

Influência do BAP na multiplicação *in vitro* e aclimatização de *Melissa officinalis* L.

Reis, Érika Soares¹; José Eduardo Brasil Pereira Pinto²; Luciana Domiciano Silva Rosado³; Ricardo Monteiro Corrêa⁴.

¹ Mestre em Agronomia/Fitotecnia. Universidade Federal de Lavras (UFLA), Dep^{to} de Agricultura, Cx.Postal: 3037. Campus UFLA. CEP: 37200-000. Lavras-MG. e-mail: erikasreis@yahoo.com.br.

²Professor – UFLA, e-mail: jeduardo@ufla.br. ³ Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, e-mail: lusrosado@yahoo.com.br. ⁴ Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia. e-mail: ricardomonc7@yahoo.com.br.

INTRODUÇÃO

As Lamiaceae compreendem uma família pertencente à Ordem Tubiflorae (Lamiales), abrangendo cerca de 200 gêneros e, aproximadamente, 3.200 espécies, distribuídas em todo o mundo. Pertencente a esta família, *Melissa officinalis*, conhecida popularmente como melissa ou erva cidreira, é uma planta aromática, herbácea, perene, com caule quadrangular e folhas opostas. Possui aplicações na medicina, culinária (condimento) e perfumaria (constituintes aromáticos). A infusão das folhas é usada como sedativo e tem propriedades antiespasmódicas, antinevrálgica e carminativa. (Morelli, 1977).

A cultura de tecidos vem sendo uma técnica amplamente utilizada como ferramenta biotecnológica para o estudo do metabolismo, fisiologia, desenvolvimento e reprodução de plantas com propriedades medicinais, tais como resistência a pragas e acúmulo de substâncias ativas de interesse comercial.

Vários protocolos de micropropagação têm sido estudados para diversas espécies. No entanto, o sucesso deste processo depende de alguns fatores, como o genótipo, o regulador de crescimento e sua dosagem, o meio de cultivo, concentrações de sacarose e as condições de incubação, dentre outros.

Grataplaglia & Machado (1998) afirmam que o tipo e a concentração utilizados de citocinina são os fatores que mais influenciam o sucesso da multiplicação *in vitro*, sendo a faixa mais empregada entre 2,22 e 22,2 μM . O excesso pode ser tóxico e comprometer o desenvolvimento das culturas.

Assim o objetivo do presente trabalho foi estudar o efeito dos meios de cultivo na multiplicação *in vitro* e aclimatização de plantas *Melissa officinalis* L..

METODOLOGIA

Plantas provenientes de germinação *in vitro* foram doadoras de segmentos nodais, utilizados com explantes para o presente experimento. Os tratamentos consistiram do meio MS com presença ou ausência de regulador de crescimento (BAP-benzilaminopurina), ou seja, Tratamento1: MS sem BAP e Tratamento 2: MS suplementado com 4,44 μM de BAP.

A inoculação dos explantes foi realizada em câmara de fluxo laminar, colocando-se 1 segmento nodal por tubo.

Em seguida, os tubos contendo os explantes foram levados para sala de crescimento e mantidos sob fotoperíodo de 16/8 horas de luz/escuro e intensidade luminosa de 25 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, à temperatura de 26 ± 1 °C.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com 11 repetições e cada parcela experimental composta por 4 tubos de ensaio.

O estudo da taxa de multiplicação *in vitro* de *M. officinalis* foi feito realizando-se 3 subcultivos das plantas com intervalos de 30 dias entre cada subcultivo para os tratamentos 1 e 2 separadamente. Para cada subcultivo, foi utilizado o mesmo delineamento experimental (DIC) contendo o mesmo número de repetições (11) e explantes por parcela (4). As avaliações foram feitas no final de cada subcultivo (30 dias), quando foram analisados número de brotos, número de nós, comprimento do maior broto e número de raízes principais.

Das brotações obtidas no primeiro subcultivo (Tratamento 1), após avaliadas, foram retirados explantes (segmentos nodais) para o segundo subcultivo. Após a avaliação deste, as brotações obtidas serviram como fonte de explante para o terceiro subcultivo.

Com a formação de múltiplos brotos no meio MS com 4,44 μM BAP (Tratamento 2), as múltiplas brotações foram individualizadas e utilizadas como explantes para os subcultivos seguintes, tendo o meio MS com 4,44 μM de BAP sido usado em todas as 3 multiplicações.

De posse das avaliações de crescimento dos Tratamentos 1 e 2, foi estimado, por inferência, o número de brotações obtidas a partir de um único explante ao final dos seis subcultivos.

Após isso 50 plantas micropropagadas e microestacas oriundas de subcultivos em meio MS sem BAP (Tratamento 1) e meio MS com BAP (Tratamento 2), respectivamente, foram transplantadas para bandejas de isopor de 128 células contendo substrato comercial Plantmax®. As bandejas foram colocadas em casa de vegetação para o processo de aclimatização, sendo este processo feito reduzindo-se gradativamente a irrigação e aumentando-se a luminosidade.

Foram feitas observações diariamente, analisando-se a percentagem de sobrevivência das plantas.

Após 10 dias de aclimatização em bandejas, as mudas foram transplantadas para vasos de 3 litros contendo o mesmo substrato Plantmax®.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O meio de cultura influenciou significativamente ($p \leq 0,05$) na taxa de multiplicação de *Melissa officinalis*, para todas as variáveis analisadas.

Para a variável número de brotos, no primeiro subcultivo, não houve diferença no número médio de brotos para as plantas presentes no meio MS e no meio MS + 4,44 μM de BAP. Já no segundo e terceiro subcultivos, as plantas presentes no meio com BAP apresentaram um número médio de brotos significativamente maior que as plantas presentes no meio MS sem a presença de BAP (Tabela 1).

TABELA 1: Número médio de brotos de *Melissa officinalis*, em função do meio de cultura nos três subcultivos.

Tratamentos	1º subcultivo	2º subcultivo	3º subcultivo
MS	1,91 a	1,59 b	2 b
MS + BAP	1,98 a	3,25 a	3,7 a

* As médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de F ao nível de 5 % de probabilidade.

Hu & Wang (1983) afirmam que as citocininas são utilizadas para quebrar a dominância apical dos brotos e aumentar a taxa de multiplicação. Desse modo, ocorre um grande número de brotações por meio do crescimento de meristemas laterais. Esse relato corrobora com os resultados obtidos para a espécie em estudo.

Com relação ao número de nós, observou-se que, para os três subcultivos, as plantas presentes no meio MS sem a presença de BAP apresentaram um número de nós maior (média de 3,8 nós) que as plantas presentes no meio com a presença de 4,44 μM de BAP (média de 2,5 nós) para os três subcultivos, conforme mostrado na Tabela 2.

TABELA 2: Número médio de nós de *Melissa officinalis*, em função do meio de cultura nos três subcultivos.

Tratamentos	1º subcultivo	2º subcultivo	3º subcultivo
MS	3,54 a	3,42 a	4,6 a
MS + BAP	1,06 b	2,73 b	3,6 b

* As médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de F ao nível de 5 % de probabilidade.

A partir desses resultados de número de brotos e número de nós, pôde-se calcular a taxa de multiplicação das plantas presentes no meio sem e com BAP. As brotações presentes no meio MS sem BAP foram multiplicadas em segmentos nodais a partir do número de nós e nas brotações presentes no meio MS com a presença de BAP realizou-se a individualização de brotos.

Assim, pôde-se estimar, a partir dos valores médios de números de nós para as plantas presentes no meio MS e a partir do número de brotos para as plantas presentes no meio MS + BAP, o número de brotos obtidos no final de seis meses de cultivo.

Dessa forma, considerando uma média de quatro nós por brotação, para as plantas presentes no meio MS sem BAP, pode-se obter no final de seis meses de subcultivos, um total de 1.024 brotações. Já para as plantas presentes no meio MS com 4,44 μM de BAP, considerando uma média de três brotos por planta no final de seis subcultivos (seis meses), obtém-se um total de 486 brotos.

Por esses resultados pode-se observar que a taxa de multiplicação de *M. officinalis* é cerca de 2,1 vezes maior para plantas subcultivadas em meio MS do que para plantas subcultivadas em meio MS na presença de BAP.

Para a variável comprimento do maior broto, observou-se também que, para os três subcultivo, nas plantas presentes no meio MS sem BAP o comprimento de broto foi maior (média de 4,2 cm para os três subcultivos) do que nas plantas presentes no meio MS com BAP, onde o comprimento médio foi de 1,3 cm (Tabela 3).

TABELA 3: Comprimento médio do maior broto de *Melissa officinalis*, em função do meio de cultura, nos três subcultivos.

Tratamentos	1º subcultivo	2º subcultivo	3º subcultivo
MS	3,79 a	4,30 a	4,4 a
MS + BAP	0,81 b	1,33 b	1,8 b

* As médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de F ao nível de 5 % de probabilidade.

Leshem et al. (1988) afirmam que o uso de citocinina estimula maior produção de partes aéreas, mas o seu excesso é tóxico e caracteriza-se, principalmente, pelo demasiado entufamento e falta de alongamento das culturas, redução no tamanho das folhas, encurtamento dos entrenós, engrossamento exagerado dos caules e vitrificação generalizada, o que leva á sérios problemas na fase de enraizamento.

Giacobbo et al. (2003), estudando a multiplicação *in vitro* de porta-enxerto de macieira com diferentes níveis de benzilaminopurina (BAP) e ácido naftaleno acético (ANA), observaram que dosagens superiores a 0,49 μM de BAP proporcionaram um decréscimo no crescimento das brotações de macieira.

Com relação ao número de raízes, observou-se que as plantas presentes no meio MS sem BAP formaram em média 2,2 raízes. Já para as plantas presentes no meio contendo BAP, não houve a formação de raízes em nenhum dos subcultivos (Tabela 4).

TABELA 4: Número médio de raízes de *Melissa officinalis*, em função do meio de cultura nos três subcultivos.

Tratamentos	1º subcultivo	2º subcultivo	3º subcultivo
MS	1,97 a	2,86 a	1,7 a
MS + BAP	0,0 b	0,0 b	0,0 b

* As médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de F ao nível de 5 % de probabilidade.

Por esses resultados é possível explicar o que foi observado na etapa de aclimatização. Houve 70% de sobrevivência das plantas que estavam presentes no meio

MS sem a presença de BAP e 0% de sobrevivência das plantas provenientes de subcultivos em meio MS com 4,44 μM de BAP. Esse resultado se deve à presença de raízes nas plantas vindas do cultivo em meio MS e a ausência nas plantas cultivadas em meio com BAP. Além disso, as plantas cultivadas em meio MS eram maiores e mais vigorosas.

CONCLUSÕES

Pode-se concluir que a taxa de multiplicação das plantas subcultivadas meio MS sem BAP é 2,1 vezes maior do que em plantas subcultivadas em meio MS com a presença de BAP e que a porcentagem de sobrevivência na fase de aclimatização das plantas subcultivadas em meio na presença de BAP é zero.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

GIACOBBO, C. L.; GOMES, F. R. C.; KROTH, L. L.; CONCEIÇÃO, M. K.; FORTES, G. R. de L. Multiplicação *in vitro* de porta-enxerto de macieira Cv. Marubakaio (*Malus prunifolia*) com diferentes níveis de benzilaminopurina e ácido naftalenoacético. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 9, n. 1, p. 31-33, jan./mar. 2003.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/ EMBRAPA-CNPQ, 1998. p. 183-260.

HU, C. Y.; WANG, P. J. Meristem, shoot tip and bud culture. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R. **Handbook of plant cell cultures**. New York: Macmillan, 1993. v. 1, p. 177-227.

LESHEM, B.; WERKER, E.; SHALEV, D. P. The effect of cytokinins on vitrification in melon and carnation. **Annals of Botany**, London, v. 62, n. 3, p. 271-276, Sept. 1988.

MORELLI, I. Constituenti e usi della *Melissa officinalis*. **Bollettino Chimico Farmaceutico**, Milan, v. 116, n. 6, p. 334-340, gin. 1977.