

INDUÇÃO DE CALOS EM HORTELÃ-PIMENTA (*Mentha piperita* L.) CULTIVADA IN VITRO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES HORMONAIS

JULIANA DOS SANTOS RIBEIRO¹; SHAIANE LESSA DOS SANTOS²;
RODRIGO BARCELLOS BRAHM³; MARIA CHRISTINA WILLE⁴; EUGENIA
JACIRA BOLACEL BRAGA⁵; VALMOR JOÃO BIANCHI⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – julianaribeiro1965@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – shaianelessadossantos44@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – rodrigobarcellos2000@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – chriswille80@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – jacirabraga@hotmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – valmorjb@yahoo.com

1. INTRODUÇÃO

A família de plantas Lamiaceae, pertencente à ordem Lamiales, é uma das maiores entre as angiospermas, abrangendo atualmente entre 236 e 256 gêneros e mais de 7.000 espécies distribuídas em todo o mundo (ZHAO et al., 2021). Dentre seus gêneros, destaca-se o gênero *Mentha*, amplamente reconhecido pelo uso medicinal de suas espécies, utilizadas no preparo de infusões, além da extração de óleos essenciais de elevado valor comercial. Esses óleos são largamente utilizados nas indústrias farmacêutica, cosmética e de perfumaria (LORENZI; MATOS, 2002).

Dentre as espécies do gênero *Mentha*, a hortelã-pimenta (*Mentha piperita* L.) se destaca pelas suas aplicações terapêuticas, sendo amplamente empregada na medicina tradicional no alívio de sintomas como náuseas, desconfortos gastrointestinais, gases, distúrbios hepáticos, ansiedade e como agente expectorante (LORENZI; MATOS, 2008).

A extração dos princípios ativos desta espécie requer a produção de plantas em larga escala, ou então o uso de técnicas biotecnológicas, como o cultivo in vitro ou micropropagação, que permite obter novas plantas clonadas, além de possibilitar a produção de tecidos específicos (calos) que posteriormente são induzidos a produzir os metabólitos desejáveis em maior escala (CARDOSO et al., 2019).

Para realizar o cultivo in vitro, é necessário utilizar um meio nutritivo, com ou sem a presença de reguladores de crescimento vegetal, dependendo da espécie e do tipo de tecido que se quer produzir (HUSSAIN, 2012). Os reguladores de crescimento como a Benzilaminopurina (BAP) e o Ácido Naftalenoacético (ANA) desempenham um papel fundamental, sendo a BAP uma citocinina que estimula a indução e proliferação de brotações, enquanto o ANA, uma auxina sintética, favorece a formação de raízes e calos (OLIVEIRA et al., 2010).

A interação e o balanço entre citocininas e auxinas, no meio de cultivo, são cruciais para a indução e formação de calos: massas de células indiferenciadas (MURASHIGE; SKOOG, 1962). Em resposta a diferentes concentrações desses reguladores de crescimento, as plantas podem ser estimuladas a produzir e acumular diferencialmente diversos metabólitos secundários, dentre eles os compostos fenólicos, triterpenoides e flavonoides, que possuem alto valor econômico e de uso devido suas propriedades antioxidantes (ZADIE, 2024).

Como massas de calos possuem grande potencial de multiplicação, esse tipo de tecido pode ser utilizado para produção de metabólitos secundários desejados mediante processos de elicitação (SANTOS et al., 2023). Diante da importância da *M. piperita* para o setor farmacêutico e econômico, no presente estudo buscou-se investigar as respostas morfogênicas de dois tipos de explantes (foliares e de

entrenós) frente ao cultivo em diferentes combinações de citocinina e auxina, visando a produção de massas de calos nesta espécie.

2. METODOLOGIA

O material vegetal utilizado neste experimento foi obtido de brotações de *M. piperita*, previamente cultivada in vitro em Meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com sacarose (30 g L^{-1}), mio-inositol (100 mg L^{-1}), ágar (7 g L^{-1}), sem regulador de crescimento e pH 5,8.

Para a instalação do experimento de indução de calos, utilizou-se o meio MS com a mesma suplementação descrita, acrescentando ainda diferentes combinações de citocinina (BAP) e de auxina (ANA), compondo os tratamentos descritos na Tabela 1. Foram testados dois tipos de explante, discos foliares e entrenós, que foram avaliados aos 15 e 30 dias após a instalação do experimento.

Tabela 1- Meios de indução de calos contendo diferentes combinações de 6-benzilaminopurina (BAP) e ácido naftalenoacético (ANA)

Combinações de BAP e ANA	BAP (mg L^{-1})	ANA (mg L^{-1})
1	0,00	1,0
2	0,25	1,0
3	0,50	1,0
4	1,00	1,0
5	1,50	1,0
6	2,00	1,0

Os explantes (discos foliares, com aproximadamente 1 cm de diâmetro, e segmentos de entrenós, com 1 cm de comprimento) foram inoculados em frascos contendo os respectivos meios de cultura e mantidos sob luz branca contínua, com densidade de fluxo de fótons de $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, na câmara de crescimento, sob temperatura controlada de $22 \pm 2,0 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial ($2 \times 6 \times 2$), cujos fatores foram: a) dois tipos de explante (disco foliar e entrenó); b) seis combinações de BAP \times ANA; e c) data de avaliação (15 e 30 dias). Em cada data de avaliação, foram analisadas as seguintes variáveis: número de explantes com formação de calo, volume médio de calo por explante, porcentagem de explantes com presença de raízes, volume médio de raízes por explante e número médio de raízes formadas.

Ao final do experimento, os dados coletados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando o programa R. Quando significativos, comparou-se as médias dos tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de variância (Tabela 2) não revelou interação significativa entre os fatores avaliados. Observa-se que nem o tipo de explante (A) nem as combinações de meios de cultivo (B) apresentaram efeito significativo sobre as variáveis analisadas, cujas médias gerais foram: volume médio de calos por explante (VMCE) = 1,95; porcentagem de calos com raiz (PCR) = 29,99%; número de raízes por explante (NRE) = 2,54 e porcentagem de explantes com calo (PEC) = 2,82.

Por outro lado, o fator data de avaliação (C) exerceu efeito altamente significativo ($p < 0,01$) em todas as variáveis, indicando que o tempo foi

determinante para o desenvolvimento morfogênético dos explantes. Os elevados coeficientes de variação para PCR (121,64%) sugerem maior heterogeneidade dessa resposta, enquanto VMCE, NRE e PEC apresentaram variações moderadas.

De forma geral, a ausência de efeito dos fatores explante e meios de cultivo sugere que o meio basal já forneceu condições suficientes para induzir o desenvolvimento inicial, sendo a totipotência celular dos explantes determinante para a resposta, independentemente das combinações testadas (ABDUL TAWAB et al., 2022). Assim, o fator temporal destacou-se como a principal fonte de variação, corroborando resultados prévios reportados por Gomes et al. (2015).

Tabela 2- Análise de Variância (ANOVA) para VMCE, PCR, NRE e PEC

Fonte de variação	GL	Quadrados médios			
		VMCE	PCR	NRE	PEC
Explante (A)	1	2,30 ^{ns}	1,91 ^{ns}	1,61 ^{ns}	0,15 ^{ns}
Meios (B)	5	0,20 ^{ns}	148,74 ^{ns}	10,76 ^{ns}	0,44 ^{ns}
Data (C)	1	32,47 ^{**}	19.809,96 ^{**}	359,09 ^{**}	6,96 ^{**}
A x B x C	5	1,12 ^{ns}	85,23 ^{ns}	7,89 ^{ns}	0,28 ^{ns}
Erro	36	0,36	62,18	0,27	0,26
CV (%)		30,95	121,64	20,7	18,42
Média geral		1,95	29,99	2,54	2,82

VMCE – Volume médio de calos por explante; PCR – Porcentagem de calos com raiz; NRE – Número de raízes por explante; PEC – Porcentagem de explantes com calo. GL - Graus de Liberdade; ** Significativos a 1% de probabilidade do erro.

O fator data de avaliação foi decisivo para as diferenças observadas entre o 15º e o 30º dia de cultivo (Tabela 3). Em todas as variáveis, constatou-se aumento expressivo ao final do período: a porcentagem de explantes com calo (PEC) passou de $2,63 \pm 0,72\%$ para $3,00 \pm 0,0\%$, representando incremento de 12,33%; o volume médio de calo por explante (VMCE) aumentou de $1,20 \pm 0,48$ para $2,70 \pm 0,70$, correspondendo a 55,55% de crescimento; a porcentagem de calos com raízes (PCR) evoluiu de $11,1 \pm 23,69\%$ para $48,87 \pm 43,5\%$, um aumento de 77,28%; e o número de raízes por explante (NRE) passou de $0,14 \pm 0,41$ para $4,93 \pm 5,5$, o que representa incremento de 97,16%.

Esses resultados confirmam que o crescimento e a diferenciação celular são processos progressivos, que se intensificam ao longo do tempo de cultivo, tornando os efeitos mais evidentes nas avaliações tardias (ISLAM et al., 2018).

Tabela 3- Respostas de explantes de *Mentha piperita* avaliados após 15 e 30 dias de cultivo

Variável	Dia da avaliação	
	15 dias	30 dias
Explantes com calo (%)	2.63 ± 0.72 b	$3 \pm 0,0$ a
Volume médio de calo/explante	1.2 ± 0.48 b	2.7 ± 0.7 a
Porcentagem de calos com raízes	11.1 ± 23.69 b	48.87 ± 43.5 a
Número de raízes/explante	0.14 ± 0.41 b	4.93 ± 5.5 a

Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

O expressivo aumento na porcentagem de calos com raízes e no número de raízes por explante, permitiu inferir que o meio de cultura forneceu os sinais hormonais para a indução do enraizamento já aos 15 dias, o tempo foi o fator determinante para a expressão completa desse processo. O período mais longo de cultivo foi crucial para que as células se diferenciasssem em tecidos de raiz. Por

outro lado, a resposta inesperada de maior formação de raízes em detrimento da calogênese pode ser atribuída à natureza genotípica da espécie *M. piperita*, que possui uma alta capacidade rizogênica. Este comportamento da planta, que se mostra mais sensível à auxina e com predisposição a formar raízes, é um fator determinante na cultura de tecidos, que requer um ajuste fino nas concentrações hormonais para induzir as respostas morfogênicas desejadas (RADOMIR et al., 2023).

4. CONCLUSÕES

Nas condições em que o experimento foi realizado, o fator tempo de cultivo demonstrou ser o principal determinante para as respostas morfogênicas obtidas. A ausência de respostas para os fatores tipo de explante e combinações de reguladores de crescimento sugere que o meio de cultivo precisa de ajustes mais finos nas combinações hormonais para aumentar a diferenciação de calos em *M. piperita*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CARDOSO, J.C.; OLIVEIRA, M.E.B.S.; CARDOSO, F.C.I. Advances and challenges on the in vitro production of secondary metabolites from medicinal plants. **Horticultura Brasileira**, v. 37, n. 2, p. 124-132, 2019.
- GOMES, H. T. et al. Assessment of mint (*Mentha spp.*) species for large-scale production of plantlets by micropropagation. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 37, n. 4, p. 385-391, 2015.
- HUSSAIN, A. et al. Plant tissue culture: current status and opportunities. In: **Recent advances in plant in vitro culture**. IntechOpen, 2012.
- ISLAM, A. T. M. R.; ALAM, M. F. In vitro callus induction and indirect organogenesis of *Mentha piperita* (L.) - an aromatic medicinal plant. **GSC Biological and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 3, p. 49-60, 2018.
- LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 544p.
- LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 246-251p.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**. Copenhagen, v.15.
- OLIVEIRA, M. L. P.; et al. Growth regulators, culture media and antibiotics in the in vitro shoot regeneration from mature tissue of citrus cultivars. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, p. 654-660, 2010.
- RADOMIR, A-M. et al. In vitro multiplication of *Mentha piperita* L. and comparative evaluation of some biochemical compounds in plants regenerated by micropropagation and conventional method. **Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus**, v. 21, n. 4, p. 45-52, 2022.
- SANTOS, É. S.; et al. Improvement of phenolic compounds production in callus cultures of *Cereus hildmannianus* (K.) Schum. by elicitation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 153, n. 1, p. 37-51, 2023.
- ZADIE, J. Callus: A foundation for plant growth and biotechnology. **Journal of Plant Biochemistry & Physiology**. Barcelona, v.12, n.6.
- ZHAO, F. et al. An updated tribal classification of Lamiaceae based on plastome phylogenomics. **BMC Biology**. London, v. 19, n. 2, p. 1-20, 2021.