

Concentrações de Sacarose e Tipos de Vedação no Cultivo *in vitro* de *Melissa officinalis* L.

Márcia Vaz Ribeiro¹, Cláudia Simone Madruga Lima², Juliana de Magalhães Bandeira¹, Sílvia Rubin¹, Letícia Carvalho Benitez¹, José Antonio Peters³ e Eugenia Jacira Bolacel Braga³

Introdução

A grande importância do emprego das plantas no tratamento de diversas enfermidades é expressiva, e isso pode ser constatado pelo aumento do consumo de fitoterápicos pela população no contexto mundial [1].

Melissa officinalis L., erva cidreira verdadeira, é uma vigorosa herbácea perene, pertencente à família Lamiaceae; apresenta agradável aroma de limão, é de uso bastante freqüente na medicina popular, além de ser utilizada na culinária e na ornamentação. Suas folhas, normalmente glabras e verde-brilhantes são utilizadas sob a forma de chá, indicado como digestivo, calmante, e também no combate a dores de cabeça, enxaquecas, gases e cólicas intestinais, infecções virais (gripe, herpes, caxumba, varicela), além de facilitar a menstruação e estimular a produção da bile. Para uso externo, é aplicada como pasta ou creme como repelente de insetos [2].

A micropropagação de plantas medicinais tem se difundido devido à possibilidade de produzir um grande número de plantas homogêneas e com elevada qualidade sanitária, a possibilidade de conservar o germoplasma, garantindo a manutenção da biodiversidade, além de auxiliar no melhoramento genético [3]. Tendo em vista a propagação de plantas homogêneas e geneticamente estáveis, os explantes ideais para a regeneração são aqueles contendo gemas pré-existentes, como os segmentos nodais e apicais [4], uma vez que, não sendo necessária a desdiferenciação celular, há uma menor probabilidade de regeneração de plantas com variação somaclonal.

Devido à importância desta planta para múltiplos propósitos e à dificuldade de obtenção dos princípios ativos em cultura *in vitro* [5], justifica-se a aplicação de metodologia que forneça grande número de plantas de *Melissa officinalis* clonadas, visando selecionar linhagens de alta qualidade para plantio extensivo e extração de fitofármacos.

Material e métodos

O presente experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas do Departamento de Botânica do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas. Foram utilizados como explantes, segmentos nodais, contendo duas gemas axilares, de aproximadamente 0,5 cm de comprimento, oriundos de

plantas pré-estabelecidas *in vitro* de *Melissa officinalis* L.

Para o desenvolvimento do experimento utilizou-se o meio MS [6] acrescido de três concentrações de sacarose (30, 40 e 50 g L⁻¹) e 100 mg L⁻¹ de mio-inositol. O pH foi ajustado para 5,8 e solidificado com 7 g L⁻¹ de ágar. Os meios de cultura foram distribuídos em frascos de vidro com capacidade de 300 mL (40 mL/frasco) e, posteriormente, esterilizados em autoclave por 20 minutos à temperatura de 120°C e 1 atm de pressão. Os explantes foram inoculados nos diferentes meios, em câmara de fluxo laminar e os frascos vedados com alumínio, algodão e filme de polivinilcloreto (zap). Os frascos, contendo os tratamentos, foram mantidos em sala de crescimento a 25 ± 2°C, 16 horas de fotoperíodo e 48 μmol m⁻² s⁻¹ de densidade de fluxo de fótons, por 40 dias.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3x3, sendo três concentrações de sacarose e três tipos de vedações dos frascos. Utilizaram-se cinco repetições por tratamento, representadas cada uma, por um frasco contendo quatro explantes. As variáveis analisadas foram: altura (cm), número de folhas, entrenós, brotos e gemas, assim como área foliar (cm²). Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Resultados e Discussão

Após 40 dias de cultivo *in vitro* observou-se que para a variável área foliar, houve interação entre os fatores, onde a maior média foi obtida naquelas mantidas em frascos vedados com algodão e adicionados de 30 g L⁻¹ de sacarose, diferindo significativamente dos demais tratamentos. O aumento da concentração de sacarose, nesta vedação provocou uma redução significativa na área foliar (Tab. 1).

A vedação dos frascos com algodão proporcionou maior aeração no interior do frasco e por conseqüência maior troca gasosa entre o ambiente interno e o ar atmosférico, diminuindo a umidade relativa no interior dos frascos, melhorando a transpiração da planta e o desenvolvimento de suas folhas, proporcionando assim maior área foliar. Vedações herméticas como filme de polivinilcloreto, aumentam o acúmulo de etileno no interior do frasco. Este gás, produzido pelo metabolismo

1. Mestranda do Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal, Departamento de Botânica, Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas. Capão do Leão, RS. Caixa Postal 354, CEP 96010-900. E-mail: marciavribeiro@bol.com.br

2. Aluna da Faculdade de Agronomia - FAEM - Universidade Federal de Pelotas, Bolsista de Iniciação Científica - Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas - Departamento de Botânica, Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas.

3. Professor Adjunto do Departamento de Botânica, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas.

Apoio financeiro: CAPES e FAPERGS.

das plantas, cujas funções são consideradas reguladoras do seu crescimento, pode ser tóxico à planta. Esta toxicidade leva ao desenvolvimento anormal das folhas e muitas vezes é representado pela redução da área foliar e senescência precoce [7, 8,9].

A concentração de sacarose influencia diretamente o desenvolvimento das folhas e, conseqüentemente, na sua área foliar. Os níveis de sacarose, normalmente usados em cultura de tecidos, podem inibir a síntese de clorofila [10]. De acordo com Kozai *et al.* [11], na presença de açúcar, as plantas não desenvolvem capacidade fotoautótrofica, podendo causar crescimento reduzido *in vitro* e morte de mudas durante a fase de aclimatização.

A atividade da enzima fixadora de carbono (Rubisco Pcpase), nas folhas de certas espécies cultivadas *in vitro*, é significativamente prejudicada pela adição de sacarose exógena do meio de cultura [12], e conforme Langford e Wainwright [13], a absorção de CO₂ pode ser incrementada por meio da redução gradativa da concentração de sacarose nos sucessivos subcultivos.

Para as demais variáveis analisadas os fatores vedação dos frascos e concentração de sacarose foram significativos apenas quando analisados separadamente, não apresentando interação entre eles.

As variáveis altura, número médio de brotos e entrenós obtiveram as maiores médias, quando crescidas em meio contendo 30 g L⁻¹ de sacarose, embora não diferindo significativamente das médias obtidas com 40 g L⁻¹. Com o aumento da concentração de sacarose houve redução na altura, número médio de brotos e entrenós das plantas (Fig. 1, 2A, 3A). Oliveira [14] observou maior altura em plantas de crisântemo (*Dendranthema grandiflora*), quando estas foram submetidas ao tratamento com baixas concentrações de sacarose.

Nicoloso *et al.* [15], comparando fontes de carbono, observou que a sacarose na concentração de 30 g L⁻¹ foi a melhor fonte de carboidratos para a altura, número de brotações, número total de segmentos nodais por planta, de *P. glomerata*, demonstrando que esse carboidrato é o mais apropriado ao cultivo *in vitro*.

Os diferentes tipos de vedações testadas não alteraram os valores para a altura das plantas analisadas, sendo a maior média observada na vedação alumínio. Corroborando com as informações de Taiz e Zeiger [16], onde a redução da incidência de luz no interior do frasco causada pela vedação alumínio, leva a um estiolamento dos caules das plantas, conseqüentemente, aumento em altura.

Em relação ao número médio de brotos, as maiores médias foram observadas quando os frascos foram vedados com alumínio, diferindo estatisticamente da vedação com algodão (2B). Essas informações contestam os dados obtidos por Cuzzuol [7], na micropropagação de *Dianthus caryophyllus* L. que observou melhores respostas, com vedação algodão diminuindo a vitrificação das plantas.

O emprego da vedação com filme de polivinilcloro proporcionou um acréscimo na média para a variável número médio de entrenós, diferindo dos demais tipos de

vedação (Fig. 3B). Conforme Taiz & Zeiger [16], o etileno provoca o encurtamento dos entrenós e conseqüentemente o seu aumento e acréscimo no número de gemas e folhas, proporcionando assim o aumento do número de entrenós.

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que para o cultivo *in vitro* de *Melissa officinalis*, meios de cultura contendo 30 g L⁻¹ de sacarose ou frasco com vedação alumínio apresentaram os melhores resultados para a micropropagação da espécie em estudo.

Referências

- [1] CARDOSO JÚNIOR, E.L. 1996. Homem e plantas medicinais: passado, presente e futuro. In: SEMINÁRIO MINEIRO DE PLANTAS MEDICINAIS, 2. 1996, *Anais*, Lavras: UFLA: 1-4.
- [2] RIGUEIRO, M. P. 1992. *Plantas Que Curam. Manual Ilustrado de Plantas Medicinais*. Editora Paulus, 3ª edição, São Paulo. 97p.
- [3] HUSSEY, G. 1986. Problems and prospects in the *in vitro* propagation of herbaceous plants. In: WITHERS, L.A.; ALDERSON, P.G. *Plant tissue culture and its agriculture applications*. London: Butterworths. 69-84.
- [4] DEBERGH, P.C.; READ, P.E. 1991. Micropropagation. In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H. *Micropropagation: technology and application*. London: Kluwer Academic, p.1-13.
- [5] GBOLADE, A. A.; LOCKWOOD, G. 1989. The constituents of *Melissa officinalis* cell cultures. *Planta Med.* 55: 228p.
- [6] MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco culture tissues. *Physiological Plantarum*, 15:473-497.
- [7] CUZZUOL, G.R.F.; GALLO, L. A.; ALMEIDA, M. de; CROCOMO, O. J. 1995. Controle da vitrificação do cravo (*Dianthus caryophyllus* L.) *in vitro*. *Scientia Agricola*, 52 (3): 604-615.
- [8] FERREIRA, M. das G. R. [On line] *Fitorreguladores e meios de cultura*. Embrapa Rondônia, Ciência e Pesquisa – Artigos Técnicos. *Homepage*: <http://www.clubedofazendeiro.com.br/Cietec/artigos/ArtigosTexto> >.
- [9] FILHO, W. B.; PEREIRA, A. M. S.; FRANÇA, S. de C.; FURLAN, M. 2002. Indução de Metabólitos Bioativos em Culturas de Células de *Maytenus ilicifolia*. *Eclética Química*, 27: 403-416.
- [10] GEORGE, E.F.; SHERRINGTON, P.D. 1984. *Plant propagation by tissue culture*. Eversley: Exegetics. 253p.
- [11] KOZAI, T. 1991. Micropropagation under photoautotrophic conditions. In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, T.H. *Micropropagation technology and application*. Dordrecht: Kluwer, 484p.
- [12] GROUT, B.W.W. 1988. Photosynthesis of regenerated plantlets “in vitro” and the stresses of transplanting. *Acta Horticulturae*, 230:129-134.
- [13] LANGFORD, P.J.; WAINWRIGHT, M. 1986. *Photosynthetic ability of in vitro grown rose shoots in relation to media components*. In: International Congress of Plant Tissue and Cell Cultures, 2. St. Paul Abstract... St. Paul: University of Minnesota, 1986, 433p. Abstracts.
- [14] OLIVEIRA, P. D. de. 1994. *Propagação “in vitro” de crisântemo (Dendranthema grandiflora Tzvelev.) cv. Orange Reagen*. 116f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Programa de Pós-graduação em Agronomia, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz.
- [15] NICOLOSO, F.T. *et al.* 2003. Efeito de concentrações e fontes de carboidratos no crescimento de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen cultivadas *in vitro*. *Ciência e Agrotecnologia*, 27 (1): 84-90.
- [16] TAIZ, L. & ZEIGER, E. 2004. *Fisiologia Vegetal*. 3 ed., Artmed, Porto Alegre, RS. 719p.

Tabela 1. Área foliar média (cm²) de plantas de *Melissa officinalis*, após 40 dias de cultivo *in vitro* em meio MS adicionados de três concentrações de sacarose e diferentes tipos de vedação nos frascos

Vedação dos frascos	Concentração de sacarose (g L ⁻¹)		
	30	40	50
Alumínio	27,27 ab A	23,17 a AB	13,54 a B
Filme de polivinilcloreto	16,31 b A	13,09 b A	9,42 a A
Algodão	43,48 a A	19,49 b B	5,78 b C

*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste de Tukey.

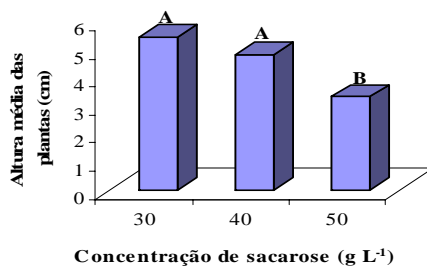


Figura 1. Altura média (cm) de plantas de *Melissa officinalis*, após 40 dias de cultivo *in vitro* em meio MS adicionados de três concentrações de sacarose. As médias foram comparadas estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. *Letra maiúscula comparam a concentração de sacarose nos meios de cultura.

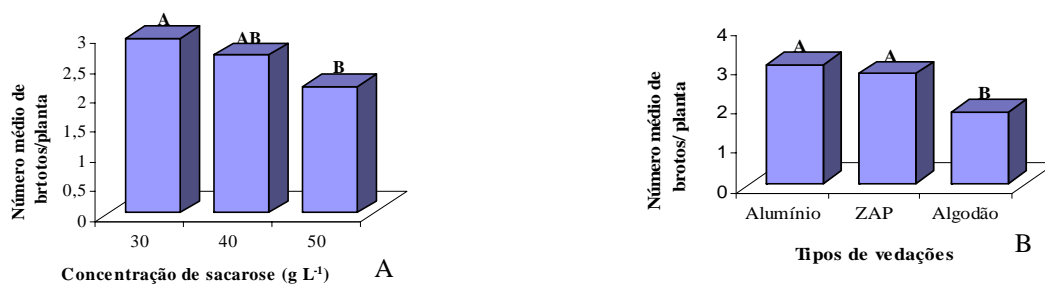


Figura 2. Número médio de brotos por planta de *Melissa officinalis* em meio MS, adicionados de três concentrações de sacarose (A) e diferentes tipos de vedação nos frascos (B), após 40 dias de cultivo *in vitro*. As médias foram comparadas estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. *Letras maiúsculas comparam as diferentes concentrações de sacarose (A) e diferentes tipos de vedações (B).

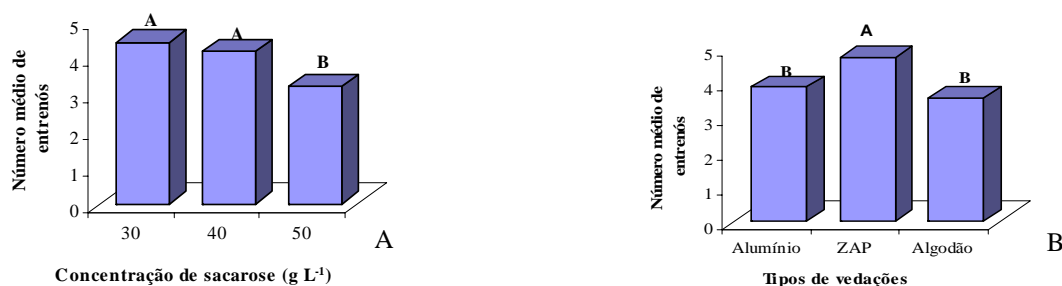


Figura 3. Número médio de entrenós por planta de *Melissa officinalis* em meio MS, adicionados de três concentrações de sacarose (A) e diferentes tipos de vedação nos frascos (B), após 40 dias de cultivo *in vitro*. As médias foram comparadas estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. *Letras maiúsculas comparam as diferentes concentrações de sacarose (A) e diferentes tipos de vedações (B).