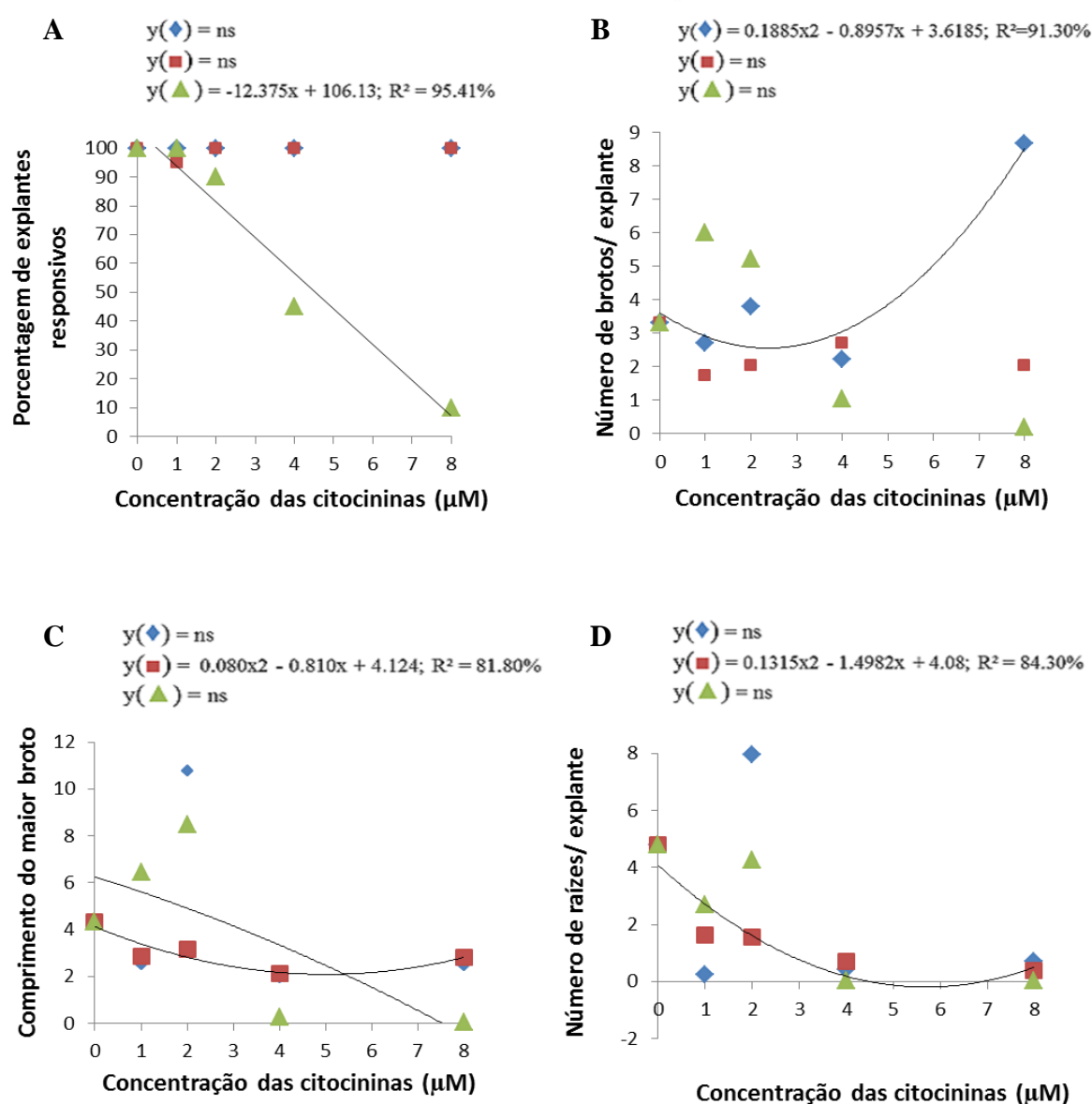
Houve influência significativa das citocininas testadas sobre a multiplicação *in vitro* de *H. ramosa*, sendo que as maiores médias para a porcentagem de explantes responsivos foram observadas com a utilização de BAP e CIN, obtendo-se 100 e 99%, respectivamente. Avaliando a influência do BAP e da CIN sobre a multiplicação *in vitro* de *Mentha x Piperita* L. Asmar et al. (2011) verificaram a maior eficiência do BAP, com maior taxa de regeneração de plantas a partir de segmentos nodais. Em todas as concentrações testadas de BAP foi encontrada a taxa máxima de explantes responsivos (100%) com o uso do

segmento nodal, semelhante ao observado no tratamento sem suplementação de citocinina. Por outro lado, a menor taxa de explante responsivo foi verificada com a utilização do TDZ (0,20%). A análise de regressão apontou um modelo linear decrescente para o efeito das concentrações de TDZ ( $p < 0.01$ ) (FIGURA 2A), demonstrando que esse regulador apresenta efeito citocínico mais intenso que as demais citocininas testadas. O TDZ é uma difeniluréia com elevada atividade de citocinina que estimula a proliferação em muitas espécies de plantas e também entre os representantes da família Lamiaceae, como observado para o gênero *Mentha* L. (HUETTEMAN; PREECE, 1993). Para Graça et al. (2001), as concentrações de TDZ requeridas para a multiplicação *in vitro* são menores quando comparada com as demais citocininas, o que foi confirmado nesse trabalho.

Para o número de brotos por explante a análise de regressão indicou um modelo quadrático descendente ( $p < 0,01$ ) para as concentrações de BAP, enquanto que para as respostas obtidas com o meio suplementado com CIN não se obteve um modelo matemático representativo. Por outro lado, quando o meio foi suplementado com TDZ, a análise apontou um modelo linear decrescente ( $p > 0,01$ ) como sendo o mais representativo (FIGURA 2B). A maior média para o número de brotos por explante foi alcançada na presença de  $8\mu\text{M}$  de BAP (9 brotos/explante). As citocininas são capazes de estimular ou inibir processos fisiológicos e, dentre elas, o BAP tem sido preconizado como um dos mais eficientes para a promoção e a proliferação de partes aéreas e indução de gemas adventícias *in vitro* (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998), como evidenciado neste estudo. Resultados semelhantes aos encontrados nesse trabalho foram observados para chapéu-de-couro (*Echinodorus cf. scaber* Rataj) (PEREIRA et al., 2000), poejo do campo (*Cunila galioides* Benth.) e hortelã-pimenta (*Mentha x piperita* L.) (ASMAR et al., 2011).

Já para o comprimento do maior broto, a análise estatística não apontou um modelo matemático representativo para as respostas obtidas com diferentes concentrações de BAP, enquanto que para as respostas obtidas para as concentrações de CIN e TDZ apontou um comportamento quadrático descendente e ascendente ( $p < 0,01$ ), respectivamente. O maior comprimento de broto foi observado quando o meio de cultura foi suplementado com TDZ na concentração de  $2,0\mu\text{M}$  (8,50 cm), tendendo a uma redução do comprimento com o aumento da concentração (FIGURA 2C). Resultados semelhantes foram observados para *Cannabis sativa* L, em que o emprego do TDZ em baixas concentrações ( $0,5\mu\text{M}$ ) mostrou-se altamente eficaz na indução do crescimento (LATA et al., 2009), no entanto, para *Mentha x Piperita* L. foi registrado que o maior comprimento da parte aérea ocorreu na ausência de citocininas testadas (ASMAR et al., 2011).

Comportamento similar ao comprimento dos brotos foi verificado para o número de raízes por explante, em que o maior número de raízes foi observado nas microplantas mantidas em meio suplementado com TDZ na concentração de  $2,0\mu\text{M}$  (FIGURA 2D). A formação de raízes na etapa de multiplicação reduz o tempo para o estabelecimento de um protocolo de micropropagação, uma vez que as brotações não precisarão passar pela etapa de enraizamento *in vitro*, como foi observado para *Melissa officinalis* L. (SILVA et al., 2006) e *Salvia stenophylla* Burchell ex Bentham (MUSARURWA et al., 2010). Contudo, nesse estudo, a etapa de enraizamento foi necessária para a espécie, pois a mesma apresentou formação de raízes em pequeno número e facilmente quebradiças.



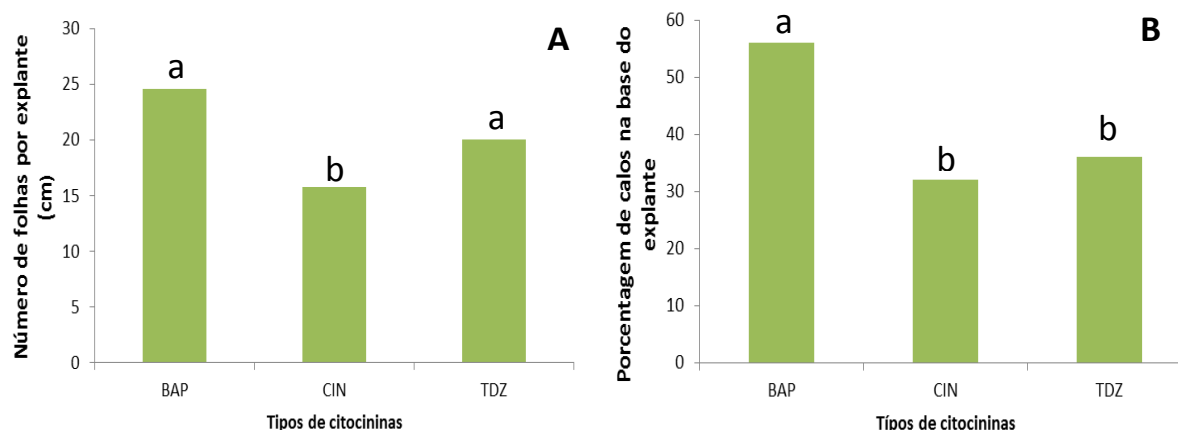
**FIGURA 2:** Porcentagem de explantes responsivos para formação de brotos (A); Número de brotos por explante (B); Comprimento do maior broto (C) e número de raízes por explante (D) *H. ramosa* Pohl ex Benth. submetidos a diferentes concentrações de BAP, KIN e TDZ (BAP  $\blacklozenge$ , KIN  $\blacksquare$  e TDZ  $\blacktriangle$ ). UEFS, Feira de Santana, 2015.

Em relação ao número de folhas por explante não foi possível o ajuste de um modelo matemático representativo em função das citocininas testadas. O maior número de folhas por brotação foi verificada com a utilização do BAP (21,30) seguida da citocinina TDZ (21,60) não diferindo estatisticamente entre si (FIGURA 3 A). O aumento no número de folhas na fase de multiplicação é bastante favorável, uma vez que na região de inserção da folha encontra-se a gema axilar, a qual poderá originar novos brotos e conseqüentemente aumentar a taxa de multiplicação (COSTA; DROSTE, 2010).

Os resultados encontrados nesse trabalho para o número de folhas por explante não corroboram aos reportados por Silva et al. (2013) com a espécie *Caesalpinia pyramidalis* Tul. cultivada *in vitro* em meio WPM suplementado com diferentes concentrações de BAP, CIN e TDZ onde observaram maiores médias na ausência de citocininas e as menores médias na presença da citocinina TDZ, o que não foi observado nesse trabalho. O TDZ possui elevada atividade citocínica, de maneira que as baixas concentrações em relação às demais citocininas, em geral, induzem melhores resultados na formação de brotos e, em decorrência disso, maior número de folhas (SILVA et al., 2013). Contudo, efeitos nocivos de elevadas concentrações de TDZ foram reportadas por Oliveira et al. (2010).

Como para a variável número de folhas por explante também não foi possível o ajuste de um modelo matemático representativo para a variável porcentagem de calos na base do explante, sendo que a maior taxa de explantes com formação de calos na base foi observada na presença de BAP, com 66% dos explantes formando calos (FIGURA 3B). A formação de calos na base do explante também foi reportada por Graça et al. (2001) ao avaliar o efeito de diferentes citocininas na formação de brotos em *Eucalyptus dunnii* Maiden, no qual os autores observaram que as brotações apresentaram formação excessiva de calos na base quando cultivadas em meio suplementado com BAP e TDZ.

Foram observados brotos hiperhídricos em todos os tratamentos testados, sendo que a análise de regressão não apontou um modelo biológico representativo para todas as citocininas testadas. A maior porcentagem de brotos hiperhídricos foi observada em plantas submetidas ao TDZ, nas concentrações de 1 e 2 $\mu$ M (85 e 70%, respectivamente), seguida das cultivadas em meio com CIN (65%) e BAP (50%). Brotos hiperhídricos são indesejáveis em um protocolo de micropropagação, pois são pequenos e incapazes de se alongarem, dificultando a separação (HARTMANN et al., 2002), além de apresentarem dificuldades para o enraizamento e conseqüentemente a aclimatização (GEORGE, 1996).



**FIGURA 3:** Número de folhas por explante (A) e porcentagem de calos na base do explante (B) de *Hyptis ramosa* Pohl ex Benth submetidos a diferentes concentrações das citocininas BAP, CIN e TDZ. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de *Tukey*. UEFS, Feira de Santana/BA, 2015.

Os resultados obtidos para os parâmetros de enraizamento demonstraram interação dupla (concentração de AIB e concentração de carvão ativado) altamente significativa ( $p < 0,01$ ) para as variáveis comprimento da maior raiz e porcentagem de sobrevivência dos brotos (Apêndice - B). Para a porcentagem de enraizamento não houve interação significativa, sendo influenciada de modo significativo apenas pelo carvão ativado ( $p > 0,01$ ) (Apêndice - B). Contudo, para porcentagem de enraizamento dos brotos não foi possível o ajuste de um modelo matemático significativo para a variável em análise, tanto na presença quanto na ausência de carvão ativado (TABELA 3).

**TABELA 3:** Porcentagem de enraizamento de brotos de *Hyptis ramosa* Pohl ex Benth em diferentes concentrações de AIB e carvão ativado em meio de cultura MS/2 aos 45 dias de inoculação. UEFS. Feira de Santana, BA, 2015.

Concentração AIB ( $\mu\text{M}$ )	Carvão ativado ( $\text{g L}^{-1}$ )	
	0,0	1,0
0,0	95a	95a
1,0	90a	90a
1,5	95a	90a
2,0	100a	65b

\*Médias seguidas pelas mesmas letras na coluna não diferem entre si estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de *Tukey*.

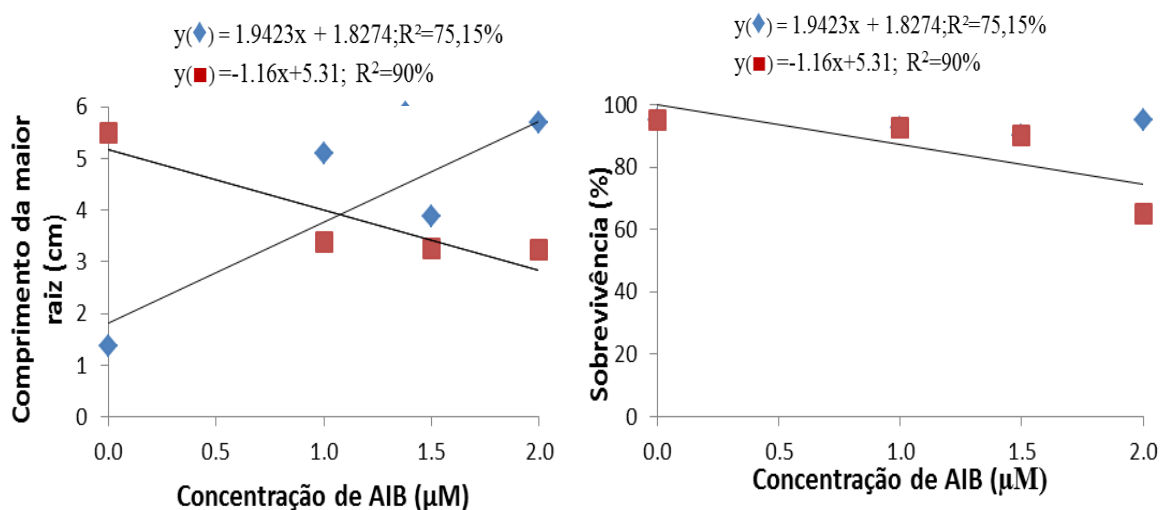
A taxa de enraizamento dos brotos de *H. ramosa* variou de 90 a 100% nos tratamentos contendo AIB na ausência de carvão ativado (TABELA 1). Verificou-se ainda

a formação de raízes em todas as microplantas cultivadas em meio sem a adição de auxinas, sendo observadas taxas acima de 90% independente da adição de carvão ativado (TABELA 3). Esse resultado corrobora com o reportado por Iapichino e Airò (2008), para culturas de *Metrosideros excelsa* Sol. ex Gaertn, no qual também observaram a formação de raízes em meio isento de regulador vegetal (33%). A adição do carvão ativado ao meio de cultura resultou em uma menor taxa de enraizamento quando o meio de cultura foi suplementado com 3.0 $\mu$ M de AIB (65%). As porcentagens de enraizamento encontradas para *H. ramosa* foram superiores a observada para *Prunus salicina* Lindl (43,3%) (CANLI; TIAN, 2009).

Os resultados obtidos para a taxa de sobrevivência dos brotos durante a fase de enraizamento de *H. ramosa* mostraram um comportamento linear ( $p < 0,01$ ) decrescente para o efeito das concentrações de AIB utilizadas, na presença de carvão ativado, enquanto que na ausência do carvão ativado não se obteve um modelo matemático representativo (Figura 3B). Resultados observados por Vieitez et al. (2009) mostraram que a taxa de sobrevivência dos brotos de *Quercus* spp. foi maior com a adição de carvão ativado ao meio de enraizamento. Entretanto, os resultados observados para *H. ramosa* foram superiores ao reportado por Sudha et al. (2005), no qual taxas de sobrevivência dos brotos de *Decalepis arayalpathra* Joseph & Chandras não superaram 28%, independente da concentração de AIB adicionada ao meio de cultura na ausência de carvão ativado. Os resultados obtidos demonstram que a adição do carvão ativado ao meio de cultura não foi eficiente para melhorar a etapa de enraizamento de *H. ramosa*, provavelmente em função da capacidade do carvão ativado de modificar o pH e a composição do meio de cultura, devido ao seu poder de adsorção de cátions, nutrientes e reguladores vegetais, que são fundamentais para o enraizamento dos brotos, conforme sugerido por Gutiérrez (2010).

Para o comprimento da maior raiz observou-se uma resposta linear ( $p < 0,01$ ) crescente para os efeitos das concentrações de AIB utilizadas, na ausência de carvão ativado. Já na presença de carvão ativado obteve-se um modelo linear ( $p < 0,05$ ) decrescente para o efeito das concentrações de AIB utilizadas (FIGURA 3A). O AIB tem sido o fitoregulador mais utilizado dentre as auxinas sintéticas para a indução da rizogênese *in vitro* de espécies vegetais (MELO et al., 2001) em decorrência da sua elevada estabilidade em relação a outros fitoreguladores, a exemplo do AIA (ASSIS; TEIXIERA, 1998; SOUZA; PEREIRA, 2007). Contudo, as respostas na rizogênese variam de acordo com a espécie estudada (ASSIS; TEIXIERA, 1998). A utilização do AIB mostrou-se benéfica para o comprimento das raízes de macieira (*Malus domestica* Borkh), sendo que a

concentração de 1  $\mu\text{M}$  o AIB promoveu resultados superiores aos obtidos com ANA e AIA, produzindo raízes com comprimento médio de 23 mm (SCHUCH; PETERS, 2002). Resultados contrários aos obtidos neste experimento foram observados para *Bauhinia cheilanta* (Bong.) Steud (GUTIERREZ, 2012) e *Lavandula angustifolia* Miller (MACHADO et al., 2013), em que a utilização de maiores concentrações de AIB resultaram em um menor comprimento de raízes.



**FIGURA 3:** Comprimento da maior raiz (A) e porcentagem de sobrevivência dos brotos (B) de *Hyptis ramosa* Pohl ex Benth, cultivada em meio de cultura MS/2 suplementado com diferentes concentrações de AIB (0,0; 1,0; 1,5; 2,0, $\mu\text{M}$ ) e carvão ativado (CA) (0,0 e 1,0 g L<sup>-1</sup>) (Com CA  $\diamond$  e sem CA  $\blacksquare$ ) UEFS. Feira de Santana, BA, 2015.

Durante a fase de aclimatização de *H. ramosa* não se detectou efeito da fase de pré-aclimatização, com uso da vedação de PVC ou algodão, sobre o percentual de sobrevivência das plantas (Apêndice - C) Em todos os tratamentos testados as taxas de sobrevivência durante a fase de aclimatização foi de 100%. Esses resultados são muito promissores, pois a baixa taxa de sobrevivência de plantas quando transferidas do meio de cultura para o ambiente *ex vitro* é um dos maiores limitantes à produção comercial das plantas micropropagadas (DONNELLY; VIDAVER, 1984). Os resultados apontam para a possibilidade de multiplicação comercial da espécie *H. ramosa* utilizando a organogênese direta, a partir de segmentos nodais.



#### 4 CONCLUSÕES

A propagação *in vitro* de *H. ramosa* é possível utilizando-se o segmento nodal como fonte de explante, em meio de cultura MS suplementado com BAP. O enraizamento *in vitro* ocorre mesmo na ausência de auxinas no meio de cultura. A espécie apresenta grande resistência à etapa de aclimatização, com sobrevivência de 100%, independentemente da realização da fase pré-aclimatização.

#### REFERÊNCIAS

- ASMAR, S. A. et al. Citocininas na multiplicação *in vitro* de hortelã-pimenta (*Mentha x Piperita* L.). Revista **Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.13, especial, p.533-538, 2011.
- ASSIS, T. F.; TEIXEIRA, S. L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A.C. CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Orgs.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa, 1998. p. 261-296.
- BOTREL, P.P. **Micropropagação, Teor e Composição Química Volátil de *Hyptis marruboides* Epl. e Atividade Inseticida**. 2013. 119f. Tese (Doutorado em Agronomia/ Fitotecnia) Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2013.
- CANLI, F. A.; TIAN, L. Regeneration of adventitious shoots from mature stored cotyledons of Japanese plum (*Prunus salicina* Lind.). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 120, p. 64–69, 2009.
- CID, L. P. B. Citocininas. In: CID, L. P. B. (Ed.) **Introdução aos Hormônios Vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. p. 55-81.
- COSTA, D.T.; DROSTE, A. Efeito da esterilização sobre o estabelecimento da cultura *in vitro* de *Rosmarinus officinalis* Linn. (Lamiaceae). **Pesquisas Botânica**, São Leopoldo n 61, p. 315-324, 2010.
- DONNELLY, D.J.; VIDAVER, W.E. Pigment content and gas exchange of red raspberry *in vitro* and *ex vitro*. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, Alexandria, v.109, n.2, p.177-181, 1984.

FALCÃO, D. Q.; MENEZES, F. S. Revisão etnofarmacológica, farmacológica e química do gênero *Hyptis*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v.84, n.3, p.69-74, 2003.

FEITOSA, R.B. et al.. Propagação *in vitro* de *Hyptis pectinata*. Ciclo de palestras sobre cultivo *in vitro* de plantas. In: Ciclo de palestras da Embrapa, 3. **Anais eletrônicos...** Sergipe: Embrapa. Disponível em <[http://www.cpatc.embrapa.br/publicacoes\\_2012/III\\_ciclo\\_de\\_palestras\\_final.pdf](http://www.cpatc.embrapa.br/publicacoes_2012/III_ciclo_de_palestras_final.pdf)>. Acesso em: 17 abr. 2014.

FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.35, n.6, p. 1039-1042, 2011.

GEORGE, E. F. Plant Tissue Culture Procedure – Background. In: GEORGE, E. F. et al. (Ed.), **Plant Propagation by Tissue Culture**, v.1 The Background. 3.ed. Dordrecht: Springer, 2008. p. 1–28.

GRACA, M. E. C. et al. Efeito das citocininas benzilaminopurina e thidiazuron, na multiplicação *in vitro* de brotações de *Eucalyptus dunnii* Maid. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 43, p. 107-112. 2001.

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, M. P.; NODARI, R. O. **Apostila de biotecnologia**. Florianópolis: Steinmacher, 2006. 41 p. Disponível em: <<http://www.lfdgv.ufsc.br/Apostila%20Biotecnologia.pdf>>. Acesso em: 14 abr. 2014.

GUTIÉRREZ, I.E.M. Regeneração *in vitro* via organogênese direta de *Bauhinia cheilantha*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41,p. 260–265, 2012.

HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; DAVIES JUNIOR, F.T. GENEVE, R.L. Plant propagation: principles and practices. 7.ed. New Jersey: Prentice-Hall, 2002. 880p

HARLEY, R. et al. Lamiaceae in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB142>>. Acesso em: 19 Fev. 2015.

HUETTEMAN, C.A.; PREECE, J.E. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, London, v.33, n.2, p.105-19, 1993.

IAPICHINO, G.; AIRÒ, M. Micropropagation of *Metrosideros excelsa*. **In Vitro Cellular and Developmental Biology- Plant**, Wallingford, UK, v. 44, p. 330-337, 2008.

LATA, H. et al. Thidiazuron-induced highfrequency direct shoot organogenesis of *Cannabis sativa* L. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, Wallingford, UK, v. 45,p. 12-19, 2009.

MACHADO, P.M. et al. Propagação *in vitro* e caracterização química do óleo essencial de *Lavandula angustifolia* cultivada no Sul do Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria v.43, n.2,p.283-289, 2013.

MAIA, S.S.S. et al. Germinação de sementes de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (Lamiaceae) em função da luz e da temperatura. **Revista Caatinga**, Mossoró, v.21, n.4, p.212-8, 2008.

MANDAL, J. In Vitro Flowering and Micropropagation of *Hyptis suaveolens* (Linn.) Poit.—An Important Medicinal Herb. **Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants**, Binghamton, v. 19, n 3, p. 233-247, 2013.

MELO, B. et al. Efeitos de ANA e AIB *in vitro* e crescimento de parte aérea de Guarirobeira (*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc). **Bioscience Journal**, Uberlândia, v.17, n.1,p.49-59,2001.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for a rapid growth and bioassays with tabacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Sweden, v.15, p.493-497, 1969.

MUSARURWA H.T, VAN STADEN J, MAKUNGA NP. In vitro seed germination and cultivation of the aromatic medicinal *Salvia stenophylla* (Burch. ex Benth.) provides an alternative source of alpha-bisabolol. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 61, p.287–295, 2010.

NASCIMENTO, P.K.V; FRANCO, E.T.H; FRASSETTO, E.G. Desinfestação e Germinação *in vitro* de Sementes de *Parapiptadenia rigida* Benth (Brenam). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 141-143, 2007.

NEPOMUCENO, C. **Propagação e Conservação *in vitro* de *Martianthus leucocephalus* (MART. Ex BENTH.) J.F.B. PASTORE**. 2012.180f. Tese (Doutorado em Botânica). Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia, 2012.

OLIVEIRA, C. M. A. et al. Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of *Hyptis ovalifolia* Benth. (Lamiaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo v. 15, n. 5, p. 756-759, 2008.

OLIVEIRA, L.M. et al. Effects of cytokinins on in vitro mineral accumulation and bud development in *Annona glabra* L. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.34, n.6 . 2010.

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

PEREIRA, F.D. et al. Propagação *in vitro* de chapéu-decouro (*Echinodorus cf. scaber* Rataj), uma planta medicinal. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.24, p.74-80, 2000.

SILVA, S. et al. *In vitro* propagation of *Melissa officinalis* L. and production of essential oil. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, Amsterdam, v. 2, n. 2, p.53-60, 2006.

SILVA, T.S.S. et al. Multiplicação *in vitro* de *Caesalpinia pyramidalis* (Leguminosae). **Sitientibus**, série Ciências Biológicas, Feira de Santana, v.13, n. 10, p131-132, 2013.

SOUZA, A. V.; PEREIRA, A. M. S. Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*. **Revista de Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, SP, v. 9, n. 4, p. 103-117, 2007.

SUDHA, C. G. et al. *In vitro* propagation of *Decalepis arayalpathra*, a critically endangered ethnomedicinal plant. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, Wallingford, UK, v. 41, n. 5, p. 648-654, 2005.

THORPE, T. et al. 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, 2008.

VIEITEZ, A. M. et al. In vitro regeneration of the important North American oak species *Quercus alba*, *Quercus bicolor* and *Quercus rubra*. **Plant Cell Tiss Organ Culture**, Amsterdam, v. 98, p. 135–145, 2009.

## CAPITULO 2

---

### **INDUÇÃO E ANÁLISE BIOQUÍMICA DE CALOS DE *Hyptis ramosa* Pohl ex benth.**

## RESUMO

Entre as várias técnicas ligadas à cultura de tecidos vegetais tem-se a calogênese, que consiste na indução de calos a partir de explantes vegetais, utilizando-se um estímulo hormonal adequado. Seja qual for a finalidade dos calos, a definição do meio de cultura e do tipo de explantes mais adequado, bem como a caracterização morfológica e bioquímica dos calos são etapas fundamentais. Com base nisso, o objetivo desse trabalho foi induzir a formação de calos de *Hyptis ramosa* Pohl ex Benth., uma espécie aromática nativa do semiárido, bem como caracterizá-los quanto a aspectos morfológicos e bioquímicos. Para tal, segmentos foliares e internodais foram inoculados em meio de cultura MS, suplementado com 2,4-D (0,0; 2,5; 5,0; 10,0 $\mu$ M) e BAP (0,0; 1,0; 2,5 e 5,0 $\mu$ M). A partir dos resultados obtidos, escolheu-se o melhor tratamento para construção da curva de crescimento calos e a quantificação dos teores de açúcares solúveis totais, açúcares redutores e proteína bruta. Os resultados demonstraram que para esse fim o melhor explante é o segmento nodal e que a combinação de 2.4 D e BAP é favorável a formação de calos. A curva de crescimento de calos mostrou comportamento quadrático com duas fases distintas. A análise bioquímica evidenciou o teor máximo de acumulação dos açúcares solúveis totais, açúcares redutores e proteína bruta no 14<sup>o</sup>, 21<sup>o</sup> e 14<sup>o</sup> dia de cultivo, respectivamente.

**Palavras-chave:** Plantas medicinais e aromáticas, Lamiaceae, Cultivo *in vitro*, Calogênese.

**ABSTRACT**

Among the various techniques related to plant tissue culture callus induction has consisting in the induction of callus from explants of plants, using an appropriate stimulating hormone. Callus cell are amorphous masses with high proliferation rate for diverse applications, such as plant propagation via somatic embryogenesis, induction of somaclonal variation, and for the production of byproducts via cell suspensions. Whatever the purpose of callus, defining the culture medium and the most suitable type of explant, as well as the morphological and biochemical characterization of callus are fundamental steps. Based on this, the objective was to induce the formation of callus *Hyptis ramosa* Pohl ex Benth., A native aromatic species in the semiarid region, as well as to characterize them as the morphological and biochemical aspects. To this end, leaf and internodal segments were inoculated in MS medium supplemented with 2,4-D (0.0, 2.5, 5.0, 10,0 $\mu$ M) and BAP (0.0; 1.0; 2.5 and 5,0 $\mu$ M). From the results obtained, we chose the best treatment for construction of the growth curve calluses and quantification of total soluble sugars, reducing sugars and crude protein. The results showed that for this purpose the best explants and nodal segment is that the combination of 2.4 D and BAP favors the formation of calluses. Callus growth curve showed a linear trend with two distinct phases and biochemical analysis showed that the total soluble sugar content and crude protein of callus from leaf explants decrease over the trial period.

**Key-words:** Medicinal and Aromatic Plants, Lamiaceae, Cultivation *in vitro*, Callogenesis.

## 1 INTRODUÇÃO

*Hyptis* Jacq. (Lamiaceae) é um gênero nativo e não endêmico do Brasil, abrigando aproximadamente 400 espécies ocorrentes desde o sul dos Estados Unidos até a Argentina (FALCÃO; MENEZES, 2003). No Brasil ocorrem 118 espécies, sendo que 78 delas são endêmicas e distribuídas em todas as regiões do país, adaptando-se as mais variadas condições edafoclimáticas (HARLEY et al., 2015). A espécie *Hyptis ramosa* Pohl ex Benth. é um arbusto, de origem nativa e endêmica do Brasil, sendo distribuída nos estados da Bahia, Espírito Santo e Minas Gerais (HARLEY et al., 2015). Faz parte da vegetação endêmica da Chapada Diamantina, sendo encontrada principalmente em margens de rios ou locais sujeitos a alagamentos.

A maior importância econômica do gênero *Hyptis* é decorrente de seu alto teor de óleos essenciais aromáticos, que apresentam propriedades terapêuticas comprovadas, dentre elas, antimicrobiana, antifúngica, antiinflamatória, anti-HIV, inseticida, larvicida, antidepressiva e antinociceptiva (FALCÃO; MENEZES, 2003), e ainda pela presença de compostos fixos, como diterpenos, triterpenos, lignanas e pironas (PEREDA-MIRANDA et al., 1990), substâncias de grande interesse para a indústria química e farmacológica. Além disso, seus representantes são utilizados como condimentos na culinária de diversos países, sendo apreciados por seu aroma e sabor (COSTA et al., 2005; BUENO et al., 2006).

Contudo, muitas espécies de *Hyptis* ainda não estão totalmente domesticadas e a ocorrência de problemas relacionados à sua propagação pela via seminal são frequentes (MAIA, 2008), a exemplo da elevada sazonalidade na produção de sementes, tamanho reduzido de sementes, germinação desuniforme, perda rápida de viabilidade e dormência (MAIA, 2008). Nesse sentido, o emprego de técnicas biotecnológicas, como a cultura de tecidos vegetais, constitui uma ferramenta potencial para auxiliar na resolução desses problemas, pois permitem a propagação rápida de plantas selecionadas, a conservação de plantas e tecidos em ambiente protegido e a obtenção de compostos bioativos de interesse, via cultura de células, órgãos ou plantas *in vitro*.

Na cultura de tecidos vegetais a organogênese indireta, com passagem pelo estágio intermediário de calo, tem sido a forma mais preconizada para a obtenção de altas taxas de multiplicação *in vitro* (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). O calo é uma massa amorfa de células não organizada, formado pela intensa divisão das células do explante. A consistência do calo é um parâmetro de grande importância, pois está diretamente relacionado com o tipo de rota organogênica a ser seguida. A friabilidade tem sido



relacionada com a capacidade dos calos em originar embriões somáticos, além de ser uma característica importante para obtenção de suspensões celulares, devido à capacidade das suas células se dispersarem no meio líquido (BARRUETO CID, 1992). Entretanto, o grau de friabilidade depende de vários fatores, como o tipo e idade do explante, o meio de cultura e o balanço hormonal utilizado. Dentre os reguladores vegetais utilizados para favorecer a formação de calos, as auxinas sintéticas 2,4-D e ANA e a citocinina BAP têm sido as mais utilizadas (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Diversas espécies de plantas medicinais têm sido submetidas a experimentos de indução de calos utilizando reguladores vegetais, para os mais diversos fins, como podem ser observados nos trabalhos de Lameira et al. (1994), Becker (1997), Abreu (1998), Lameira (1997), Kajiki (1996), Cerqueira et al. (2002), Silva et al. (2003), Dar; Joshi (2005), Rodrigues; Almeida (2010). Em geral, concentrações semelhantes de auxina e citocinina no meio de cultivo geram a formação de calos, entretanto, o tipo de calo varia de acordo com o balanço hormonal utilizado para cada espécie e, sobretudo, com o tipo de explante utilizado.

A caracterização bioquímica dos calos tem sido uma ferramenta utilizada para evidenciar alterações que ocorrem nas distintas fases do crescimento do calo, fornecendo dados importantes relacionados ao processo morfogênético *in vitro* de tecidos vegetais. Esses estudos podem auxiliar na identificação de fatores que desencadeiam mudanças fisiológicas nos explantes, como a aquisição da friabilidade e/ou desenvolvimento de embriões somáticos (VASCONCELOS et al. 2012). Diversos trabalhos têm utilizado a análise bioquímica como uma ferramenta para a avaliação de calos como, por exemplo, os estudos realizados por Serra et al.(2000), Santos et al. (2008, 2010) e Vasconcelos et al. (2012).

Assim, diante da inexistência de trabalhos na literatura sobre a propagação *in vitro* de *Hyptis ramosa*, este trabalho teve como objetivo definir o meio de cultura e o balanço hormonal mais adequado para indução a formação de calos em diferentes explantes, tendo em vista a organogênese indireta, bem como caracterizá-los quanto aos aspectos bioquímicos.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Local de realização dos experimentos**

Os ensaios fisiológicos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCTV) e as análises bioquímicas no Laboratório de Germinação (LAGER),

ambos localizados na Unidade Experimental Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS).

## 2.2 Indução de calos

Para indução dos calos foram utilizadas plântulas oriundas da germinação *in vitro* com aproximadamente 80 dias de idade. A indução de calos foi realizada a partir de segmentos foliares e internodais, ambos com aproximadamente 1 cm de comprimento. Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio contendo meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1969) solidificado com 0,7% de ágar e suplementado com 3% de sacarose e diferentes concentrações de 2,4-D (2,4-diclorofenoxiacético) (0,0; 2,5; 5,0; 10,0 $\mu$ M) e BAP (6-benzilaminopurina) (0,0; 1,0; 2,5 e 5,0 $\mu$ M). Em seguida, as culturas foram mantidas em sala de crescimento na ausência de luz e com temperatura  $25 \pm 3^\circ\text{C}$  por um período de 30 dias.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 4 x 4 (dois tipos de explantes x quatro concentrações de BAP x quatro concentrações de 2,4 D), totalizando 32 tratamentos. Cada tratamento foi constituído de cinco repetições, sendo cada repetição composta por quatro tubos de ensaio contendo um explante cada. Ao final do experimento foi quantificada a frequência de explantes com calos (%) e a frequência de calos oxidados (%), sendo os dados transformados para  $\text{arc sen}\sqrt{x}$ .

## 2.3 Obtenção da curva de crescimento dos calos

A partir dos resultados obtidos no experimento anterior foi definido o melhor tratamento para indução dos calos, iniciou-se novo experimento, agora para geração de calos, construção da curva de crescimento e análise bioquímica dos mesmos. A curva de crescimento dos calos foi determinada pela quantificação da matéria fresca (mg) dos calos formados, a partir do tempo “zero” (explantes no dia da inoculação) até 28 dias, em intervalos de 7 dias, totalizando 4 períodos. O percentual de crescimento dos calos foi determinado por meio da equação:  $\frac{Pf - Pi}{Pf} \times 100$ , sendo  $P_i$  = Peso inicial e  $P_f$  = Peso final de calos (LAMEIRA, 1997). Foram utilizadas quatro repetições, sendo cada repetição constituída por três unidades experimentais (três calos).

## 2.4 Análises bioquímicas

As análises bioquímicas foram realizadas em calos obtidos no 0º, 7º, 14º, 21º e 28º dias de cultivo, através do extrato aquoso, conforme metodologia descrita por Nogueira et al. (2008). Os calos foram macerados em almofariz e para cada 250 mg de calo foram

adicionados 2 mL de água destilada. As amostras permaneceram a 40°C em banho-maria por 30 minutos e foram centrifugadas a 8000 x g por 30 minutos a 25°C. O sobrenadante foi recolhido e armazenado sob refrigeração para análise posterior. A quantificação dos açúcares solúveis totais (AST) foi realizada pelo método ANTRONA (YEMM; WILLIS, 1954); dos açúcares redutores (AR) pelo método do DNS (MILLER, 1959); e da proteína bruta (PB) foi realizada pelo método de Bradford (1976). Para todas as análises bioquímicas foram utilizadas três repetições experimentais.

## 2.5 Análise estatística

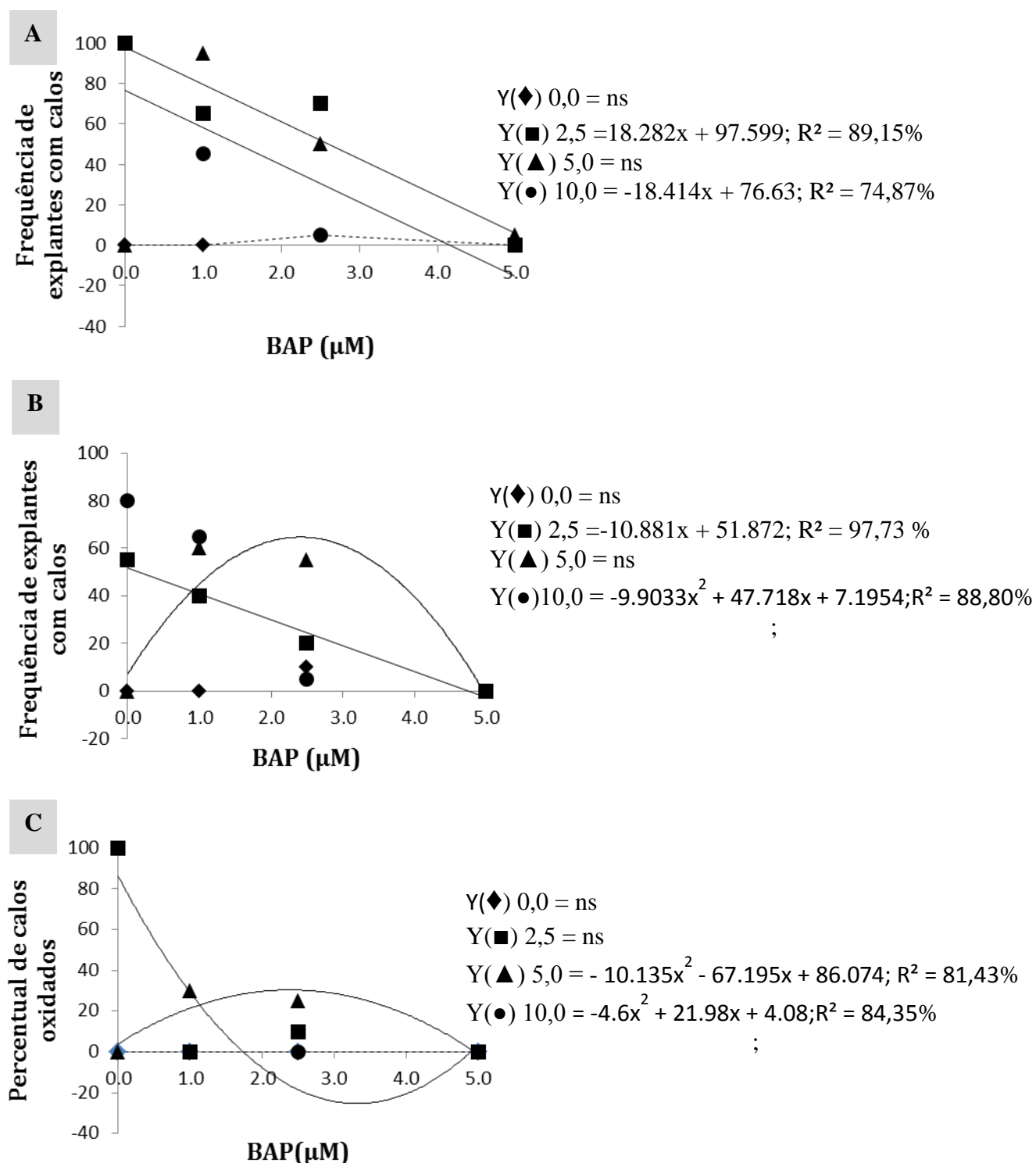
Os dados foram avaliados estatisticamente mediante análise de variância, comparando-se as médias pelo Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro para os fatores qualitativos. Para os fatores quantitativos utilizou-se ajustes de equação de regressão polinomial. Os dados foram analisados usando o programa SISVAR (FERREIRA, 2011).

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de variância indicou efeitos significativos do BAP, 2,4-D e fonte de explante, bem como interação tripla altamente significativa ( $p < 0,01$ ) entre os mesmos, na indução de calos de *Hyptis ramosa* em todas as variáveis analisadas (Apêndice – D). Verificou-se uma maior responsividade dos explantes foliares em comparação ao explante internodal (FIGURA 1 A). Esses resultados corroboram aos obtidos por Flores et al. (2006), que estudando a indução de calos em diferentes explantes de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) observaram que segmentos foliares apresentaram os melhores resultados. De modo semelhante, Dhar e Joshi (2005), trabalhando com distintos tipos de explantes na indução e crescimento de calos em *Saussurea obvallata* (DC.). Edgew. observaram influência significativa do explante foliar, com 100% de calogênese.

Quanto ao efeito da interação entre 2,4-D e BAP sobre a frequência de explantes com calos de *H. ramosa*, observou-se que na ausência de 2,4-D não foi possível o ajuste de um modelo biológico representativo para os calos formados, tanto a partir de segmentos foliares (FIGURA 1A), quanto internodais (FIGURA 1B). Entretanto, na presença de 2,4-D, a análise de regressão apontou um modelo linear decrescente ( $p < 0,01$ ) para o efeito das concentrações de BAP apenas quando se utilizou 2,4-D nas concentrações de 2,5 e 10  $\mu\text{M}$ , tanto com a utilização de segmento foliares e internodais, sobre a percentagem de calos formados a partir de segmentos foliares. A curva de resposta obtida para o efeito do BAP

na presença de 2,5 $\mu$ M de 2,4-D indica que a concentração de 2,41 $\mu$ M desse regulador promove o maior valor estimado de calogênese, 64,75% (FIGURA 1B), entretanto, esse valor não supera as médias observadas para calos obtidos a partir de segmentos foliares. Diante disso, verifica-se que as concentrações de 2,4-D demonstraram influência direta sobre a frequência de explantes com calos, evidenciando que a presença desta auxina é essencial no processo de calogênese da espécie estudada.



**FIGURA 1** – Frequência de explantes com calos oriundos do segmento foliar (A) e internodal (B) e percentual de explantes oxidados oriundos do segmento internodal (C) de *Hyptis ramosa* Pohl ex Benth, submetidos a diferentes concentrações de 2,4D e BAP ( $\blacklozenge$  0,0;  $\blacksquare$  2,5;  $\blacktriangle$  5,0;  $\bullet$  10 $\mu$ M). UEFS, Feira de Santana/ BA 2015.

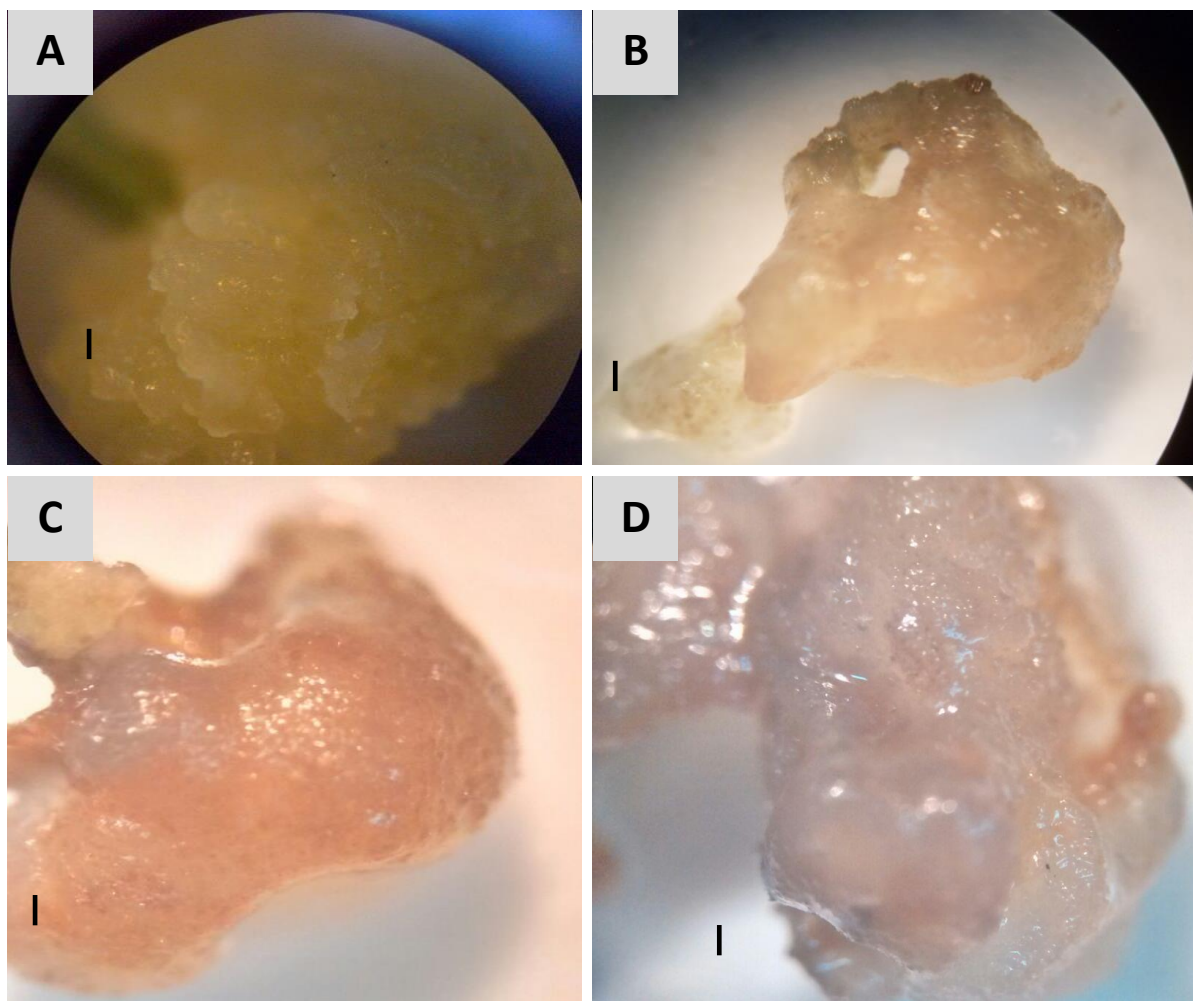
A formação de calos com a utilização de 2,4-D também foi observada por Nogueira et al. (2007), que verificaram maior eficiência da utilização desse regulador sobre a formação de calos em explantes foliares de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). O uso da auxina 2,4-D é frequente na indução da calogênese (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998), o que é facilmente compreensível, uma vez que as auxinas são responsáveis pelo desencadeamento do início da divisão celular e controle dos processos de crescimento e alongação das células (CARNEIRO et al., 2014). O 2,4-D atua também no metabolismo do RNA, levando a transcrição de RNAs mensageiros que decodificam proteínas para o crescimento, podendo desencadear uma proliferação celular desordenada quando em altas doses (GEORGE, 1996).

Apesar da utilização do 2,4-D ter promovido a formação de calos sobre os explantes foliares e internodais de *H. ramosa*, o aumento das concentrações de BAP mostrou-se inibitório, exceto na concentração de 2,5 $\mu$ M de BAP combinada com 10 $\mu$ M de 2,4-D, para os calos formados a partir de explantes internodais. Portanto, incrementos de BAP superiores a essa concentração tendem a desfavorecer a formação de calos (FIGURA 1B), sugerindo a presença de elevadas concentrações endógenas de citocininas nos tecidos, suficientes para interagir com a auxina exógena. Resultados similares foram reportados por Nogueira et al. (2007) que avaliando o efeito de diferentes concentrações da auxina 2,4-D e a sua interação com as citocininas TDZ e BAP na calogênese de explantes foliares de murici-pequeno (*B. intermedia*) observaram que o aumento da concentração de citocinina promoveu redução na porcentagem de calos formados.

Com relação à oxidação dos calos, não foi possível o ajuste de um modelo matemático representativo para o efeito do BAP, quando combinado às concentrações de 2,4-D para os calos obtidos a partir de segmentos foliares. Já para os segmentos internodais, a análise de regressão apontou um modelo biológico significativo para o efeito do BAP apenas nas concentrações de 2,5 e 10 $\mu$ M de 2,4-D, sendo quadrático ascendente ( $p < 0,01$ ) e quadrático descendente ( $p < 0,01$ ), respectivamente (FIGURA 1C). A curva de resposta obtida para calos gerados a partir de segmentos internodais na presença de 2,5 $\mu$ M de 2,4-D permite estimar que a concentração 2,4 $\mu$ M de BAP induz a oxidação em 30% dos calos, resultado similar aos obtidos para a oxidação de calos provenientes de segmentos foliares para a espécie em estudo. Esses resultados indicam que a utilização do BAP contribuiu para redução das taxas de oxidação dos calos, uma vez que, na sua ausência, foi observada a taxa máxima (100%) de calos oxidados. A oxidação dos explantes acontece devido à liberação de compostos fenólicos *in vitro*, precursores da síntese de lignina pelo

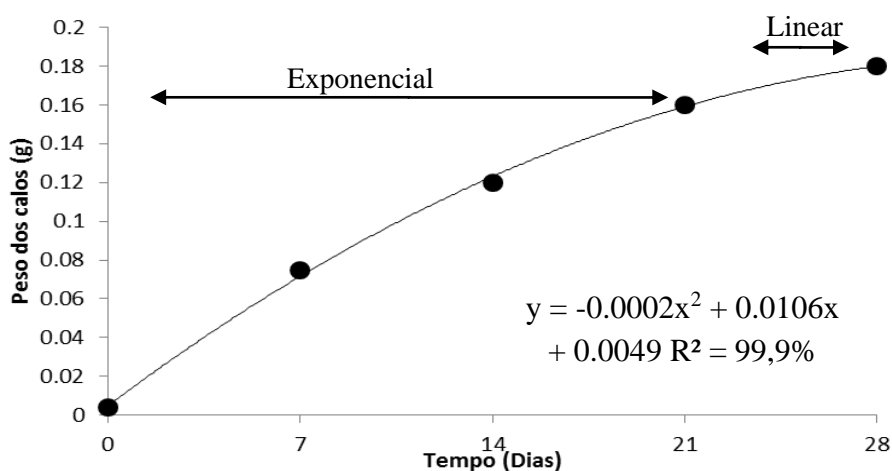
tecido injuriado. A acumulação de polifenóis e produtos de oxidação, como melanina, suberina, lignina, cutina e calose ao redor da superfície excisada alteram a composição do meio de cultura e prejudicam a absorção de metabólitos (ANDRADE et al., 2000).

Os calos formados a partir de explantes foliares de *H.ramosa* apresentaram coloração translúcida e textura variável, sendo mais friáveis nos setores periféricos e aos sete dias de cultivo (FIGURA 2). A análise do crescimento dos calos formados a partir de segmentos foliares de *H. ramosa* demonstrou um padrão quadrático com duas fases de crescimento: exponencial e linear (FIGURA 3). Santos et al. (2003), analisando a curva de crescimento de calos durante 84 dias de cultivo em explantes foliares de *Coffea arabica* cv. Rubi, detectaram a presença de três fases distintas de crescimento (lag, exponencial e linear), contudo, também não observaram a presença das fases de desaceleração e estacionária.



**FIGURA 2** - Aspectos morfológicos dos calos de *Hyptis ramosa* Pohl ex Benth. obtidos através de segmentos foliares em meio suplementado com 1,0  $\mu$ M de BAP e 5,0  $\mu$ M de 2,4D, aos 7<sup>o</sup> (A), 14<sup>o</sup> (B), 21<sup>o</sup> (C) e 28<sup>o</sup> (D) dias de cultivo. Barra = 1,0mm. UEFS, Feira de Santana/ BA, 2015.

A fase de crescimento exponencial, caracterizada pela máxima divisão celular (SANTOS et al., 2003), ocorreu do 7º até o 21º dia de cultivo, apresentando 97% de crescimento de calos. A ocorrência dessa fase variou entre o 160º e o 350º dia de cultivo para calos oriundos de segmentos foliares de *Annona glabra* L. (DECETTI, 2000). A fase crescimento linear, que consiste na diminuição das divisões celulares e aumento da área celular dos calos (SANTOS et al., 2003), ocorreu entre o 21º e o 28º dia de cultivo, com 0,38% de crescimento, quando apresentou peso fresco médio de 0,18g (Figura 4).



**FIGURA 3-** Curva de crescimento de calos de *Hyptis ramosa* Pohl ex Benth. obtidos a partir de segmentos de folhas inoculados em meio MS suplementado com 1,0 µM de BAP e 5,0 µM de 2,4D, no 0º, 7º, 14º, 21º e 28º dias de cultivo. UEFS, Feira de Santana/ BA, 2015.

Os resultados obtidos sugerem a necessidade de se ampliar o tempo de cultivo *in vitro* para a obtenção das diversas fases da curva de crescimento dos calos, pois a curva obtida não demonstrou o início de uma fase de desaceleração típica. Segundo Smith (1992), a determinação dessa fase é imprescindível, pois indica o momento mais adequado para se realizar a transferência dos calos para um novo meio de cultivo (repicagem), por causa da redução de nutrientes, secagem do ágar, acúmulo de substâncias tóxicas e/ou diminuição do oxigênio no interior das células dos calos. Landa (2000) observou que para calos originados a partir de segmentos foliares de pequizeiro a transferência dos calos para um novo meio de cultura deve ocorrer entre o 46º e o 49º dia de cultivo.

A análise bioquímica dos calos revelou que os teores dos açúcares solúveis totais (AST) se mantiveram baixos até o 7º dia de cultivo, sendo o acúmulo máximo registrado no 14º dia de cultivo, havendo declínio no teor a partir desse ponto (FIGURA 4A). O baixo percentual de açúcares solúveis até o 7º dia após a inoculação dos explantes,

provavelmente, ocorreu devido ao consumo desses metabólitos para a produção de energia, a ser direcionada para a fase exponencial de crescimento, conforme sugerido por Santos et al. (2010). Esses resultados corroboram aos encontrados por Mezzetti et al. (1991) ao avaliar o comportamento *in vitro* de calos obtidos a partir explantes foliares e nodais de *Actinidia deliciosa* CF. Liang., em que também observaram baixo percentual de açúcares solúveis totais nos primeiros dias de cultivo. Vários estudos também têm associado à composição química dos calos ao seu estágio de desenvolvimento. Para Cangahuala Inocente et al. (2009), os níveis de açúcares solúveis totais em embriões somáticos de *Acca sellowiana* (O.Berg) variaram de acordo com seus estágios de desenvolvimento, diminuindo quando o meio foi suplementado com qualquer fonte de carbono.

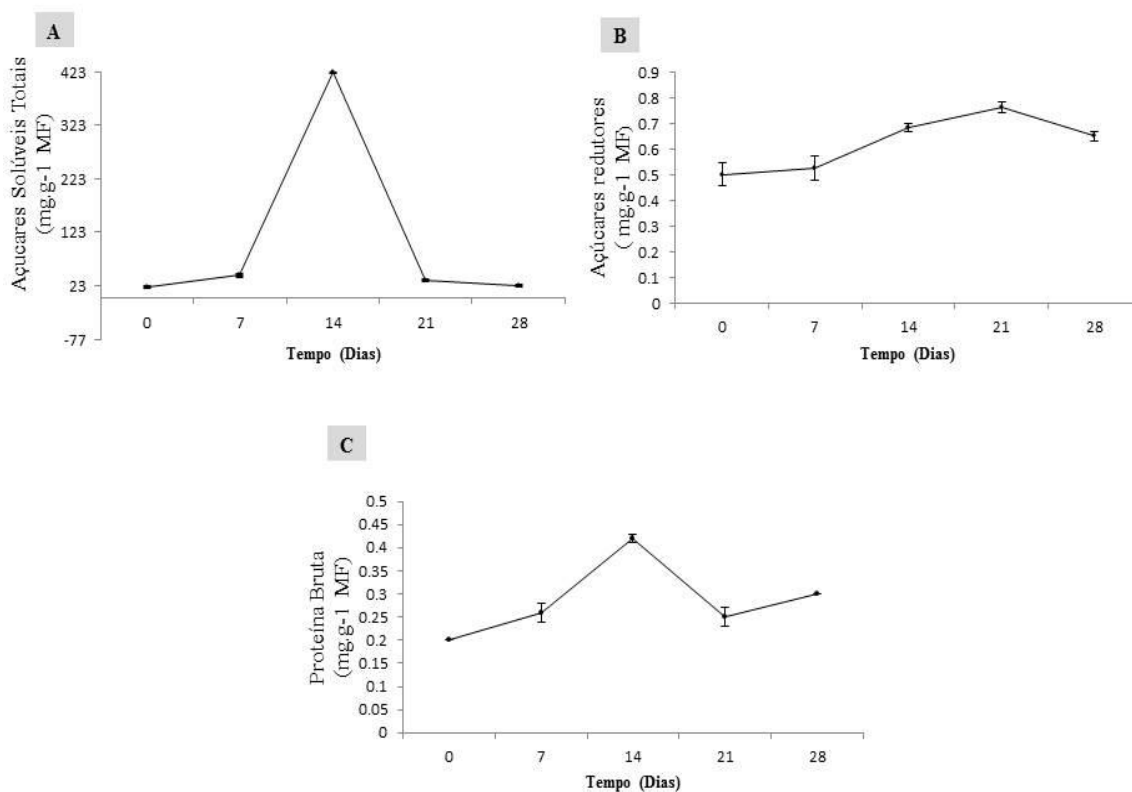
Com relação aos açúcares redutores (AR), a análise demonstrou que os teores também foram baixos inicialmente, aumentando progressivamente do 7º ao 21º dia, seguido de declínio a partir desse ponto (FIGURA 4B). Resultados similares também foram obtidos em estudos com segmentos foliares de amoreira (*Chlorophora tinctoria* (L.) Gaudichand, cultivadas em meio MS suplementado com 2,4-D (PAIVA NETO, 1996). O mesmo autor também observou que houve uma redução nos teores de açúcares redutores em calos obtidos a partir de segmentos foliares de amoreira com o avanço dos estágios de desenvolvimento dos mesmos.

Semelhante ao observado para AST e AR, os teores de proteína bruta (PB) mantiveram-se baixos até o 7º dia de inoculação, com maior acumulação no 14º dia e, após esse ponto, o teor voltou a declinar, com menor valor registrado no 21º dia (FIGURA 4C). Para Muller (2008), o aumento no teor de proteínas está diretamente relacionado a mudanças no metabolismo celular, os quais necessitam de proteínas específicas para garantir que suas funções sejam executadas. Resultados semelhantes também foram reportados por Paiva Neto (1996) e Serra et al., (2000).

A queda acentuada dos teores de PB no 21º dia de cultivo pode estar relacionada à redução dos nutrientes disponíveis no meio de cultivo. Para Wettlaufer; Leopold (1991) e Murthy; Sun (2000), esse decréscimo nos teores de PB observados em cultivo de calos, que coincidiram com elevados teores de AR, decorre de mudanças químicas em proteínas através das reações de Amadori e Mailhard, em que o grupo carbonila dos açúcares redutores reage com o grupamento amino das proteínas, sem a necessidade de presença enzimática. Essas reações são favorecidas pelas elevadas taxas de umidade, que é característica do ambiente *in vitro*, inativando as proteínas e, conseqüentemente, diminuindo seus teores nos tecidos. Esse tipo de reação pode ter sido o responsável pela



ausência de processos morfogenéticos nos calos obtidos, como a formação de brotos ou embriões somáticos, contudo, tal fato precisa ser melhor investigado.



**FIGURA 4** - Teores de açúcares solúveis totais (A); açúcares redutores (B) e proteína bruta (C) de calos de *Hyptis ramosa* Pohl ex Benth. formados a partir de segmentos foliares inoculados em meio MS suplementado com 5,0  $\mu$ M de 2,4-D + 1,0  $\mu$ M de BAP, durante 0°, 7°, 14°, 21° e 28° dias de cultivo. UEFS, Feira de Santana/BA, 2015.

## 4 CONCLUSÕES

É possível a indução de calos a partir de segmentos foliares e internodais da espécie *Hyptis ramosa* Pohl ex Benth; A combinação de 1,0  $\mu$ M de BAP e 5,0 $\mu$ M de 2,4D proporciona a maior taxa de calogênese em segmentos foliares da espécie; A curva de crescimento dos calos, nas condições de cultivo, apresenta um comportamento quadrático, com duas fases distintas. A análise bioquímica evidenciou o teor máximo de acumulação de açúcares solúveis totais, açúcares redutores e proteína bruta no 14°, 21° e 14° dias de cultivo, respectivamente.

## REFERÊNCIAS

- ANDRADE, M. W. et al. Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n. 1, p. 174-180, 2000.
- BARRUETO CID, L.P.B. A cultura de células vegetais em meio líquido. **ABCTP Notícias**, n.18, p.2-7, 1992.
- BECKER, L. **Propagação vegetativa *in vivo* e *in vitro*, indução de calos, nutrição, extração e quantificação de alcalóides nas espécies *Phyllanthus niruri* L. e *Phyllanthus corcovadensis* Muell. Arg. (Quebra-pedras).** 1997. 96f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Lisboa, v.72, p.248-254, 1976.
- BUENO, A. X et al. Effects of the aqueous extract from *Hyptis pectinata* leaves on rodent central nervous system. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 16, p. 317-323, 2006.
- CANGAHUALA INOCENTE, G.C. et al. Patterns of protein and carbohydrate foliares de sangra d'água accumulation during somatic embryogenesis of *Acca sellowiana*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, São Paulo, v. 44, n.3, p. 217-24, 2009.
- CARNEIRO. F.S. et al. Embriogênese somática em *Agave sisalana* Perrine: indução, caracterização anatômica e regeneração. **Pesquisa Agropecuária. Tropical**, Goiânia, v. 44, n. 3, p. 294-303, 2014.
- CERQUEIRA, E. S. et al. Indução de calos em erva-de-touro (*Tridax procumbens* L.) utilizando diferentes reguladores de crescimento e tipos de explantes. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.26, n.2, p.301-308, 2002.
- COSTA, J. G. M et al. Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzigium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 15, n. 4, p. 304-309, 2005.
- DECETTI, S. F. C. **Propagação *in vitro* de *Annona glabra* L.** 2000. 101 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.
- DHAR, U; JOSHI. M. Efficient plant regeneration protocol through callus for *Saussurea obvallata* DC.. Edgew. (Asteraceae); Effect of explante type, age and plant growth regulators. **Plant cell reports**, New York, v.24, p.195-200, 2005.
- FALCÃO, D. Q.; MENEZES, F. S. Revisão etnofarmacológica, farmacológica e química do gênero *Hyptis*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v.84, n.3, p.69-74, 2003.
- FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.35, n.6, p. 1039-1042, 2011.
- FLORES, R; NICOLOSO, F.T; MALDANER, J. Otimização da micropropagação de *Pfaffia tuberosa* Spreng. Hicken. **Ciência rural**, Santa Maria, v.36, p. 845-851, 2006.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: part 1: the technology**. Edington: Exegetics, 1996. 574 p.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. 1998. Micropropagacao. 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.

HARLEY, R.; FRANÇA, F.; SANTOS, E.P.; SANTOS, J.S.; PASTORE, J.F. *Lamiaceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB142>>. Acesso em: 19 Fev. 2015.

KAJIKI, F.O. **Estudo das condições para indução de calos e produção de compostos secundários em *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen**. 1996. 96f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

LAMEIRA, O. A. **Propagação *in vitro* e *in vivo* dinâmica de crescimento de células, nutrição e identificação de flavonóides em erva-baleeira (*Cordia verbenácea* L.)**. 1997. 88f. (Tese - Doutorado em Fitotecnia). Lavras: UFLA. Minas Gerais, 1997.

LAMEIRA, O.A.; COSTA, M.P.; PINTO, J.E.B.P. The efficiency of shoot and plantlet formation of *Cephaelis ipecacuanha* after three subcultures *in vitro*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.24, n.3, p.523-526, 1994.

LANDA, F.S.L. et al. Crescimento inicial de mudas de Indução *in vitro* de calos em explantes foliares de pequiheiro “mentrasto forma florífera”. **Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v. 34, n.1, 2000.

MAIA, S.S.S. et al. Germinação de sementes de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (Lamiaceae) em função da luz e da temperatura. **Revista Caatinga**, Mossoró, v.21, n.4, p.212-8, 2008.

MEZZETTI, B.; CONTE, L. S.; ROSATI, P. *Actinidia deliciosa in vitro*: II. Growth and exogenous carbohydrates utilization by explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Berlin, v. 26, p. 153-160, 1991.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Biochemistry**, New York, v.31, n.3, p.426-428, 1959.

MULLER, T.S. **Fisiologia e metabolismo da embriogênese somática e zigótica de *Acca sellowiana* (Berg) Burret**. 2008. 92f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pósgraduação em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Federal de Santa Catarina, SC.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen. v.15, p.493-497, 1969.

MURTHY, U.M.N.; SUN, W.Q. Protein modification by Amadori and Maillard reactions during seed storage: roles of sugar hydrolysis and lipid peroxidation. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.51, n.348, p.1221-1228, 2000.

NOGUEIRA, R.C. et al. Indução de calos em explantes foliares de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Ciência e agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 366-370, 2007.

NOGUEIRA et al. Curva de crescimento e análises bioquímicas de calos de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.) *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, Botucatu, v.10, n.1, p.44-48. 2008.

PAIVA-NETO, V. B. **Comportamento *in vitro* de tecido foliar e segmento nodal de moreira (*Chlorophora tinctoria* (L.) Gaudichaud)**. 1996. 39 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1996.

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

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

SANTOS, B. R. **Propagação *in vitro* e abordagem fitoquímica em salix (*Salix humbolditiana* Willd.)**. 2003. 89 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001.

SANTOS, C.G. et al. Indução e análise bioquímica de calos em segmentos foliares e nodais de *Coffea canephora* L. cv. Apoatã. **Magistra**, Cruz das Almas, v. 20, n. 1, p. 22-29, 2008.

SANTOS, D.N. et al. Análise bioquímica de calos de pinhão-manso. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, n.11, p.2268-2273, 2010.

SERRA, A. G. P.; PAIVA, R.; PAIVA, P. D. O. Análises bioquímicas de calos formados de explantes foliares de castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n. 40, p. 833- 840, 2000.

SILVA, A. S. **Indução de calos em anteras de *Coffea arabica* L., cultivadas *in vitro* na presença ou ausência de luz em meio com 2,4-D, BAP, TDZ, e cinetina**. 2003. 15 f. Monografia (Especialização em Biotecnologia) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

VASCONCELOS, J.N.C. et al. Indução, caracterização bioquímica e ultra-estrutural de calos de aroeira-do-sertão (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.14, n.4, p.592-597. 2012.

WETTLAUFER, S.H.; LEOPOLD, A.C. Relevance of amadori and maillard products reactions to seed deterioration. **Plant Physiology**, Rockville, v.97, n.1, p165-169, 1991.

YEMM, E.W.; WILLIS, A.J. The Estimation of Carbohydrate in the Plant Extract by Anthrone Reagent, **Journal of Biochemistry**, Oxford, v.57, p. 508-514, 1954.

## APÊNDICES

---

**APÊNDICE A:** Resumo da análise de variância para número de brotos por explante (NB), número de folhas por explante (NF), comprimento do maior broto (CMB); número de raízes (NR), porcentagem de explantes responsivos (% ER), porcentagem de brotos hiperhídricos (%BH) e porcentagem de formação de calos na base do explante (%FCB) de brotações de *Hyptis ramosa* Pohl ex Benth., 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*. UEFS, Feira de Santana/BA, 2015.

Quadrados Médios								
FV	GL							
		NB	NF	CMB	NR	% ER	%BH	%FCB
<b>Citocininas (C)</b>	2	23,84**	469,77*	14,64**	5,43 <sub>ns</sub>	3571,9**	3850.2**	5006.5**
<b>Concentração (c)</b>	4	11,73*	599,30*	80,20**	64,54**	2763,0**	11452.**	3181.8**
<b>C x c</b>	8	17,60**	354,17**	18,89**	12,64**	2040,7**	3861.2**	5518.9**
<b>Resíduo</b>	5 4	3,90	86,35	2,03	2,44	315,4	574.03	420.1
<b>CV%</b>		55,81	45,36	36,39	62,48	19,26	52,16	50,85

\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F. ns Não significativo.

**APÊNDICE - B:** Resumo da análise de variância para porcentagem de enraizamento (%ENR), comprimento da maior raiz (CMR) e porcentagem de sobrevivência dos brotos de *Hyptis ramosa* Pohl ex Benth, em diferentes concentrações de AIB (0,0; 1,0; 2,0; e 3,0 $\mu$ M) e carvão ativado (CA) (0,0 e 1,0 g L<sup>-1</sup>) em meio de cultura MS aos 45 dias de inoculação *in vitro*. UEFS. Feira de Santana, BA, 2015.

Quadrados Médios					
FV	GL	%ENR <sup>Y</sup>		CMR	%SOBR <sup>Y</sup>
<b>AIB</b>	3	0.037124 <sup>ns</sup>		7.913745 <sup>ns</sup>	0.035292 <sup>ns</sup>
<b>CA</b>	1	0.213068	**	0.117680 <sup>ns</sup>	0.121000*
<b>AIB*CA</b>	3	0.016339	<sup>ns</sup>	69.175593**	0.085708**
<b>Resíduo</b>	136	0.030603		7.845805	0.025474
<b>CV%</b>		36,06		69,96	32,24

\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F. ns Não significativo.

**APÊNDICE - C:** Resumo da análise de variância para a taxa de sobrevivência das microplantas de *Hyptis ramosa* Pohl ex Benth, em condições *ex vitro*, após 30 dias. UEFS. Feira de Santana, BA, 2015.

<b>Quadrados Médios</b>		
<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>Sobrevivência</b>
<b>TRATAMENTOS</b>	7	1.0ns
<b>Resíduo</b>	161	
<b>CV%</b>		0

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

**APÊNDICE - D:** Resumo da análise de variância para porcentagem de explantes com calos (PEC) e percentual de calos oxidados (PO) de *Hyptis ramosa* Pohl ex Benth, a partir de segmentos foliares e internodais inoculados em meio MS suplementado com diferentes concentrações de 2,4-D e BAP, UEFS. Feira de Santana, BA, 2015.

<b>Quadrados Médios</b>			
<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>PEC</b>	<b>PO</b>
<b>BAP</b>		7,558125**	14,4800331**
<b>2,4D</b>	3	13,630000**	9,6277232**
<b>EXPLANTE</b>	1	1,280000**	1,113056*
<b>BAP*2,4D*EXP</b>	12	3,592500**	0,969271**
<b>Resíduo</b>	779	95,085000	0,241983
<b>CV%</b>		148,67	163,03

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