



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DE RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS**

SUZIVANY ALMEIDA DOS SANTOS

CONSERVAÇÃO *in vitro* DE *Hyptis ramosa* Pohl ex Benth. (LAMIACEAE)

**Feira de Santana - BA
2017**

SUZIVANY ALMEIDA DOS SANTOS

CONSERVAÇÃO *in vitro* DE *Hyptis ramosa* Pohl ex Benth. (LAMIACEAE)

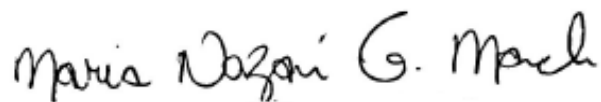
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Estadual de Feira de Santana, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador: Prof. Dr. Lenaldo Muniz de Oliveira

Co-orientadora: Dra. Marisol Ferraz

**Feira de Santana - BA
2017**

BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Maria Nazaré Guimarães Marchi
(Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Baiano – Campus Catu)



Profa. Dra. Alone Lima Brito
(Univesidade Estadual de Feira de Santana – UEFS)



Prof. Dr. Lenaldo Muniz de Oliveira
(Univesidade Estadual de Feira de Santana – UEFS)
Orientador e Presidente da Banca

Feira de Santana, BA

2017

Ficha Catalográfica – Biblioteca Central Julieta Carteado

S233c Santos, Suzivany Almeida dos

Conservação *in vitro* DE *Hyptis ramosa* Pohl *ex* Benth.
(LAMIACEAE) / Suzivany Almeida dos Santos.-, 2017.

69f.: il.

Orientador: Lenaldo Muniz de Oliveira.

Coorientadora: Marisol Ferraz

Dissertação (mestrado) –Universidade Estadual de Feira de Santana,
Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais,2017.

1.*Hyptis ramosa* – Cultivo *in vitro*. 2. Calogênese. I. Oliveira,
Lenaldo Muniz de, orient. II. Ferraz, Marisol, coorient.III. Universidade
Estadual de Feira de Santana. IV.Título.

CDU: 582.949.2

Ao meu pequeno grande Ian razão de minha vida, minha mãe
Tereza base da minha força, meu pai José pela fé e incentivo
e aos meus irmãos queridos pelo amor e torcida sempre.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A gratidão é um sentimento nobre, forte e inesquecível. Há planos que muitas vezes precisam ser adiados, porém não anulados. Nessa minha trajetória fui contemplada de grande sorte por muitos anjos terem cruzado meu caminho e de alguma maneira doar alguma contribuição.

Começo agradecendo a Deus, base de tudo na minha vida, minha força e minha fé. Ao meu pequeno Ian, que com apenas três aninhos quando iniciei foi compreensivo e com maturidade além do que sua idade permitia. Sou muito grata a minha mãe por todas as formas de apoio possível, meu pai, meus irmãos em especial Sisley que acabou dividindo comigo o papel de mãe, meus amigos... antigos e novos que ganhei no decorrer deste processo.

Foram muitas ajudas de variadas maneiras. Amigo que me deu estadia, que me deu colo, que me acalmou, que me apoiou, que prestou consulta, medicamentos, que me ensinou estatística, que olhou ou cuidou do meu filho ou que direta e indiretamente me ajudaram muito nesse processo.

Leonardo meu companheiro que mesmo não sendo da área tentava me ajudar de alguma maneira e que me presenteou com sua família tão linda e abençoada que também contribuiu com essa conquista.

Meu orientador Dr. Lenaldo Muniz de Oliveira, que além de desempenhar bem seu papel foi sempre compreensivo, sabendo respeitar meus limites e dificuldades e sempre prestativo quando o requisitei.

Marisol Ferraz, que além de co-orientadora foi minha amiga, e que mesmo não estando ali junto comigo pondo a “mão na massa” como fez muitas vezes, me dava apoio também a distância além de conselheira nas horas vagas.

A Capes pelo apoio financeiro, aos funcionários do Horto florestal pela presteza e atenção sempre que necessário e aos professores Ronaldo Simão de Oliveira pela atenção sempre que o requisitei e a professora Alone Lima Brito pelo profissionalismo, compreensão e apoio sempre.

Sou muito grata a todos...

Obrigada!

*“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo,
qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim...”*

Chico Xavier

RESUMO

O gênero *Hyptis* abrange cerca de 400 espécies distribuídas em vários países, sendo a grande maioria ainda encontrada em estado nativo e não domesticado. O gênero apresenta grande importância para a indústria farmacêutica por apresentar uma grande diversidade de espécies com grande potencial farmacológico e de interesse econômico, com diversas atividades biológicas já comprovadas, como antimicrobiana, anti-inflamatória, anestésica e inseticida. Contudo, além do endemismo presente em muitas espécies existem poucos trabalhos relacionados com a sua conservação, havendo a necessidade de mais pesquisas. No presente trabalho objetivou-se a conservação *in vitro* de plantas de *Hyptis ramosa*, além de ajustar protocolos para crioconservação de calos e gemas axilares, visando contribuir para a conservação de germoplasma desta espécie. As microplantas utilizadas foram provenientes da germinação de sementes em meio MS^{1/2}. Para conservação *in vitro* foram avaliados 10 tratamentos, com diferentes combinações entre sacarose, manitol e sorbitol. Após a inoculação as plantas foram mantidas em sala de crescimento por 240 dias, com avaliações aos 60, 120, 180 e 240 dias, quantificando-se o número de brotos, comprimento da parte aérea, número de raiz e comprimento da raiz. Para a crioconservação foram avaliadas as técnicas de vitrificação para calos e gemas axilares e de encapsulamento de gemas axilares. Os ensaios foram realizados nos Laboratórios de Germinação (LAGER) e de Cultura de Tecidos Vegetais (LCTV) da Unidade Experimental Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana. Com os resultados obtidos pôde-se concluir que é possível a conservação *in vitro* de microplantas dessa espécie, utilizando-se a combinação de 87,64mM de sacarose combinado com 87,64mM de manitol, em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1969). Com a metodologia utilizada não foi possível a crioconservação de calos e gemas da espécie, havendo a morte celular nas primeiras etapas do processo de vitrificação dos calos e na etapa criogênica para as gemas.

Palavras-chave: Calogênese; cultivo *in vitro*; espécies medicinais nativas.

ABSTRACT

The genus *Hyptis* is composed of about 400 species distributed throughout several countries, the majority being in a native and non-domesticated state. The genus has great importance for the pharmaceutical industry because of the high diversity found in its species. It has excellent pharmacological potential and is of great economic interest. Biological properties like its antimicrobial, anti-inflammatory, anesthetic, and insecticidal potential have already been demonstrated. However, in addition to the endemism present in many species, there are few works related to conservation of the genus and more research is needed to elucidate potential methods for its preservation. The objective of this research was the *in vitro* conservation of the species *Hyptis ramosa*. In addition to adjusting the protocols of cryopreservation of axillary guides and shoots, we aimed to contribute to the conservation of germplasm of this species. The microplants used came from the germination of seeds in MS1/2 medium. For the *in vitro* conservation, 10 treatments were evaluated, with different combinations between sucrose, mannitol, and sorbitol. After inoculation, the plants were maintained in a growth room for 240 days and evaluated at 60, 120, 180, and 240 days. Each evaluation quantified the number of shoots, shoot length, root number, and root length. For cryopreservation, the techniques of vitrification for axillary calluses and buds and for encapsulation of axillary shoots were evaluated. The tests were carried out in the Laboratory of Germination (LAGER) and Vegetable Tissue Culture (LCTV) of the Horto Florestal Experimental Unit da Universidade Estadual de Feira de Santana. With the results obtained, we concluded that *in vitro* conservation of microplants of this species is possible using the combination of 87.64 mM sucrose combined with 87.64 mM mannitol in MS medium (MURASHIGE; SKOOG, 1969). With the methodology used, cryopreservation of calluses and shoots of the species was not possible. Cell death occurred in the first stages of the callus vitrification process and in the cryogenic stage for the shoots.

Key words: Callogenesis; *in vitro* culture; native medicinal species.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	10
2	REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1	Gênero <i>Hyptis</i> (Lamiaceae).....	12
2.2	Conservação de Recursos Genéticos Vegetais	14
2.3	Conservação <i>in vitro</i>	17
2.4	Crioconservação	19
	REFERÊNCIAS	21
	CAPÍTULO I.....	26
	CONSERVAÇÃO <i>in vitro</i> DE <i>Hyptis ramosa</i> Pohl ex Benth. (LAMIACEAE).....	26
	RESUMO	27
	ABSTRACT	28
1	INTRODUÇÃO	29
2	MATERIAIS E MÉTODOS	31
2.1	Local de realização dos experimentos	31
2.2	Estabelecimento <i>in vitro</i>	31
2.3	Conservação <i>in vitro</i>	33
2.4	Análise estatística	34
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
4	CONCLUSÃO.....	42
	REFERÊNCIAS	42
	CAPÍTULO II.....	46
	AJUSTE DE PROTOCOLO PARA CRIOCONSERVAÇÃO DE CALOS E GEMAS AXILARES DE <i>Hyptis ramosa</i> Pohl ex Benth (LAMIACEAE)	46
	RESUMO	47
	ABSTRACT	48
1	INTRODUÇÃO.....	49

2	MATERIAL E MÉTODOS.....	52
2.1	Local de realização dos experimentos	52
2.2	Estabelecimento <i>in vitro</i>	52
2.3	Indução de calos	53
2.4	Pré-cultivo	53
2.5	Vitrificação.....	53
2.6	Encapsulamento-desidratação	55
2.7	Teste de viabilidade	55
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
4	CONCLUSÃO.....	63
	REFERÊNCIAS	63
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	65
	APÊNDICE 1	66
	APÊNDICE 2	66
	APÊNDICE 3	67
	APÊNDICE 4	67

1 INTRODUÇÃO GERAL

O crescimento populacional tem elevado consideravelmente os hábitos de consumo , levando a degradação de habitats naturais e a uma drástica diminuição de espécies nativas (SANTOS, 2000). Muitas espécies vegetais têm sofrido com esta degradação, estando inseridas neste contexto as plantas medicinais.

Plantas medicinais são espécies que possuem na sua composição substância de ação terapêutica, sendo utilizadas pelo homem desde que estes surgiram na terra (CARNEIRO et al., 2014). O uso destas plantas é de interesse tanto popular quanto de indústrias de atividades diversas e, aliado a isto, tem sido freqüente o extrativismo descontrolado, tornando-se essencial a busca de ações que promovam a conservação ou modos sustentáveis de exploração (BARATA et al.,2016).

O gênero *Hyptis* é pertencente à família Lamiaceae. É um gênero detentor de várias espécies com propriedades medicinais e terapêuticas graças à presença de óleos essenciais e compostos resultantes de seu metabolismo secundário, com diversas propriedades terapêuticas já comprovadas (FALCÃO; MENEZES, 2003). Dentre essas propriedades terapêuticas foi possível constatar capacidade na inibição de células cancerosas (ARAI et al., 2015), proteção no trato gastrointestinal (CALDAS et al., 2014) , efeito antioxidante na neutralização de radicais livres (PAIXÃO et al., 2012) além de propriedades anti-inflamatórias, anti-microbiana, inseticida (ANDRADE et al., 2010), entre outras. O gênero merece atenção ainda pelo elevado grau de endemismo de diversas espécies existentes no Brasil, principalmente no bioma caatinga (Harley et al., 2015). Neste aspecto, é importante salientar a busca de estratégias para sua conservação.

Estudos visando à conservação do germoplasma de espécies medicinais e aromáticas vem crescendo expressivamente nos últimos anos, atrelado ao grande potencial econômico representado por estas espécies (SOUZA, 2015). Existem diferentes maneiras de preservar o material biológico de espécies vegetais, dentre elas estão à conservação *in vitro* e a crioconservação, que mesmo sendo formas distintas de se conservar germoplasma, ambas são formas de conservação *ex situ*, ou seja, que ocorre fora de seu habitat natural (SANTOS, 2000; PILATTI et al., 2010).

A conservação *in vitro* é uma estratégia que visa à manutenção de plantas mantendo sua integridade genética e biológica em ambiente asséptico e com todas as condições controladas (LIMA-BRITO et al., 2011). Esse modo de conservação utiliza-se das técnicas da cultura de tecidos vegetais, ocupando espaço reduzido, com condições adequadas, em ambiente seguro fora de contaminantes (NEPONUCENO, et al., 2014). A técnica de conservação *in vitro* basei-se no crescimento reduzido através de alterações no meio de cultura, podendo ser estas através do uso de compostos osmorreguladores, retardantes de crescimento ou alterações de temperatura ou luminosidade, para que desta forma aumente os intervalos entre os subcultivos (FARIA et al., 2006; ENGELMANN, 2010; CHAVARRIA et al., 2015).

Outra maneira de conservação *ex situ* é a crioconservação, que consiste em um modo rápido de congelamento pela imersão em nitrogênio líquido a -196°C , sendo esta forma mais benéfica em relação à técnica anterior, pois permite maior tempo de conservação, menor risco de perda de material biológico, baixo custo, entre outros benefícios. O maior desafio da técnica está na proteção do material biológico contra a formação de cristais de gelo intracelular, que pode causar danos a célula, e isto pode ocorrer tanto na etapa de congelamento quanto na de descongelamento (SANTOS, 2000, VIERIA, 2000, CARVALHO; VIDAL, 2003).

Hyptis ramosa Pohl ex Benth. (Lamiaceae) é espécie nativa e endêmica do Brasil, distribuída principalmente no cerrado. Além de compor um gênero bem discutido em relação aos compostos bioativos, com diversos trabalhos relacionados ao gênero, poucos estudos foram direcionados à espécie, buscando a sua micropropagação (SOUSA, 2015) e caracterização e conservação de sementes (FERRAZ, 2016), contudo, pouco se sabe sobre a conservação *in vitro* desta espécie, sendo importante o desenvolvimento de protocolos.

Buscando contribuir para a conservação de germoplasma de espécies medicinais endêmicas do semiárido, o presente trabalho objetivou desenvolver protocolos para conservação *in vitro* e crioconservação de *Hyptis ramosa* Pohl ex Benth. (Lamiaceae).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Gênero *Hyptis* (Lamiaceae)

A família Lamiaceae compreende cerca de 7.200 espécies, divididas em sete subfamílias e 240 gêneros, sendo *Hyptis* o maior deles. No Brasil encontram-se 34 gêneros com 496 espécies (HARLEY; PASTORE, 2012). As plantas da família Lamiaceae possuem grande diversidade morfológica, com hábito herbáceo, arbustivo ou arbóreo, caule geralmente quadrangular em corte transversal, folhas opostas simples ou raramente partidas, pecioladas, sésseis ou com pedúnculos curtos e são frequentemente odoríferas devido à presença de óleos voláteis em suas folhas, flores e caules (FALCAO ; MENEZES, 2003).

Esta família tem sido relativamente bem estudada no aspecto químico e em relação ao seu metabolismo, apresentando grande variedade de classes de micromoléculas com representação em várias vias metabólicas, como do ácido acético, ácido chiquímico e ainda biossíntese mista (FALCAO; MENEZES, 2003). Destaca-se por seu grande valor comercial, com metabólitos importantes para a indústria de perfumes, cosméticos e medicamentos, principalmente por ser produtora de óleos voláteis (COÊLHO, 2014).

O gênero *Hyptis* está distribuído desde o sul dos Estados Unidos até a Argentina e é composto por aproximadamente 400 espécies, com grande variabilidade na forma vegetativa e no hábito de crescimento, sendo composto por ervas, arbustos, sub-arbustos e raramente árvores pequenas. O gênero passou por revisão taxonômica recente com base em estudos moleculares, sendo redistribuído em cinco gêneros: *Hyptis*, *Eplingiella*, *Gymneia*, *Martianthus* e *Mesosphaerum* (HARLEY; PASTORE, 2012), contudo, a espécie *Hyptis ramosa* Pohl ex Benth. foi mantida no mesmo gênero.

No Brasil o centro da diversidade desse gênero se encontra nos campos cerrados do Brasil Central, mais especificamente nos estados de Minas Gerais, Bahia e Goiás, sendo que algumas espécies, como *Hyptis tetracephala* e *Hyptis heterodon* são encontradas exclusivamente no Brasil (BORDIGNON, 1990). Diversas espécies do gênero *Hyptis* apresentam grande endemismo na vegetação do bioma Caatinga. Harley (2000) descreveu 11 espécies de *Hyptis* como sendo endêmicas na Caatinga, sendo três espécies com ampla distribuição (*H. martiusii* Benth, *H. leucocephala* Mart. e *H. platanifolia* Mart.); duas com distribuição restrita a poucas áreas (*H. leptostachys* e *H. caliada*) e seis espécies com distribuição exclusiva a um ou poucos locais (*H. longicaulis* Harley, *H. pinheiroy* Harley, *H.*

sanctigabrielii Harley, *H. stachydifolia* Epling, *H. viaticum* Harley e *H. simulans* Epling), sendo as quatro primeiras exclusivas de locais específicos do estado da Bahia.

Um aspecto relevante do gênero *Hyptis* é a grande importância etnofarmacológica e medicinal de suas espécies. Vários países além do Brasil utilizam as espécies desse gênero para fins medicinais, a exemplo da *H. suaveolens*, utilizada no tratamento de doenças respiratórias, com propriedades antissépticas e *H. capitata*, que é utilizada no tratamento de asma, resfriados e doenças fúngicas (FALCAO; MENEZES, 2003). Esses autores demonstraram que 25 espécies do gênero já foram estudadas em relação aos aspectos etnofarmacológicos, farmacológicos e da composição química. Entre os compostos encontrados destacam-se os triterpenos, monoterpênicos, diterpenos, sesquiterpenos, hidrocarbonetos, ácidos graxos, esteróides, flavonóides, lactonas e lignanas. O estudo também destaca atividades farmacológicas importantes para representantes do gênero, como anti-fúngica, anti-microbiana, inseticida e tóxica contra algumas células cancerosas. Em outro estudo, realizado com *Hyptis fruticosa*, conhecida popularmente como alecrim de vaqueiro, foram evidenciados efeitos anti-inflamatório e antioxidante do extrato das folhas, reduzindo a formação de edemas em ratos (ANDRADE et al., 2010).

A variabilidade no metabolismo especial das plantas deste gênero tem sido reportada, com destaque para os óleos essenciais, que são valorizados por diversas comunidades que os utilizam, devido às suas propriedades terapêuticas (OLIVEIRA et al., 2011). Óleos essenciais são compostos odoríferos originados a partir de metabolismo secundário das plantas que atuam na defesa vegetal e dissipação de calor, sendo armazenados em células especiais da epiderme de folhas, flores e caules, denominados tricomas (TAIZ e ZEIGER, 2004). Os óleos essenciais apresentam importantes ações farmacológicas, como anestésico, antiespasmódico e anti-inflamatório, podendo até ser abortivo em doses elevadas. Vários constituintes químicos podem ser encontrados na composição de óleos essenciais de plantas aromáticas, com predomínio do mono e sesquiterpenos, contudo, sua composição é muito dependente de fatores genéticos e ambientais (BOTREL et al., 2010).

Hyptis ramosa Pohl ex Benth, espécie em estudo, é uma planta de hábito herbáceo, com caule e ramos de aspecto quadrangular, folhas membranosas e aspecto ramificado (Figura 1). Trata-se de uma espécie nativa e endêmica do Brasil, distribuída nos estados da Bahia, Espírito Santo e Minas Gerais (HARLEY; PASTORE, 2012). Está presente na flora natural da Chapada Diamantina com ocorrência nas margens de riachos e solos encharcados

(SOUSA, 2015). Até o momento não foram realizados estudos químicos e farmacológicos com a espécie, havendo, entretanto, estudo relacionado com a sua propagação através de organogênese direta e indireta e caracterização fitoquímica de calos (SOUSA, 2015).



FIGURA 01: *Hyptis ramosa* Pohl ex Benth: planta adulta cultivada na Unidade Experimental Horto Florestal da UEFS (A); planta cultivada *in vitro* (B); sementes em placa de germinação (C) e inflorescência (D). Foto do autor.

Por se tratar de um gênero de importância farmacológica, com produção de óleos essenciais de valor terapêutico e, ainda, pelo endemismo desta espécie, que é naturalmente brasileira, faz-se necessário estudos a cerca de sua caracterização, conservação e cultivo, sob risco de perda da diversidade dessa espécie.

2.2 Conservação de Recursos Genéticos Vegetais

O crescente aumento da população tem levado a um quadro de constante degradação dos habitats naturais das espécies, levando a uma conseqüente erosão da diversidade genética e espécies de plantas nativas ou até mesmo a sua extinção (SANTOS, 2000). Com isso, vários estudos têm sido realizados objetivando a conservação da variabilidade genética. Atividades

relacionadas com recursos genéticos vegetais têm enfoque na conservação da variabilidade genética para o futuro, com base na conservação do germoplasma e em programas de melhoramento vegetal (NASS; PATERNIANI, 2000).

Os recursos genéticos vegetais são à base da alimentação do planeta, além de fonte de fibras, energia, fármacos, dentre outros, e é essencial que estes recursos sejam corretamente caracterizados e preservados para as gerações futuras, uma vez que estes funcionam como matéria-prima para o melhoramento vegetal (NASS et al., 2012).

O termo germoplasma pode ser definido como uma unidade viva que contém a composição genética de um organismo em particular, podendo se reproduzir; é um clone representativo de uma espécie, uma amostra passível de ser mantida viva. A coleta de germoplasma é o conjunto de atividades que visam à obtenção de unidades vivas que carreguem a composição genética de um organismo ou que represente a população de uma determinada espécie com potencial reprodutivo (WALTER et al., 2005). De acordo com Medeiros e Cavallari (1992), com o objetivo de se garantir a sobrevivência de certas espécies por diversas gerações, torna-se necessário estudos buscando-se a identificação de maneiras de conservação do seu germoplasma por longo prazo.

Existem vários métodos de conservação do germoplasma, podendo ser *in situ*, ou seja, quando a conservação ocorre no seu habitat natural, ou *ex situ*, quando a conservação é realizada fora do habitat natural. A conservação *ex situ* pode ser através da manutenção de coleções em condições de campo, de casa de vegetação, de sementes em câmaras com temperatura e umidade relativamente baixa, conservação de plantas, calos ou células *in vitro*, crioconservação, entre outras (SANTOS, 2000). As principais estratégias para a conservação *ex situ* são aquelas que envolvem o armazenamento de sementes ortodoxas, o crescimento lento através da conservação *in vitro* e a crioconservação (PILATTI et al., 2010).

Dentre os recursos genéticos que merecem atenção no desenvolvimento de pesquisas e alternativas na conservação do seu germoplasma estão as plantas medicinais, que basicamente dividem-se em dois grandes grupos: o das plantas nativas e as introduzidas. Muitas espécies medicinais exóticas foram trazidas por imigrantes ao Brasil e muitas delas além de terem se adaptado bem a diferentes ambientes, são atualmente muito importantes, como a camomila (*Chamomilla recutita*), hortelãs (*Mentha sp.*), manjeriço (*Ocimum brasiliicum*), alecrim (*Rosamarinus officinalis*) entre outras. Já as espécies nativas, apesar de pouco estudadas, têm

seu uso bem difundido e muitas delas com grande importância comercial, já sendo consumidas tanto nacionalmente como internacionalmente (SCHEFFER et al., 1999).

Acredita-se que cerca de 60.000 espécies de plantas são usadas universalmente devido às suas propriedades aromáticas, medicinais e nutricionais e que toneladas de seus materiais são comercializadas (BARATA et al., 2016), além disso, estudos apontam que mais de 50% das espécies nativas que são exportadas pelo país foram coletadas em seu ambiente natural (CAMILLO et al., 2009). Assim, diante do crescente interesse global por estas plantas, incluindo uso popular, indústria farmacêutica, alimentícia e de cosméticos, aliado ao extrativismo descontrolado de plantas silvestres, ações para conservação e utilização sustentável de plantas medicinais tornam-se essenciais (BARATA et al., 2016).

Nesse contexto, deve-se pontuar que no Brasil o número de instituições que têm atividades vinculadas à conservação de germoplasma de plantas medicinais é inversamente proporcional à riqueza da biodiversidade, ainda sendo muito limitada a conservação de germoplasma de plantas medicinais no Brasil. Além do pouco número de instituições públicas que atuam na conservação dessas espécies, a maior parte possui pequenas coleções de campo, aliado à falta de estrutura e de preparo dos responsáveis pelas coleções, que muitas vezes não seguem as recomendações e padrões necessários para a criação e manutenção de bancos de germoplasma. Ressalta-se que para a conservação de recursos genéticos de plantas medicinais é necessário considerar alguns fatores fundamentais, como a origem, importância social e econômica e suas características regionais, uma vez que muitas espécies possuem uso popular relacionado à medicina tradicional, crenças ou rituais religiosos, sendo necessário estabelecer estratégias para sua conservação (SCHEFFER et al., 1999).

Contudo, tem-se observado um pequeno avanço no âmbito nacional em ações que promovam a conservação dos recursos genéticos de plantas medicinais, sobretudo após a criação da Embrapa Recursos Genéticos (CENARGEN), que através de pesquisas em torno dos recursos genéticos e biotecnologia tem contribuído para a conservação e utilização de muitas espécies de interesse, entre elas muitas medicinais. Além disso, o país tem evoluído também na implantação de unidades de conservação, ampliando a conservação *in situ*, ou seja, no seu estado natural (MMA, 2017). Além da Embrapa, o Instituto Brasileiro de Meio Ambiente – IBAMA, criou em 2001 o Núcleo de Plantas medicinais e Aromáticas – NUPLAM, visando promover o conhecimento tradicional e a sua valorização, incentivar a pesquisa científica voltada para o desenvolvimento de técnicas de cultivo e manejo, de modo

que garantam a sustentabilidade econômica e ecológica na utilização dessas plantas (AMBIENTE BRASIL, 2017). Ressalta-se também que algumas universidades públicas têm contribuído com a conservação de recursos genéticos de plantas medicinais, através de seus grupos de pesquisa em plantas medicinais, com destaque para a UnB, UFPR, UFPE, UFCE, UNICAMP, UFPA e UFMA (SCHEFFER et al., 1999).

O Grupo de Pesquisa em Plantas Medicinais e Aromáticas do Semiárido, sediado na Universidade Estadual de Feira de Santana, tem desenvolvido trabalhos relevantes relacionados com a caracterização e conservação de espécies medicinais nativas, com ênfase nas famílias Lamiaceae e Verbenaceae, a exemplo do estudo realizado por Silva (2015), com a espécie *Eplingiella fruticosa* (Salzm. Ex Benth) Harley & J.F.B. (anteriormente designada *Hyptis fruticosa*). O estudo objetivou caracterizar diferentes genótipos desta espécie, coletados nos estados da Bahia e Sergipe, por meio de dados morfológicos, agrônômicos, fitoquímicos e moleculares, constatando a existência de grande variabilidade entre os genótipos e identificando genótipos com potencial para uso em programas de melhoramento da espécie, visando à produção de óleos essenciais.

Outro trabalho importante desenvolvido pelo grupo foi realizado por Ferraz (2016), que avaliou quatro formas distintas para conservação de sementes de oito espécies da subtribo Hyptidinae: 1) caixa gerbox® em geladeira a 10°C; 2) câmara plástica hermeticamente fechada e com solução saturada de zinco em geladeira a 10°C, 3) câmara plástica hermeticamente fechada e com solução saturada de zinco em câmara de germinação tipo B.O.D a 25°C e 4) Imersão direta em nitrogênio líquido a -196°C. A autora verificou que, das oito espécies estudadas, somente para *Hyptis velutina* não foi possível a conservação de sementes com os métodos testados. A autora testou ainda a viabilidade de uso do raio-X para avaliação da qualidade das sementes armazenadas, constatando ser uma técnica eficiente, permitindo a seleção daquelas mais promissoras para conservação, assim como para o monitoramento do processo de conservação.

2.3 Conservação *in vitro*

A cultura de tecido tem sido empregada para diversas finalidades, tais como a micropropagação de plantas, obtenção de variantes somaclonais, quebra de incompatibilidade genética, produção de metabólitos secundários e na conservação *in vitro* (TORRES et

al.,1998), demonstrado grande importância prática e potencial nas áreas agrícolas, florestal, na horticultura, floricultura e fruticultura, bem como na pesquisa básica.

A micropropagação é a técnica utilizada no cultivo de plantas *in vitro* onde a planta é cultivada em ambiente asséptico com condições de temperatura e intensidade luminosa controladas, onde partes da planta são inoculadas e meio nutritivo, viabilizando a sua propagação de modo que a planta gerada mantenha as características da planta mãe (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

A conservação *in vitro* foi inicialmente utilizada como uma alternativa para resolver o problema em relação a espécies que possuem sementes recalcitrantes, por não suportarem a dessecação e temperaturas abaixo de 18°C, que é a forma de armazenamento das sementes ortodoxas. Atualmente a conservação *in vitro* tem sido uma técnica bastante utilizada em espécies de grande valor econômico, para espécies de propagação assexuada, para linhagens melhoradas e espécies nativas de difícil reprodução (SANTOS, 2000).

De modo geral, a conservação *in vitro* busca criar as condições para o crescimento lento das microplantas, reduzindo o metabolismo das plantas *in vitro* e, conseqüentemente, aumentr o intervalo entre os subcultivos. O crescimento lento tem se apresentado como uma boa alternativa para conservação *in vitro* de plantas com propriedades medicinais. Envolve a manutenção de culturas em crescimento ativo através de subculturas periódicas de brotos e segmentos nodais utilizando meio de cultura com baixa concentração salina e em baixas temperaturas, podendo-se utilizar retardantes de crescimento. Embora seja uma técnica laboriosa, que requer subculturas freqüentes, esse método apresenta grande vantagem uma vez que ele permite um intercâmbio de germoplasma de forma segura e de qualidade. Neste contexto, existem algumas estratégias que são utilizadas objetivando o crescimento mínimo, como o uso de compostos osmorreguladores no meio de cultura, de retardantes de crescimento, diminuição da temperatura, redução de sais, intensidade luminosa, entre outras (SANTOS, 2000; VIEIRA 2000; LIMA-BRITO et al., 2011; FLORES et al., 2013;).

Osmorreguladores são compostos que atuam removendo o excesso de água intracelular, através do gradiente osmótico criado por determinados compostos, como, por exemplo, manitol, sorbitol e sacarose, que podem atuar tanto como fonte de energia quanto como regulador osmótico (FLORES et al., 2013). É importante ainda destacar que ao adicionar ao meio esse tipo de composto, devem-se definir as concentrações experimentalmente, pois a efetividade destas variam a depender da espécie (MATSUMOTO

et al., 2010). A redução da temperatura e da intensidade luminosa são estratégias também aplicadas às técnicas de redução do crescimento vegetal, porém, no caso da luminosidade não se deve efetuar uma diminuição drástica, uma vez que isso pode causar estiolamento e a morfogênese (MATSUMOTO et al., 2010). A redução da temperatura é o método mais utilizado para reduzir o metabolismo da planta (LIMA-BRITO et al., 2011).

Diversos trabalhos de conservação *in vitro* têm sido realizados com plantas medicinais. Nepomuceno (2012) desenvolveu protocolo de micropropagação e conservação *in vitro* com *Martianthus leucocephalus* (Lamiaceae), concluindo que a utilização de ancimidol (retardante de crescimento) e a combinação entre sacarose e manitol, nas concentrações de 43,82mM ou de 65,73mM, são eficientes na redução do crescimento *in vitro* das plantas, sendo o tratamento mais indicado para a conservação da espécie. Em trabalho utilizando a espécie *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken (Amaranthaceae), Flores et al. (2013) observaram que em meio MS acrescido de 10g L⁻¹ de sorbitol e isento de sacarose foi possível a sua conservação *in vitro*. Em outro trabalho utilizando a espécie *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae), Alves et al. (2010) testaram diferentes meios de cultura, com diferentes combinações entre sacarose, sorbitol e manitol, constatando que para esta espécie o tratamento mais indicado para sua conservação *in vitro* foi aquele contendo MS/2 acrescido de 2% de sacarose e 4% de sorbitol.

2.4 Crioconservação

A crioconservação é a conservação do material biológico em nitrogênio líquido a -196°C ou na sua fase de vapor a -150°C. Teoricamente podem ser crioconservados diversos tipos de materiais biológicos, como sementes, protoplastos, suspensões celulares, calos, gemas, entre outros. Entretanto, a capacidade de cada tecido vegetal sobreviver à crioconservação vai depender da sua tolerância à desidratação e a temperatura no nitrogênio líquido que é utilizado no método (SANTOS, 2000). Em relação à conservação *in vitro*, a técnica de crioconservação possui maiores benefícios. Dentre as vantagens apresentadas pelo método estão o baixo custo do processo, menores riscos de perda do material biológico, a possibilidade de conservação por tempo indeterminado sem inviabilizar o material conservado e a variedade nos tipos de estruturas que podem ser crioconservadas (SANTOS, 2000; CARVALHO; VIDAL, 2003).

Entre as desvantagens estão à complexidade do processo de congelamento e descongelamento e o fato de que para cada tipo de cultura é necessário o desenvolvimento de diferentes protocolos (CARVALHO e VIDAL, 2003). O grande desafio para a crioconservação é realizar o congelamento evitando a formação de cristais de gelo intracelular e, em virtude disto, é que foram desenvolvidas técnicas de crioconservação baseadas na vitrificação e no encapsulamento (VIEIRA, 2000).

Para qualquer procedimento de crioconservação é necessário preparar o material a ser conservado para aplicação em nitrogênio líquido. A vitrificação é uma alternativa de proteção celular que pode ser feita com a ação de crioprotetores, como DMSO (Dimetilsulfóxido), glicerol, sacarose, etileno glicol, ente outros. Crioprotetores são substâncias capazes de proteger os tecidos vegetais contra danos provenientes do processo de congelamento. Essas substâncias permitem a redução rápida de água e, assim, reduz o tamanho dos cristais formados durante o processo (NOGUEIRA, 2010). A vitrificação tornou-se um dos principais métodos de crioconservação de estruturas vegetais e uma relevante vantagem deste método é a possibilidade de congelamento rápido através da imersão direta em nitrogênio líquido. A vitrificação baseia-se na utilização de uma solução onde ocorre a passagem da água diretamente para uma fase amorfa ou vítrea, evitando assim a formação de cristais de gelo (SANTOS, 2000). A solução mais utilizada atualmente é a Plant Vitrification Solution 2 (PVS2) criada por Sakay et al. (1990), composta por 30% de glicerol (p/v), 15% de etileno glicol (p/v), 15% de DMSO (p/v) e 0,4M de sacarose em meio de cultura (CAMPOS, 2014).

Outra técnica usada para conservar o material a ser congelado é o encapsulamento ou encapsulamento-desidratação. Nesta técnica os explantes são envoltos em alginato de sódio, formando cápsulas, que são pré-cultivadas em meios compostos de sacarose e, posteriormente, desidratados em capela de fluxo laminar por exposição ao ar (SANTOS, 2001). Os explantes são transferidos inicialmente para solução de alginato a 3% (p/v) e com o auxílio de uma pipeta de Pasteur formam gotas esféricas, que serão polimerizadas em solução de CaCl_2 a 0,1M em agitador por 15 min (BENSON et al., 2007). O encapsulamento, além de minimizar os processos de desidratação, protege os explantes contra danos físicos e ambientais, sendo um método simples, eficiente e barato (CAMPOS, 2014).

Além da etapa de preparação do material, outra etapa importante no método de crioconservação é o descongelamento, podendo acarretar também formação de cristais de gelo e, desta maneira, danificar as células, inviabilizando o germoplasma conservado. Nesse

contexto, o descongelamento rápido, que consiste na imersão do material congelado em água em torno de 40°C tem sido o mais adequado para várias espécies (CAMPOS, 2014).

As pesquisas com crioconservação vêm se desenvolvendo muito rapidamente, já sendo uma forma de conservação de germoplasma utilizada para diversas espécies. Guerra e Pompelli (2001) adaptaram protocolos para crioconservação e recuperação de ápices caulinares de moranguinho. Marchi (2016) testou diferentes soluções de carregamento para crioconservação de brotos de *Discocactus zehntneri* subsp boomianus, cactácea endêmica da Bahia, e constatou que as diferentes concentrações de carregamento bem como a vitrificação não foram eficientes para a crioconservação destes explantes, já para sementes, observou-se que o início da germinação foi inversamente proporcional ao tempo de imersão no nitrogênio, concluindo que esta forma de armazenamento mantém a qualidade fisiológica das sementes.

Em se tratando de plantas medicinais poucos trabalhos têm sido desenvolvidos. Popova et al. (2009) crioconservou calos de *Ginkgo biloba* utilizando solução concentrada de sacarose e ABA como crioprotetor antes de imergir em nitrogênio líquido, optando pelo descongelamento rápido com imersão das amostras em banho de água a 41°C por 90s. Nesse trabalho constatou-se que ao realizar a incubação preliminar de calo em meio suplementado com alta concentração de sacarose e ABA por 7 dias, foi possível sua crioconservação. Em trabalho mais recente, Campos (2014) testou métodos de crioconservação de ápices de *Campomanesia pubescens* O. Berg popularmente chamada de guabirobeira, utilizando a técnica de encapsulamento, tendo verificado que é possível a crioconservação de ápices caulinares desta espécie através do método de vitrificação, obtendo sobrevivência acima de 50% de ápices após exposição ao PVS2.

REFERÊNCIAS

ALVES, R. B. N; BERTONI, B. W; VIEIRA, R. F; FRANÇA, S. C; MING; L. C; PEREIRA, AM. S. Influência de diferentes meios de cultura sobre o crescimento de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae) para conservação in vitro. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, Botucatu, v.12, n.4, p.510-515, 2010.

AMBIENTE BRASIL. **Núcleo de Plantas Medicinai**s e **Aromáticas**. Disponível em: http://ambientes.ambientebrasil.com.br/agropecuário/artigo_agropecuário/nucleo_de_plantas_medicinai_s_e_aromaticas_-_nuplam.html. Acesso em: 07 de abril de 2017.

ANDRADE, A. M; OLIVEIRA, J. P. R; SANTOS, A. L. L. M; FRANCO, C. R. P. ANTONIOLLI, ESTEVAM, C. S. THOMAZZI, S. M. Preliminary study on the anti

inflammatory and antioxidant activities of the leave extract of *Hyptis fruticosa* Salzm. ex Benth., Lamiaceae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.20, n.6, p. 962-968, 2010.

ARAI, M. A; UCHIDA, K; SADHU, S. K; AHMED, F; KOYANO, T; KOWITHAYAKORN, T; ISHIBASHI, M. Hedgehog inhibitors from *Artocarpus communis* and *Hyptis suaveolens*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 23, 4150–4154, 2015.

BARATA, A. M; ROCHA, F; LOPES, V; CARVALHO, A. M. Conservation and sustainable uses of medicinal and aromatic plants genetic resources on the worldwide for human welfare. **Industrial Crops and Products**, v.02, n.035, 2016.

BENSON, E. E; HARDING, K; JOHNSTON, J. W. **Cryopreservation of Shoot Tips and Meristems**. Methods in Molecular Biology, vol. 368: Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols, Second Edition Edited by: J. G. Day and G. N. Stacey © Humana Press Inc., Totowa, NJ. 2007.

BORDIGNON, S. A. L. 1990. **O Gênero *Hyptis* Jacq. (Labiatae) no Rio Grande do Sul**. Dissertação (Mestrado - Instituto de Biociências) Universidade Federal do Rio Grande do Sul -RS.

BOTREL, P. P; PINTO, J. E. B. P; FERRAZ, V; BERTOLUCCI, S. K. V; FIGUEIREDO, F. P. Teor e composição química do óleo essencial de *Hyptis marruboides* Epl., Lamiaceae em função da sazonalidade. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 32, n. 3, p. 533-538.2010.

CARNEIRO, F. M; SILVA, M. J. P; BORGES, L. L; ALBERNAZ, L. C; COSTA, J. D. P. Tendências dos estudos com plantas medicinais no Brasil. **Revista sapiência: sociedade, saberes e práticas educacionais**, v.3, n.2, p. 44-75.2014.

CHAVARRIA, G; ROSA, W. P; HOFFMANN, L; DURIGON, M. R. Regulador de crescimento em plantas de trigo: reflexos sobre o desenvolvimento vegetativo, rendimento e qualidade de grãos. **Revista Ceres**. Viçosa, v. 62, n.6, p. 583-588, nov-dez, 2015.

CALDAS, G. F. R; OLIVEIRA, A. R. S; ARAUJO, A. V; QUIXABEIRA, D. C. A; SILVA-NETO, J. C; COSTA-SILVA, J. H; MENEZES, I. R. A; FERREIRA, F; LEITE, A. C. L; COSTA, J. G. M; WANDERLEY, A. G. Gastroprotective and Ulcer Healing Effects of Essential Oil of *Hyptis martiusii* Benth. (Lamiaceae). **Plos one**, v. 9, n.1, p. e84400, 2014.

CARVALHO, J. M. F. C; VIDAL, M. S. Crioconservação no melhoramento vegetal. Campina Grande, **Embrapa**: Nacional de Pesquisa de algodão, p. 12-21. 2003.

CAMPOS, N. A. 2014. **Estratégias para conservação in vitro de gabirobeira (*campomanesia pubescens*): Micropropagação, unidades encapsuláveis e criopreservação**. Tese (Doutorado em Programa de pós-graduação em Agronomia/Fisiologia vegetal) Universidade Federal de Lavras – MG.

CAMILLO, J; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E; VIEIRA, R. F; PEIXOTO, J. R. Conservação *in vitro* de *Cochlospermum regium* (Schrank) Pilg.- Cochlospermaceae sob regime de crescimento mínimo. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v.11, n.2, p.184-189. 2009.

COÊLHO, M. R. V. 2014. **Alterações Fisiológicas e Metabólicas em *Hyptis Fruticosa* Salzm. Ex. Benth e *Ocimum Gratissimum* L. Sob Diferentes Regimes Hídricos.** Dissertação (Mestrado em programa de pós graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Estadual de Feira de Santana – BA.

ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant Biodiversity. **In Vitro cellular developmental biology plant**, v47, n.1,p. 5-16, 2010.

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

FARIA, G. A; COSTA, M. A. P. C; JUNGHANS, T. G; LEDO, C. A. S; SOUZA, A. S. Efeito da sacarose e sorbitol na conservação in vitro de *Passiflora giberti* N. E. Brown. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 2, p. 267-270. 2006.

FERRAZ, M. 2016. **Caracterização e Conservação de Sementes de Espécies da Subtribo Hyptidinae (Lamiaceae) nativas do Semiárido Baiano.** Tese (Doutorado em Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais) Universidade Estadual de Feira de Santana – BA.

FLORES, R; ULIANA, S. C. PIMENTEL, N; GARLET, T. M. B. Sucrose and sorbitol on the *in vitro* conservation of *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken (Amaranthaceae). **Biotechnology and Biodiversity**, v. 4, n.3, p. 192-199, 2013.

GUERRA, M. P; POMPELLI, M. F. 2001. **Conservação de germoplasma in vitro.** Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de ciências agrárias, departamento de fitotecnia.

GRATTAPAGLIA, D; MACHADO, M. A. 1998. Micropropagação In: TORRES A. C, CALDAS L. S.; BUZZO J. A. (Orgs). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas.** Brasília: Embrapa v.1. e 2, p.183-260.

HARLEY, R. M. In search of Labiatae in eastern Brazil. **Vitex: a newsletter for Lamiaceae and Verbenaceae Research**, n. 1, p. 5-7, 2000.

HARLEY, R.; FRANÇA, F.; SANTOS, E.P.; SANTOS, J.S.; PASTORE, J.F. 2015 *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: 04 Jul. 2017

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

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

MMA – MINIATÉRIO DE MEIO AMBIENTE. **Conservação *in situ*, *ex situ* e on farm**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biodiversidade/conservacao-e-promocao-do-uso-da-diversidade-genetica/agrobiodiversidade/conservacao-in-situ,-ex-situ-e-on-farm>> Acesso em : 07 de abril de 2017.

MARCHI, M. N. G. 2016. **Aspectos fisiológicos, anatômicos e moleculares da propagação e conservação *in vitro* de espécies de cactos endêmicos da Bahia**. Tese (Doutorado em Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais) Universidade Estadual de Feira de Santana.

MATSUMOTO, K; CARDOSO, L. D; SANTOS, I. R. I. Manual de curadores de germoplasma – Vegetal: Conservação *in vitro*. **Embrapa Recursos genéticos e tecnologia**. Brasília-DF. 2010.

MEDEIROS, A. D. DE S; CAVALLARI, D. A. N. Conservação de Germoplasma de Aroeira (*Astronium urundeuva* (FR. ALL.) Engl. I. Germinação de sementes após imersão em Nitrogênio líquido (-196°C)1. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 14, n. 1, p. 73-75, 1992.

NASS, L. L; PATERNIANI, E. Pre-breeding: a link between genetic resources and maize breeding. **Scientia Agricola**, v.57, n.3, p.581-587, 2000.

NASS, L. L; SIGRIST, M. S; RIBEIRO, C. S. C; REIFSCHNEIDER, F. J. B. Genetic resources: the basis for sustainable and competitive plant breeding. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.12, p. 75-86, 2012

NEPOMUCENO, C. F. 2012. **Propagação e Conservação *in vitro* de *Martianthus Leucocephalus* (Mart. Ex Benth.) J.F.B. Pastore**. Tese (Doutorado em Programa de pós graduação em botânica) Universidade Estadual de Feira de Santana.

NEPONUCENO, C. F; FONSECA, P. T; SILVA, T. S; OLIVEIRA, L. M; SANTANA, J. R. F. Germinação *in vitro* de *Hyptis leucocephala* Mart. ex Benth. e *Hyptis platanifolia* Mart. ex Benth. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.16, n.4, p. 886-895, 2014.

NOGUEIRA, G. F. 2010. **Criopreservação e produção de sementes sintéticas *in vitro* de mangabeira**. Dissertação (Mestrado em programa de pós graduação em fitotecnia) Universidade Federal de Lavras.

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

PAIXÃO, M. S; MELO, M. S, OLIVEIRA, M.G. B; SANTANA M. T; LIMA, A. C. B; DAMASCENA, N. P; DIAS, A. S; ARAUJO, B. S; ESTEVAM, C. S; BOTELHO, M. A; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. *Hyptis pectinata*: Redox Protection and Orofacial Antinociception. **Phytother. Res.** 27: 1328–1333. 2012.

PILATTI, F.K; AGUIAR, T; SIMÕES, T; BENSON, E. E; VIANA, A. M. In vitro and cryogenic preservation of plant biodiversity in Brazil. **In Vitro cellular developmental biology plant**, v. 47,n1, p. 82–98, 2010.

- POPOVA, E. V; LEE, E; WU, C; HAHN, E; PAEK, K. A simple method for cryopreservation of Ginkgo biloba callus. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, v. 97, p. 337–343, 2009.
- SANTOS, I. R. I. Criopreservação: Potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.12, p. 70-84, 2000.
- SANTOS, I. R. I. Crioconservação de germoplasma vegetal. **Biociência**, n. 20, p. 60 – 65, 2001.
- SAKAY, A.; KOBAYASHI, S.; OIYAMA, I. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus senensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. **Plant Cell Reports**. v.9, p.30-33, 1990.
- SILVA, A. F. 2015. **Caracterização agrônômica, molecular e fitoquímica de *Eplingiella HARLEY & J.F.B. PASTORE***. Tese (Doutorado em Programa de pós graduação em recursos genéticos vegetais) Universidade Estadual de Feira de Santana - BA.
- SOUSA, F. P. 2015. **Micropropagação de *Hyptis ramosa Pohl ex Benth.* (LAMIACEAE)**. Dissertação (Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais) Universidade Estadual de Feira de Santana-Ba.
- SOUZA, D. C. L. Técnicas moleculares para caracterização e conservação de plantas medicinais e aromáticas: uma revisão. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.17, n.3, p. 495-503, 2015.
- SCHEFFER, M. C.; MING, L. C.; ARAÚJO, A. J. **Conservação de recursos genéticos de plantas medicinais**. In. Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas para o Nordeste Brasileiro, 1999.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719p.
- TORRES A. C, CALDAS L. S.; BUZZO J. A. (Eds). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. v.1. e 2. Brasília, Embrapa, 864p. 1998.
- VIEIRA, M. L. C. Conservação de Germoplasma in vitro. **Biociência**, v. 3, n.14, p. 18 – 20. 2000.
- WALTER, B.M.T; CAVALCANTI, T. B; BIANCHETTI, L.B; VALLS, J.F.M. **Coleta de germoplasma vegetal: relevância e conceitos básicos**. Fundamentos para a coleta de germoplasma vegetal. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005. p.28-29.

CAPÍTULO I

CONSERVAÇÃO *in vitro* DE *Hyptis ramosa* Pohl ex Benth. (LAMIACEAE)

Feira de Santana, BA

2017

RESUMO

Nos últimos anos as técnicas envolvendo a conservação *in vitro* têm sido consideradas promissoras, tanto por possibilitar a manutenção de grandes quantidades de acessos fora dos riscos do ambiente natural quanto por necessitar de pequeno espaço físico. Os métodos envolvendo o crescimento lento caracterizam-se pela redução do crescimento vegetal através de modificações no ambiente ou no meio de cultivo, que pode ser através de reguladores osmóticos ou retardantes de crescimento. A espécie *Hyptis ramosa* Pohl ex Benth (Lamiaceae) é nativa e endêmica do semiárido nordestino, pertencendo a um gênero detentor de várias propriedades terapêuticas já comprovadas. Devido à ausência de trabalhos abordando a conservação desta espécie, objetivou-se com o presente trabalho a conservação *in vitro* de brotações, através da redução do crescimento mediante utilização de condicionadores osmóticos. Os trabalhos foram conduzidos no Laboratório de Germinação e de Cultura de Tecidos Vegetais da Unidade Experimental Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana. Sementes de *H. ramosa* foram desinfestadas e inoculadas em meio MS^{1/2} para estabelecimento *in vitro*. Para conservação *in vitro* segmentos nodais obtidas das plantas germinadas *in vitro* com aproximadamente 80 dias de idade foram inoculadas em meio MS suplementado com diferentes combinações entre sacarose, manitol e sorbitol. Os experimentos foram realizados em DIC e os dados analisados no programa Sisvar 5.3. Pode-se concluir que a utilização de osmorreguladores é indicada na conservação *in vitro* de brotações desta espécie, sendo a combinação entre sacarose e manitol, ambos na concentração de 87,63mM, o tratamento mais eficiente, podendo manter-se as brotações por até 240 dias sem necessidade de subcultivos.

Palavras-chave: Crescimento mínimo; Conservação de RGV; Osmorreguladores.

ABSTRACT

In recent years techniques involving in vitro conservation have been considered the most promising, both because it allows the maintenance of large amounts of access outside the risks of the natural environment and because it requires a small physical space. Methods involving slow growth are characterized by reduced plant growth through modifications in the growth medium, which may be through osmotic or growth retardant regulators. The species *Hyptis ramosa* Pohl ex Benth (Lamiaceae) is native and endemic of the northeastern semi - arid (REGION OF BRAZIL), belonging to a genus that has been proven to have several therapeutic properties. Due to the absence of studies addressing the conservation of this species, the objective of this research was the in vitro conservation of shoots, through the reduction of growth through the use of osmotic conditioners. The work was carried out in the Laboratory of Germination (LAGER) and Vegetable Tissue Culture (LCTV) of the Experimental Horto Florestal Unit of the State University of Feira de Santana (HORTO / UEFS). *H. ramosa* seeds were sterilized and inoculated in MS1 / 2 medium for in vitro establishment. For in vitro conservation nodal segments obtained from the in vitro germinated plants with approximately 80 days of age were inoculated in MS medium supplemented with different combinations between sucrose, mannitol, and sorbitol. The experiments were performed in DIC and the data analyzed in the Sisvar 5.3 program. It can be concluded that the use of osmoregulators is indicated in the in vitro conservation of shoots of this species, the combination between sucrose and mannitol, both in the concentration of 87.63mM, the most effective treatment, being able to maintain shoots up to 240 days without the need for subcultures.

Keywords: Conservation of RGV; minimal growth; osmoregulators.

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Hyptis* é detentor de propriedades terapêuticas já comprovadas, decorrentes de seu alto teor de óleos essenciais aromáticos. Considerando este ponto de vista, cerca de 25 espécies já foram estudadas, demonstrando a importância desse gênero como fonte de compostos com propriedades antiinflamatória, antimicrobiana, inseticida, entre outras (FALCÃO e MENEZES, 2003). Da mesma forma, estudos moleculares e fitoquímicos do gênero demonstram suas propriedades medicinais (SILVA, 2015). Pertence à família Lamiaceae, é um gênero bem estudado, valorizado economicamente devido sua variada utilização, desde a culinária, industrial, medicinal ou até mesmo ornamental (FALCÃO e MENEZES, 2003).

As espécies do gênero *Hyptis* estão distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais desde os Estados Unidos até a Argentina (SILVA-LUZ et al., 2012). Para o Brasil é registrado a ocorrência de 118 espécies e, 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. No bioma 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), sendo todas ainda não domesticadas.

Apesar da importância fitoquímica e farmacológica, trabalhos científicos do gênero ainda são pontuais, havendo registros de estudos realizados objetivando a propagação das espécies (OLIVEIRA et al., 2011; NEPONUCENO et al., 2014; SOUZA, 2015), o cultivo (AZEVEDO et al., 2016), a conservação (BOTREL, 2012; SOUZA, 2015), caracterização fitoquímica (BOTREL et al., 2010; AZEVEDO, 2014) e a atividade biológica (ANDRADE et al., 2010; SILVA, 2012; COELHO, 2014; MEDEIROS, 2014; GÓES, 2015).

A espécie *Hyptis ramosa* Pohl ex Benth é um arbusto, com caule ereto, ramosíssimo, folhas ovato-oblongas e inflorescência do tipo capítulo. 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 a espécie *H. ramosa*, até a presente data, não há registros de estudos etnofarmacológicos, botânicos ou farmacológicos (SOUZA, 2015). Em trabalho recente desenvolvido pelo grupo de pesquisa

em “Plantas medicinais e aromáticas do semiárido” sediada na Universidade Estadual de Feira de Santana, foi realizado um trabalho pioneiro com a espécie *H. ramosa*, objetivando o estabelecimento e cultivo *in vitro* da mesma. Como resultado se estabeleceu um protocolo de micropropagação através da organogênese direta de segmentos nodais, com a utilização de citocininas sintéticas, verificando-se ser possível o cultivo *in vitro* da espécie, com sobrevivência de até 100% das plantas (SOUZA, 2015).

Tendo em vista a carência de estudos e a importância farmacológica do gênero, estudos de conservação do germoplasma existente são urgentes. Nesse contexto, as técnicas envolvendo a conservação *in vitro* têm sido consideradas umas das mais promissoras, devido à possibilidade de manutenção de grande número de acessos em curto espaço físico, livre dos riscos existentes no ambiente natural, garantia da fidelidade genética, além de reduzir os custos na manutenção (SILVA et al., 2016). Ressalta-se que as espécies do gênero *Hyptis* não são perenes, o que requer formas mais estáveis para a sua conservação.

A conservação *in vitro* tem contribuído para que coleções de germoplasma de diversas espécies possam ser mantidas por longos períodos, possibilitando que o material de interesse torne-se disponível para recuperação ou possível utilização futura (SÁ et al., 2015). Para isso, são necessárias condições controladas de temperatura, fotoperíodo e meio de cultura que favoreça o crescimento lento dos propágulos, além disso, a manutenção de coleções *in vitro* requer um conjunto de medidas científicas e técnicas operacionais que garantam a sua integridade (MATSUMOTO et al., 2010).

O crescimento lento consiste na redução do metabolismo da planta de modo que isso não inviabilize a sobrevivência da mesma, mantendo a sua integridade biológica. Isso pode ser feito com a utilização de compostos que podem atuar nos processos osmóticos da planta, removendo o excesso de água intracelular por meio do gradiente osmótico, fazendo com que a planta cresça de forma mais lenta (FARIA et al., 2006). São exemplos de osmorreguladores o manitol, sorbitol e a sacarose (FLORES et al., 2013). Além dos osmorreguladores, outra estratégia utilizada para reduzir o crescimento vegetal é a utilização de retardantes de crescimento, substâncias que bloqueiam etapas da via de biossíntese das giberilinas, hormônio relacionado com alongamento e expansão celular, acarretando na redução do crescimento vegetal (CHAVARRIA et al., 2015). São exemplos destes compostos o ancimidol, daminozide, flurprimidol, paclobutrazol, entre outros (CARVALHO, 2010).

Os métodos de conservação *in vitro* através da redução do crescimento têm sido aplicados com sucesso a várias espécies herbáceas de importância medicinal. Em *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken (Amaranthaceae), por exemplo, uma espécie herbácea que contém vários metabólitos secundários de interesse medicinal, avaliou-se o efeito na concentração de sacarose e sorbitol na sua conservação *in vitro* verificando-se que a mesma pode ser conservada por até 120 dias sob crescimento lento em meio contendo sorbitol (FLORES et al., 2013). Outro trabalho foi realizado com o algodão-do-campo, espécie endêmica do cerrado e muito usada na medicina popular, em que se avaliou qual a melhor condição para a conservação desta espécie, concluindo-se que o meio WPM associado à temperatura de 20°C possibilita a menor taxa de crescimento (CAMILLO et al., 2009).

Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi estabelecer protocolos para a conservação *in vitro* de *Hyptis ramosa* Pohl ex Benth através do crescimento lento, utilizando a combinação de diferentes reguladores osmóticos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

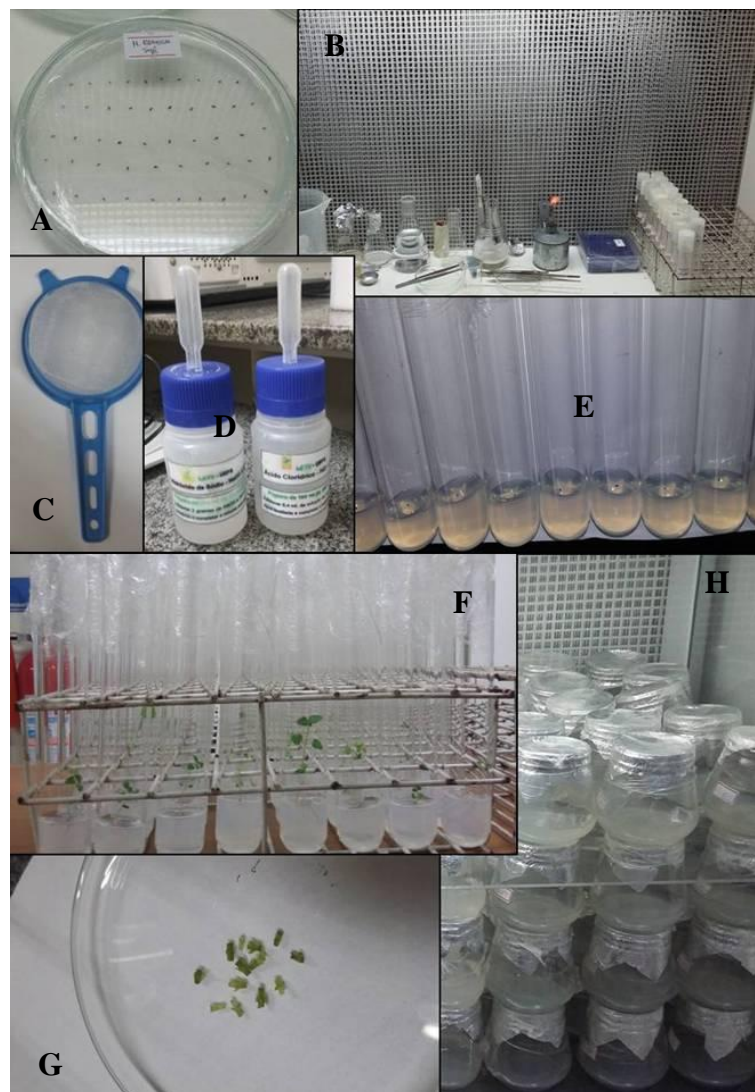
2.1 Local de realização dos experimentos

Os ensaios foram desenvolvidos no Laboratório de Germinação (LAGER) e de Cultura de Tecidos Vegetais (LCTV) da Unidade Experimentais Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana (HORTO/UEFS). As sementes de *Hyptis ramosa* Pohl ex Benth 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 (HUEFS), onde as exsicatas encontram-se depositadas (Voucher número 212750).

2.2 Estabelecimento *in vitro*

Sementes de *H. ramosa* Pohl ex Benth (figura 1A) foram desinfestadas em câmara de fluxo laminar com auxílio de uma peneira (figura 1C) em solução de álcool 70% (30s), seguido de hipoclorito de sódio a 2,5% (10 minutos), sendo em seguida lavadas quatro vezes em água destilada esterilizada. Posteriormente, as mesmas foram inoculadas individualmente

em tubos de ensaio de 25 x 150 mm contendo 10 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1969) com metade das concentrações salinas ($MS^{1/2}$), suplementado com 87,64mM de sacarose e solidificado com 0,7% de Agar (figura 1E), conforme a metodologia utilizada por Souza (2015). O pH do meio foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$ (utilizando-se NaOH ou HCl 0,1N) (figura 1D) antes da autoclavagem à temperatura de $121^{\circ}C$ por 15 minutos. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 3^{\circ}C$, fotoperíodo de 16 horas, e radiação fotossintética ativa de $40\mu mol m^{-2} s^{-1}$.



FIRURA 1: Etapas da conservação *in vitro* da espécie *Hyptis ramosa* Pohl ex Benth. Feira de Santana-Ba. 2016. Fotos do autor. Etapas do estabelecimento *in vitro*: A, B, C, D e E - desinfestação das sementes de *Hyptis ramosa* Pohl ex Benth (A, B e C), ajuste de pH do meio

(D), inoculação das sementes em tubos de ensaio contendo 10ml de meio MS^{1/2} (E); etapas da conservação *in vitro*: F, G e H – Plantas com aproximadamente 80 dias de cultivo utilizadas como fonte de explante (F), incisão de segmentos nodais contendo gemas axilares com 1,0 cm de comprimento (G), inoculação das gemas axilares em 30ml de meio MS suplementados com diferentes combinações de sacarose, manitol e sorbitol.

2.3 Conservação *in vitro*

Segmentos nodais contendo gemas axilares (1,0cm de comprimento) (Figura 1G) obtidos de plantas germinadas *in vitro* em meio de cultura MS^{1/2}, com aproximadamente 80 dias de cultivo (Figura 1F), foram utilizadas como fonte de explante. Os explantes foram inoculados em frascos contendo 30 mL meio de cultura MS (Figura 1H), suplementado com diferentes combinações de sacarose, manitol e sorbitol, de acordo com a tabela 1, compondo 10 tratamentos com 15 repetições cada, sendo cada repetição constituída por um frasco contendo 3 explantes cada. Após 60, 120, 180 e 240 dias de cultivo foram avaliadas as seguintes variáveis: número de brotos por explante, comprimento da parte aérea (cm), número de raiz e comprimento da maior raiz (cm). Aos 240 dias (final do experimento) avaliou-se o peso fresco e seco das brotações, utilizando-se 5 repetições por tratamento.

Tabela 1: Tratamentos com diferentes combinações e concentrações entre sacarose, manitol e sorbitol utilizados na conservação *in vitro* de *Hyptis ramosa* Pohl ex Benth

Tratamentos	Sacarose	Manitol	Sorbitol
T1	87,64 mM	---	---
T2	131,46 mM	---	---
T3	175,28 mM	---	---
T4	87,64 mM	43,82 mM	---
T5	87,64 mM	87,64 mM	---
T6	131,46 mM	43,82 mM	---
T7	87,64 mM	---	43,82 mM
T8	87,64 mM	---	87,64 mM
T9	131,46 mM	---	43,82 mM
T10	87,64 mM	43,82 mM	43,82 mM

2.4 Análise estatística

Os experimentos foram realizados em delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 10 x 4 (tratamento x tempo) totalizando 10 tratamentos, com 15 repetições por tratamento e 3 amostras por repetição, exceto para peso fresco e seco, onde se utilizou apenas 5 repetições com 1 amostra cada. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as diferenças de médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade e os dados transformados a raiz quadrada de $y + 1.0$ através de programa estatístico Sisvar 5.3.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise estatística dos resultados demonstrou que houve interação entre a combinação de diferentes osmorreguladores com diferentes concentrações (Tabela 1) no crescimento de *Hyptis ramosa* Pohl ex Benth, apresentando alta significância em todas as variáveis analisadas (Apêndices 1, 2, 3 e 4). Os tratamentos com combinações entre sacarose e manitol foram os que promoveram os melhores resultados sobre a redução no crescimento desta espécie, contudo, de modo geral, os resultados demonstraram uma grande variação no comprimento das brotações e no número de brotos por explante (Figura 3).



FIGURA 3: Variação no tamanho das plantas e número de brotos por explante de *Hyptis ramosa* Pohl ex Benth cultivadas em meio MS suplementado com diferentes combinações entre sacarose, manitol e sorbitol (Tabela 1). Feira de Santana-Ba. 2016. Fotos do autor.

A combinação de diferentes osmorreguladores influenciou significativamente no comprimento da parte aérea das brotações da espécie conservadas *in vitro* (Tabela 02). Os tratamentos que promoveram as menores médias de comprimento de parte aérea aos 240 dias de cultivo foram o T4, onde se obteve média de 1,83cm de comprimento e T5, com 2,08cm, não havendo diferença estatística entre eles. Ambos foram compostos por sacarose e manitol, diferindo apenas na concentração do manitol, que no T4 foi de 43,82mM e no T5 87,64mM. Este resultado foi compatível ao encontrado por Lima-Brito et al. (2011) trabalhando com a

espécie *Syngonanthus mucugensis* Giul, onde observou que os tratamentos contendo manitol foram os que promoveram menor taxa de crescimento, independente da temperatura utilizada.

TABELA 02: Análise fatorial do comprimento da parte aérea de brotações obtidas a partir de segmentos nodais de *Hyptis ramosa* Pohl ex Benth., cultivadas *in vitro* em meio MS suplementados com diferentes combinações de sacarose, manitol e sorbitol (tabela 1), durante 60, 120, 180 e 240 dias de cultivo. Feira de Santana, Bahia, 2017.

	Tratamento			Período de cultivo (Dias)			
	Sacarose	Manitol	Sorbitol	60	120	180	240
1	87,64 mM	---	---	1,45bD	1,81deC	2,25bcB	2,49dA
2	131,46 mM	---	---	1,53bD	1,77abcC	2,18cB	2,55dA
3	175,28 mM	---	---	1,63abC	2,30abB	2,49bB	3,55cA
4	87,64 mM	43,82 mM	---	1,48bB	1,62eAB	1,77eA	1,83fA
5	87,64 mM	87,64 mM	---	1,53bB	1,63deB	1,88deA	2,08efA
6	131,46 mM	43,82 mM	---	1,60abC	1,89cdB	2,13cdA	2,3deA
7	87,64 mM	---	43,82 mM	1,85aD	2,40aC	2,84aB	4,28aA
8	87,64 mM	---	87,64 mM	1,59abC	2,03bcB	2,37bcA	2,44dA
9	131,46 mM	---	43,82 mM	1,55bD	2,41aC	2,82aB	3,88bA
10	87,64 mM	43,82 mM	43,82 mM	1,55bD	1,96cC	2,25bcB	2,55dA

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e pelas mesmas letras maiúsculas nas linhas não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

O manitol é um açúcar modificado derivado alcoólico que inibe a quantidade e a velocidade de entrada de água nas células, reduzindo o crescimento vegetal (KERBAUY, 2004), fator crucial para a conservação *in vitro*. Ressalta-se que para conservação *in vitro* é

importante o crescimento reduzido, aumentando o máximo possível os intervalos de subcultivo sem inviabilizar o vegetal (ALVES et al., 2010).

Considerando o crescimento lento e a integridade do vegetal, dois aspectos buscados na conservação *in vitro*, o tratamento que mais se destacou foi a combinação de sacarose e manitol na mesma proporção (87,64mM) (T5), pois, além de promover baixo crescimento induziu alto índice de brotação, com plantas bem formadas e com bom aspecto visual (Tabela 3). A sacarose é um carboidrato que pode se comportar tanto como fonte de energia e carbono, como também osmorregulador (FLORES et al., 2013), o que explica o fato de que mesmo com baixo crescimento as plantas se mostraram viáveis e com alto índice de brotação.

TABELA 03: Análise fatorial do nº de brotos formados por explantes de *Hyptis ramosa* Pohl ex Benth. cultivados *in vitro* em meio MS acrescido de diferentes combinações de sacarose, manitol e sorbitol, após 60, 120, 180 e 240 dias de cultivo. Feira de Santana, Bahia, 2017.

	Tratamento			Período de cultivo (Dias)			
				60	120	180	240
	Sacarose	Manitol	Sorbitol				
1	87,64 mM	---	---	1,73bA	1,83gA	1,94eA	1,88eA
2	131,46 mM	---	---	1,66bA	1,83gAB	1,93eAB	2,32eA
3	175,28 mM	---	---	1,89bC	2,04fgBC	2,48eB	3,56dA
4	87,64 mM	43,82 mM	---	1,73bC	2,35efgB	3,71dA	3,46dA
5	87,64 mM	87,64 mM	---	2,0bD	3,26bcdC	4,69abB	6,28aA
6	131,46 mM	43,82 mM	---	2,0bD	2,96cdeC	4,39bcB	5,73abA
7	87,64 mM	---	43,82 mM	1,73bD	2,63defC	3,77cdB	5,10bcA
8	87,64 mM	---	87,64 mM	2,82aD	4,04aC	5,06aB	6,15aA
9	131,46 mM	---	43,82 mM	2,0bC	3,54abcB	4,44abA	4,57cA
10	87,64 mM	43,82 mM	43,82 mM	1,94bD	3,92abC	4,68abB	5,27bA

médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e pelas mesmas letras maiúsculas nas linhas não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Todos os tratamentos contendo sacarose e sorbitol promoveram altos índices de crescimento e formação de brotos, fato também observado por Flores et al. (2013) ao conservar *in vitro* *Pffafia tuberosa* (Spreng), constatando também que as plantas cultivadas em meio contendo apenas sorbitol tiveram um crescimento reduzido em relação aquelas cultivadas em meio contendo a combinação entre sacarose e sorbitol. O sorbitol é um açúcar álcool que para algumas espécies pode induzir o crescimento vegetal, atuando de forma semelhante à sacarose, e para outras espécies age somente como regulador osmótico, promovendo então a redução do crescimento (FLORES et al., 2013).

Contudo, semelhante aos resultados encontrados por Alves et al. (2010), os tratamentos com a combinação de sacarose e sorbitol foram os que promoveram maior comprimento da parte aérea das brotações após 240 dias de cultivo, tendo os tratamentos T7 (4,28cm) e T9 (3,88cm) promovido maior crescimento, o que não é vantajoso para conservação *in vitro* já que isso diminuiria os intervalos de subcultivo.

As maiores médias para número de raiz por brotação foram verificadas nos tratamentos que continham na sua composição o sobitol (T7, T8, T9 e T10), sendo o tratamento 9 (T9) o que promoveu a maior média (3,63), seguindo do T7 com média de 3,18, sugerindo que este açúcar comportou-se exclusivamente como fonte de carboidrato para o vegetal (Tabela 04).

TABELA 04: Número de raízes geradas em explantes de *Hyptis ramosa* Pohl ex Benth. cultivados *in vitro* em meio MS suplementados com diferentes combinações de sacarose, manitol e sorbitol durante 60, 120, 180 e 240 dias de cultivo. Feira de Santana, Bahia, 2017.

	Tratamento			Período de cultivo (Dias)			
	Sacarose	Manitol	Sorbitol	60	120	180	240
1	87,64 mM	---	---	1,24dA	1,0gA	1,08eA	1,0eA
2	131,46 mM	---	---	1,41cdC	1,63fBC	1,82dAB	2,15dA
3	175,28 mM	---	---	3,18aB	2,44cdAB	2,78bcA	2,75bcA
4	87,64 mM	43,82 mM	---	1,94abBC	1,76efC	2,4cA	2,18dAB
5	87,64 mM	87,64 mM	---	2,09aA	2,14deA	1,68dB	2,25dA
6	131,46 mM	43,82 mM	---	2,23aB	2,23dA	2,75bcA	2,4cdAB
7	87,64 mM	---	43,82 mM	2,14aC	2,52bcdB	2,88abAB	3,18abA
8	87,64 mM	---	87,64 mM	1,0dB	2,88abcA	3,15abA	3,0bA
9	131,46 mM	---	43,82 mM	1,52bcC	3,02aB	3,31aAB	3,62aA
10	87,64 mM	43,82 mM	43,82 mM	1,45cdC	2,92abB	3,31aA	2,82bcB

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e pelas mesmas letras maiúsculas nas linhas não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

A formação de raízes é importante para sobrevivência vegetal, contudo, buscando-se o crescimento mínimo, a menor taxa de formação pode levar a uma menor taxa de absorção e, conseqüentemente, de crescimento do vegetal.

Verificou-se que, exceto no controle, em todos os tratamentos com estresse osmótico houve uma tendência de aumento no número de raízes ao longo do tempo, sugerindo que essa condição estimulou a formação de maior número de raízes ao longo dos 240 dias, provavelmente por conta da limitação da água livre no meio de cultura. A análise dos dados

revelou ainda diferenças estatísticas em relação ao comprimento de raiz entre os tratamentos, sendo a menor média encontrada no tratamento T1, com 1,0 cm, seguido do T4 (1,18cm) e o T5 (1,19cm) sendo estes dois últimos iguais estatisticamente (Tabela (5)).

TABELA 05: Comprimento da maior raiz em brotações de *Hyptis ramosa* Pohl ex Benth. cultivadas *in vitro* em meio MS suplementados com diferentes combinações de sacarose, manitol e sorbitol durante 60, 120, 180 e 240 dias. Feira de Santana, Bahia, 2017.

	TRATAMENTO			Período de cultivo (Dias)			
	Sacarose	Manitol	Sorbitol	60	120	180	240
1	87,64 mM	---	---	1,14aA	1,0eB	1,03dAB	1,0fB
2	131,46 mM	---	---	1,13abB	1,16dB	1,20cAB	1,27deA
3	175,28 mM	---	---	1,22aC	1,33abB	1,39aB	1,52cA
4	87,64 mM	43,82 mM	---	1,18aA	1,17cdA	1,23bcA	1,18eA
5	87,64 mM	87,64 mM	---	1,17aA	1,23bcdA	1,13cdA	1,19eA
6	131,46 mM	43,82 mM	---	1,21aB	1,26abcd AB	1,34abA	1,36dA
7	87,64 mM	---	43,82 mM	1,23aC	1,37aB	1,39aB	1,74bA
8	87,64 mM	---	87,64 mM	1,0bD	1,20bcdC	1,40aB	1,74bA
9	131,46 mM	---	43,82 mM	1,14bC	1,38aB	1,41aB	1,98aA
10	87,64 mM	43,82 mM	43,82 mM	1,12abD	1,30abcC	1,41aB	1,52cA

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e pelas mesmas letras maiúsculas nas linhas não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

A menor média foi obtida no tratamento T1, com 1,0cm de comprimento. Assim como para número de raiz, para esta variável observou-se também as maiores médias nos tratamentos contendo sorbitol. Contrariamente, os tratamentos contendo manitol apresentaram valores menores para comprimento de raiz, mostrando que, neste caso, este carboidrato atuou como osmorregulador, inibindo o crescimento da raiz. Observou-se ainda que em todos os tratamentos, exceto no T1 (controle), houve um aumento gradual no comprimento da raiz, sugerindo que o estresse osmótico pode ter induzido o aumento do comprimento ao longo dos 240 dias.

A análise do acúmulo de massa das brotações, no final do experimento (240 dias) revelou que o tratamento T8 (87,64mM de sacarose e 87,64mM sorbitol) induziu o maior acúmulo de massa fresca, enquanto que o tratamento controle T1 (87,64mM de sacarose) promoveu o menor acúmulo (Tabela 06).

TABELA 06: Média da massa fresca e massa seca das brotações de *Hyptis ramosa* Pohl ex Benth. cultivadas *in vitro* em meio MS suplementados com diferentes combinações de sacarose, manitol e sorbitol após 240 dias de cultivo. Feira de Santana, Bahia, 2017.

Tratamento	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
Massa fresca	0,28f	0,70e	1,96c	0,86e	1,42d	2,0c	2,26c	3,3a	2,82b	2,9b
Massa seca	1,01d	1,10c	1,32b	1,22b	1,29b	1,28b	1,26b	1,43a	1,44a	1,37a

1 – 87,64mM de sacarose; 2 – 131,46mM de sacarose; 3 – 175,28mM de sacarose; 4 – 87,64mM de sacarose e 43,82mM de manitol; 5 – 87,64mM de sacarose e 87,64mM de manitol; 6 – 131,46mM de sacarose e 43,82mM de manitol; 7 – 87,64mM de sacarose e 43,82mM de sorbitol; 8 – 87,64mM de sacarose e 87,64mM sorbitol; 9 – 131,46mM de sacarose e 43,82mM de sorbitol e 10 – 87,64mM de sacarose, 43,82mM de manitol e 43,82mM de sorbitol. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na linha não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Contudo, ressalta-se que essa forma de medição pode ser um indicador inconsistente do crescimento, já que pode ser influenciado pelo *status* hídrico, então, o peso seco é freqüentemente o mais apropriado (TAIZ E ZEIGER, 2004). Considerando este aspecto,

verifica-se que os tratamentos T8, T9 e T10 promoveram o maior acúmulo de massa seca, com médias de 1,43g, 1,44g e 1,37g, respectivamente (Tabela 06), confirmando mais uma vez que os tratamentos com sorbitol foram aqueles que promoveram o maior crescimento. A menor massa seca foi observada no tratamento 1 (controle), pesando em média 1,01g.

Com base nos resultados obtidos verifica-se que a utilização de agentes osmóticos na conservação *in vitro*, a depender da sua estrutura e propriedades químicas, pode retardar ou estimular o crescimento vegetal, pelo fato de alguns açúcares atuarem tanto como fonte de carboidrato quando agente osmótico, como é o caso do sorbitol e outros apenas como agentes osmóticos, como é o caso do manitol.

4 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstram que é possível conservar *in vitro* brotações da espécie *Hyptis ramosa* através da utilização de osmorreguladores por até 240 dias de cultivo, mantendo viável o material conservado; a combinação de sacarose e manitol é eficiente na inibição do crescimento das plantas cultivadas, enquanto que a combinação entre sacarose e sorbitol estimula o crescimento das mesmas; considerando o crescimento mínimo, o alto índice de brotação e a viabilidade vegetal, o tratamento contendo 87,64mM de sacarose + 87,64mM de manitol é o mais indicado para conservação *in vitro* desta espécie.

REFERÊNCIAS

ALVES, R. B. N; BERTONI, B. W; VIEIRA, R. F; FRANÇA, S. C; MING; L. C; PEREIRA, AM. S. Influência de diferentes meios de cultura sobre o crescimento de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae) para conservação *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.12, n.4, p.510-515, 2010.

ANDRADE, A. M; OLIVEIRA, J. P. R; SANTOS, A. L. L. M; FRANCO, C. R. P. ANTONIOLLI, ESTEVAM, C. S. THOMAZZI, S. M. Preliminary study on the anti-inflammatory and antioxidant activities of the leave extract of *Hyptis fruticosa* Salzm. ex Benth., Lamiaceae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.20, n. 6, p. 962-968, 2010.

AZEVEDO, B. O. 2014. **Crescimento, produção e composição química do óleo essencial de *martianthus leucocephalus* (mart. Ex benth.) J. F. B. Pastore em condições de feira de santana, bahia, brasil**. Dissertação (Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais) Universidade Estadual de Feira de Santana – BA.

AZEVEDO, B. O; OLIVEIRA, L. M; LUCCHESI, A. M. SILVA, D. J; LEDO, C. A. S; NASCIMENTO, M. N. Crescimento e produção de óleo essencial de *Martianthus leucocephalus* cultivada nas condições edafoclimáticas de Feira de Santana, Bahia, Brasil. **Ciência Rural**. v.46, n.4, p.593-598, 2016.

BOTREL, P. P. 2012. **Micropropagação, teor e composição química volátil de *Hyptis marruboides* Epl. e atividade inseticida**. Tese (Doutorado em programa de pós graduação em agronomia e fitotecnia) Universidade Federal de Lavras – MG.

BOTREL, P. P; PINTO, J. E. B. P; FERRAZ, V; BERTOLUCCI, S. K. V; FIGUEIREDO, F. P. Teor e composição química do óleo essencial de *Hyptis marruboides* Epl., Lamiaceae em função da sazonalidade. **Acta Scientiarum. Agronomy Maringá**, v. 32, n. 3, p. 533-538, 2010.

CAMILLO, J; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E; VIEIRA, R. F; PEIXOTO, J. R. Conservação *in vitro* de *Cochlospermum regium* (Schrank) Pilg.- Cochlospermaceae sob regime de crescimento mínimo. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.11, n.2, p.184-189. 2009.

CARVALHO, M. P. 2010. **Retardantes de crescimento na produção, qualidade e plasticidade anatômica de roseiras de vaso**. Dissertação (Mestrado em programa de pós graduação em Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa – MG.

CHAVARRIA, G; ROSA, W. P; HOFFMANN, L; DURIGON, M. R. Regulador de crescimento em plantas de trigo: reflexos sobre o desenvolvimento vegetativo, rendimento e qualidade de grãos. **Revista Ceres**, v. 62, n.6, p. 583-588, 2015

COELHO, M. R. V. 2014. **Alterações Fisiológicas e Metabólicas em *Hyptis Fruticosa* Salzm. Ex. Benth e *Ocimum Gratissimum* L. Sob Diferentes Regimes Hídricos**. Dissertação (Mestrado em programa de pós graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Estadual de Feira de Santana – BA.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

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

FARIA, G. A; COSTA, M. A. P. C; JUNGHANS, T. G; LEDO, C. A. S; SOUZA, A. S. Efeito da sacarose e sorbitol na conservação *in vitro* de *Passiflora giberti* N. E. Brown. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 2, p. 267-270, 2006.

FLORES, R; ULIANA, S. C. PIMENTEL, N; GARLET, T. M. B. Sucrose and sorbitol on the *in vitro* conservation of *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken (Amaranthaceae). **Biotechnology and Biodiversity**, v. 4, n.3, p. 192-199, 2013.

GÓES, V. S. 2015. **Avaliação toxicológica, antinociceptiva, anti-inflamatória e sobre o sistema nervoso central de *Martianthus leucocephalus* (mart. Ex benth.) J.f.b. pastore**. Dissertação (Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais) Universidade Estadual de Feira de Santana – BA.

HARLEY, R.; FRANÇA, F.; SANTOS, E.P.; SANTOS, J.S.; PASTORE, J.F. 2015 *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: 04 Jul. 2017.

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

MATSUMOTO, K; CARDOSO, L. D; SANTOS, I. R. I. Manual de curadores de germoplasma – Vegetal: Conservação *in vitro*. **Embrapa Recursos genéticos e tecnologia**. Brasília-DF.2010.

MEDEIROS, F. C. M. 2014. **Caracterização química e atividade biológica de óleos essenciais de plantas do Cerrado contra fungos xilófagos**. Dissertação (Mestrado Programa de Pós-Graduação em ciências florestais, do departamento de Engenharia Florestal) Universidade de Brasília. Brasília-DF.

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

NEPOMUCENO, C.F; FONSECA, P.T; SILVA, T.S; OLIVEIRA, L.M; SANTANA, J.R.F. Germinação *in vitro* de *Hyptis leucocephala* Mart. ex Benth. e *Hyptis platanifolia* Mart. ex Benth. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.16, n.4, p.886-895, 2014.

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

SÁ, F. P; SOUZA, F. V. D; SILVA, A. V. C; LÉDO, A. S. Encapsulamento, crioproteção e desidratação na capacidade regenerativa de ápices caulinares de *Genipa americana*. **Ciência Rura**, v.45, n.11, Nov, 2015.

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.

SILVA, A. F. 2015. **Caracterização agrônômica, molecular e fitoquímica de *Eplingiella HARLEY & J.F.B. PASTORE***. Tese (Doutorado em Programa de pós graduação em recursos genéticos vegetais) Universidade Estadual de Feira de Santana - BA.

SILVA, A. F. 2012. **Identificação Morfoanatômica e Código de Barras Genético de *Hyptis stricta* BENTH (LAMIACEAE)**. Dissertação (Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração de insumos, medicamentos e correlatos) Universidade Federal do Paraná- Curitiba-PR.

SILVA, N. D. G; DUTRA, L. F; BIANCHI, V. J; SOMMER, L. R; VARGAS, D. P; PETERS, J. A. Conservação in vitro de amoreira-preta: Crescimento lento. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v. 12, n. 1, p. 7-12, 2016.

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

SOUZA, F. P. 2015. **Micropropagação de Hyptis ramosa Pohl ex Benth. (LAMIACEAE)**. Dissertação (Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais) Universidade Estadual de Feira de Santana-Ba.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. Porto Alegre:Artmed, 2004. 719 p.

CAPÍTULO II

AJUSTE DE PROTOCOLO PARA CRIOPRESERVAÇÃO DE CALOS E GEMAS AXILARES DE *Hyptis ramosa* Pohl ex Benth (LAMIACEAE)

Feira de Santana, BA

2017

RESUMO

O gênero *Hyptis* (Lamiaceae) é detentor de muitas espécies com propriedades medicinais devido à presença de compostos com propriedades terapêuticas, destacando os óleos essenciais. A espécie *Hyptis ramosa* Pohl ex Benth é nativa do semiárido brasileiro, aromática, apresentando potencial fitoquímico. Apesar da importância do gênero, trabalhos buscando a conservação são escassos. Em virtude do caráter não perene dessas espécies, para conservação em longo prazo, as técnicas de crioconservação são promissoras. Diante do exposto, este trabalho buscou ajustar protocolos para crioconservação de calos e gemas axilares para esta espécie, utilizando os métodos da vitrificação e do encapsulamento-desidratação. Os ensaios foram conduzidos nos Laboratórios de Germinação e de Cultura de Tecidos Vegetais da Unidade Experimental Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana. Sementes foram desinfestadas e inoculadas em meio MS^{1/2} para o estabelecimento de plantas *in vitro*. Após 3 meses de cultivo, folhas e segmentos internodais foram inoculados em meio MS suplementado com 5,0 μM de 2,4D e 1,0 μM de BAP para indução dos calos. Calos e gemas axilares foram inicialmente pré-cultivados (MS líquido+ 0,5M de sacarose) e incubados por 20h sobre agitação constante. Em seguida, os calos foram vitrificados e as gemas axilares, além de vitrificadas, foram submetidas a técnica de encapsulamento-desidratação, sendo, por fim, colocados em criotubos e armazenados em nitrogênio líquido a -196°C. Para o controle de viabilidade dos calos foi utilizado o cloreto de 2,3,5 trifenil tetrazólio (TTC), testando-se inicialmente duas concentrações (05% e 1,0%) e 4 tempos de incubação (2, 4, 8 e 24h). Para gemas axilares determinou-se inicialmente a curva de dessecação, submetendo-se as gemas encapsuladas em alginato de sódio à sílica gel por um período de 6h, quantificando-se a cada 1h o teor de umidade, seguido do teste de viabilidade quantificada pela taxa de regeneração dos explantes após a reinoculação em meio de cultura MS suplementado com 87,64mM de sacarose e solidificado com 0,7% de ágar. Os resultados demonstraram que a utilização de TTC na concentração de 1,0% com 4h de incubação foi mais eficiente para testar a viabilidade dos calos desta espécie. A desidratação das gemas axilares encapsuladas por 5h em sílica gel foi o tratamento mais promissor, possibilitando maior taxa de regeneração dos explantes. Contudo, com a metodologia utilizada não foi possível a crioconservação de calos e gemas da espécie, havendo a morte celular nas primeiras etapas do processo de vitrificação dos calos e na etapa criogênica para as gemas.

Palavras-chave: Conservação *ex situ*, encapsulamento-desidratação, vitrificação.

ABSTRACT

The genus *Hyptis* (Lamiaceae) holds many species with medicinal properties due to the presence of compounds with therapeutic properties, highlighting the essential oils. The species *Hyptis ramosa* Pohl ex Benth is native to the Brazilian semiarid, aromatic, presenting phytochemical potential. Despite the importance of the genre, conservation efforts are scarce. Because of the non-permanent nature of these species, for long-term conservation, cryopreservation techniques are promising. In view of the above, this work sought to adjust protocols for cryopreservation of calli and axillary buds for this species, using the methods of vitrification and encapsulation-dehydration. The tests were conducted at the Laboratory of Germination and Vegetable Tissue Culture of the Horto Florestal Experimental Unit of the State University of Feira de Santana. Seeds were disinfested and inoculated in MS1 / 2 medium for plant establishment in vitro. After 3 months of culture, internodal leaves and segments were inoculated in MS medium supplemented with 5.0 μ M of 2,4D and 1.0 μ M of BAP for callus induction. Axillary buds and buds were initially precultured (liquid MS + 0.5M sucrose) and incubated for 20 h over constant shaking. Then, the calli were vitrified and the axillary buds were vitrified, submitted to encapsulation-dehydration technique, and finally placed in cryotubes and stored in liquid nitrogen at -196°C. For the control of viability of calluses, 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC) was used, initially testing two concentrations (0.5% and 1.0%) and 4 incubation times (2,4,8 and 24h). For axillary buds, the desiccation curve was initially determined by subjecting the sodium alginate encapsulated gemstones to silica gel for a period of 6 hours, and the moisture content was quantified every 1 hour, followed by the rate-quantified viability test of regeneration of the explants after reinoculation in MS culture medium supplemented with 87.64 mM sucrose and solidified with 0.7% agar. The results demonstrated that the use of 1.0% TTC with 4h incubation was better to test the viability of the calli of this species. The dehydration of axillary buds encapsulated for 5 h on silica gel was the most promising treatment, allowing a higher rate of regeneration of the explants. However, with the methodology used it was not possible to cryopreservation of callus and bud of the species, with cell death in the first stages of the callus vitrification process and in the cryogenic stage for the buds.

Key words: Ex situ conservation, encapsulation-dehydration, vitrification.

1 INTRODUÇÃO

Bem representada no semiárido brasileiro, a família Lamiaceae é composta por uma gama de espécies aromáticas e detentoras de propriedades medicinais (AZEVEDO et al., 2016), apresentando uma extensa variedade de classes de moléculas resultantes de seu metabolismo secundário, sendo bem estudada nesse aspecto (FALCÃO E MENEZES, 2003). Com grande importância comercial, as espécies de Lamiaceae destacam-se por ser fonte de óleos essenciais, sendo amplamente utilizadas como condimentos, a exemplo do alecrim, lavanda e menta (AZEVEDO, 2014). A família apresenta 240 gêneros e aproximadamente 7.200 espécies, sendo o gênero *Hyptis* considerado o mais extenso, compreendendo atualmente cerca de 280 espécies (HARLEY E PASTORE, 2012).

O gênero *Hyptis* é composto na sua maioria por ervas, arbustos e subarbustos, sendo bem distribuída geograficamente, com muitas de suas espécies usadas popularmente. Entre as espécies deste gênero está *Hyptis ramosa* Pohl ex Benth, espécie aromática e nativa do semiárido brasileiro (HARLEY E PASTORE, 2012). Apresenta hábito herbáceo, com caule e ramos de aspecto quadrangular, folhas membranosas e aspecto ramificado, com distribuição nos estados da Bahia, Espírito Santo e Minas Gerais (HARLEY E PASTORE, 2012). Faz parte da flora natural da Chapada Diamantina, com ocorrência nas margens de riachos e solos encharcados. Apesar do seu grande potencial fitoquímico, até o momento não foram realizados estudos químicos, farmacológicos ou agrônômicos com a espécie.

Considerando a importância e o elevado grau de endemismo dos representantes desse gênero estudos sobre a caracterização e conservação são urgentes. Nesse contexto, para a conservação de espécies nativas, diversas abordagens têm sido utilizadas, como a conservação em seu local de origem, denominada conservação *in situ*, ou fora de seu habitat natural, denominada conservação *ex situ*. Para a conservação *ex situ* alguns métodos têm sido utilizados, como a conservação *in vitro*, que é a conservação de plântulas em meio de cultura e sob condições de crescimento reduzido, e a crioconservação, que é a conservação em nitrogênio líquido a -196°C ou a -150°C na sua fase de vapor (SANTOS, 2000). Na conservação *in vitro* há a necessidade de subculturas periódicas, aumentando o custo de manutenção, enquanto que na crioconservação utiliza-se temperaturas ultra-baixas, fazendo com que ocorra uma suspensão quase que total do metabolismo celular, proporcionando,

assim, uma forma mais promissora de conservação em longo prazo (CARVALHO E VIDAL, 2003; MARCHI, 2016).

Nos últimos anos estudos envolvendo a crioconservação têm alcançado alguns progressos, já havendo protocolos de crioconservação para diferentes espécies, desde ornamentais, frutíferas, leguminosas e até mesmo medicinais e aromáticas (SANTOS, 2001). O maior desafio da técnica está relacionado ao congelamento e/ou descongelamento do tecido sem a formação de cristais de gelo no meio intracelular, que pode ocasionar a ruptura das membranas celulares, fazendo com que esta perca a sua permeabilidade e, conseqüentemente, ocasione a morte celular. Normalmente os tecidos ou órgãos utilizados para crioconservação são sementes embriões, calos, segmentos nodais, entre outros, contudo, exceto para sementes, a maioria possui alto teor de água, sendo, portanto, necessário tratamento prévio para retirada de água antes do congelamento (SANTOS, 2001). Assim, para evitar a ocorrência de cristais de gelo é imprescindível que haja o processo de desidratação dos tecidos, sobretudo para aqueles com alto teor hídrico, como é o caso de calos, ápices caulinares, embriões somáticos e zigóticos (ENGELMANN, 2010).

Basicamente três métodos têm sido utilizados para proteger o material a ser criopreservado, sendo a utilização de compostos crioprotetores, como glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO), etilenoglicol, metanol, propileno glicol, etanoldiolo método mais comumente utilizado (SANTOS, 2000; BENSON et al., 2007). Além da utilização de crioprotetores, a vitrificação e o encapsulamento-desidratação também têm sido bastante pesquisados (SANTOS, 2000; BENSON et al., 2007). Os crioprotetores intracelulares são solventes orgânicos de baixo peso molecular que possuem a capacidade de penetrar na célula, substituindo parcialmente a água e ligando-se ao hidrogênio das moléculas de água intracelular, o que aumenta a viscosidade da solução e, conseqüentemente, reduz o ponto de congelamento da mesma. A eficácia dos crioprotetores depende de uma série de características, como solubilidade em baixas temperaturas, poder de penetração nas células e baixa toxicidade (BENSON et al., 2007).

A vitrificação é um mecanismo de crioproteção utilizado para impedir a formação de cristais de gelo através de alterações na composição da fase líquida, utilizando crioprotetores. Estes compostos aumentam a concentração total de todos os solutos e, com isso, levam à formação de um “estado vítreo”, que é definido pela viscosidade num nível suficientemente elevado de modo que se comporte como um sólido, sem a possibilidade de cristalização. O

maior impasse para esta técnica é a toxicidade que alguns crioprotetores podem apresentar, sendo prejudiciais para as células (BENSON et al., 2007). Como exemplo, a solução de vitrificação plantas PVS2 (Plant Vitrification Solution 2), elaborada por Sakai et al. (1990), é composta por 30% de glicerol (p/v), 15% de etileno glicol (p/v) e 15% de DMSO (p/v). O processo de vitrificação tornou-se um dos principais métodos de crioproteção, sendo aplicado a uma grande variedade de tecidos vegetais (SANTOS, 2001). Dentre as vantagens observadas nesse modo de crioproteção está a possibilidade de congelamento ultra rápido, sem a necessidade de utilização de freezers com diferentes temperaturas. O ponto crítico do método está no passo da desidratação, justamente pelo conteúdo de água variar de um tipo de explante para outro (ENGELMAN, 2010; PORTO, 2013).

Além da vitrificação, outro método que tem ganhado bastante espaço na crioconservação é a técnica de encapsulamento-desidratação. Este procedimento é baseado na tecnologia desenvolvida para produção de sementes sintéticas, em que os explantes são encapsulados em uma matriz de alginato e cloreto de cálcio (CaCl_2) que protege o material contra danos físicos, ambientais e minimiza os processos da desidratação (CAMPOS, 2014). Este método tem possibilitado altas taxas de sobrevivência e recuperação das amostras (VIEIRA, 2000; ENGELMAN, 2010), sendo indicado para embriões somáticos e zigóticos, ápices caulinares e gemas laterais.

Já foram desenvolvidos diversos protocolos bem sucedidos para crioconservação de espécies medicinais utilizando diferentes tipos de explantes, como sementes de *Stryphnodendron adstringens* (Mart) Covelle, que foram eficientemente crioconservadas com teor de água entre 6% a 9% (PORTO, 2013); calos de *Ginko biloba* utilizando dissecação simples em solução de sacarose e ABA (ácido abscísico), sendo este método suficiente para sobrevivência dos calos após crioconservação (POPOVA et al., 2009) e ápices caulinares de *Campomanesia pubescens* pelo método de vitrificação, utilizando PVS2 por 15 ou 30 minutos, resultado em mais de 50% de sobrevivência (CAMPOS, 2014) e de outras espécies não medicinais como em *Citrus* spp. (GONZALEZ-ARNAO et al., 1998), *Solanum* spp. (FABRE e DEREUDDRE, 1990), *Vitis vinifera* (PLESSIS et al., 1993), *Wasabia japonica* (MATSUMOTO et al., 1995) e *Oryza sativa* L. (MARASSI, SCOCCHI e GONZALEZ, 2006; VIEIRA, 2000; ENGELMAN, 2010). Embora haja alguns trabalhos e protocolos desenvolvidos para crioconservação de germoplasma de diversas espécies, não existem trabalhos envolvendo crioconservação de espécies do gênero *Hyptis*, por isso, considerando a

importância medicinal apresentada pelo gênero e a carência de trabalhos envolvendo a conservação do seu germoplasma, este trabalho objetivou ajustar protocolos para crioconservação de calos e gemas axilares de *Hyptis ramosa* Pohl ex Benth.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local de realização dos experimentos

Os ensaios foram desenvolvidos nos Laboratórios de Germinação (LAGER) e de Cultura de Tecidos Vegetais (LCTV) da Unidade Experimental Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Feira de Santana-BA. As sementes de *Hyptis ramosa* Pohl ex Benth 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 (HUEFS), onde as exsicatas encontram-se depositadas (Voucher número 212750).

2.2 Estabelecimento *in vitro*

Sementes de *H. ramosa* Pohl ex Benth foram desinfestadas em câmara de fluxo laminar em solução de álcool 70% por 30 segundos, seguido de imersão em solução de hipoclorito de sódio comercial a 2,0 - 2,5% por 10 minutos e enxaguadas quatro vezes em água destilada esterilizada. Após a desinfestação as sementes foram inoculadas individualmente em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura MS modificado (MURASHIGE; SKOOG, 1969), contendo 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 $5,7 \pm 0,1$ e autoclavados a 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, radiação fotossintética ativa de $40\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e umidade relativa de 60%.

2.3 Indução de calos

Para indução dos calos foram utilizadas plantas cultivadas *in vitro* com aproximadamente 3 meses de idade. A indução de calos foi realizada a partir de folhas e segmentos internodais, ambos com aproximadamente 1cm de comprimento. Quatro explantes foram inoculados em cada pote contendo 60 ml de meio de cultura MS, solidificado com 0,7% de ágar e suplementado com 3% de sacarose, 5,0 μ M de 2,4-D (2,4-diclorofenoxiacético) e 1,0 μ M de BAP (6-benzilaminopurina). Em seguida, as culturas foram mantidas em sala de crescimento na ausência de luz e com temperatura $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$ por 90 dias.

2.4 Pré-cultivo

Calos inteiros (Figura 1A) e gemas axilares medindo 0,3cm de comprimento provenientes do cultivo *in vitro* foram incubados em solução de pré-cultivo, composta por MS líquido, acrescido de 0,5M de sacarose (Figura 1B) e sob agitação constante em agitador tipo shaker (Figura 1C) por 20 horas. Após a etapa de pré-cultivo as amostras foram submetidas a dois métodos de criopreservação: vitrificação para os calos e gemas axilares e encapsulamento-desidratação para as gemas axilares.

2.5 Vitrificação

Amostras de calos e gemas axilares foram submetidas à solução de vitrificação PVS2, composta por 30% de glicerol, 15% de etileno glicol e 15% de DMSO (SAKAY et al.,1990), a 60% (Figura 1E) e a 100% (Figura F) onde após preparadas ambas as soluções foram esterilizadas por filtração, utilizando filtro millipore 25nm (Figura 1D) e armazenadas em refrigerador. Após o pré-cultivo amostras de calo com 100mg (pesados em balança analítica shimadzu modelo AUX220) e gemas axilares com 0,3 cm foram incubados em solução gelada de PVS2 a 60% por 20 minutos para etapa de carregamento (Figura 1E) sendo em seguida transferidas para criotubos contendo solução gelada de PVS2 a 100% por 30 minutos para a desidratação (Figura 1F). Seguindo estas etapas as amostras foram transportadas em caixa de isopor com gelo (Figura 1G) e armazenadas em nitrogênio líquido a -196°C (Figura 1H). Todo o procedimento foi realizado de forma asséptica em câmara de fluxo laminar.



FIGURA1: Etapas da crioconservação de calos e gemas axilares de *Hyptis ramosa* Pohl ex Benth. A, B e C: Etapa de pré-cultivo para calos e gemas - (A) Calos com 90 dias de crescimento, (B e C) fase de pré-cultivo em meio MS líquido + sacarose sob agitação constante por 20h; D, E, F, G e H: Etapa de vitrificação de calos e gemas axilares - (D) esterilização das soluções de carregamento e desidratação com filtro milipore 25nm, (E) fase de carregamento dos explantes em solução de PVS2 a 60% por 20 min, (F) desidratação dos explantes em solução de PVS2 a 100% por 30 min, (G) transporte dos criotubos contendo explantes vitrificados, (H) etapa de crioconservação; I, J, L, M, N, O e P: encapsulamento-desidratação das gemas axilares - (I, J, L e M) fase do encapsulamento das gemas axilares em solução de alginato (I) solidificadas em solução de cloreto de cálcio (J) sobe agitação constante (M), desidratação das gemas encapsuladas em caixa gerbox com sílica gel fechada com PVS (N e O), crioconservação (P). Feira de Santana-Bahia, 2017.

2.6 Encapsulamento-desidratação

As gemas axilares foram encapsuladas utilizando meio líquido MS acrescido de 2% de alginato solidificadas em solução de cloreto de cálcio (CaCl_2) a 0,1M, diluído em água destilada. As soluções foram autoclavadas e o procedimento foi realizado de forma asséptica em câmara de fluxo laminar. Inicialmente foi determinada a curva de dessecação das amostras encapsuladas em alginato, objetivando identificar o menor teor de água tolerado pelas amostras encapsuladas, utilizando-se seis repetições de dez cápsulas. As cápsulas foram depositadas em formas de alumínio de aproximadamente 2,5mm colocadas sobre sílica gel em caixa tipo gerbox vedada com PVC por período máximo de 6h, retirando-se a cada 1h 10 cápsulas para pesagem e determinação de teor de umidade. Em seguida, as cápsulas foram inoculadas em tubos de ensaio contendo meio MS acrescido de 0,7% de ágar e 3% de sacarose para testar a viabilidade dos explantes, mediante quantificação da taxa de regeneração de brotações nas gemas.

Após a determinação do tempo de dessecação, gemas axilares retiradas do pré-cultivo foram imersas em solução de alginato de sódio a 2% (Figura 1I) e com auxílio de uma pipeta de Pasteur (Figura 1J) foram ‘pescadas’ e gotejadas em solução de CaCl_2 (figura 1L) e agitadas por 10 minutos (Figura 1M). Os explantes encapsulados foram colocados em de alumínio de aproximadamente 2,5mm (Figura 1N) acondicionadas em caixa gerbox contendo sílica gel (Figura 1O) fechada com PVC, permanecendo por período de 5h de dessecação, sendo, em seguida, colocados em criotubos (Figura 1P) armazenados em nitrogênio líquido.

2.7 Teste de viabilidade

Para gemas axilares, após cada etapa da vitrificação e encapsulamento-desidratação, 10 amostras foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 10ml de meio MS suplementado com 87,64mM de sacarose e solidificado com 0,7% de ágar. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 3^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas, radiação fotossintética ativa de $40\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, avaliando-se após 30 dias a taxa de explantes que apresentaram brotos. Ao todo foram recortadas 60 gemas axilares e, após todas as etapas do encapsulamento (extração das gemas, pré-cultivo, encapsulamento e desidratação) ou da vitrificação (extração das gemas, pré-cultivo, carregamento e desidratação), 20 cápsulas

desidratadas foram transferidas para criotubos e armazenados em nitrogênio líquido a 196°C. Destas, 10 cápsulas foram retiradas do nitrogênio após 21 dias, descongeladas em banho maria a 40°C e inoculadas em meio MS para verificar a taxa de sobrevivência.

O controle de viabilidade dos calos foi feito utilizando coloração com cloreto de 2,3,5 trifenil tetrazólio (TTC) a 1,0% com 4h de incubação no escuro e em temperatura ambiente, de acordo com ajuste metodológico preliminar, onde foi testado duas concentrações de TTC (05% e 1,0%) e 4 tempos de incubação (2, 4, 8 e 24h). Para interromper a reação de TTC foram acrescentados à solução 1,5ml de álcool absoluto, sendo, em seguida, mergulhados em água fervente por 5 minutos, centrifugados a 6000rpm por 10min e, posteriormente, realizada leitura das amostras em espectrofotômetro Femto 800 XI a $\lambda=490\text{nm}$, conforme a metodologia proposta por Nogueira (2010). Para determinação do branco, calos com 1mg não submetidos à etapa de pré-cultivo foram colocados em tubos e submetidos à água fervente por 5 minutos, procedendo-se, em seguida, a coloração com TCC e leitura espectrofotométrica. A viabilidade foi expressa em porcentagem em relação ao controle (branco) utilizando para o cálculo $(\text{absorbância do tratamento}/\text{absorbância do controle}) \times 100$ (NOGUEIRA, 2010).

Após cada etapa do protocolo (pré-cultivo, carregamento, desidratação, crioconservação) foram retiradas amostras de calo com 0,1g, que foram transferidas para tubos de polietileno contendo 0,5ml de TTC e incubadas por 4h no escuro a temperatura ambiente. As avaliações foram realizadas em triplicata (3 amostras com 3 repetições cada). Após o congelamento em nitrogênio líquido foram retirados dois criotubos, um contendo calos vitrificados, submetendo-os a descongelamento rápido em banho maria a 40°C, seguido da coloração com TCC e leitura espectrofotométrica.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O ajuste metodológico para o teste de viabilidade dos calos, com cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio (TTC), demonstrou que a melhor concentração de TTC a ser utilizada para os calos desta espécie foi a de 1,0% com 4h de incubação no escuro, sendo este o tratamento que demonstrou maior valor de absorvância em relação ao controle (branco) (Tabela 1). A absorvância da amostra decorre da produção de formazan, composto colorido formado durante a reação do TTC com o metabolismo celular, sendo proporcional à atividade metabólica e número de células vivas (SILVA, 2009).

TABELA 1: Valores médios de absorvância obtidos nos calos de *Hyptis ramosa* Pohl ex Benth após quatro tempos de incubação em duas concentrações de TTC. Feira de Santana-Bahia, 2017.

Tempo de incubação		2h		4h		8h		24h	
Concentração de TTC		0,5%	1,0%	0,5%	1,0%	0,5%	1,0%	0,5%	1,0%
Absorvância ($\lambda=$)	Branco	0,218	0,036	0,050	0,024	0,051	0,137	0,171	0,136
	Amostra	0,297	0,120	0,062	0,825	0,041	0,113	0,205	0,052
	Relação	1,36	3,33	1,24	34,37	0,80	0,82	1,19	0,38

Os brancos equivalem a calos mortos submetidos a água fervente e a amostra representa calos sem nenhum tratamento prévio.

A técnica de vitrificação utilizada não foi eficiente para crioconservação dos calos e gemas axilares da espécie *Hyptis ramosa*. Para as gemas axilares, já na fase do pré-cultivo (PC), onde os explantes passaram por incubação de 20h em meio MS líquido + 0,5M sacarose, 60% dos explantes não brotaram em meio de regeneração, constatando que estes não sobreviveram ao tratamento. Nas etapas de carregamento (solução de PVS2 60%) e de desidratação (PVS2 100%) a taxa de sobrevivência foi nula, ou seja, em nenhuma das 10 gemas inoculadas houve brotações de explantes inoculados, enquanto que no tratamento controle (gemas não submetidas a tratamento com a solução PVS2) teve 100% de regeneração, indicando que a vitrificação não foi um tratamento adequado para a crioconservação das gemas axilares desta espécie (Tabela 2).

TABELA 2: Número de gemas com brotos gerados após transferência das gemas axilares de *Hyptis ramosa* Pohl ex Benth para a solução de regeneração, composta por meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1969) suplementado com 87,64mM de sacarose e solidificado com 0,7% de Agar, após etapas do processo de vitrificação. Feira de Santana-Bahia, 2017.

	C	PC	PVS2 60%	PVS2 100%	CRIO
Nº gemas inoculadas	10	10	10	10	0
Nº gemas c/ brotos	10	4	0	0	0

C – controle, gemas axilares não submetidas a tratamento; PC- pré-cultivo, gemas axilares incubadas em solução de 0,5M de sacarose por 20h; PVS2 60% - gemas axilares carregadas em solução de PVS2 a 60%; PVS2100% - gemas axilares desidratadas em solução de PVS2 a 100% e CRIO – gemas axilares criopreservadas em nitrogênio líquido a -196°C.

Esses resultados corroboram os encontrados por VOLK et al. (2006), em trabalho realizado com *Mentha x piperita* L., buscando quantificar a sobrevivência de gemas apicais após serem expostas a soluções crioprotetoras PVS2, PVS3 (com concentrações maiores de cada crioprotetor) e PGLuD (10% DMSO, 10% de glicose e 10% de PEG8000). Os autores constataram que entre os tratamentos utilizados a solução de PVS2 foi a que acarretou em maiores danos as gemas apicais, inviabilizando as mesmas antes de completar 1h de incubação, ou seja, semelhante ao ocorrido com as gemas axilares neste trabalho onde não houve regeneração de nenhum explante já na etapa da solução de PVS2 a 60%.

Em relação aos calos foi possível observar que houve um decréscimo na viabilidade logo nas primeiras etapas do processo de vitrificação, de acordo com a quantidade de formazan formada durante a reação com o cloreto de 2,3,5 trifênil tetrazólio e identificada pela leitura espectrofotométrica (Tabela 3). Nos calos que não foram submetidos a tratamento (controle), como esperado, foram obtidos os maiores valores de absorbância, a qual se atribuiu o valor relativo de 100%.

TABELA 3: Valores médios de absorvância obtidos nas amostras de calos de *Hyptis ramosa* Pohl ex Benth após etapas do protocolo de vitrificação. Feira de Santana-Bahia 2017.

Amostras	B	C	PC	PVS2 60%	PVS2 100%	CRIO
Absorbância	0,045	0,207	0,040	0,038	0,068	0,085
% relativo	21,70%	100,00%	19,45%	18,33%	32,90%	41,00%
Desvio padrão	0,0061	0,077	0,018	0,027	0,034	0,005

B – branco: calos submetidos a água fervente; C – controle: calos não submetidos a tratamento; PC- pré-cultivo: calos incubados em solução de 0,5M de sacarose por 20h; PVS2 60%: calos carregados em solução de PVS2 a 60%; PVS2100%: calos desidratados em solução de PVS2 a 100% e CRIO: calos crioconservados em nitrogênio líquido a -196°C.

Resultados semelhantes foram observados por MATSUMOTO et al. (2004) ao criopreservar calos de *Dimocarpus longan* L., constatando que mesmo utilizando metade da concentração de PVS2, esta já foi suficientemente tóxica para os calos. Da mesma forma, PORTO (2013), em trabalho realizado com calos de *Stryphnodendron abstringem* (Mart) Coville, testou-se diferentes soluções crioprotetoras com concentrações mais baixas de DMSO e etileno glicol, assim como solução contendo apenas DMSO acrescido de sacarose, verificando que os calos desta espécie não sobreviveram a nenhum tratamento. A solução de PVS2 é comumente utilizada, mas pode ser letal a depender do tempo de exposição, devido as suas combinações potencialmente tóxicas, podendo acarretar em estresse osmótico ou químico (VOLK et al., 2006). Trata-se de uma solução concentrada constituída de três crioprotetores, glicerol, etilenoglicol e DMSO, que causam uma osmodesidratação das células do explante, entretanto, o tempo de exposição ao PVS2, suficiente para fornecer proteção ao nitrogênio líquido sem que venha a ser tóxico para as células, é bastante difícil de ser determinada (LAMBARDI; BENELLI, 2008).

Em relação a curva de desidratação das gemas encapsuladas durante 6 horas, a avaliação demonstrou a ausência de regeneração de gemas nos intervalos até 4 horas de desidratação, contudo, a dessecação por 5 horas (T5) promoveu a redução no teor de água para 57,13%, com regeneração de 90% dos explantes inoculados, enquanto que na dessecação por 6 horas (T6) o teor de água foi 53,34% com regeneração de 60% dos explantes, sendo escolhido o tempo de dessecação de 5 horas para a crioconservação de gemas axilares desta

espécie (Tabela 4). A ausência de regeneração de brotações no início do processo de desidratação sugere um efeito estimulante do estresse hídrico na superação da dormência das gemas, embora este fato não tenha respaldo em outras pesquisas.

TABELA 4: Valores médios de peso fresco, peso seco, teor de água e percentual de regeneração de brotações a partir de gemas axilares de *Hyptis ramosa* Pohl ex Benth encapsuladas e desidratadas em sílica gel, por 6h, para obtenção da curva de dissecação. Feira de Santana-Bahia, 2017.

Tempo (hora)	PF (g)	PS (g)	Teor de H ₂ O(g)	Teor relativo de H ₂ O (%)	% de regeneração	Nº de gemas c/ brotos
0	0,6811	0,0199	0,6612	97,08%	0,0%	0
1	0,5647	0,0195	0,5452	80,05%	0,0%	0
2	0,5332	0,0203	0,5129	75,30%	0,0%	0
3	0,4955	0,0199	0,4756	69,83%	0,0%	0
4	0,4758	0,0208	0,4550	66,80%	0,0%	0
5	0,4099	0,0208	0,3891	57,13%	90%	9
6	0,3840	0,0207	0,3633	53,34%	60%	6

PF- peso fresco; PS – peso seco; Teor de H₂O – quantidade relativa de água; % de H₂O – porcentagem relativa de água perdida no processo de desidratação.

Com base nos valores obtidos, de teor relativo de água, foi construída a curva de desidratação das gemas axilares de *Hyptis ramosa* (Figura 5). Após a determinação da curva de desidratação as gemas foram submetidas às várias etapas do processo de encapsulamento e inoculadas em meio de regeneração.

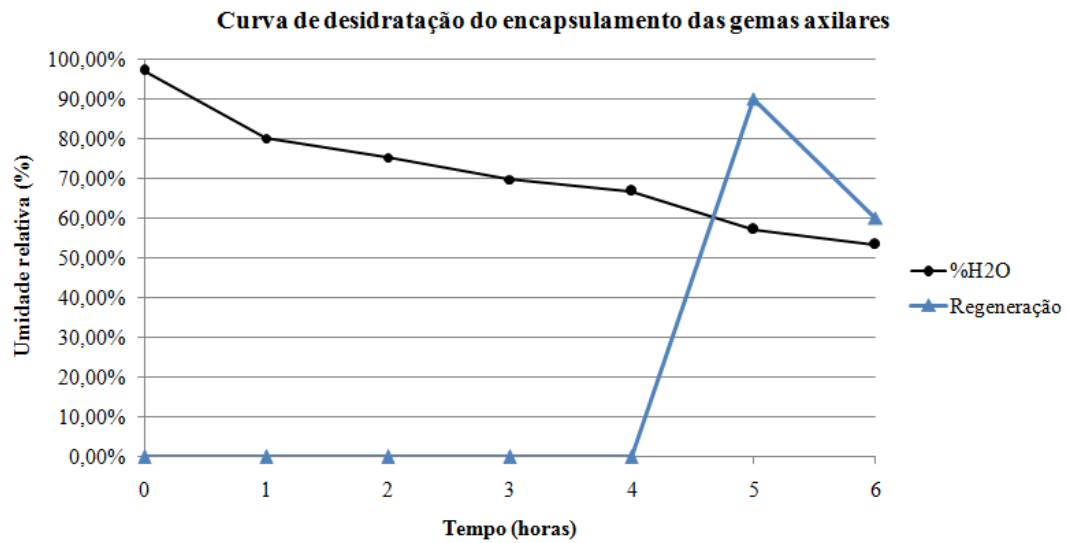


FIGURA 5: Curva de desidratção e regeneração de gemas axilares de *Hyptis ramosa* Pohl ex Benth encapsuladas e desidratadas por período de 6h. Feira de Santana-Bahia, 2017.

Os resultados obtidos após as várias etapas do processo de encapsulamento demonstraram a capacidade das gemas sobreviverem nas diversas fases do processo, com taxas de sobrevivência de 90, 30 e 50% nas fases de pré-cultivo, encapsulamento e desidratção, respectivamente, entretanto, não houve regeneração das brotações após a retirada das gemas do nitrogênio líquido a -196°C (etapa criogênica) após a inoculação no meio de regeneração (Tabela 5).

TABELA 5: Número de gemas inoculadas, número de brotações regeneradas, percentual de contaminação e de regeneração após cada fase do protocolo de encapsulamento-desidratção de gemas axilares de *Hyptis ramosa* Pohl ex Benth. Feira de Santana-Bahia, 2017.

Fase do protocolo	Nº de gemas inoculadas	Nº de gemas c/ brotos	Percentual de contaminação	Percentual de regeneração
Controle*	10	8	2	80,0%
Pré-cultivo	10	9	0	90,0%
Encapsulamento	10	3	0	30,0%
Desidratção	10	5	0	50,0%
Crioconservação	10	0	0	0,0%

*Gemas excisadas e inoculadas

Ressalta-se que neste trabalho as gemas axilares foram incubadas em solução de pré-cultivo (MS líquido + 0,5M de sacarose) antes de serem encapsuladas, enquanto que em outros trabalhos já realizados a etapa de pré-cultivo tem sido realizada após o encapsulamento dos explantes em matriz de alginato (SANTOS, 2004; SÁ et al., 2015) o que pode ter influenciado na morte dos explantes. Santos (2004), durante o desenvolvimento de protocolos de crioconservação de eixos embrionários de *Citrus sinensis* [L.] usando a técnica do encapsulamento-desidratação, sugeriu que o pré-cultivo com sacarose aumenta a tolerância à desidratação dos explantes com teores de umidade mais baixos, após observação de que eixos embrionários com conteúdos de água abaixo da faixa ótima se beneficiaram do pré-tratamento, mostrando melhoria na regeneração até mesmo após congelamento a -196°C . Entretanto, em trabalho realizado por Sá et al. (2015), buscando avaliar o efeito de diferentes tempos de desidratação e a capacidade regenerativa de ápices caulinares de *Genipa americana*, verificou-se efeito significativo do tempo de desidratação e de imersão em solução crioprotetora, concluindo que a exposição por 4h promoveu redução de mais de 50% da umidade, acarretando em melhor desempenho na regeneração, resultados estes semelhantes aos observados neste trabalho.

Neste trabalho as cápsulas obtidas apresentaram coloração clara após o encapsulamento e coloração verde após a imersão em nitrogênio líquido por 45 dias e descongelamento em banho-maria, contudo, após alguns dias de inoculação em meio de regeneração as mesmas já apresentavam coloração marrom, sugerindo a morte dos tecidos. Estes resultados são compatíveis com os resultados observados em trabalho com crioconservação de gemas apicais de *Hancornia speciosa* Gomez pelo método de encapsulamento, testando diferentes matrizes de alginato (WPM, WPM + diferentes concentrações de sacarose, WPM + glicerol + sacarose), onde não observaram a regeneração de brotações em nenhuma das matrizes de alginato testadas, constatando-se que as gemas apresentaram coloração verde após descongelamento e marrom após alguns dias de inoculação em meio de regeneração (NOGUEIRA, 2010).

4 CONCLUSÃO

Os resultados aqui apresentados demonstraram que os métodos aplicados para crioconservação de calos e gemas axilares de *Hyptis ramosa* Pohl ex Benth não foram eficientes, levado à morte celular já nas primeiras etapas da vitrificação dos calos e na etapa criogênica para as gemas.

REFERÊNCIAS

AZEVEDO, B. O. 2014. **Crescimento, produção e composição química do óleo essencial de martianthus leucocephalus (mart. Ex benth.) J. F. B. Pastore em condições de feira de santana, bahia, brasil.** Dissertação (Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais) Universidade Estadual de Feira de Santana – BA.

AZEVEDO, B. O; OLIVEIRA, L. M; LUCCHESI, A. M. SILVA, D. J; LEDO, C. A. S; NASCIMENTO, M. N. Crescimento e produção de óleo essencial de *Martianthus leucocephalus* cultivada nas condições edafoclimáticas de Feira de Santana, Bahia, Brasil. **Ciência Rural**, v.46, n.4, 2016.

BENSON, E. E; HARDING, K; JOHNSTON, J. W. **Cryopreservation of Shoot Tips and Meristems. Methods in Molecular Biology.** vol. 368: Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols, Second Edition Edited by: J. G. Day and G. N. Stacey © Humana Press Inc., Totowa, NJ. 2007.

CARVALHO, J. M. F. C; VIDAL, M. S. Crioconservação no melhoramento vegetal. Campina Grande, **Embrapa: Nacional de Pesquisa de algodão**, p. 12-21. 2003.

CAMPOS, N. A. 2014. **Estratégias para conservação in vitro de gabirobeira (campomanesia pubescens): Micropropagação, unidades encapsuláveis e criopreservação.** Tese (Doutorado em Programa de pós-graduação em Agronomia/Fisiologia vegetal) Universidade Federal de Lavras – MG.

ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant Biodiversity. **In Vitro cellular developmental biology plant**, v47, n.1, p. 5-16, 2010.

FABRE, J; DEREUDDRE, J. Encapsulation-dehydration: a new approach to cryopreservation of *Solanum* shoot-tips. **Cryo-Letters**, v. 11, p. 413-426, 1990.

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

GONZALEZ-ARNAO, M.T; ENGELMANN, F; URRRA, C; MORENZA, M; RIOS A. Cryopreservation of citrus apices using the encapsulation-dehydration technique. **CryoLetters**, v.19, p.177–182,1998.

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

LAMBARDI, M; OZUDOGRU, E. A; BENELLI, C. Cryopreservation of embryogenic cultures. **Plant Cryopreservation: A Practical Guide**. Springer, p. 177–194, 2008.

MATSUMOTO, T; SAKAI, A; TAKAHASHI, C; YAMADA, K. Cryopreservation in vitro grown apical meristems of wasabi (*Wasabi japonica*) by encapsulation-vitrification method. **Cryo-Letters**, v. 16, p.189–206, 1995.

MATSUMOTO, K; RAHARJO, S. H. T; DHEKNEY, S; MOON, P. A; LITZ, R. E. Criopreservação e embriogênese somática de calos de *Dimocarpus longan*. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.39, n.12, p.1261-1263, 2004.

MARASSI, M. A; SCOCCHI, A; GONZALEZ, A. M. PLANT REGENERATION FROM RICE ANTERS CRYOPRESERVED BY AN ENCAPSULATION/DEHYDRATION TECHNIQUE. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, v.42, p.31-36, 2006.

MARCHI, M. N. G. 2016. **Aspectos fisiológicos, anatômicos e moleculares da propagação e conservação in vitro de espécies de cactos endêmicos da Bahia**. Tese (Doutorado em Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais) Universidade Estadual de Feira de Santana.

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

NOGUEIRA, G. F. 2010. **Criopreservação e produção de sementes sintéticas in vitro de mangabeira**. Dissertação (Mestrado em programa de pós graduação em fitotecnia) Universidade Federal de Lavras.

PLESSIS, P; LEDDET, C; COLLAS, A; DEREUDDRE, J. Cryopreservation of *Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay shoot tips by encapsulation-dehydration: effect of pretreatment, cooling and postculture conditions. **Cryo-lett**, v.14, p. 309–320,1993.

POPOVA, E. V; LEE, E; WU, C; HAHN, E; PAEK, K. A simple method for cryopreservation of *Ginkgo biloba* callus. **Plant Cell Tissue Organ Cult**, v.97, n.3, p.337–343, 2009.

PORTO, J. M. P. 2013. **Criopreservação de calos, ápices caulinares e sementes de Barbatimão**. Tese (Doutorado em agronomia, área de concentração em fisiologia vegetal) Universidade Federal de Lavras – MG.

SÁ, F. P; SOUZA, F. V. D; SILVA, A. V. C. ; LÉDO, A. S. Encapsulamento, crioproteção e desidratação na capacidade regenerativa de ápices caulinares de *Genipa americana*. **Ciência Rural**. Santa Maria, v.45, n.11, p.1939-1945, 2015

SANTOS, I. R. I. Criopreservação: Potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.12, p.70-84, 2000.

SANTOS, I. R. I. Crioconservação de germoplasma vegetal. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.4, n.20, p. 60 – 65, 2001.

SANTOS, I. R. I. Criopreservação de eixos embrionários de espécies de *Citrus* usando encapsulamento e desidratação. **Documentos - Embrapa recursos genéticos e biotecnologia**, v. 23, p. 0102-0110, 2004.

SAKAY, A.; KOBAYASHI, S.; OIYAMA, I. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus senensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. **Plant Cell Reports**, v.9, p.30-33, 1990.

SILVA, L. C. 2009. **Viabilidade de células pró-embriogênicas e suspensão celular de murici – pequeno**. Dissertação (Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Agronomia área de concentração em fisiologia vegetal) Universidade Federal de Lavras – MG.

VIEIRA, M. L. C. Conservação de Germoplasma *in vitro*. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.3, n.14, p. 18 – 20, 2000.

VOLK, G. M; HARRIS, J. L; ROTINDO, K. E. Survival of mint shoot tips after exposure to cryoprotectant solution components. **Cryobiology**, v. 52, n.2 p.305–308, 2006.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O crescimento reduzido se mostrou eficiente para conservação *in vitro* da espécie por 240 dias de cultivo sendo o tratamento contendo a combinação de 87,64mM de sacarose e manitol o mais viável apresentando menor taxa de comprimento de parte aérea;

As metodologias aplicadas para crioconservação da espécie não foram eficientes, havendo morte celular nas primeiras etapas do processo de vitrificação dos calos e das gemas na etapa criogênica;

Novos trabalhos devem ser conduzidos, avaliando-se maiores tempos de incubação em solução de pré-cultivo, incubação dos explantes encapsulados em solução de pré-cultivo antes de imersão em nitrogênio líquido a -196°C e ampliação do tempo de desidratação dos tecidos.

APÊNDICE 1: Tabela da análise de variância do número de brotos de *Hyptis ramosa* Pohl ex Benth. cultivadas *in vitro* em meio MS suplementados com diferentes combinações de sacarose, manitol e sorbitol, após 60, 120, 180 e 240 dias de cultivo. Feira de Santana, Bahia, 2017.

Variável analisada: NB

Opção de transformação: Raiz quadrada de $Y + 1.0 - \text{SQRT} (Y + 1.0)$

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	9	152.957030	16.995226	157.907	0.0000
TEMPDIAS	3	173.536917	57.845639	537.459	0.0000
TRAT*TEMPDIAS	27	55.717701	2.063619	19.174	0.0000
erro	160	17.220475	0.107628		
Total corrigido	199	399.432123			
CV (%) =	10.13				
Média geral:	3.2377213	Número de observações:	200		

APÊNDICE 2: Tabela da análise de variância do comprimento da parte aérea de *Hyptis ramosa* Pohl ex Benth. cultivadas *in vitro* em meio MS suplementados com diferentes combinações de sacarose, manitol e sorbitol, após 60, 120, 180 e 240 dias de cultivo. Feira de Santana, Bahia, 2017.

Variável analisada: CPA

Opção de transformação: Raiz quadrada de $Y + 1.0 - \text{SQRT} (Y + 1.0)$

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	9	26.030727	2.892303	164.023	0.0000
TEMPDIAS	3	39.678532	13.226177	750.058	0.0000
TRAT*TEMPDIAS	27	14.019677	0.519247	29.447	0.0000
erro	160	2.821368	0.017634		
Total corrigido	199	82.550303			
CV (%) =	6.12				
Média geral:	2.1681210	Número de observações:	200		

APÊNDICE 3: Tabela de análise de variância do número de raiz de *Hyptis ramosa* Pohl ex Benth. cultivadas *in vitro* em meio MS suplementados com diferentes combinações de sacarose, manitol e sorbitol, após 60, 120, 180 e 240 dias de cultivo. Feira de Santana, Bahia, 2017.

Variável analisada: NR

Opção de transformação: Raiz quadrada de $Y + 1.0 - \text{SQRT} (Y + 1.0)$

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	9	51.624255	5.736028	109.044	0.0000
TEMPDIAS	3	21.610089	7.203363	136.939	0.0000
TRAT*TEMPDIAS	27	25.620200	0.948896	18.039	0.0000
erro	160	8.416453	0.052603		
Total corrigido	199	107.270996			
CV (%) =	10.14				
Média geral:	2.2613370	Número de observações:	200		

APÊNDICE 4: Tabela de análise de variância do comprimento da raiz de *Hyptis ramosa* Pohl ex Benth. cultivadas *in vitro* em meio MS suplementados com diferentes combinações de sacarose, manitol e sorbitol, após 60, 120, 180 e 240 dias de cultivo. Feira de Santana, Bahia, 2017.

Variável analisada: CR

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	9	23.880450	2.653383	82.148	0.0000
TEMPDIAS	3	20.246550	6.748850	208.943	0.0000
TRAT*TEMPDIAS	27	24.328950	0.901072	27.897	0.0000
erro	160	5.168000	0.032300		
Total corrigido	199	73.623950			
CV (%) =	25.47				
Média geral:	0.7055000	Número de observações:	200		