



### Tipos de explantes para estabelecimento *in vitro* de orégano e hortelã

Daiane Silva Lattuada<sup>1</sup>, Leonardo Zucuni Guasso<sup>2</sup>, Kádima Melo de Oliveira<sup>3</sup>, Valmira Machado da Silva<sup>4</sup>, Paulo Vitor Dutra de Souza<sup>5</sup>

**Resumo** - Considerando a importância farmacológica de orégano (*Origanum vulgare* L.) e hortelã (*Mentha piperita* L.), o desenvolvimento de formas de propagação e cultivo *in vitro* poderá contribuir para a inserção dessas espécies em sistemas de produção sustentáveis, com características genéticas preservadas. O objetivo deste trabalho foi verificar o tipo explante mais promissor para o estabelecimento *in vitro* de orégano (*Origanum vulgare* L.) e hortelã (*Mentha piperita* L.). Os tratamentos adotados foram: a introdução de três tipos de explantes: segmentos nodais, segmentos foliares e sementes. Cada explante foi introduzido, individualmente, em tubo de ensaio, contendo 15mL do meio de cultivo DSD1. Avaliou-se, aos sete, 14 e 21 dias após a introdução *in vitro*, o percentual de resposta positiva de introdução: brotação, para segmentos nodais; sobrevivência, para folhas e germinação, para sementes; contaminação (fungos e bactérias), oxidação e número de brotos por explante. O delineamento experimental utilizado foi o completamente casualizado, com três repetições, compostas por 10 tubos de ensaio, em cada tratamento. As médias observadas foram diferenciadas pelo teste de Tukey 5%. Os resultados indicam que para o estabelecimento *in vitro* de orégano somente os segmentos nodais apresentaram regeneração de plantas. Enquanto que para hortelã, os explantes segmentos nodais e sementes apresentaram resultado positivo. Mais estudos devem ser realizados à fim de reduzir as contaminações por fungos e bactérias.

**Palavras-Chave:** Lamiaceae. Cultura de tecidos vegetais; Propagação vegetativa.

### Types of explant for *in vitro* establishment of oregano and mint

**Abstract** – Considering the pharmacological importance of oregano (*Origanum vulgare* L.) and peppermint (*Mentha piperita* L.), the development of *in vitro* propagation and cultivation forms may contribute to the insertion of these species into sustainable production systems with preserved genetic characteristics. The objective of this work was to verify the type of explant most promising for the *in vitro* establishment of oregano (*Origanum vulgare* L.) and mint (*Mentha piperita* L.). The treatments adopted were the introduction of three types of explants: nodal segments, leaf segments, and seeds. Each was individually introduced into test tubes containing 15 ml of the DSD1 culture medium. At the 7, 14 and 21 days after the *in vitro* introduction, the percentage of positive introduction response: budding to nodal segments, survival to leaves and germination to seeds were evaluated; contamination (fungi and bacteria), oxidation and number of shoots per explant. The experimental design was completely randomized, with three replicates, composed of 10 test tubes, in each treatment. The observed means were differentiated by Tukey's test 5%. The results indicate that for *in vitro* establishment of oregano only the nodal segments showed regeneration of plants. While for mint the nodal segment explants and seeds showed positive results. Further studies should be carried out to reduce fungal and bacterial contamination.

**Keywords:** Lamiaceae. Plant tissue culture. Vegetative propagation.

<sup>1</sup> Eng. Agrônoma, Dra. Pesquisadora do DDP/SEAPDR, Centro de Pesquisa Celeste Gobbato - DDP/SEAPDR, Estrada Fazenda Souza, s/n – Caxias do Sul. E-mail: daiane-lattuada@agricultura.rs.gov.br

<sup>2</sup> Eng. Agrônomo, MSc., Aluno de doutorado do PPG Fitotecnia - UFRGS. Avenida Bento Gonçalves 7712 - Porto Alegre - RS. E-mail: leonardo.guasso@ufrgs.br

<sup>3</sup> Graduanda de Ciência e Tecnologia de Alimentos - UERGS, Centro de Pesquisa Celeste Gobbato - DDP/SEAPI, Estrada Fazenda Souza, s/n – Caxias do Sul. E-mail: kadimelooo@gmail.com

<sup>4</sup> Graduanda de Ciência e Tecnologia de Alimentos - UERGS, Centro de Pesquisa Celeste Gobbato - DDP/SEAPI, Estrada Fazenda Souza, s/n – Caxias do Sul. E-mail: valmirams2016@gmail.com

<sup>5</sup> Eng. Agrônomo, Dr. Professor titular do Departamento de Horticultura e Silficultura da Faculdade de Agronomia – UFRGS, Avenida Bento Gonçalves, 7712 - Porto Alegre. E-mail: pvdsouza@ufrgs.br



## Introdução

As plantas da família Lamiaceae pertencem à ordem Tubiflorae Lamiales, abrangendo cerca de 200 gêneros e, aproximadamente, 3.200 espécies, distribuídas em todo o mundo. A maioria das espécies é conhecida pelo seu uso condimentar, e muitas delas possuem atividade biológica já relatada na literatura, por diversos autores (LORENZI; MATOS, 2008). Dentre algumas espécies brasileiras que mais se destacam está a *Hyptis suaveolens* L. (alfavacão), *H. mutabilis* e *H. atrorubens*; *Lavandula angustifolia* Mill (alfazema); *Melissa officinalis* L. (cidreira), *Mentha avensis* (hortelã-do-Brasil), *M. piperita* L. (hortelã), *M. pulegium* L. (poejo), *Ocimum basilicum* L. (majericão), *Origanum vulgare* L. (orégano), *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim), *Salvia officinalis* L. (sálvia) (LORENZI; MATOS, 2008).

Nativo de regiões montanhosas e pedregosas do sul da Europa, o orégano atualmente é cultivado no sul e sudeste do Brasil como especiaria de largo uso na culinária, além de possuir princípios ativos como taninos e óleo essencial. O óleo é utilizado na composição de aromatizantes tanto em alimentos quanto em cosméticos (BRANT et al., 2011). Mesmo havendo grande demanda deste condimento, o suprimento interno brasileiro acontece principalmente por meio de importação (CASTRO; RAMOS 2003), sendo que Chile e Peru juntos respondem por aproximadamente 90% da importação brasileira (MDIC, 2007).

*Mentha piperita* L., planta conhecida como hortelã-pimenta, menta ou hortelã-apimentada, se destaca por suas propriedades medicinais podendo ser empregada no tratamento de náuseas, cólicas gastrointestinais, flatulências, cálculos biliares, icterícia, ansiedade e expectoração. As propriedades medicinais desta planta estão relacionadas com o óleo essencial extraído de suas folhas frescas (LORENZI; MATOS 2008). Atualmente os maiores produtores mundiais de menta são: Brasil, Japão e China (HERBOTECHNIA, 2007).

Geralmente, a multiplicação do orégano se dá através da propagação vegetativa, com a divisão da planta, porém ocorrem níveis altos de heterogeneidade entre as populações e algumas populações têm baixa viabilidade ou esterilidade total de sementes. Nesta espécie, a propagação vegetativa contínua tem acarretado em declínio, devido ao acúmulo de vários fungos sistêmicos, bacterianos, e infecções virais (GOLENIOWSKI et al., 2003). Já a hortelã pode ser propagada por via sexuada ou vegetativa, no entanto, a multiplicação via sementes é laboriosa. Ainda, a variabilidade genética decorrente da multiplicação via sementes pode comprometer o uso desta espécie para propósitos farmacêuticos, devido a variações na composição química do óleo extraído. Por outro lado, a multiplicação por estaquia ou divisão de touceira pode permitir o acúmulo de vários fungos sistêmicos, bactérias e infecções virais que comprometem a propagação vegetativa (GOLENIOWSKI et al., 2003) e a produção de óleo essencial.

Para contornar as dificuldades citadas acima, pode-se utilizar a cultura de tecidos vegetais, pois é uma técnica promissora para a preservação de fontes vegetais. Através desta técnica é possível a produção em larga



doi: <https://doi.org/10.36812/pag.201925391-103>

escala de plantas geneticamente idênticas à planta matriz, fator de extrema importância para a propagação de genótipos selecionados e quimiotipos de espécies produtoras de óleos essenciais (ANDRADE et al., 1999). Ainda, pode contornar dificuldades decorrentes do baixo poder germinativo de sementes de algumas espécies e, preservar a manutenção genética e fitossanitária de espécies vegetais, sendo uma ótima alternativa para a multiplicação de plantas com propriedades medicinais ou produtoras de óleos essenciais. Pode-se encontrar referências da aplicação desta técnica em hortelã-pimenta na literatura (PAOLICCHI et al., 2002; GHANTI et al., 2004; SUNANDAKUMARI et al., 2004; WANG et al., 2008), contudo para orégano os trabalhos ainda são incipientes.

A primeira etapa do cultivo *in vitro* é o estabelecimento, que vai desde a seleção dos explantes até a obtenção de uma cultura livre de contaminantes visíveis e suficientemente adaptada a essas condições (ERIG; SCHUCH, 2005). Muitos são os fatores que estão envolvidos na regeneração das plantas *in vitro*, entre eles estão o tipo de meio de cultura, seguido do suplemento de reguladores de crescimento, concentração de sacarose, iluminação, tipo de explante, entre outros (ZHANG et al., 2003), sendo necessário encontrar as condições mais adequadas para cada genótipo que se pretende propagar.

Na seleção dos explantes, devem ser considerados aspectos como o nível de diferenciação do tecido utilizado e a finalidade da micropropagação. Teoricamente, qualquer tecido pode ser utilizado como explante, em vista da totipotência das células vegetais. Na prática, entretanto, procuram-se utilizar explantes que contenham maior proporção de tecido meristemático ou que tenham maior capacidade de expressar a totipotência (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

A grande vantagem no uso de segmentos nodais está na presença de órgãos meristemáticos pré-formados, propiciando maior estabilidade genética das plantas micropropagadas. A regeneração de plantas *in vitro* a partir de outros tipos de explante, tais como cotilédone, disco foliar, hipocótilo, também pode ser utilizada para a micropropagação, desde que a morfogênese ocorra por organogênese ou embriogênese somática de forma direta, ou seja, sem que ocorra a formação de calo, evitando assim a ocorrência de variantes somaclonais. Essa característica, apesar de desejável para trabalhos de melhoramento, é extremamente prejudicial quando da conservação e multiplicação clonal, pois a estabilidade genética deve ser mantida (FARIA et al. 2007). Por outro lado, plântulas obtidas da germinação de sementes *in vitro* têm favorecido o estabelecimento do cultivo de algumas espécies, em especial cactáceas, em função das reduções de contaminação e de oxidação dos explantes, fatores limitantes ao estabelecimento da cultura *in vitro* (PÉREZ-MOLPHE-BALCH; DÁVILA-FIGUEROA, 2002; SANTOS-DÍAZ et al. 2003).

Diante deste cenário, o objetivo deste trabalho foi identificar o tipo de explante mais promissor para o estabelecimento *in vitro* de orégano (*Origanum vulgare* L.) e hortelã (*Mentha piperita* L.).



## Material e métodos

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia Vegetal, no Centro de Pesquisa Celeste Gobatto (CPCG), em Caxias do Sul (SEAPDR-DDPA), e no Laboratório de Biotecnologia em Horticultura da Faculdade de Agronomia da UFRGS, em outubro de 2018. Para o estabelecimento *in vitro* de orégano e hortelã, os tratamentos foram: a introdução de três tipos de explantes: segmentos nodais, segmentos foliares e sementes.

Foram utilizadas sementes de orégano - marca comercial Horticerres®, lote 15000208, com 67% de germinação e 99% de pureza; as sementes de hortelã foram da marca comercial Isla®, lote 115041-011, com 86% de germinação e 100% de pureza.

O meio de cultivo adotado foi o DSD1 (descrito em LATTUADA, 2010), acrescido de 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 8 g L<sup>-1</sup> de ágar, o pH foi ajustado para 5,8 e autoclavado a 121° C, à 1 atm, por 15 minutos. Os segmentos nodais e foliares, foram coletados de planta matriz, mantida em casa de vegetação (condições ambientais médias do período: temperatura média 20,32 °C, mínima 15,90 °C e máxima 25,92 °C, umidade relativa do ar 73,12 %; mudas cultivadas em embalagens de 1 L de substrato comercial a base de turfa e vermiculita expandida e sob irrigação por gotejamento com 3 ciclos de 4 minutos por dia) e conduzidos ao laboratório, onde foram imersos em água e detergente neutro e passaram por leve escovação. Na sequência passaram por desinfestação, através de imersão em etanol 70%, por 30 segundos, seguida de imersão em hipoclorito de sódio 2% acrescido de uma gota de Tween 20 0,01%, por 10 minutos. A desinfestação das sementes foi realizada através de imersão em etanol 70%, por 30 segundos, seguida de imersão em hipoclorito de sódio 2%, acrescido de uma gota Tween 20 0,01%, por três minutos. A tríplice lavagem de todos os tipos de explantes foi realizada, em câmara de fluxo laminar estéril, com água destilada autoclavada. Os explantes foram inoculados, em tubos de ensaio individualmente (contendo 15 mL de meio de cultivo por tubo). Após os tubos foram vedados e armazenados em sala de crescimento, nas condições de temperatura de 25±2°C, 16 horas de fotoperíodo e 60-70% de UR.

Avaliou-se, para orégano, aos sete e 14 dias após a introdução *in vitro* (DAI), e para hortelã aos sete, 14 e 21 DAI, o percentual de resposta positiva de introdução: brotação para segmentos nodais, sobrevivência para segmentos foliares e germinação para sementes; contaminação (fungos e bactérias), oxidação e o número médio de brotações emitidas por explante.

Os dados foram submetidos à análise de variância (teste F) e as médias comparadas pelo teste de Tukey, ambos a 5% de significância. Foi adotado o delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial (tipos de explante X período, sendo 3 X 2 para orégano e 3 X 3 para hortelã), verificando-se eventuais interações entre os tipos de explante e os dias após a introdução *in vitro*.



doi: <https://doi.org/10.36812/pag.201925391-103>

Concomitantemente ao experimento de cultivo *in vitro*, foi realizado teste de germinação de sementes de orégano, seguindo as regras de análise de sementes para esta espécie (BRASIL, 2009), com o objetivo de verificar a sua viabilidade.

## Resultados e discussão

Para orégano, o tipo de explante teve efeito significativo em todas as variáveis analisadas, exceto na oxidação (Tabela 1), já que somente um segmento nodal oxidou. Os explantes segmento nodal e foliar apresentaram melhor desempenho para a resposta positiva (brotação e sobrevivência, respectivamente). Contudo apresentaram maior contaminação, sendo significativamente maior a proliferação de fungos no explante segmento foliar e, de bactérias, no segmento nodal (Tabela 1). As folhas, embora tenham permanecido vivas, não apresentaram sinais de indução *in vitro*, como a calogênese, e, conforme a análise ao longo do tempo, apresentaram maior proliferação de contaminação, especialmente de fungos.

Da mesma forma, FONSECA et al. (2007) trabalhando com tipos de explante: segmento nodal, foliar e internodal para estabelecimento *in vitro* de quatro genótipos de hortelã-japonesa (*M. arvensis* -Lamiaceae), observaram que somente o segmento nodal proporcionou regeneração de plantas. Embora, resultados diferentes foram obtidos por SHASANY et al. (1998), onde os segmentos internodais foram eficientes na regeneração de *M. arvensis* cultivares Himalaia e Kalka.

O protocolo adotado para desinfestação das sementes foi eficiente, pois não foram observadas contaminações, contudo apenas uma semente germinou *in vitro* (Tabela 1). Ainda, no teste de germinação realizado concomitantemente, somente 5% das sementes germinaram, corroborando com GOLENIOWSKI et al., (2003) que indica que as sementes de orégano possuem baixa viabilidade. Sousa (2015), trabalhando com tipos de explante de *Hyptis ramosa* (Lamiaceae) obteve taxa de germinação de 47%, após 60 dias da inoculação das sementes. Alguns trabalhos têm demonstrado baixa taxa de germinação *in vitro* para os membros da família Lamiaceae, como foi observado para o alecrim, em que se obteve apenas 0,67% de germinação (COSTA; DROSTE, 2010).

A germinação é a retomada do processo de crescimento e desenvolvimento do embrião, influenciado tanto por fatores ambientais, quanto por condições endógenas da semente. As sementes podem ser classificadas de acordo com sua resposta fisiológica em relação à variação de umidade o que influencia diretamente na sua longevidade quando armazenadas. Sementes ortodoxas podem ser armazenadas a baixos teores de umidade sem perder a viabilidade, enquanto o comportamento contrário é observado em espécies recalcitrantes, sendo sua viabilidade dependente de altos níveis de umidade (MOROZESK et al. 2014). Espécies da família Lamiaceae apresentam sementes ortodoxas (MOROZESK et al. 2014), que suportam a redução no teor de umidade e



doi: <https://doi.org/10.36812/pag.201925391-103>

portanto, podem ser armazenadas por longo período. Contudo, a baixa germinação das sementes de orégano observadas neste estudo, pode ser atribuída também ao tipo de armazenamento. As sementes utilizadas neste estudo encontravam-se em embalagem hermética aluminizada. Estudos indicam que embalagens de polietileno podem dificultar as trocas gasosas entre a embalagem e o meio (SILVA et al. 2011), sendo que quando exposta a uma temperatura mais elevada, pode favorecer o aumento da respiração da semente proporcionando maior liberação de água e aumentando a umidade relativa do ar no interior da embalagem, favorecendo a deterioração. A porcentagem de germinação de sementes armazenadas inadequadamente é reduzida devido à deterioração das mesmas, a qual altera de maneira significativa os processos bioquímicos e fisiológicos das sementes, aumentando a degradação dos compostos de reserva, uma vez que ocorre a produção de substâncias reativas de oxigênio, que alteram a estrutura de enzimas antioxidantes, ocasionando redução acentuada no potencial fisiológico (GRAHAM 2008).

A interação entre explante e período (DAI) somente teve efeito significativo para proliferação de bactérias, sendo maior em segmentos nodais, na segunda avaliação, aos 14 dias (Tabela 1).

**Tabela 1.** Percentual de resposta positiva (brotação, sobrevivência ou germinação, para segmento nodal, foliar e semente, respectivamente), contaminação (por fungos ou bactérias) e oxidação em tipos de explantes de orégano (*Origanum vulgare* L.) introduzidos *in vitro*.

Tratamentos	Resposta positiva (%)	Contaminação (%)						
		Fungo	Bactérias	Oxidação (%)				
Seg. Nodal	46,00	a	15,00	ab	31,00	a	0,00	
Seg. Foliar	55,00	a	35,00	a	10,00	b	0,00	
Semente	16,00	b	0,00	b	0,00	b	0,00	
DAI								
7	41,10		13,30		8,80	b	0,00	
14	27,70		20,00		18,80	a	10,00	
Explante	0,0010	***	0,0069	***	0,0000	***	0,3966	ns
DAI	0,0754	ns	0,3782	ns	0,0082	**	0,3370	ns
Explante X DAI	0,2621	ns	0,3019	ns	0,0028	***	0,3966	ns
CV (%)	15,28		34,33		10,66		22,32	

Médias seguidas das mesmas letras na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey 5%.

Segmentos nodais de orégano apresentaram início de brotação aos sete dias de avaliação, contudo, aos quatorze dias, este material foi perdido devido aos processos de contaminação ou oxidação (Figura 1 a).



doi: <https://doi.org/10.36812/pag.201925391-103>

Para hortelã, o tipo de explante teve efeito significativo em todas as variáveis analisadas (Tabela 2). Os explantes segmento nodal e sementes apresentaram desempenho significativamente superior quanto à resposta positiva (brotação e sobrevivência, respectivamente), em relação ao segmento foliar. Contudo, segmento nodal apresentou maior proliferação de contaminantes, especialmente fungos (Tabela 2). Processos oxidativos somente foram observados em segmentos foliares, onde 53,3% dos explantes oxidaram, no período avaliado.

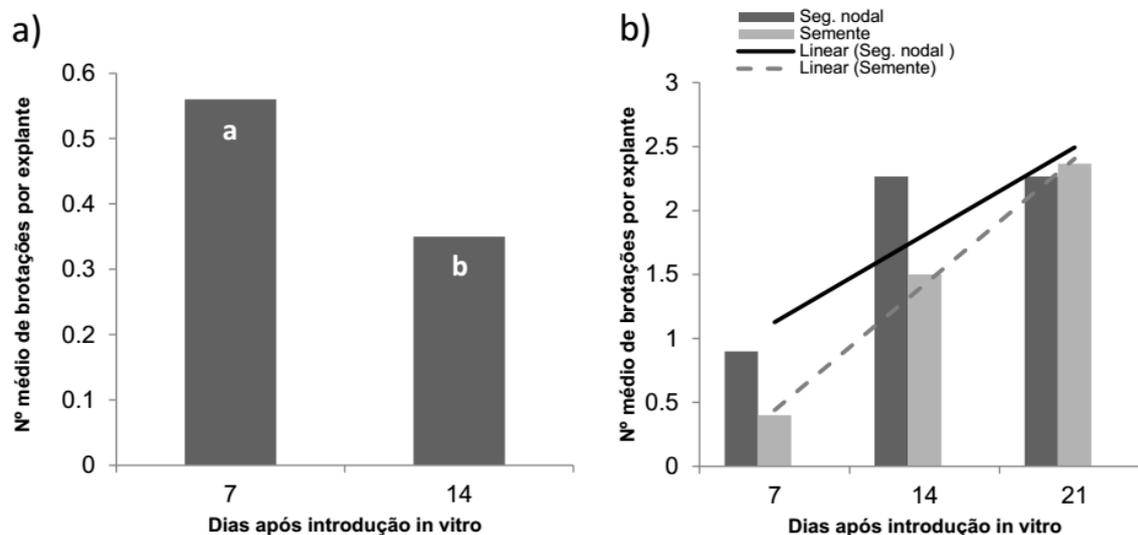
Na análise ao longo do tempo, percebe-se que o período avaliado foi suficiente para promover a germinação das sementes e o início da brotação, nos segmentos nodais. Contudo, houve incremento na proliferação de fungos e oxidação (Tabela 2).

**Tabela 2.** Percentual de resposta positiva (brotação, sobrevivência ou germinação, para segmento nodal, folha e semente, respectivamente), contaminação (por fungos ou bactérias) e oxidação em tipos de explantes de hortelã (*Mentha piperita* L.) introduzidos *in vitro*.

Tratamentos	Resposta positiva (%)	Contaminação (%)		
		Fungo	Bactéria	Oxidação (%)
<b>Explante</b>				
Seg. Nodal	78,8 a	13,30 a	7,70 a	0,00 b
Seg. Foliar	44,4 b	3,30 b	0,00 b	53,3 a
Semente	74,4 a	0,0 b	0,00 b	0,00 b
<b>DAI (dias)</b>				
7	75,5 a	2,20 a	2,20	1,10 b
14	67,7 a	14,40 b	2,20	25,5 a
21	54,4 b	14,40 b	2,20	26,6 a
Explante	0.0000 ***	0.0000 ***	0,0043 ns	0.0000 ***
DAI	0,0015 ***	0.0000 ***	0,5882 ***	0.0000 ***
Explante X DAI	0.0000 ***	0.0000 ***	0,7037 ns	0.0000 ***
CV (%)	15,72	13,71	17,31	9,03

Médias seguidas das mesmas letras na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey 5%.

O número médio de brotações por explante teve comportamento linear tanto para segmento nodal quanto para sementes, em hortelã, contudo, observa-se aumento mais pronunciado na emissão de brotação em sementes, comparado à segmentos nodais, durante o período avaliado (Figura 1b). Nas primeiras avaliações as sementes apresentavam menor crescimento que os segmentos nodais, pois ainda estavam em processo de germinação. Mas assim que terminado o processo, devido a apresentarem todos os órgãos já formados, as plantas oriundas de sementes tiveram o crescimento acelerado e culminando em maior brotação.



**Figura 1.** Número médio de brotações por explante de a) orégano (segmento nodal) e b) hortelã (Segmento nodal  $y=-13.19+28.46x$ ;  $r^2=0.73$  e sementes  $y= 3.51+9.81x$ ;  $r^2=0.87$ ), após o período de avaliação de cada experimento (colunas com letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey 5%).

Da mesma forma que ocorreu com orégano, em hortelã os segmentos foliares permaneceram vivos durante o período avaliado, mas não apresentaram indução *in vitro*. Resultado similar também foi observado para *Hyptis ramosa* Pohl ex Benth (Lamiaceae), onde, os explantes segmento internodal e foliar não apresentaram processo morfogênético (SOUSA, 2015). Da mesma forma, NEPOMUCENO (2012), em estudos com *Martianthus leucocephalus* (Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore (Lamiaceae), cujos segmentos internodais e foliares também não apresentaram respostas morfogênicas frente aos tratamentos testados. A ausência de resposta morfogênética nos segmentos internodais e foliares pode estar associada à ausência de gemas pré-formadas nesses tecidos, bem como à ineficiência dos tratamentos hormonais testados na rediferenciação dos mesmos (NEPOMUCENO, 2012).

Entre os fatores que afetam a resposta morfogênética *in vitro*, destacam-se a suplementação do meio de cultura com reguladores vegetais, que propicia uma grande variação de respostas obtidas, pois dependem da espécie, da idade, origem e diferenciação do explante. O balanço auxina/citocinina determina a formação de raízes ou brotações nos vegetais (HARTMANN et al., 2011), de modo que a maior quantidade de auxina estimula a formação de raízes enquanto maior quantidade de citocinina estimula a emissão de brotos (TAIZ; ZEIGER, 2009). Contudo, as concentrações endógenas dos hormônios dificultam a condução dessas rotas com base apenas na adição de reguladores ao meio de cultura (GUTIÉRREZ, 2010). Ainda, dependendo da



doi: <https://doi.org/10.36812/pag.201925391-103>

finalidade da micropropagação, a adição de reguladores de crescimento no início do estabelecimento pode dificultar as etapas subsequentes, devido ao efeito residual de alguns hormônios, como a citocinina. Diante disto, neste estudo optou-se por utilizar meio de cultura sem a adição exógena de hormônios, visando observar o potencial de regeneração próprio da espécie. Os resultados apontam que, tanto orégano quanto hortelã, podem ser estabelecidas sem a adição de hormônios *in vitro*, especialmente através de segmentos nodais. Contudo, para obter melhores percentuais de multiplicação *in vitro* são necessários estudos avaliando o comportamento destas espécies em meios de cultivo suplementados com citocininas e auxinas.

Para as duas espécies estudadas, orégano e hortelã, observou-se elevada proliferação de contaminantes (fungos e bactérias), quando utilizados explantes de segmentos foliares e nodais (Tabelas 1 e 2). A assepsia é uma das etapas iniciais que antecedem a introdução *in vitro*. Para a maioria das espécies essa etapa tem sido o maior obstáculo, sobretudo para plantas com elevado número de tricomas nos caules e folhas, como é o caso das lamiáceas, o que dificulta a assepsia inicial (NEPOMUCENO, 2012). As técnicas de assepsia para sementes podem ser generalizadas para inúmeras espécies. Contudo, o mesmo não ocorre para explantes como gemas axilares ou apicais (SOUZA et al., 2014). Além da presença de micro-organismos externos, outra questão relevante é a ocorrência de micro-organismos endofíticos, que tem sido considerada um problema frequente e de difícil solução. Estes podem aparecer como uma contaminação tardia, entre 30 dias e até 1 ano após o início do cultivo *in vitro* (MORAES et al., 2007). Diante dos resultados encontrados, especialmente para orégano, são necessários estudos mais aprofundados, visando a elaboração de um protocolo eficiente de desinfestação de explantes.

### Conclusões

Segmentos nodais são os explantes mais promissores para o estabelecimento *in vitro* de orégano (*Origanum vulgare* L.); contudo, ainda são necessários avanços no processo de assepsia a fim de reduzir a proliferação de agentes contaminantes.

Para estabelecimento *in vitro* de hortelã (*Mentha piperita* L.) podem ser utilizados segmentos nodais e sementes.

### Agradecimentos:

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)



doi: <https://doi.org/10.36812/pag.201925391-103>

## Referências

ANDRADE, L. B. et al. The effect of growth regulators on shoot propagation and rooting of common lavender (*Lavandula vera* DC). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 56, n. 02, p. 79-83, 1999.

BRANT, R.S. et al. Multiplicação de orégano por meio de cultura de tecidos. *Horticultura Brasileira* 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para Análise de Sementes Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: MAPA/ACS, 2009, 399p.

CASTRO, L.O.; RAMOS, R.L.D. Descrição botânica, cultivo e uso de *Origanum majorana* L., manjerona e de *Origanum vulgare* L., orégano (LAMIACEAE). Porto Alegre: FEPAGRO, 2003. (Circular Técnica, 22).

COSTA, D.T.; DROSTE, A. Efeito da esterilização sobre o estabelecimento da cultura *in vitro* de *Rosmarinus officinalis* Linn. (Lamiaceae). *Pesquisas Botânica*, São Leopoldo n 61, p. 315-324, 2010.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Estabelecimento *in vitro* de mirtilo a partir de segmentos nodais. *Scientia Agraria*, v. 6, n. 1-2, p. 91-96, 2005.

FARIA, G.A. et al. Meio de cultura e tipo de explante no estabelecimento *in vitro* de espécies de maracujazeiro. *Bragantia*, Campinas. v. 66, n.4, p.535-543, 2007

FONSECA, V.O. et al. Influência de tipos de explantes e reguladores de crescimento na multiplicação *in vitro* de genótipos de hortelã-japonesa (*Mentha arvensis* L.). Anais... 16º Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais / 3º Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas / 1º Simpósio de Plantas Ornamentais Nativas, Goiânia – Goiás 2007. On line. Disponível em: <file:///C:/Users/User/Downloads/1479-7270-1-SM.pdf>; Acesso em: 21/05/2019.

GHANTI, K. et al. Rapid regeneration of *Mentha piperita* L. from shoot tip and nodal explants. *Indian Journal of Biotechnology*, v.3, p.594-598, 2004.

GRAHAM, I.A. Seed storage oil mobilization. *Annual Review of Plant Biology*. v. 59, p.115-142, 2008.



doi: <https://doi.org/10.36812/pag.201925391-103>

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

GOLENIOWSKI, M.E.; FLAMARIQUE, C.; BIMA, P. 2003. Micropropagation of oregano (*Origanum vulgare* x 3 APPLII) from meristem tips. *In vitro: Cell Developmental Biology Plant*. 39: 125-128.

GUTIÉRREZ, I.E.M. Micropropagação de *Bauhinia cheilantha* (BONG.) STEUD. (Fabaceae) (Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-graduação em Biotecnologia/UEFS) Feira de Santana, Bahia, 2010.

HARTMANN, H.T. et al. Hartmann and Kerster's PLANT PROPAGATION: principles and practices. 8. ed. Boston: Prentice Hall, 2011, 915p.

HERBOTECNIA. Tecnologías de cultivo y poscosecha de plantas medicinales, aromáticas y tintóreas. *Mentha arvensis*. Disponível em: [www.herbotecnia.com.ar/exotica-mentajaponesa.html](http://www.herbotecnia.com.ar/exotica-mentajaponesa.html). Acesso em: 10 janeiro 2007.

LATTUADA, D.S. Micropropagação e miniestaquia de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) (Dissertação de Mestrado Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia/UFRGS). Porto Alegre, Rio Grande do Sul. 2010.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. 2.ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 544p.

MORAES, R. M. et al. Micropropagação e Banco de Germoplasma “*in vitro*” para produção e conservação de plantas nativas do Cerrado. In: PEREIRA, A.M.S. (Org.). Recursos genéticos e conservação de plantas medicinais do Cerrado. Ribeirão Preto: Editora Legis Summa, 2007. v. 1, p. 185-214.

MOROZESK, M. et al. Longevidade de sementes nativas da Floresta Atlântica. *Natureza on line*, v. 12, n. 4, p.185-194, 2014.



doi: <https://doi.org/10.36812/pag.201925391-103>

NEPOMUCENO, C. Propagação e Conservação *in vitro* de *Martianthus leucocephalus* (MART. Ex BENTH.) J.F.B. PASTORE. 2012. 180f. Tese (Doutorado em Botânica). Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia, 2012.

PAOLICCHI, F. et al. Effect of clinorotation on *in vitro* cultured explants of *Mentha piperita* L. *Scientia Horticulturae*, v.92, n.3-4, p.305-315, 2002.

PÉREZ-MOLPHE-BALCH, E.; DÁVILA-FIGUEROA, C. A. *In vitro* propagation of *Pelecyphora aselliformis* Ehrenberg and *P. strobiliformis* Werdermann (Cactaceae). *In vitro Cellular & Developmental Biology Plant*, v. 38, p. 73–78, 2002.

SANTOS-DÍAZ, M. D. S. et al. *In vitro* organogenesis of *Pelecyphora aselliformis* Erhenberg (Cactaceae). *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, v. 39, p. 480-484, 2003.

SILVA, K.B. et al. Armazenamento de sementes de *Erythrina velutina* willd. *Revista Árvore*, Viçosa, v. 35 n.4, p.809-816, 2011.

Sistema Alice do Ministério do Desenvolvimento Indústria e Comércio Exterior. Disponível em: [www.mdic.gov.br](http://www.mdic.gov.br). Acesso em dez de 2007.

SHASANY, A. K. et al. High regenerative nature of *Mentha arvensis* internodes. *Indian Academy of Sciences*, n.5, p. 641-646, 1998.

SOUSA, F.P. (2015) Micropropagação de *Hyptis ramosa* Pohl ex Benth. (LAMIACEAE) Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, 2015. 64 f

SUNANDAKUMARI, C. et al. Rapid axillary bud proliferation and *ex vitro* rooting of herbal spice, *Mentha piperita* L. *Indian Journal of Biotechnology*, v.3, p.108-112, 2004.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. p. 622-624



doi: <https://doi.org/10.36812/pag.201925391-103>

WANG, X. et al. Highly efficient *in vitro* adventitious shoot regeneration of peppermint (*Mentha x piperita* L.) using internodal explants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, on line first, 2008.

ZHANG, L. et al. Factors influencing shoot regeneration from cotyledons of tetraploid *Isatis indigotica* F. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, v. 39, n. 05, p. 459-462, 2003.