



**Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Botânica**

**Desenvolvimento e aperfeiçoamento de estratégias para a conservação e propagação *in vitro* de *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen e *Lippia filifolia* (Mart. and Schauer ex Schauer), com ênfase ao uso do óleo mineral e biorreatores de imersão temporária**

**Aluna:** Luciana Florêncio de Lacerda  
**Orientador:** Jonny Everson Scherwinski-Pereira

**Brasília – DF  
2017**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

FF632d Florencio de Lacerda, Luciana  
Desenvolvimento e aperfeiçoamento de estratégias  
para a conservação e propagação in vitro de *Pfaffia*  
*glomerata* (Spreng) Pedersen e *Lippia filifolia*  
(Mart. and Schauer ex Schauer), com ênfase ao uso do  
óleo mineral e biorreatores de imersão temporária /  
Luciana Florencio de Lacerda; orientador Jonny  
Everson Scherwinski Pereira. -- Brasília, 2017.  
111 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Botânica) --  
Universidade de Brasília, 2017.

1. Botânica. 2. Micropropagação in vitro. 3.  
Conservação in vitro. I. Scherwinski Pereira, Jonny  
Everson, orient. II. Título.

**LUCIANA FLORÊNCIO DE LACERDA**

**Desenvolvimento e aperfeiçoamento de estratégias para a conservação e propagação in vitro de *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen e *Lippia filifolia* (Mart. and Schauer ex Schauer), com ênfase ao uso do óleo mineral e biorreatores de imersão temporária**

Dissertação apresentada ao Departamento de Botânica, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Botânica.

**Orientador:** Jonny Everson Scherwinski-Pereira

**Brasília - DF**

**2017**

*A Deus,*

*Aos meus queridos vizinhos,*

*Às minhas queridas vizinhas,*

*A Sebastião Quirino de Vasconcelos*

*pelo imenso amor e por acreditarem em mim!*

*Dedico.*

“Só quem arrisca merece viver o extraordinário”

(Autor desconhecido).

## AGRADECIMENTOS

Agradeço,

A Deus pela oportunidade de obter essa grande conquista.

Aos meus pais Ubaldo e Rosa, a minha irmã Luiza.

A minha amiga Pati e Dr. Hugo pela amizade, carinho, atenção, paciência na hora de transmitir os conhecimentos e pela oportunidade de viver esse sonho.

Ao meu orientador Dr. Jonny pela orientação e oportunidade.

Aos meus amigos do laboratório Cultura de Tecidos II da Embrapa Cenargen: Renan, Rapha, Gabi, Ina, Paulo, Giuliano, Talita, Glória, André, Zan, Sa, Filipe, Emília, Jeniffer, Vinicius pela paciência, apoio, e carinho, vocês são incríveis!

A Jaque pela grande amiga que é pra mim, pelas palavras sempre construtivas, pela paciência ao ouvir minhas intermináveis dúvidas e inseguranças, e sempre me incentivando a seguir em frente, ao seu irmão Sebastião que me ajudou com as fotos da anatomia, aos seus pais o seu Sebastião e a dona Onilda que me deram apoio e um lugar especial para ficar em Rio Verde, pela grandeza e generosidade que representa essa família linda que é dádiva na minha vida.

As minhas amigas amadas Uii, Pati, Bi, Mila, Ingrid pela compreensão da minha ausência, pelo apoio e por acreditarem em mim!

A todos os meus amigos Jane, Ivonete, Fran que até hoje não sabem direito o que eu fiz durante esses dois anos, mas que sempre me apoiaram e me deram força.

Aos professores do Programa de Pós- Graduação em Botânica da Unb. Aos colegas do programa de Pós- Graduação em Botânica.

A Capes pela concessão da bolsa.

E a todos que contribuíram com sorrisos, palavras de apoio e carinho, pelas críticas construtivas que me ajudaram durante esses dois anos! **MUITO OBRIGADA!!!**

**Desenvolvimento e aperfeiçoamento de estratégias para a conservação e propagação *in vitro* de *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen e *Lippia filifolia* (Mart. and Schauer ex Schauer), com ênfase ao uso do óleo mineral e biorreatores de imersão temporária**

**RESUMO**

*Pfaffia glomerata* e *Lippia filifolia* apresentam importantes propriedades medicinais e fazem parte da lista de espécies que podem ser distribuídas aos usuários do Sistema Único de Saúde (SUS). Neste sentido, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver e aperfeiçoar estratégias para a conservação e propagação *in vitro* de *Pfaffia glomerata* e *Lippia filifolia*, com ênfase ao uso do óleo mineral e o uso de biorreatores de imersão temporária. Para os estudos de micropropagação utilizou-se como material vegetal microestacas (1,0 cm) contendo uma gema lateral, as quais foram inoculadas em diferentes sistemas de cultivo: meio semissólido, líquido estacionário, líquido sob agitação e líquido em biorreatores de imersão temporária, modelos RITA<sup>®</sup> e BIT Embrapa<sup>®</sup>. Após 30 dias de cultivo, a percentagem de sobrevivência, a altura, a taxa de multiplicação e a taxa de enraizamento das brotações, além do peso da massa fresca (g) e seca (g) dos brotos regenerados nos cinco sistemas de cultivo foram avaliados. Já para a conservação *in vitro* dois experimentos foram realizados. No primeiro deles, microestacas de aproximadamente 1,0 cm de altura com pelo menos uma gema lateral foram avaliadas as quais foram inoculadas em meio de MS e mantidas, inicialmente sob uma camada de óleo mineral contendo diferentes volumes (5, 10 e 15 mL) sobre as estacas e colocadas sobre diferentes temperaturas (15, 20 e 25°C). A caracterização anatômica foi realizada com o auxílio do corante Azul de Toluidina e para as análises histoquímicas foram utilizados o Reagente de Schiff/ ácido periódico - PAS para polissacarídeos neutros e o Xylidine Ponceau para proteínas totais. Nos resultados referentes a micropropagação, verificou-se que *P. glomerata* apresentou altas taxas de multiplicação nos sistemas de cultivo líquido com agitação e líquido em biorreatores de imersão temporária modelo RITA<sup>®</sup>, e semissólido. O cultivo em biorreatores de imersão temporária modelo RITA<sup>®</sup> proporcionou melhores resultados para ganho de massa fresca e seca, altura e taxa de enraizamento. Para a multiplicação de *L. filifolia* o sistema de cultivo semissólido proporcionou uma alta taxa de sobrevivência e formação de plantas com altura média de 7,0 cm. Variações morfológicas foram verificadas nas plantas cultivadas no sistema de cultivo líquido com e sem agitação. O sistema de biorreatores de imersão temporária modelo RITA<sup>®</sup> apresentou resultados superiores quando comparados ao modelo Embrapa. De maneira geral, a *L. filifolia* apresentou dificuldades de enraizamento *in vitro*. O resultado do primeiro experimento de

conservação mostrou que as duas espécies estudadas apresentaram médias de sobrevivência em óleo mineral acima de 90 %, sugerindo ser uma alternativa para a conservação das espécies. No experimento de conservação, verificou-se que *P. glomerata* pode ser mantida por até 12 meses sob temperatura de 15 °C e imersa sob óleo mineral, com sobrevivência média acima de 90%. A *L. filifolia* obteve uma menor taxa de sobrevivência com média de 24,9% na temperatura de 15 °C, após os 12 meses de conservação. Anatomicamente as folhas de *P. glomerata* no tratamento de 5 mL apresentaram folhas mais espessas, com células do parênquima do tipo paliçádico, as células do mesofilo apresentaram arranjo compacto com poucos espaços intercelulares. No tratamento com 15 mL de óleo mineral, as células da epiderme e do mesofilo foram mais volumosas com paredes celulares delgadas. O caule das plantas que estavam conservadas em óleo mineral, independente do tratamento, não apresentou fistula. Para a *L. filifolia* no tratamento com 5mL de óleo mineral as folhas se apresentaram delgadas com epiderme contendo células volumosas, arredondadas e achatadas. O mesofilo apresentou parênquima clorofiliano com células paliçádicas, com células arredondadas e achatadas com espaços intercelulares. Foi verificado a presença de tricomas em ambas as faces epidérmicas. No tratamento com 10 mL de óleo mineral, foi possível observar um desarranjo das células que compõe o cilindro vascular, com células adjacentes aos feixes vasculares. As plantas conservadas em 15 mL de óleo mineral apresentaram epiderme espessa e mesofilo com células volumosas e compactas com vários espaços intercelulares. No caule, os tratamentos com óleo mineral apresentaram células de maior volume quando comparados com o controle. No tratamento com 5 mL, as células do cortex apresentaram formato alongado e vários espaços intercelulares. Os feixes vasculares são menores. Histoquimicamente evidenciou-se que o amido e as proteínas aparecem como material de reserva na folha e no caule das duas espécies.

**Palavras- chave:** *Pfaffia glomerata*, *Lippia filifolia*, micropropagação, biorreatores de imersão temporária, conservação *in vitro*, anatomia vegetal, histoquímica.



## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	4
2.1. <i>Lippia filifolia</i> .....	4
2.2. <i>Pfaffia glomerata</i> .....	6
2.3. Micropropagação.....	8
2.4. Biorreatores de Imersão Temporária .....	10
2.5. Conservação <i>in vitro</i> de germoplasma .....	15
3. OBJETIVOS.....	18
3.1. Objetivo geral .....	18
3.2. Objetivos específicos.....	18
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	19
CAPÍTULO 1 .....	29
MICROPROPAGAÇÃO DE <i>Pfaffia glomerata</i> (Spreng) Pederseng e <i>Lippia filifolia</i> (Mart & Schauer and Schauer) EM DIFERENTES SISTEMAS DE CULTIVO .....	29
RESUMO .....	30
1. Introdução.....	31
2. Material e Métodos.....	33
2.1. Local de realização dos experimentos.....	33
2.2. Material Vegetal.....	33
2.3. Micropropagação em diferentes sistemas de cultivo.....	33
2.4. Descrição dos Biorreatores de imersão temporária .....	34
2.5. Enraizamento.....	35
2.6. Condições do cultivo <i>in vitro</i> .....	36
2.7. Aclimatização.....	36
2.8. Análise estatística.....	36
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	37
3.1- Micropropagação de <i>Pfaffia glomerata</i> em diferentes sistemas de cultivo.....	37
3.1.2- Efeito dos diferentes sistemas de cultivo <i>in vitro</i> na produção de massa fresca e seca	39

3.2 Aclimatização de <i>Pfaffia glomerata</i> .....	40
3.2 Micropropagação de <i>Lippia filifolia</i> em diferentes sistemas de cultivo.....	42
3. CONCLUSÕES.....	50
CAPÍTULO 2.....	59
CONSERVAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE <i>Pfaffia glomerata</i> e <i>Lippia filifolia</i> COM ÊNFASE AO USO DE ÓLEO MINERAL.....	59
RESUMO .....	60
1. INTRODUÇÃO .....	62
2. Material e Métodos.....	64
2.1- Local de realização dos experimentos.....	64
2.2- Material Vegetal.....	64
2.4- Efeito do óleo mineral e da temperatura na conservação <i>in vitro</i> de <i>Lippia filifolia</i> e <i>Pfaffia glomerata</i> .....	65
2.7. Recuperação do crescimento e Aclimatização .....	67
3. RESULTADOS e DISCUSSÃO.....	68
3.1 Influência do óleo mineral na conservação <i>in vitro</i> de <i>Pfaffia glomerata</i> e <i>Lippia filifolia</i> .....	68
3.1.2 Efeito do óleo mineral e da temperatura na conservação <i>in vitro</i> de <i>Pfaffia glomerata</i> e <i>Lippia filifolia</i> .....	72
4.CONCLUSÃO.....	89
5. Referências bibliográficas .....	90

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO DE LITERATURA

**Figura 1.** A-Aspectos gerais da morfologia de *Lippia filifolia* no habitat natural em Diamantina- MG, B- aspectos gerais de *Lippia filifolia* cultivada na Universidade Federal de Juiz de Fora ..... pg 5.

**Figura 2.** A-B Aspectos gerais da morfologia de *Pfaffia glomerata* no habitat natural a beira do rio Santo Inácio, na cidade de Ipatinga- SP; C- Ilustração da raiz tuberosa da espécie .....pg 7.

**Figura 3.** Recipiente de Imersão Temporária Automatizada (RITA<sup>®</sup>) no cultivo *in vitro* de *Pfaffia glomerata* .....pg 13.

**Figura 4.** Sistema de biorreator Embrapa no cultivo *in vitro* de *Pfaffia glomerata* .....pg 14.

### CAPÍTULO 1

**Figura 1.** Esquema ilustrativo dos cinco tipos de sistemas de cultivo *in vitro* utilizados durante a micropropagação das espécies *Pfaffia glomerata* e *Lippia filifolia*..... pg 35.

**Figura 2.** A- Planta de *Pfaffia glomerata* após 30 dias de cultivo em meio sólido; B-Aspecto hiperhídrico de *Pfaffia glomerata* após 30 dias de cultivo em meio líquido com e sem agitação orbital..... pg 41.

**Figura 3.** Mudanças de *Pfaffia glomerata* após 30 dias de cultivo na fase de aclimatização, em diferentes sistemas de cultivo. A) Regeneração em recipiente de imersão temporária automatizado RITA<sup>®</sup>; B) Regeneração em sistema de biorreator Embrapa (BIT); C) Detalhe das raízes adventícias formadas no processo; D) Aclimatização de mudas de *Pfaffia glomerata* oriundas da micropropagação ..... pg 42.

**Figura 4.** Aspectos morfológicos de *Lippia filifolia* nos demais sistemas de cultivo *in vitro* avaliados, após 30 dias de cultivo A) cultivo em meio semi-sólido; B) cultivo em sistema de biorreator de frascos gêmeos (BIT); C) meio líquido com agitação orbital; D) meio líquido

sem agitação orbital; **E**) cultivo em recipiente de imersão temporária automatizado (RITA<sup>®</sup>) ..... pg 45.

**Figura 5.** **A)** Aspecto geral de um explante de *Lippia filifolia* colocado para o enraizamento; **B)** Detalhe de um explante que não respondeu á rizogênese; **C)** Explante com formação de raiz; **D)** Explantes com formação de calo ..... pg 48.

**Figura 6.** Aclimatização de mudas de *Lippia filifolia* provenientes do cultivo *in vitro* com diferentes tipos e concentrações de auxinas após 30 dias; **A)** Plantas enraizadas em substrato após 1 dia de transferência; **B)** Plantas aclimatizadas após 30 dias da transferência..... pg 50.

## CAPÍTULO 2

**Figura 1.** Influência do óleo mineral na conservação *in vitro* das espécies *Pfaffia glomerata* e *Lippia filifolia*, após 120 dias sob temperatura de 25 °C; **A)** *Pfaffia glomerata* cultivada em meio de MS, sem óleo mineral; **B)** *Pfaffia glomerata* cultivada em meio de MS, com uma camada de 5 mL de óleo mineral; **C)** *Pfaffia glomerata* conservada com uma camada de 5 mL de água destilada; **D)** *Lippia filifolia* cultivada em meio de MS, sem óleo mineral; **E)** *Lippia filifolia* cultivada em meio de MS, com uma camada de 5 mL de óleo mineral; **F)** *Lippia filifolia* conservada com uma camada de 5 mL de água destilada..... pg 73.

**Figura 2.** Análise da altura de *Pfaffia glomerata* conservada *in vitro* sob diferentes temperaturas (25, 20, 15°C), e volumes de óleo mineral (5, 10 e 15mL) por 90, 180, 270 e 360 dias.....pg 77.

**Figura 3.** Aspecto de *Pfaffia glomerata* após 360 dias de conservação *in vitro* sob temperatura de 15°C e imersão em diferentes volumes de óleo mineral 0 (Controle), 5, 10 e 15 mL. Altura do óleo mineral 5mL= 1,5cm; 10mL= 2,5 cm; 15 mL= 3,5cm..... pg 77.

**Figura 4.** Análise da altura de *Pfaffia glomerata* conservada *in vitro* sob diferentes temperaturas (25, 20, 15°C), e volumes de óleo mineral (5, 10 e 15mL) por 90, 180, 270 e 360 dias.....pg 79.

**Figura 5.** Aspecto de *Lippia filifolia* após 360 dias de conservação *in vitro* sob temperatura de 25°C (A), 20°C (B), 15°C (C) e imersão em diferentes volumes de óleo mineral 0 (Controle), 5, 10 e 15 mL .....pg 79.

**Figura 6.** Aspecto de plantas de *Pfaffia glomerata* após 30 dias em casa de vegetação, oriundas de conservação *in vitro* com óleo mineral ..... pg 81.

**Figura 7.** Caracterização anatômica da folha e do caule de *Pfaffia glomerata* em secções transversais e coradas com azul de Toluidina após 360 dias de conservação em óleo mineral. **A)** Tratamento controle folha; **B)** Tratamento controle caule; **C)** Folha em 5mL de óleo mineral; **D)** Caule em 5 mL de óleo mineral; **E)** Folha em 10 mL de óleo mineral; **F)** Caule em 10 mL de óleo mineral; **G)** Folha em 15 mL de óleo mineral; **H)** Caule em 15 mL de óleo mineral ..... pg 82.

**Figura 8.** Corte transversal da folha e do caule de *Lippia filifolia* e coradas com azul de Toluidina após 360 dias de conservação em óleo mineral **A)** Folha tratamento controle sem óleo mineral; **B)** Caule tratamento controle sem óleo mineral; **C)** Folha tratamento 5mL com óleo mineral; **D)** Caule tratamento 5mL com óleo mineral; **E)** Folha tratamento com 10mL óleo mineral **F)** Caule tratamento com 10 mL óleo mineral ..... pg 84.

**Figura 9.** Secção transversal da folha e do caule de *Pfaffia glomerata* submetido ao teste com PAS e XP após período de 360 dias de conservação *in vitro* em óleo mineral. **A.** Explante foliar tratamento controle PAS **B.** Caule tratamento controle PAS **E.** Folha submersa em 5 mL de óleo mineral **F.** Caule submerso em 5 mL de óleo mineral **I.** Folha submersa em 10 mL de óleo mineral **J.** Caule submerso em 10 mL de óleo mineral **M.** Folha submersa em 15 mL de óleo mineral **N.** Caule submerso em 15 mL de óleo mineral **C.** Explante foliar tratamento controle XP **D.** Caule tratamento controle XP **G.** Folha submersa em 5 mL de óleo mineral **H.** Caule submerso em 5 mL de óleo mineral **K.** Folha submersa em 10 mL de óleo mineral **L.** Caule submerso em 10 mL de óleo mineral **O.** Folha submersa em 15mL de óleo mineral **P.** Caule submerso em 15 mL de óleo mineral..... pg 87.

**Figura 10.** Cortes transversais da folha e do caule de *Lippia filifolia* submetido ao teste com PAS e XP após período de 360 dias de conservação *in vitro* em óleo mineral. **A.** Explante foliar tratamento controle PAS **B.** Caule tratamento controle PAS **E.** Folha submersa em 5 mL de óleo mineral **F.** Caule submerso em 5 mL de óleo mineral **I.** Folha submersa em 10 mL de

óleo mineral **J.** Caule submerso em 10 mL de óleo mineral **C.** Explante foliar tratamento controle XP **D.** Caule tratamento controle XP **G.** Folha submersa em 5 mL de óleo mineral **H.** Caule submerso em 5 mL de óleo mineral **K.** Folha submersa em 10 mL de óleo mineral **L.** Caule submerso em 10 mL de óleo mineral..... pg 81.

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

**Tabela 1.** Influência dos diferentes sistemas de cultivo na micropropagação de *Pfaffia glomerata* após 30 dias em cinco sistemas de cultivo *in vitro*.....pg 38

**Tabela 2.** Análise de massa fresca (MF) e massa seca (MS) de parte aérea (PA) e sistema radicular (RZ) de *Pfaffia glomerata* após 30 dias de cultivo *in vitro*.....pg 40

**Tabela 3.** Aclimatização de *Pfaffia glomerata*, após 30 dias de cultivo *in vitro* em diferentes sistemas de cultivo.....pg 42

**Tabela 4.** Efeito dos diferentes sistemas de cultivo na micropropagação de *Lippia filifolia* após 30 dias de cultivo *in vitro*.....pg 45

**Tabela 5.** Análise da sobrevivência e altura da parte aérea, em *Lippia filifolia* na fase de enraizamento *in vitro* sob diferentes concentrações das auxinas ácido 3- indolacético (AIA), ácido indolbutírico (AIB), ácido naftaleno- acético (ANA).....pg 46.

**Tabela 6.** Formação de raízes e calos na fase de enraizamento *in vitro* em *Lippia filifolia* sob diferentes concentrações das auxinas ácido 3- indolacético (AIA), ácido indolbutírico (AIB), ácido naftaleno- acético (ANA).....pg 47

### CAPÍTULO 2

**Tabela 1.** Análise da sobrevivência e altura em plantas de *Pfaffia glomerata* ao longo do período de conservação *in vitro* sob temperatura de 25°C..... pg 71

**Tabela 2.** Análise da sobrevivência e altura da espécie *Lippia filifolia* durante o período de conservação *in vitro* com óleo mineral sob temperatura de 25 °C..... pg 72.

**Tabela 3.** Análise da sobrevivência de *Pfaffia glomerata* conservada *in vitro* sob diferentes volumes de óleo mineral e temperaturas..... pg 75.

**Tabela 4.** Análise da sobrevivência em *Lippia filifolia* conservada *in vitro* sob diferentes volumes de óleo mineral e temperaturas..... pg 78



## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

**μM** – Micromolar

**μg** – Micrograma

**mg** - Miligramas (unidade de medida de massa)

**mL** - Mililitro (unidade de medida de volume)

**g** - Grama (unidade de medida de massa)

**h** - Hora (unidade de tempo)

**°C** - Graus Celsius

**et al.** Expressão latina que significa “e outros”

**MS** - Meio de cultura desenvolvido por Murashige & Skoog (1962)

**AB** – face abaxial

**AD** – face adaxial

**AIA** – ácido indolacético

**AIB** – ácido indol butírico

**ANA** – ácido naftalenoacético

**EP** – epiderme

**EST** – estômato

**OM**- óleo mineral

**PA** – parênquima

**PP** – parênquima paliçádico

**FV**- feixe vascular

**rpm** – rotações por minuto

**FAA** - formaldeído, ácido acético glacial e álcool etílico

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O conhecimento e utilização das plantas medicinais com o objetivo de tratamento e cura de doenças é milenar e tradicional, e também um hábito que sempre existiu na história da humanidade (VELLOSO; PEGLOW, 2003; BADKE *et al.*, 2011).

Há milênios o homem já sabia diferenciar as plantas comestíveis das plantas que poderiam curar suas moléstias. O vasto conhecimento adquirido foi então sendo repassado de geração para geração por meio da medicina popular, sendo ainda bastante utilizado atualmente com fins terapêuticos (SILVA & CARVALHO, 2004; SILVEIRA *et al.*, 2008; GIRALDE; HANAZAKI, 2010; RAFIEIAN-KOPAEI, 2013).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a definição de plantas medicinais é tida como “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos vegetais, compostos que podem ser utilizados com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semissintéticos”. De acordo com dados da OMS cerca de 80% da população faz algum uso de medicamentos a base de plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde e estima-se que só o Brasil movimentou aproximadamente U\$ 1 bilhão de dólares em 2010, dos U\$ 20 bilhões movimentados em todo o mundo (OMS, 2005; RAMOS, 2011).

Entretanto, ainda existam relativamente poucos conhecimentos sobre os verdadeiros efeitos dessas substâncias no organismo humano. Por isso, da mesma forma que os fitoterápicos, o uso das plantas medicinais também deve fornecer segurança e eficácia para o uso popular, sendo necessária a comprovação científica de sua aplicação no corpo humano (TAGLIAT; FÉRES, 2009).

No Brasil, a própria política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos, aprovada por meio do decreto 5.813 de 22 de junho de 2006, indica a necessidade de estudos, por meio do estabelecimento de diretrizes e linhas prioritárias para o desenvolvimento de ações direcionadas à garantia do acesso seguro e uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos (BRASIL, 2006).

Neste contexto, trabalhos sobre a composição fitoquímica, possíveis efeitos colaterais, além de estudos sobre a produção e padronização de matérias-primas para suprir a demanda da indústria de fitoterápicos, parecem de fundamental importância para ampliar as opções terapêuticas aos usuários do Sistema Único de Saúde (SUS) (BRASIL, 2006; SOUSA *et al.*, 2008).

Assim, para um país como o Brasil que possui cerca de 20% da biodiversidade do planeta (BRASIL, 2006), é necessário que espécies medicinais de reconhecido valor

farmacológicos sejam submetidas a estudos mais aprofundados, visando fortalecer as bases técnicas e científicas para o melhor aproveitamento desses produtos nativos da flora brasileira (VALE & BERNARDES, 2006). E entre as espécies medicinais que podem ser utilizadas pelo SUS, destacam-se a *Pfaffia glomerata* e a *Lippia filifolia*.

*Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen pertence à família Amaranthaceae, sendo conhecida popularmente como ‘ginseng brasileiro’. A espécie é usada há séculos pelos índios para a cura de males, além de possuir grande interesse comercial na forma de fitomedicamentos e suplementos alimentares, em razão do seu uso popular como antitumoral, antidiabético e tônico afrodisíaco (NISHIMOTO *et al.*, 1986; NISHIMOTO *et al.*, 1987; SHIOBARA *et al.*, 1993). Esta planta vem sendo objeto de estudo devido a composição química das raízes que apresentam substâncias adaptógenas que promovem o aumento da resistência como a ecdisterona, e a rubrosterona, contra inflamações (SHIOBARA *et al.*, 1993).

*Lippia filifolia* (Mart. and Schauer ex Schauer) pertencente à família Verbenaceae, apresenta grande importância econômica devido as diferentes formas de utilização dos óleos essenciais produzidos pelas folhas (MOLDENKE, 1965). Por esse motivo, várias espécies desse gênero são utilizadas como planta medicinal, como a *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br., amplamente aplicada no tratamento antiespasmódico (PASCUAL *et al.*, 2001), antimicrobiana (AGUIAR *et al.*, 2008); *L. sidoides* usada como anti-inflamatório (MONTEIRO *et al.*, 2007), além de *L. multiflora* usada no tratamento contra malária (VALENTIN *et al.*, 1995). *Lippia filifolia* é uma espécie endêmica da Cadeia do Espinhaço em Minas Gerais, e apresenta características aromáticas e medicinais importantes que se assemelham às demais espécies do gênero (PEIXOTO *et al.*, 2006).

Assim, apesar do conhecimento destas espécies quanto aos seus usos medicinais, agronomicamente ainda são escassas as informações, especialmente àquelas relacionadas com o método de cultivo mais eficientes e a padronização da produção de matérias primas selecionadas (SOUSA *et al.*, 2008). Neste sentido, uma das informações de grande importância refere-se às formas eficientes de propagação dessas espécies, bem como a multiplicação e conservação *in vitro* de germoplasma, com boas condições fitossanitárias (SCHEFFER *et al.*, 2005). A micropropagação via microestaquia se constitui como uma excelente alternativa de produção de mudas de qualidade. O método consiste na produção de novas plantas por meio do cultivo de partes vegetativas *in vitro*, em meio de cultivo contendo ou não reguladores de crescimento, com a vantagem de poder possibilitar a produção de um elevado número de plantas em curto espaço de tempo e de forma rápida, produzindo

indivíduos geneticamente uniformes (COELHO *et al.*, 2011; LARIBI *et al.*, 2012; NAVROSKI *et al.*, 2014). No entanto, convencionalmente esta técnica de multiplicação é baseada no cultivo dos propágulos em pequenos frascos contendo meio de cultura semi-sólido, havendo a necessidade de intensa manipulação das culturas e demanda de mão de obra especializada, tendo como desvantagem geralmente o custo elevado da produção (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998; TEIXEIRA, 2002).

Novas técnicas de micropropagação utilizando meios de cultivo líquidos e equipamentos semi-automatizados estão sendo utilizados para a redução de custos e aumento de produtividade (LORENZO *et al.*, 1998; PENCHEL *et al.*, 2007). Biorreatores de imersão temporária são equipamentos semi-automatizados que vem sendo usados no cultivo de células, gemas e/ou qualquer tipo de propágulo utilizado na micropropagação, com o objetivo de produzir mudas em larga escala (ZIV, 1994; TEIXEIRA, 2002; PAEK *et al.*, 2005; LIMA *et al.*, 2012; WATT, 2012). Com o uso desse sistema de cultivo é possível obter a redução dos custos laboratoriais, pela redução das quantidades de frascos utilizados no processo e a ausência de agente geleificante no meio de cultivo (ETIENNE *et al.*, 2006; MALLÓN *et al.*, 2012; BALOGUN *et al.*, 2014). No Brasil, alguns protocolos foram descritos fazendo o uso de biorreatores para a produção de plantas medicinais (NASCIMENTO *et al.*, 2012; LIMA *et al.*, 2012; POLZIN *et al.*, 2014).

Adicionalmente, técnicas da cultura de tecidos de plantas também permitem que o germoplasma seja conservado *in vitro*, evitando que espécies sofram com a erosão genética causada pela destruição de habitats naturais e/ou com a exploração predatória do homem, colocando-as em risco de extinção (VILELA- MORALES; VALOIS, 2000; FLORES *et al.*, 2013).

O processo de conservação *in vitro* de germoplasma preserva a integridade genética e biológica das plantas, visando seu uso atual e futuro como fonte de variabilidade (SAMPAIO *et al.*, 2011). Embora a restrição do crescimento *in vitro* seja apontada como uma metodologia segura e vantajosa em relação as demais formas de conservação, é importante que se realizem estudos no sentido de se aperfeiçoar as metodologias de conservação, além de melhorar compreensão de eventos relacionados aos organismos vegetais durante o cultivo e/ou manutenção *in vitro* (APEZZATO-DA-GLORIA & CARMELLO GUERREIRO, 2003; KRAUS & ARDUIN, 1997).

O objetivo do trabalho foi desenvolver e aperfeiçoar estratégias de propagação e conservação *in vitro* de *Pfaffia glomerata* e *Lippia filifolia* em diferentes sistemas de cultivo, incluindo o uso de biorreatores de imersão temporária e do óleo mineral.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. *Lippia filifolia*

*Lippia filifolia* pertence à família Verbenaceae e compreende duas subfamílias: a Verbenoidae e Virticoideae (CRONQUIST, 1988). Entretanto, estudos filogenéticos e morfológicos feitos com a família Verbenaceae sugeriram que a subfamília Virticoideae faria parte da subfamília Lamiaceae. Sendo assim, a família Verbenaceae limita-se aos indivíduos da subfamília Verbenoidae, com cerca de 175 gêneros e 2.800 espécies amplamente distribuídas em todo o território brasileiro, incluindo zonas tropicais, subtropicais e temperadas do Hemisfério Sul e regiões temperadas do Hemisfério Norte (GOULART & MARCATI, 2008).

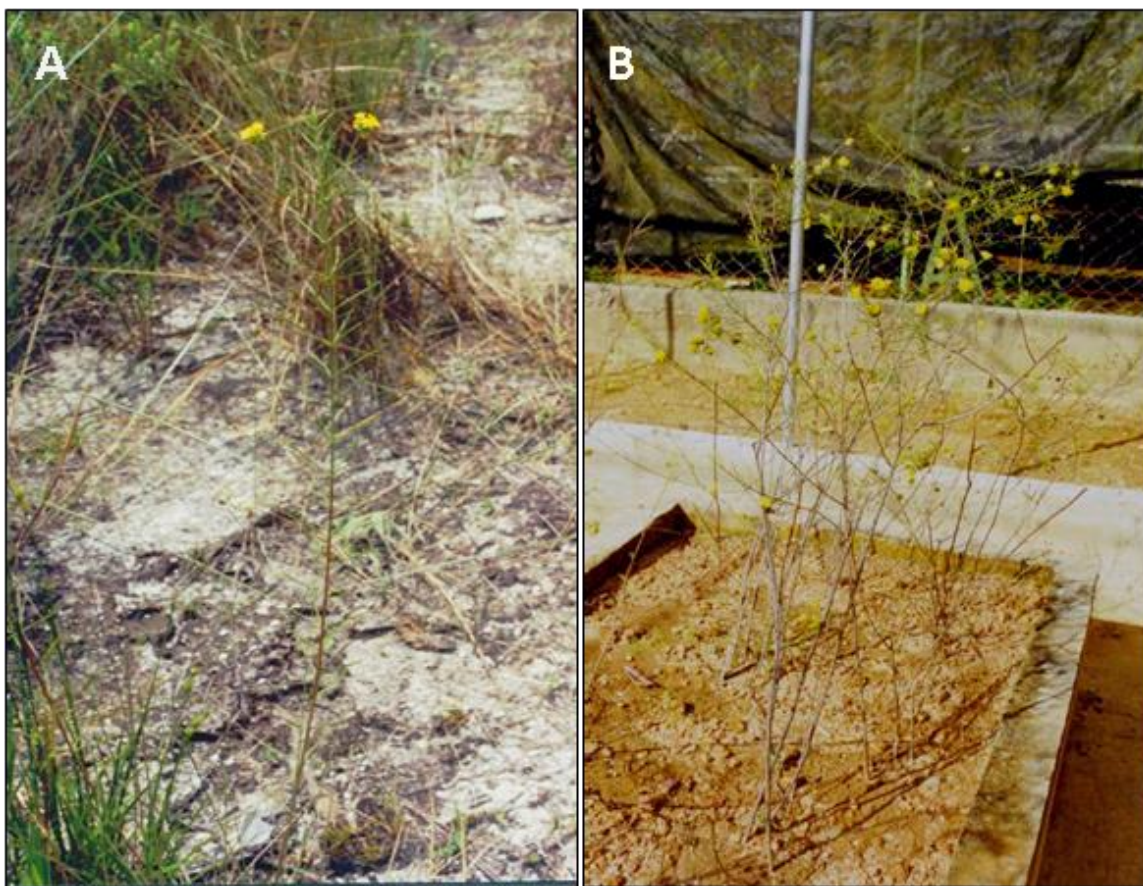
As espécies da família Verbenaceae são encontradas em praticamente todos os ecossistemas terrestres, sendo uma das cinco famílias mais importantes entre as Eudicotiledôneas dos campos rupestres. Trata-se de subarbustos de morfologia variável, alcançando até 1,5 m de altura, raramente 2 metros, com ramos finos, arqueados, quebradiços e de coloração esbranquiçada. As folhas da espécie possuem cor verde claro a escuro, nervadas, opostas ou verticiladas, simples ou compostas, bordos serrados, ápice agudo e não possuem estípula, possuindo cheiro forte e aromático. As flores são dispostas em inflorescências racemosas, sendo zigomorfas, pentâmeras, com ovário súpero, bicarpelar e bilocular. O androceu apresenta quatro estames didínamos e sua reprodução é por alogamia gerando frutos do tipo drupa ou esquizocarpo (SCHOKEN, 2007; LORENZI & MATOS, 2008; MELO *et al.*, 2010).

O gênero *Lippia* foi descrito por Linnaeus em 1753 e compreende cerca de 200 espécies distribuídas no Brasil, Paraguai, Argentina, e algumas espécies endêmicas na África (SALIMENA *et al.*, 2002). O Brasil possui cerca de 70 a 75% da diversidade de espécies do gênero *Lippia*, sendo considerado centro de diversidade a Cadeia do Espinhaço em Minas Gerais e a Chapada Diamantina na Bahia. Os Campos rupestres e Cerrados do Brasil são considerados regiões de alto endemismo (VICCINI *et al.*, 2005).

Os indivíduos do gênero dessa família são conhecidos popularmente por diversos nomes, entre eles: erva cidreira, erva cidreira brasileira, erva cidreira do campo, alecrim, alecrim do mato, alecrim do campo (JULIÃO *et al.*, 2003). As plantas são usadas tradicionalmente na preparação de chás, em compressas e banhos ou extratos alcóolicos em função das suas propriedades farmacológicas, devido aos seus constituintes ativos presentes especialmente nos seus óleos essenciais (LUZ *et al.*, 2014).

As espécies do gênero *Lippia* possuem propriedades medicinais e aromáticas, sendo consideradas fontes de compostos biologicamente ativos (AGUIAR *et al.*, 2008). Nesse gênero várias espécies apresentam propriedades medicinais comprovadas como a espécie *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br ex Britt & Wilson utilizada na medicina tradicional para o tratamento de indigestão, antiespasmódico, no combate à insônia e asma, sendo considerada também anti-inflamatória e antipirética (GOMES *et al.*, 1993; PASCUAL *et al.*, 2001).

*Lippia filifolia* (Mart. e Schauer ex Schauer) é uma planta endêmica da Cadeia do Espinhaço no Estado de Minas Gerais (PEIXOTO *et al.*, 2006). As plantas chegam a medir entre 0,5 a 1,0 m de altura, na forma de arbustos e/ou semi- arbustos. Seus ramos são frágeis e aromáticos. Apresenta formato tetragonal, com ramificações apenas na porção superior. As folhas são filiformes, verticiladas, sésses com coloração verde brilhante. As flores apresentam coloração amarela ou laranja com cálice piloso, bífido e pontiagudo (MOLDENKE, 1965) (Figura 1). Além das propriedades medicinais, possui também propriedades aromáticas devido à presença de tricomas glandulares na superfície das folhas (PEIXOTO *et al.*, 2006).



**Figura 1.** Aspectos gerais da morfologia de *Lippia filifolia* no habitat natural em Diamantina - MG (A), Cultivada na Universidade Federal de Juiz de Fora (B). Foto: Lyderson Facio Viccini, 2001.

## 2.2. *Pfaffia glomerata*

*Pfaffia glomerata* pertence à família Amaranthaceae a qual compreende 169 gêneros, com cerca de 2960 espécies em regiões tropicais e subtropicais. No Brasil, são encontradas 145 espécies, distribuídas em 19 gêneros, sendo 71 espécies endêmicas de diferentes regiões e biomas brasileiros (MARCHIORETTO *et al.*, 2010).

O gênero *Pfaffia* compreende cerca de 33 espécies distribuídas nas Américas Central e do Sul. Destas 33 espécies, 21 ocorrem no Brasil, sendo o país conhecido como um centro de coleta de espécies desse gênero para interesses medicinais (MARCHIORETTO *et al.*, 2009). As espécies são encontradas em diversos tipos de ambientes como campos rupestres, cerrados, beira de matas, restingas, terrenos baldios e cultivados, sendo mais comuns em ambientes abertos, embora algumas espécies sejam encontradas no interior de florestas (SMITH & DOWNS, 1972). A *P. glomerata* é uma espécie nativa da América do Sul e de ocorrência comum nos estados do Paraná, Mato Grosso do Sul e Goiás (SIQUEIRA, 2002). É uma espécie hidrófila, ou seja, desenvolve-se parcial ou por completo sobre a água ou em solos muito úmidos e ambiente heliófilo (cresce melhor em plena luz solar). No entanto, as geadas prejudicam seu crescimento, se desenvolvendo melhor em temperaturas mais elevadas (MAGALHÃES, 2000).

Trata-se de uma erva perene (relativamente alta, atingindo até 2 metros de altura), podendo apresentar-se como arbustos ou trepadeiras anuais ou perenes (Figura 2). O gênero apresenta folhas opostas, rosuladas ou alternas, glabras ou pilosas. As inflorescências são espiciformes, capituliforme, com flores unissexuais ou bissexuais e frutos do tipo cápsula monospermica (MARCHIORETTO *et al.*, 2009).

Utilizada há séculos pelos índios brasileiros na cura e prevenção de doenças, a *Pfaffia* é também conhecida pelos nomes populares de fáfia, corango-sempreviva, corrente, acônito e ginseng brasileiro, por causa do formato de suas raízes serem bem parecido com o do ginseng coreano (*Panax ginseng* C.A Meyer), e também devido às suas propriedades tônicas e estimulantes (LORENZI & MATOS, 2008).

O interesse comercial pela espécie está nas suas raízes tuberosas que possuem substâncias com propriedades medicinais ( $\beta$ -ecdisterona, rubrosterona e o ácido pfáffico) (SHIOBARA *et al.*, 1993). Estas substâncias são usadas na forma de fito-medicamento e suplemento alimentar em razão do uso popular como atuação na regeneração de células, purificação do sangue, inibição de crescimento de células cancerígenas, antidiabetes (MONTANARI JUNIOR *et al.*, 1999), regulação das funções hormonal e sexual, além de ser um bioenergético (SHIOBARA *et al.*, 1993).



**Figura 2.** Aspectos gerais da morfologia de *Pfaffia glomerata* no habitat natural a beira do rio Santo Inácio, na cidade de Ipatinga- SP (A e B); Destaque para a raiz tuberosa da espécie (C). Foto: Lin Chau Ming, 2003.

A reprodução dessa espécie pode ser feita de forma sexuada ou assexuada. Suas sementes são férteis e o poder germinativo gira em torno de 50 e 77%. Porém, de maneira sexuada as plantas originadas são heterogêneas, devido a grande variabilidade morfológica e genética da espécie. Estudos sobre a multiplicação vegetativa da espécie demonstraram que a estaquia é fisiologicamente viável, porém, tecnicamente apresenta baixo rendimento, além de fatores como luminosidade, água, nutrientes e temperatura serem determinantes para o crescimento da planta (NICOLOSO *et al.*, 2003).

No Brasil, principalmente na região Noroeste do Estado do Paraná, a espécie *P. glomerata* é amplamente comercializada no mercado atacadista interno e externo de plantas medicinais. Com essa crescente demanda na atividade extrativista predatória da espécie, tal



procedimento pode colocar em risco a perpetuação em seu ambiente natural e o fornecimento de matéria-prima com qualidade e em quantidade para a população (MONTANARI JUNIOR, 2002).

### **2.3. Micropropagação**

A propagação *in vitro*, também conhecida como micropropagação devido ao tamanho dos propágulos utilizados, é uma técnica eficiente no que diz respeito à manutenção das características de interesse da planta matriz, possibilitando a multiplicação em larga escala de indivíduos selecionados, a partir de um explante inicial e independentemente da estação do ano (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998; PAUNESCU, 2009; GOMES *et al.*, 2015).

A técnica, uma vez estabelecida, pode proporcionar a produção de grandes quantidades de plantas homogêneas, livres de doenças, em um curto espaço de tempo. Isso ocorre porque o cultivo em laboratório utiliza meios nutritivos otimizados em condições controladas de temperatura e luminosidade, acelerando a morfogênese e organogênese vegetal. Outros fatores são também considerados importantes na micropropagação, pois influenciam no desenvolvimento da planta, como o tipo de explante e recipiente de cultivo que podem influenciar no crescimento da espécie (RAO & RAVISHANKAR, 2002; NICOLOSO *et al.*, 2003; CID & TEIXEIRA, 2010). De maneira geral, diversas partes da planta matriz podem ser utilizadas como fonte de explantes no cultivo *in vitro* para a regeneração das plantas, como, por exemplo, segmentos nodais, ápices caulinares e discos foliares (RECH & PIRES, 1986).

Segundo Pereira e Fortes (2001), cada espécie possui características genéticas próprias e podem responder de maneiras diferentes ao cultivo *in vitro*. O tipo, a posição e a idade dos explantes influenciam na capacidade de regeneração e multiplicação dos explantes.

A micropropagação se baseia na totipotencialidade das células vegetais, hipótese elaborada em 1902 pelo botânico alemão Gottlieb Haberlandt, ou seja, no potencial que as células vegetais vivas possuem de regenerar uma planta inteira (HABERLANDT, 1902).

Nesse contexto, ainda na década de 70, Murashige (1974) estabeleceu cinco estágios para a micropropagação: 1) seleção dos explantes; 2) cultivo/estabelecimento do explante em meio nutritivo básico, sobre condições assépticas; 3) multiplicação e a proliferação dos brotos mediante sucessivas subculturas em meio próprio para multiplicação; 4) indução e desenvolvimento de raiz, 5) aclimatização, que é a transferência das plantas obtidas no cultivo *in vitro* para as condições *ex vitro*, geralmente em substrato em casa de vegetação (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998; WENDLING *et al.*, 2006).

### **2.3.1. Meios de cultura e reguladores do crescimento vegetal**

Os meios nutritivos são de grande importância na cultura de tecidos e fornecem as substâncias essenciais exigidas para o desenvolvimento das plantas, complementando as substâncias sintetizadas pelas células. Vários compostos orgânicos e inorgânicos são incorporados ao meio para suprirem as necessidades metabólicas, energéticas e estruturais das células. De uma maneira geral, os meios de cultura são compostos por água, micro e macronutrientes, vitaminas, aminoácidos, agentes solidificantes, reguladores vegetais, além de uma fonte de carbono (COHEN, 1995; WADA *et al.*, 2015).

A solução de micronutrientes é composta de zinco, manganês, ferro, boro, cobre, cloro e molibdênio. A solução de macronutrientes é composta de cálcio, fósforo, potássio, magnésio, nitrogênio e enxofre (CALDAS, 1998). Ao meio de cultura geralmente são adicionados reguladores de crescimento, com o objetivo de suprir deficiências dos teores endógenos de hormônios nos explantes. Adicionalmente, aplicadas em concentrações controladas, essas substâncias podem estimular, inibir ou modificar o crescimento e desenvolvimento das plantas. Existem seis classes de hormônios/reguladores de crescimento amplamente conhecidos: as auxinas, citocininas, giberelinas, o ácido abscísico, etileno e os brassinoesteroides (SALISBURY e ROSS, 1994; TORRES *et al.*, 1998; FREITAS, 2009).

Dos reguladores de crescimento as auxinas e citocininas são as mais utilizadas na cultura *in vitro*. As auxinas promovem principalmente o crescimento de calos, alongamento celular e rizogênese em tecidos vegetais (TAIZ & ZAIGER, 2004; FREITAS, 2009). Segundo Souza e Pereira (2007), o uso de auxinas durante o cultivo *in vitro* acelera o processo de formação de raízes em estacas de difícil enraizamento. O mesmo autor ainda relata que as auxinas são responsáveis por alguns efeitos fisiológicos nas plantas dentre eles se destaca a formação de raízes adventícias em estacas ocasionadas pelo alongamento e divisão celular.

Dentre as auxinas, as mais utilizadas são ácido indolbutírico (AIB), ácido naftalenoacético (ANA) e ácido indolacético (AIA), além do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). O AIA (ácido 3-indolacético) é a auxina mais encontrada nas plantas, podendo ser encontrada de forma livre, que é a ativa, ou de forma conjugada considerada inativa, inibindo ou regulando seus efeitos fisiológicos no crescimento das raízes (RADMANN *et al.*, 2003; NIZAN & TE-CHATO, 2009). Em geral na cultura de tecidos não é frequente o uso de AIA por ser pouco estável a luz (fotossensível) e também por ser anulado através da oxidação da enzima AIA-oxidase, predominando, assim, o uso de auxinas sintéticas (SALISBURY e ROSS, 1994).

As auxinas sintéticas mais utilizadas e eficazes em promover o enraizamento de estacas são ácido indolbutírico (AIB) e o ácido naftaleno acético (ANA). O uso desses fitorreguladores pode vir a compensar a falta de auxina endógena nas plantas (HARTMANN *et al.*, 2002). No entanto, o ácido indolbutírico (AIB) apresenta algumas vantagens quando comparado ao ANA dentre as quais está a sua maior capacidade de diferenciação de raízes, a não toxicidade em altas concentrações, além de se manter estável a fotodegradação, promovendo, assim, a formação de raízes (LUDWING-MULLER e EPSTEIN, 1994; TONIETTO *et al.*, 2001; HARTMANN *et al.*, 2002).

As citocininas são substâncias indispensáveis à divisão e multiplicação celular, à quebra de dominância apical, à indução e à proliferação de gemas axilares e a diferenciação de gemas adventícias. Dentre estas, as mais conhecidas são 6- benzilaminopurina (BAP) e Cinetina (KIN), isopenteniladenina (2-iP) e a zeatina (ASMAR, 2011).

Já o carboidrato mais utilizado é a sacarose, componente importante por ser a fonte de energia da planta *in vitro*, uma vez que a fotossíntese da planta pode ser limitada nestas condições de cultivo (CALDAS, 1998).

Entretanto, para cada tipo de explante, espécie ou cultivar, o meio de cultura mais adequado deve ser determinado experimentalmente (LÉDO *et al.*, 2007; REZENDE *et al.*, 2008).

#### **2.4. Biorreatores de Imersão Temporária**

A micropropagação possui algumas limitações quanto ao seu uso comercial. Uma delas é o relativo alto custo de produção das plantas, devido a grande necessidade de mão-de-obra especializada, que pode atingir até a 60% dos custos da produção (ALVARD *et al.*, 1993; CID *et al.*, 2010; BAQUE *et al.*, 2012). A caracterização da micropropagação convencional baseia-se no cultivo em recipientes, geralmente pequenos, com um número limitado de plantas por frasco, contendo meio de cultura e a realização de repicagens manuais do material vegetal em câmara de fluxo laminar (TEIXEIRA, 2002). No geral, após 4 a 6 semanas é necessária a transferência das plantas para um novo meio de cultura, devido ao crescimento das plantas que ficam limitadas pelo volume dos frascos e a diminuição do volume do meio de cultura que é absorvido pelas plantas (ULISSES *et al.*, 2013). A consistência do meio pode ser líquida ou sólida, sendo que, a cultura em meio líquido necessita geralmente de um suporte para agitação para prover a oxigenação do material vegetal (ZIV, 1994).

A adoção de cultivo em meio líquido é uma importante medida para a redução de custos no processo de micropropagação, tanto por dispensar a utilização do solidificante do meio, como por promover um contato mais próximo dos tecidos com o meio de cultura (TEIXEIRA, 2002). Cultivos em meio líquido facilitam a absorção de nutrientes e fitorreguladores, estimulando o crescimento das plantas, a formação e o desenvolvimento de brotos e raízes (ESCALONA, 1999; KAMARAINEM *et al.*, 2010). Entretanto, o cultivo em meio líquido pode favorecer a hiperhidricidade que é caracterizada pelo elevado teor de água no interior das células e tecidos, um fenômeno que pode levar a alterações morfológicas e fisiológicas irreversíveis dos explantes em cultivo (ZHAO *et al.*, 2012).

Nesse sentido, novos sistemas de micropropagação têm sido desenvolvidos com o objetivo de se obter melhorias do processo de produção de mudas *in vitro*, tornando esta técnica mais simples e reduzindo os custos, a fim de proporcionar uma maior eficiência no processo de propagação de mudas (BALOGUN *et al.*, 2014). Entre os novos sistemas surgidos com interesse na propagação comercial de plantas, encontra-se o sistema de biorreatores (EIBL *et al.*, 2009).

Os primeiros biorreatores, conhecidos como fermentadores foram desenvolvidos para o cultivo de fungos e bactérias. Porém foram feitas modificações para o seu uso na propagação *in vitro* de plantas (BARRUETO *et al.*, 2002). Os biorreatores são equipamentos utilizados para a micropropagação clonal sob imersão temporária ou permanente de células, tecidos, gemas, embriões vegetais, utilizando solução nutritiva líquida, tendo como principal objetivo a produção em larga escala (LIMA *et al.*, 2012). Outras vantagens atribuídas à utilização desse sistema de cultivo são a possibilidade de semi- automação do sistema, a redução de mão-de-obra necessária para a micropropagação de plantas, o uso de recipientes maiores, com um volume maior do que os frascos utilizados na propagação convencional, além de geralmente o sistema permitir a redução da quantidade de repicagens do material (MEHROTRA *et al.*, 2007).

O desenvolvimento de novas técnicas de cultivo *in vitro* de plantas fazendo o uso de equipamentos, como os biorreatores, parece ter sido inicialmente estabelecido por Takayama e Misawa (1981) para a micropropagação de begônia, a partir de segmentos nodais estabelecidos *in vitro*.

Atualmente, o sistema de cultivo em biorreatores vem sendo utilizado com eficiência para a multiplicação de várias espécies de plantas, dentre elas, a cana-de-açúcar (MALUTA *et al.*, 2013), café (TEISSON *et al.*, 1995), abacaxizeiro (FEUSER *et al.*, 2010; ESCALONA *et*

*al.*, 1999), orquídeas (MOREIRA *et al.*, 2012), além de diversas plantas medicinais (SAGAWA & KUNIZAKI, 1989; ZHAO *et al.*, 2012).

Os biorreatores são classificados de acordo com o mecanismo de renovação do meio de cultivo, tipo de aeração, funcionamento e exposição do explante, dependendo das exigências da espécie, do tipo de célula ou órgão a ser propagado (ETIENNE & BERTHOULY, 2002; EIBL *et al.*, 2009).

Os biorreatores de imersão temporária foram adaptados para se obter um manuseio mais simples, visando melhorar as condições de oxigenação do meio nutritivo para o cultivo de plantas, diminuindo a ocorrência de desordens fisiológicas e incrementando a produtividade e eficiência do processo de propagação de mudas (ETIENNE *et al.*, 2006; WATT, 2012).

De maneira geral o sistema de cultivo consiste na transferência do meio de cultura de um recipiente, onde fica armazenado o meio de cultura, para outro recipiente onde se encontram as plantas. Esses dois recipientes, denominados frascos gêmeos são interligados geralmente por mangueira de silicone autoclavável por onde passa o meio de cultura. O sistema é automatizado por um temporizador que controla um compressor que faz o bombeamento do ar a uma determinada pressão para o recipiente onde se encontra o meio de cultura, fazendo com que o líquido seja transferido através da mangueira para o outro recipiente que contém as plantas. Ao ser transferido, o meio de cultura cobre totalmente os explantes por um período de tempo programado pelo temporizador. Em seguida, o líquido retorna para o recipiente de origem (TAKAYAMA & AKITA, 2006; TEIXEIRA, 2002).

O sistema de imersão temporária proporciona a melhoria das trocas gasosas do ambiente, dentro dos recipientes de cultivo e o contato físico da planta com o meio nutritivo líquido que é mais bem aproveitado pela planta, aumentando a absorção de nutrientes (PAEK *et al.*, 2001). Sendo assim, este sistema apresenta várias vantagens quando comparado a outros sistemas líquidos, como por exemplo, a possibilidade de redução da hiperhidricidade, causada pelo estresse hídrico e pela falta de aeração, e a ausência de estresse mecânico ao material em cultivo devido à ausência de aeração e agitação (ESCALONA *et al.*, 1999; ETIENNE *et al.*, 2006).

O biorreator de imersão temporária resultou da adaptação de vários biorreatores. Segundo Teixeira (2002), já em 1952 Steward e colaboradores foram os primeiros a aplicarem a tecnologia do cultivo sob imersão temporária, com a construção de um equipamento denominado “auxophyton” que melhorou a oxigenação da cultura, por meio de um sistema rotacional dos recipientes, que em determinados momentos submergia os explantes e, logo em

seguida, as culturas eram expostas ao ar. Posteriormente, Aitken-Christie & Davies (1988) desenvolveram um equipamento de cultivo semi-automático de imersão temporária, onde as plantas eram cultivadas em recipientes maiores com meio semissólido na parte inferior do recipiente e em determinado período, o meio líquido era adicionado sobre o meio sólido, sendo periodicamente removido. Logo após esse período, Simonton *et al.* (1991) desenvolveram um sistema automatizado de tempo em que o meio nutritivo líquido era colocado sobre as plantas cultivadas.

Atualmente, dentre os vários tipos de biorreatores de imersão temporária, o sistema RITA<sup>®</sup> (Recipiente de Imersão Temporária Automatizada) (Figura 3), patenteado por TEISSON *et al.* (1995), comercializado pela Vitropic S/A, é um dos tipos mais utilizados para uma série de espécies vegetais (ALVARD *et al.*, 1993; ETIENNE & BERTOULY, 2002). Entre suas principais vantagens, está a facilidade de utilização, a facilidade de esterilização e a economia de espaço, pois trata-se de apenas um recipiente com dois compartimentos: um superior que contém os segmento nodais, e outro inferior que contém o meio de cultura armazenado.



**Figura 3.** Recipiente de Imersão Temporária Automatizada (RITA<sup>®</sup>) no cultivo *in vitro* de *Pfaffia glomerata*. (Barra de escala= 1 cm). Fonte: Laboratório de Cultura de Tecidos II da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, 2016.

Na busca por melhores resultados na propagação de material vegetal, foi desenvolvido por TEIXEIRA (2002) o Sistema de Biorreator de imersão temporária (BIT), patenteado pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Figura 4). Esse sistema possui várias vantagens, dentre elas, a possibilidade de utilização de vários tipos, tamanhos, e formatos de recipientes, diferentes tipos e constituição de tampas, a possibilidade do sistema ser utilizado em regime de imersão temporária e permanente; a utilização de fontes artificiais de ar, com dosagens específicas de oxigênio, nitrogênio e gás carbônico; e a capacidade do equipamento ser utilizado tanto para o cultivo de células e embriões, quanto para gemas, segmentos nodais e raízes (CID & TEIXEIRA, 2010).



**Figura 4.** Sistema de biorreator modelo Embrapa no cultivo *in vitro* de *Pfaffia glomerata* (barra de escala= 5 cm). Fonte: Laboratório de Cultura de Tecidos II da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, 2016.

## 2.5. Conservação *in vitro* de germoplasma

Com o aumento da população mundial, as fronteiras agrícolas e urbanas expandiram-se, favorecendo a degradação do habitat natural das plantas. Esse extrativismo intenso contribui para a erosão genética das espécies, aumentando o número de espécies em risco de extinção (CAMILLO *et al.*, 2009). Diante disso, a conservação *in vitro* de recursos genéticos, por meio da manutenção de coleções de germoplasma de espécies vegetais, por meio do estabelecimento de bancos de germoplasma, vem sendo bastante utilizada (SCHERWINSKI-PEREIRA *et al.*, 2010).

As vantagens da conservação *in vitro* são a manutenção de genótipos em condições assépticas, com redução dos custos com mão-de-obra, e a utilização de pequeno espaço físico, facilitando a disponibilidade do material para o melhoramento genético e para o intercâmbio de germoplasma (ENGELMANN, 2004).

A conservação pode ser *in situ* e *ex situ*. *In situ* é quando a espécie é preservada em seu habitat natural, como em parques, reservas biológicas e reservas ecológicas. Este tipo de conservação, geralmente é feita por períodos de curto e médio prazo. No entanto, em ambientes naturais a conservação é considerada cara, devido à necessidade de grandes áreas, além das espécies ficarem vulneráveis e expostas ao ataque de patógenos e adversidades climáticas (WITHERS & WILLIAMS, 1998; CID & TEIXEIRA, 2010).

Já a conservação *ex situ* ocorre quando se preserva a espécie em coleções ou bancos de germoplasma fora das suas condições naturais, geralmente em instituições de pesquisa. Na conservação *ex situ*, as amostras de material vivo podem ser armazenadas em forma de sementes, plantas ou partes das plantas, como ápices caulinares, segmentos nodais, gemas axilares, meristemas, tecidos ou células, permitindo que vários genótipos estejam disponíveis para utilização futura (ENGELMANN, 2004).

A conservação das espécies *in vitro* em bancos de germoplasma podem ser feitas por meio de modificações nas condições do ambiente de cultivo, sob baixas temperaturas, baixa intensidade luminosa, em meio de cultura com baixa concentração de sais, ou pelo uso de agentes osmóticos, sendo protegidas de eventuais perdas, garantindo a sua utilização a curto, médio, e longo prazo. Para a conservação do material *in vitro* existem dois métodos principais: o crescimento lento em curto e médio prazo e a criopreservação, considerada de longo prazo (ENGELMANN, 2004).

Pelo método de crescimento lento, as plantas são submetidas a condições que desacelerem o metabolismo e crescimento, sem afetar a estabilidade e viabilidade genética. Aumentam-se, assim, os intervalos entre os subcultivos, diminuindo a manipulação das



plantas e possíveis problemas de contaminação (WHITERS & WILLIANS, 1998). Esta diminuição do metabolismo pode ocorrer por alterações físicas (temperatura e luz) do ambiente e/ou químicas utilizando agentes osmóticos (sacarose, manitol, sorbitol) no meio de cultura, que atuam removendo o excesso de água intracelular por gradiente osmótico, diminuindo o crescimento da planta (DUMET *et al.*, 1993; LIMA-BRITO *et al.*, 2011; SILVA & SCHERWINSKI-PEREIRA, 2011). Esses carboidratos podem ser utilizados junto a inibidores de crescimento, como o ácido abscísico ou o ácido salicílico, devendo-se manter alta a taxa de sobrevivência do material cultivado durante o período de conservação *in vitro* (KEATMETHA *et al.*, 2006; AHMED & ANJUM, 2010).

Outra estratégia para a conservação *in vitro* é a adição de uma camada de óleo mineral sobre o explante (WITHERS & ENGELMANN, 1997). De acordo com Caplin (1959), o óleo mineral provém do petróleo e sua utilização sob o explante diminui a sua capacidade de captar oxigênio, mantendo assim, o crescimento mínimo das plantas por reduzir o metabolismo das mesmas. Segundo Augereau *et al.* (1986), a utilização desta técnica no armazenamento de espécies vegetais é simples e vantajosa pois não há a necessidade de utilização de equipamentos sofisticados e apresenta baixo custo benefício para os laboratórios. De maneira geral, essa técnica é considerada vantajosa, pois as plantas podem permanecer viáveis por vários meses e até anos no mesmo meio de cultura, prolongando os intervalos de subcultivo, reduzindo a necessidade de mão-de-obra e o uso de reagentes (SHARMA *et al.*, 2012; CRUZ-CRUZ *et al.*, 2013).

## **2.6. Estudos Anatômicos e Histoquímicos**

A anatomia vegetal é uma área da botânica destinada ao estudo das estruturas celulares, a organização dos tecidos e órgãos dos vegetais, podendo auxiliar no entendimento sobre a origem, constituição e função das estruturas que caracterizam as plantas (APEZZATO- DA GLÓRIA & CARMELLO, 2003).

O uso de técnicas de análise anatômica permite o detalhamento de eventos ocorridos durante o cultivo *in vitro* de espécies vegetais. No entanto, as plantas cultivadas *in vitro* se desenvolvem em condições diferentes das plantas cultivadas *ex vitro* podendo apresentar mudanças morfológicas, anatômicas e fisiológicas (JAUSURO *et al.*, 2010). Entre essas mudanças estão a reduzida diferenciação de células do mesofilo das folhas com vários espaços intercelulares (CAPELLADES *et al.*, 1990), cutícula pouco desenvolvida (FUCHIGAMI *et al.*, 1981) e sistema vascular pouco desenvolvido (GROUT & ASTON, 1978). Dentro desse contexto, é necessária a avaliação anatômica das plantas medicinais,

cultivadas *in vitro* a fim de realizar o manejo adequado e identificar as mesmas características de interesse da planta matriz (COSTA, 2006).

Além disso, as células vegetais podem produzir diferentes tipos de substâncias como carboidratos, lipídeos, aminoácidos e proteínas que irão sinalizar as respostas fisiológicas do metabolismo das plantas (DORES, 2007). A técnica histoquímica permite detectar de forma qualitativa e quantitativa a presença dessas substâncias existentes nas plantas e está baseada no uso de reagentes químico- histológicos pré-estabelecidos (GERSBACH, 2002). Sua metodologia baseia-se em reações cromáticas realizadas para o reconhecimento da natureza química das membranas e do conteúdo celular (COSTA & CUNHA, 2000).

No entanto, até o momento, nenhum estudo foi feito para verificar a caracterização anatômica das espécies e a análise histoquímica das substâncias produzidas e acumuladas nas folhas durante a conservação *in vitro* utilizando óleo mineral.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

Desenvolver e aperfeiçoar estratégias para a propagação e conservação *in vitro* de *Pfaffia glomerata* e *Lippia filifolia*.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Avaliar a taxa de multiplicação e o crescimento *in vitro* das espécies medicinais *P. glomerata* e *L. filifolia* em sistema de cultivo semi-sólido, líquido estacionário, líquido sob agitação e biorreatores de imersão temporária;
- Estabelecer o enraizamento das plantas *in vitro*, bem como a sobrevivência no processo de aclimatização;
- Verificar a tolerância de brotos de *P. glomerata* e *L. filifolia* à conservação *in vitro* por imersão em óleo mineral, bem como adequar a quantidade do óleo a ser utilizado e a temperatura de armazenamento;
- Realizar a caracterização anatômica e histoquímica de *P. glomerata* e *L. filifolia* conservadas em óleo mineral.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, J. S., COSTA, M. C., NASCIMENTO, S. C., & SENA, K. X. Antimicrobial activity of *Lippia alba* (Mill.) NE Brown (Verbenaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.3, p.436-440, 2008.

AHMED, M., & ANJUM, M. A. *In vitro* storage of some pear genotypes with the minimal growth technique. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, v.34, n.1, p. 25-32, 2010.

AITKEN-CRISTIE, J.; DAVIES, H. Development of a semiautomated micropropagation system. **Acta Horticulture**, v.230, p.81-87, 1988.

ALVARD, D.; CÔTE F.; TEISSON, C. Comparison of methods of liquid media culture for banana micropropagation. Effects of temporary immersion of explants. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v.32, p. 55-60, 1993.

APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. **Anatomia Vegetal**. Viçosa - Editora UFV, p.438, 2006.

ASMAR, S. A.; RESENDE, R. F.; ARARUNA, E. C.; MORAIS, T. P.; LUZ, J. M. Q. Citocininas na multiplicação *in vitro* de hortelã-pimenta (*Mentha x Piperita* l.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 13, especial, p. 533-538, 2011.

BADKE, M. R.; BUDÓ, M. D. L. D.; Silva, F. M. D., & RESSEL, L. B. Plantas medicinais: o saber sustentado na prática do cotidiano popular. **Esc Anna Nery**, v.15, n.1, p. 132-9, 2011.

BALOGUN, M. O.; MAROYA, N.; ASIEDU, R. Status and prospects for improving yam seed systems using temporary immersion bioreactors. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 15, p. 1614-1622, 2014.

BARRUETO, CID, P.; CRUZ, A. R. R.; TEIXEIRA, J. M. Biorreatores de imersão permanente Biotecnologia. **Ciência e Desenvolvimento**, Uberlândia, v.4, n.25, p. 50-53, mar.\ abr. 2002.

BAQUE, M. A.; MOH, S. H.; LEE, E. J.; ZHONG, J. J., & PAEK, K. Y. Production of biomass and useful compounds from adventitious roots of high-value added medicinal plants using bioreactor. **Biotechnology advances**, V.30, N.6, P. 1255-1267, 2012.

BOCHNER, R.; FISZON, J.T.; ASSIS, M.A.; AVELAR, K.E.S. Problemas associados ao uso de plantas medicinais comercializadas no Mercado de Madureira, município do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.14, n.3, p.537-547, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 971, de 03 de maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PN-PIC) no Sistema Único de Saúde. **Diário Oficial da União. Poder Executivo**. Brasília, DF, n. 119, p. 2-4, jul.2006.

CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E.; Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A.; **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa SPI: Embrapa CNPH, v.1, p. 87- 132,1998.

- 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.
- CAPELLADES, M., FONTARNAU, R., CARULLA, C., & DEBERGH, P. Environment influences anatomy of stomata and epidermal cells in tissue-cultured *Rosa multiflora*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.15, n.1, p.141-145, 1990.
- CAPLIN, M. S. Mineral oil overlay for conservation of plant tissue culture. California Institute Technology Pasadena. **America Journal Botanic**, v.46, n.5, p. 324-329, 1959.
- CID, L. P. B.; TEIXEIRA, J. B. Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. In: CID, L. P. B. **Cultivo *in vitro* de plantas**. EMBRAPA-SPI; EMBRAPA-ERGB, p. 15-49, 2010.
- COELHO, M. D. F. B.; MAIA, S. S. S.; OLIVEIRA, A. K.; DIÓGENES, F. É. P., & SOARES, S. R. F. Vegetative propagation of liamba, a medicinal plant. **Horticultura Brasileira**, v.29, n.3, p. 418-420, 2011.
- COHEN, D. The culture médium. **Acta horticultureae**, n.393, p.15-24, 1995.
- CORTEZ, D. A. G., TORRADO, M. C., CORTEZ, L.E.R. Ginseng Brasileiro. **Arquivo Ciência e Saúde Unipar**. v. 2,n.3, p. 299-306,1998.
- CRONQUIST, A. **The evolution and classification of flowering plants**. The New York Botanical Garden. New York, 1988.
- COSTA, N.M.S. **Cultivo *in vitro* e estudo anatômico da tamareira (*Phoenix dactylifera* L.)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, p.86, 2006.
- CRUZ-CRUZ, C. A.; GONZÁLEZ-ARNAO, M. T., & ENGELMANN, F. Biotechnology and conservation of plant biodiversity. **Resources**, v.2, n.2, p. 73-95, 2013.
- DORES, R. G. R. **Histoquímica de *Dimorphandra mollis* Benth.** 2007. 136f. Tese (Doutorado), Pós-Graduação em Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.
- DUMET, D.; ENGELMANN, F.; CHABRILLANGE, N.; DUVAL, Y.; DEREUDDRE, J. Importance of sucrose for the acquisition of tolerance to desiccation and cryopreservation of oil palm embryos. **Cryo-Letters**, v.14, p.243-250, 1993.
- EIBL, R.; WERNER, S.; EIBL, D. Disposable bioreactors for plant liquid cultures at Litre-scale. **Engineering in Life Sciences**, v. 9, n. 3, p. 156-164, 2009.
- ENGELMANN, F. Plant cryopreservation: Progress and prospects. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 40, n. 5, p. 427-433, Sep-Oct 2004.
- ESCALONA, M.; LORENZO, J. C.; GONZÁLES, B.; DAQUINTA, M.; GONZÁLES, J. L.; DESJARDINS, Y.; BORROTO, C. G.; Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary imersion systems. **Plant Cell Reports**, v.18, p.743-748, 1999.

ETIENNE, H.; BERTHOULY, M. Temporary immersion systems in plant micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Holanda, v.69, p.215-231, 2002.

ETIENNE, H.; DECHAMP, E.; BARRY-ETIENNE, D.; BERTRAND, B. Bioreactors in coffee micropropagation. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v.18, n.1, p.45-54, 2006.

FEUSER, S.; NODARI, R. O., & GUERRA, M. P. Eficiência comparativa dos sistemas de cultura estacionária e imersão temporária para a micropropagação do abacaxizeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.23, n.1, p. 6-10, 2010.

FLORES, R.; ULIANA, S. C., PIMENTEL, N., & GARLET, T. M. B. Sacarose e sorbitol na conservação in vitro de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken (Amaranthaceae). **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v.4, n.3, 2013.

FREITAS, H. B. **Desenvolvimento e hormônios vegetais**. Editora da Universidade Federal da Bahia, Salvador. 2009.

FUCHIGAMI, L.H.; CHENG, T.Y.; SOLDNER, A. Abaxial transpiration and water loss in aseptically cultured plum. **Journal of American Society of Horticultural Science**, v. 106, n.4, p.519-522, 1981.

GERSBACH, P. V. The essential oil secretory structures of *Prostanthera ovalifolia*. **Annals of Botany**, v. 89, n. 3, p. 255-260, 2002.

GIRALDI, M., & HANASAKI, N. Uso e conhecimento tradicional de plantas medicinais no Sertão do Ribeirão, Florianópolis, SC, Brasil. **Acta botânica Brasilica**, v.24, n.2, p.395-406, 2010.

GOMES, E.C.; MING, L.C.; MOREIRA; E.A.; MIGUEL, O.G. Constituintes do óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br (Verbenaceae). **Revista Brasileira Farmacologia**; v.74, p. 29-32, 1993.

GOMES, H.T.; BARTOS, P.M.C.; MARTINS, A.E.; OLIVEIRA, S.O.D.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E. Assessment of mint (*Mentha spp.*) species for large-scale production of plantlets by micropropagation. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v.37, n.4, p. 405-410, 2015.

GOULART, S. L.; MARCATI, C. N. Anatomia comparada do lenho em raiz e caule de *Lippia salviifolia* Cham. (Verbenaceae). **Revista Brasileira de Botânica**. v. 31, n. 2, p. 263-275, abr-jun. 2008.

GROUT, B.W.W.; ASTON, J.M. Transplanting of cauliflower plants regenerated from meristem culture: I. Water loss and water transfer related to changes in leaf wax and to xylem regeneration. **Horticulture Research**.v.17, n.1-7, 1977.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**, v. 1. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, p. 183-260, 1998.

HABERLANDT, G. Culturversuche mit isolierten. Pflanzenzellen. Sitzungsberichte der Kaiserlichen. Akademie der Wissenschaften. **Mathematisch- Naturwiss.** Kl, Abt I, p.69-92, 1902.

HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; DAVIS, JR, F.T.; GENEVE, R.L. **Plant Propagation: principles and practices.** 7th ed. Prentice-Hall, New Jersey, USA, p.880, 2002.

JULIÃO, L. S., TAVARES, E. S., LAGE, C. L. S., & LEITÃO, S. G. Cromatografia em camada fina de extratos de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill) N.E.Br. (erva-cidreira). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, p. 36-38, 2003.

JAUSORO, V.; LLORENTE, B.E.; APÓSTOLO, N.M. Structural differences between hyperhydric and normal *in vitro* shoots of *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex DC) Mattos (Bignoniaceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, p. 183–191, 2010.

KAMARAINEN, K.; VIRTANEN E.; ROKKA V. E. P. A. T. Novel bioreactor technology for mass propagation of potato microtubers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** v. 101, n. 2, p. 245-249, 2010.

KRAUS, J.E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal.** Rio de janeiro: EDUR, p.198, 1997.

KEATMETHA, W.; SUKSA-ARD, P.; MEKANAWAKUL, M.; TE-CHATO, S. *In vitro* germplasm conservation of *Garcinia mangostana* L. and *Lansium domesticum* Corr. **Walailak Journal of Science and Technology**, v.3, n.1, p.33-50, 2006.

LARIBI, B.; ROUATBI, N., KOUKI, K., & BETTAIEB, T. *In vitro* propagation of *Stevia rebaudiana* (Bert.)—A non-caloric sweetener and antidiabetic medicinal plant. **International Journal of Medicinal and Aromatic Plants**, v.2, n.2, p. 333-339, 2012.

LÉDO, A. S.; SECA, G. S. V.; BARBOZA, S. B. S. C.; SILVA JÚNIOR, J. F. Crescimento inicial de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) em diferentes meios de germinação *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 4, 2007.

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**, Santa Maria, v. 41, n. 8, p. 1354-1361, 2011.

LIMA, G. P. P.; SILVA, C. R. A.; WILLADINO, L. G.; CÂMARA, T. J., & VIANELLO, F. **Polyamines, Gelling Agents in Tissue Culture, Micropropagation of Medicinal Plants and Bioreactors**, INTECH Open Access Publisher, 2012.

LORENZI, H; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas.** Nova Odessa\ São Paulo: Instituto Plantarum, p.11-19 2008.

LORENZO, J. C.; GONZÁLEZ, B. L., ESCALONA, M.; TEISSON, C., & BORROTO, C. Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.54, n.3, p. 197-200, 1998.

- LUDWING-MULLER, J.; EPSTEIN, E. Indole-3-butyric acid in *Arabidopsis thaliana*. III. In vivo biosynthesis. **Plant Growth Regulation**, v. 14, p.7-14, 1994.
- LUZ, J. M. Q.; SANTOS, V. A.; RODRIGUES, T. M.; ARRIGONI BLANK, M. F. & ASMAR, S. A. Estabelecimento *in vitro* e aclimatização de *Lippia alba* (Mill.) NE Brown. **Revista brasileira plantas medicinais**, v. 16, n. 2, supl. 1, p. 444-449, 2014.
- MAGALHÃES, P.M. de. Agrotecnología para el cultivo de fáfia o ginseng brasileiro. In: MARTINEZ, J.V. *et al.* **Fundamentos de agrotecnología de cultivo de plantas medicinales iberoamericanas**. Santafé de Bogotá: Convênio Andrés Bello/CYTED, p.323-332, 2000.
- MALLÓN, R.; COVELO, P., & VIEITEZ, A. M. Improving secondary embryogenesis in *Quercus robur*: application of temporary immersion for mass propagation. **Trees**, v.26, n.3, p. 731-741, 2012.
- MALUTA, F. A.; BORDIGNON, S. R.; ROSSI, M. L.; AMBROSANO, G. M. B., & RODRIGUES, P. H. V. Notas Científicas Cultivo *in vitro* de cana-de-açúcar exposta a diferentes fontes de luz. **Pesquisa Agropecuária brasileira Brasília**, v.48, n.9, p. 1303-1307, 2013.
- MARCHIORETTO, M. S.; MIOTTO, S. T. S.; JOSAFÁ C. Padrões de distribuição geográfica das espécies brasileiras de *Pfaffia* (Amaranthaceae). **Rodriguésia**, p. 667-680, 2009.
- MARCHIORETTO, M. S; MIOTTO, S. T. S; SIQUEIRA, J. C. The genus *Pfaffia* Mart. (Amaranthaceae) in Brazil. **Hoehnea**, v. 37, n. 3, p. 461-511, 2010.
- MELO, J. I. M.; MEDEIROS, A. I.; SOUSA, R. T. M.; BARBOSA, L. M. M. A., & ANDRADE, W. M. Verbenacea Sensus Lato um trecho da Esec Raso da Catarina, Bahia, BRASIL. **Revista Caatinga**, v.23, n.3, p. 41-47, 2010.
- MEHROTRA, S.; GOEL, M.K.; KUKREJA, A.K.; MISHRA, B.N. Efficiency of liquid culture systems over conventional micropropagation: A progress towards commercialization. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, p. 1484-1492, 2007.
- MOLDENKE, H.N. Material towards a monography of *Lippia l.* **Phytologia** v.12, n.6, p. 71, 1965.
- MONTANARI, I. JR.; MAGALHÃES, P. M.; QUEIROGA, C.L. Influence of plantation density and tenors of  $\beta$ -ecdysone in *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen. **Acta Horticulturae V. III** N. 502. p. 125-128, 1999.
- MONTANARI JUNIOR, I. Exploração econômica de plantas medicinais da Mata Atlântica. In: SIMÕES, L.L.; LINO, C.F. (Orgs). **Sustentável Mata Atlântica: a exploração de seus recursos florestais**. São Paulo: Senac, p. 35-54, 2002.
- MONTEIRO, M. V. B., de MELO, L. A. K. R., BERTINI, L. M., de MORAIS, S. M., & NUNES-PINHEIRO, D. C. S. Topical anti-inflammatory, gastroprotective and antioxidant effects of the essential oil of *Lippia sidoides* Cham. leaves. **Journal of ethnopharmacology**, v.111, n.2, p. 378-382, 2007.



MORAIS, T. P.; LUZ, J. M. Q.; SILVA, S. M.; RESENDE, R. F., & SILVA, A. S. Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais. **Revista Brasileira Plantas. Mediciniais., Botucatu**, v.14, n.1, p.110-121, 2012.

MOREIRA, A. L., SILVA, A. B. D., SANTOS, A., REIS, C. O. D., & LANDGRAF, P. R. C. *Cattleya walkeriana* growth in different micropropagation systems. **Ciência Rural**, n.43, n.10, p. 1804-1810, 2012.

MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v.25, p.1335-166, 1974.

NASCIMENTO, M. M.; FERREIRA, M. A. C.; MALOSSO, M. G. Produção de mudas de carobinha (*Jacaranda decurrens* Cham.) em sistema de imersão temporária com biorreatores do tipo RITA. **Revista brasileira de plantas medicinais**, v. 14, n. 2, p. 414-417, 2012.

NAVROSKI, M. C. I.; WALDOW, D. A. G., REINIGER, L. R. S., GOLLE, D. P., CURTI, A. R., & PEREIRA, M. O. Multiplicação *in vitro* de segmentos apicais caulinares de segurelha (*Satureja hortensis* L.). **Revista brasileira plantas medicinais**, v.16, n.1, p.117-121, 2014.

NICOLOSO, F. T., ERIG, A. C., RUSSOWSKI, D & MARTINS, C. F. Efeito de doses e fontes de carboidratos no crescimento de plantas de ginseng brasileiro *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen cultivadas *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, 2003.

NIZAM, K.; TE-CHATO, S. Optimizing of root induction in oil palm plantlets for acclimatization by some potent plant growth regulators (PGRs). **Journal of Agricultural Technology**, v.5, p.371-383, 2009.

NOLLA, D.; SEVERO, B. M. A.; MIGOTT, A. M. B. **Plantas medicinais**. 2. ed., Passo Fundo: Ed. Universidade de Passo Fundo, p. 71, 2005.

OMS - ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. **Estratégia de la OMS sobre medicina tradicional** 2002-2005. Ginebra: Organización Mundial de la Salud. 78 p, 2005.

PAEK, K. Y.; HAHN, E.J; SON, S.H.O. Application of bioreactors for large-scale micropropagation systems of plants. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 37, n. 2, p. 149-157, 2001.

PAEK K.Y; CHAKRABARTY D; HAHN E.J. Application of bioreactor systems for large production of horticultural and medicinal plants. **Plant Cell Tissue Organ Cult.** 81:28-300, 2005.

PAUNESCO, A. Biotechnology for Endangered Plant Conservation: A Critical Overview. **Romanian Biotechnological Letters**, Bucuresti, v. 14, n. 1, p. 4095-4103, 2009.

PASCUAL, M. E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; MATA, D. S., & VILLAR, A. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of ethnopharmacology**, v.76, n.3, p. 201-214, 2001.

PEREIRA, J. E. S.; FORTES, G. R. L. Multiplicação e aclimatização da macieira influenciada pelo tipo de explante e pelo tempo em meio de cultura de enraizamento. **Revista brasileira de fruticultura**, Jaboticabal, v.23 n.2, p.417- 420, ago, 2001.

PEARSE, A. G. E. **Histochemistry, theoretical and applied**, 2 ed. Londres, p-99,1960.

PEIXOTO, P. H. P.; SALIMENA, F. R. G., DE OLIVEIRA, S. M.; DA SILVA G., L.; DE OLIVEIRA P. P. M.; VICCINI, L. F., & OTONI, W. C. *In vitro* propagation of endangered *Lippia filifolia* Mart. and Schauer ex Schauer. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v.42, n.6, p. 558-561, 2006.

PENCHEL, R.M.; OTONI, W.C.; XAVIER, A. Tecnologia de biorreatores e preparação fotoautotrófica *in vitro*. In : Borém, A. (Ed). **Biotecnologia florestal**. Viçosa: UFV, c.4, p. 75-92, 2007.

POLZIN, F.; SYLVESTRE, I.; DÉCHAMP, E.; ILBERT, P.; ETIENNE, H., & ENGELMANN, F. Effect of activated charcoal on multiplication of African yam (*Dioscorea cayenensis-rotundata*) nodal segments using a temporary immersion bioreactor (RITA<sup>®</sup>). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v.50, n.2, p.210-216, 2014.

RAO, S. R.; RAVISHANKAR, G. A. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 20, p. 101–153, 2002.

RADMANN, E. B.; GONÇALVES, E. D.; FORTES, G. R. L. Concentrações de ácido indolbutírico e período de escuro no enraizamento *in vitro* de amora-preta (*Rubus* sp.) cv. Ébano. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.25, p.124-126, 2003.

RAFIEIAN-KOPAEI, M., & SEWELLI, R. D. The history and ups and downs of herbal medicines usage. **Journal of HerbMed Pharmacology**, 2014.

RAFIEIAN- KOPAEI, M. Medicinal plants and the human needs. **Journal of Herb Med Pharmacology**, v.1, n. 1, 2013.

RAMOS 2011: <http://www.guiadafarmacia.com.br/fitoterapicos/conjuntura>. Acesso em :15 novembro de 2014.

RECH, E.L.; PIRES, M.J.P. Tissue culture propagation of *Mentha* spp. by the use of axillary buds. **Plant Cell Reports**, v.5, n.1, p.17-8, 1986.

REZENDE, J. C. de; PASQUAL, M.; CARVALHO, S. P de; PEREIRA, A. R.; VILLA, F. Influência do meio de cultura e concentração de ágar no crescimento e desenvolvimento de plântulas de café oriundas de embriogênese somática direta. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 9, n. 1, p. 21-26, 2008.

SAGAWA, Y.; KUNISAKI, J. T. Micropropagation of floricultural crops. In: AMMIRATO, P. V.; EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; BAJAJ Y. P. S. (Ed.). **Handbook of plant cell culture 5**. New York: McGraw-Hill, p. 22-56, 1989.

SALISBURY, F.; ROSS, C. **Fisiologia vegetal**. México: Grupo Editorial Iberoamérica, p.759, 1994.

SALIMENA, F.; FRANÇA, F.; SILVA, T. R. S. Verbenaceae. In: Giulietti, A. M.; Rapini, A.; Andrade, M. J. G.; Queiroz, L. P.; Silva, J. M. C. (orgs). **Plantas Raras do Brasil**. 1 ed., Belo Horizonte, MG, Universidade Estadual de Feira de Santana, 2002.

SAMPAIO, A. L. B. M. M.; ALVIMLL, A. B. F. M.; BELLINTANILL, S. V. R. M. C., & SANTANAIV, J. R. F. Agentes osmóticos e temperatura na conservação *in vitro* de semente. **Ciência Rural**, v.41, n.8, p.1354-1361, 2011.

SHARMA, N.; SATSANGI, R.; PANDEY, R.; SINGH, R.; KAUSHIK, N., & TYAGI, R. K. *In vitro* conservation of *Bacopa monnieri* (L.) using mineral oil. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v.111, n.3, p.291-301, 2012.

SCHEFFER, M. C.; MING, L.C.; ARAUJO, A.J. **Conservação de recursos genéticos de plantas medicinais**, 2005.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E.; COSTA, F.H.S.; CAMILLO, J.; SILVA, D.B.; ALVES, R.B.N.; VIEIRA, R.F. Tissue cultures storage of Brazilian medicinal plants germoplasm. **Acta horticulturae**, v. 860, p.211-24, 2010.

SHIOBARA, Y.; INOUE, S.; KATO, K.; YUKARI, N.; NISHIGUCHI, Y.O.; NISHIMOTO, N.; OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M.K.; HASHIMOTO, G. A nortripernoid, triterpenoids and ecdysteroids from *Pfaffia glomerata*. **Phytochemistry**, v.32, n.6, p.1527-30, 1993.

SCHOCKEN, N.R.L. **Obtenção de quimiotipos híbridos de *Lippia alba* (Mill.) N.E. BROWN**. 96p. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) - Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas, 2007.

SILVA, M, C.; CARVALHO, J. C. T. Plantas medicinais. In: CARVALHO, J. C. T. **Fitoterápicos antiinflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. São Paulo: Tecmed, p. 39- 41, 2004.

SILVA, T. L. D.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. *In vitro* conservation of *Piper aduncum* and *Piper hispidinervum* under slow-growth conditions. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.46, n.4, p.384-389, 2011.

SILVEIRA, P. F.; BANDEIRA, M. A. M. & ARRAIS, P. S. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v.18, n.4, p. 618-26, 2008.

SIMONTON, W.; ROBACKER, C. & KRUEGER, S. A programable micropropagation apparatus using cycled liquid medium. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.27, p.211-218, 1998.

SIQUEIRA, J.C. Amaranthaceae In M.G.L In: WANDERLEY, M.G.L *et al* (Orgs) **Flora fanerogâmica do Estado de São Paulo**. Hucitec, FAPESP, São Paulo, v.2, p.11-30, 2002.

SOUSA, F. C.; MELO, C. T., CITÓ, M. C.; FÉLIZX, F. H. C.; VASCONCELOS, S. M.; FONTELES, M. M & VIANA, G. S. Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: Uma

revisão da bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v.18, p. 642-654, 2008.

SOUZA, A. V.; PEREIRA, M. A. S. Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9, n. 4, p. 103-117, 2007.

SMITH, L. B.; DOWNS, R. J. **Flora Ilustrada Catarinense: amarantáceas**. Itajaí: [s.n.], 110 p, 1972.

TAGLIATI, C. A.; FÉRES, C. A. de O. Pesquisas toxicológicas e farmacológicas. In: LEITE, J. P. V. (Edit.) **Fitoterapia: Bases Científicas e Tecnológicas**. São Paulo: Atheneu, p. 119-140, 2009.

TAKAYAMA, S.; AKITA, M. Bioengineering aspects of bioreactor application in plant propagation. In: GUPTA, S. D.; IBARAKI, Y. (Eds.). **Plant tissue culture engineering**. Dordrecht: Springer, p. 83-100, 1994.

TAKAYAMA, S.; MISAWA, M. Mass propagation of *Begonia* × *hiemalis* plantlets by shake culture. **Plant and Cell Physiology**, v. 22, n. 3, p. 461-467, 1981.

TEISSON, C.; ALVARD, D.; BERTHOULY, M.; COTE, F.; ESCALANT, J.V. & ETIENNE, H. *In vitro* culture by temporary immersion: a new device. **Plantations**, v.2, n.5, p.32-33, 1995.

TEIXEIRA, J. B. Biorreatores. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n.24, p.36-41, 2002.

TONIETTO, A.; FORTES, G. D. L., & SILVA, J. D. Enraizamento de miniestacas de ameixeira. **Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal**, v.23, n.3, p.373-376, 2001.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: **Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq**, v.2. p.87-132, 1998.

ULISSES, C.; WILLADINO, L.; ALBUQUERQUE, C. C., & CÂMARA, T. R. Clonagem vegetal. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, v.7, p. 86-91, 2013.

VALE F. P.; BERNARDES, J. D. Levantamento Etnobotânico das Plantas Mediciniais utilizadas pela população de Iporá, 2006.

VALENTIN, A.; PÉLISSIER, Y.; BENOIT, F.; MARION, C.; KONE, D.; MALLIE, M. & BESSIERE, J. M. Composition and antimalarial activity *in vitro* of volatile components of *Lippia multiflora*. **Phytochemistry**, v.40, n.5, p. 1439-1442, 1995.

VELLOSO, C. C.; PEGLOW, K. **Plantas Mediciniais**. Porto Alegre: EMATER/ ASCAR, 72 p. (Coleção Aprendendo a fazer melhor, n. 4), 2003.

VICINI, L. F.; PIERRE, P. M. O.; PRAÇA, M. M.; DA COSTA, D. S.; DA COSTA ROMANEL, E.; DE SOUSA, S. M. & SALIMENA, F. G. Chromosome numbers in the genus *Lippia* (Verbenaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 256, n. 1, p. 1-4. 2005.

VILELA- MORALES, E.A.; VALOIS, A.C.C. Recursos genéticos vegetais autóctones e seus usos no desenvolvimento sustentável. **Cadernos de Ciências & Tecnologia**. V. 17, n.2, p.11-42, maio\agosto, 2000.

WADA, S.; NIEDZ, R. P., & REED, B. M. Determining nitrate and ammonium requirements for optimal *in vitro* response of diverse pear species. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, P.1-9, 2015.

WATT, M. P. The status of temporary immersion system (TIS) technology for plant micropropagation. **African Journal Biotechnology**, v. 11, p. 14025-14035, 2012.

WENDLING, I.; DUTRA, L. F.; GROSSI, F. **Produção de mudas de espécies lenhosas**. Colombo, PR: (Série Documentos, 130). Embrapa Florestas, 2006.

WITHERS, L.A; ENGELMANN, F. *In vitro* conservation of plant genetic resources. In: ALTMAN, A. (Ed.). **Agricultural biotechnology**. New York: Marcel Dekker, p. 57-88, 1997.

WITHERS, L. A.; WILLIAMS, J. T. Conservação *in vitro* de recursos genéticos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI, p. 297-330, 1997.

ZHAO, Y.; SUN, W.; WANG, Y.; SAXENA, P. K., & LIU, C. Z. Improved mass multiplication of *Rhodiola crenulata* shoots using temporary immersion bioreactor with forced ventilation. **Applied biochemistry and biotechnology**, V.166, N.6, P. 1480-1490, 2012.

ZIV, M. The control of bioreactor environment for plant propagation in liquid culture. **Environmental Effects and their Control in Plant Tissue Culture** 393, p. 25-38, 1995.

## CAPÍTULO 1

---

**MICROPROPAGAÇÃO DE *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pederseng e *Lippia filifolia*  
(Mart & Schauer and Schauer) EM DIFERENTES SISTEMAS DE CULTIVO**

## RESUMO

O objetivo do trabalho foi avaliar a micropropagação de *Pfaffia glomerata* e *Lippia filifolia* a partir dos diferentes sistemas de cultivo: semi-sólido, líquido estacionário, líquido sob agitação e biorreatores de imersão temporária modelos RITA<sup>®</sup> e tipo frascos gêmeos BIT - Embrapa<sup>®</sup>. Para a multiplicação *in vitro* foram utilizados como explantes segmentos nodais de 1,0 cm, com pelo menos uma gema lateral. O material foi cultivado em meio de MS suplementado de 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e mantido em sala de crescimento com temperatura e luminosidade controladas. Após 30 dias, avaliaram-se nos cinco sistemas de cultivo a percentagem de sobrevivência, a altura, a taxa de multiplicação e a taxa de enraizamento, além do peso da massa fresca (g) e seca (g) dos brotos regenerados. Para o enraizamento *in vitro* foram utilizados como explantes segmentos nodais contendo uma gema axilar e inoculados em meio de MS semi-sólido, suplementado com as auxinas AIA, ANA e AIB nas concentrações não combinadas de 0; 0,1; 0,5; 1,0; 2,5 e 5,0 µM., O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com pelo menos quatro repetições por tratamento. Como resultado, verificou-se que *P. glomerata* apresentou altas taxas de multiplicação nos sistemas de cultivo líquido e semi-sólido. O cultivo em biorreatores de imersão temporária modelo RITA<sup>®</sup> proporcionou melhores resultados para ganho de massa fresca e seca, além de altura de plantas. Na fase de aclimatização, os melhores resultados para sobrevivência foram observados em plantas de *Pfaffia* com altura superior a 10,0 cm. Já para a multiplicação de *L. filifolia*, observou-se que o sistema de cultivo semi-sólido proporcionou alta taxa de sobrevivência e formação de plantas com altura média de 7,0 cm. Variações morfológicas foram verificadas durante a multiplicação das mudas no sistema de cultivo líquido com e sem agitação. O sistema de cultivo de biorreatores de imersão temporária modelo RITA<sup>®</sup> proporcionou resultados superiores quando comparados ao modelo BIT - Embrapa<sup>®</sup>. De maneira geral, a *L. filifolia* apresentou baixas taxas de enraizamento e consequentemente baixa sobrevivência na fase de aclimatização.

**Palavras-chave:** *P. glomerata*; *L. filifolia*; sistemas de propagação, meio de cultura, sistemas de imersão temporária.

## 1. INTRODUÇÃO

No Brasil, o conhecimento e a utilização das plantas como alimento e fonte terapêutica vêm sendo repassado desde as antigas civilizações até os dias atuais (TOMAZZONI *et al.*, 2006; AGUIAR & BARROS, 2012). Além disso, as populações de espécies medicinais de interesse comercial no seu habitat natural estão cada vez mais reduzidas pelas pressões exercidas pelo crescimento das cidades, agricultura e o extrativismo severo, fatores que podem colocar em risco de extinção as populações naturais (OLIVEIRA & AKISSUE, 2000). Adicionalmente, em razão da crescente demanda de matérias-primas pela indústria de fitoterápicos, torna-se necessário o desenvolvimento de técnicas que possam produzir mudas com qualidade e garantir o uso das espécies medicinais de maneira segura e eficaz.

A Organização Mundial de Saúde (OMC, 2005) relata que cerca de 85% da população mundial faz uso de medicamentos à base de espécies medicinais utilizadas com finalidades profilática, curativa, paliativa ou com fins de diagnóstico. Para garantir o acesso seguro e a inserção de fitoterápicos e plantas medicinais nos hospitais públicos, o Brasil criou a política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos aprovada por decreto 5.813, de 22 de junho de 2006, e a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde (SUS), aprovada pela Portaria Ministerial MS/GM nº 971 de 03 de maio de 2006 (AMARAL & SILVA, 2003). Entre as espécies medicinais que podem ser utilizadas destacam-se a *Pfaffia glomerata* e a *Lippia filifolia*.

A espécie *P. glomerata* conhecida como ginseng brasileiro, vem sendo objeto de estudo devido as substâncias contidas em suas raízes tuberosas que possuem propriedades medicinais ( $\beta$ -ecdisterona, rubroesterona, ácido páfífico) e vem auxiliando no tratamento da diabetes, na purificação do sangue, na regularização das funções hormonais e sexuais (NISHIMOTO *et al.*, 1986; NISHIMOTO *et al.*, 1987; SHIOBARA *et al.*, 1993). Já a espécie *L. filifolia* apresenta importância econômica, devido as suas propriedades aromáticas presentes no seu óleo essencial, que são produzidos pelas folhas (PEIXOTO *et al.*, 2006). As espécies pertencentes ao gênero *Lippia* possuem propriedades medicinais e aromáticas, sendo consideradas fontes de compostos biologicamente ativos (AGUIAR *et al.*, 2008). Nesse gênero várias espécies apresentam propriedades medicinais comprovadas como a espécie *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br ex Britt & Wilson utilizada na medicina tradicional para o tratamento de indigestão, antiespasmódico (PASCUAL *et al.*, 2001).

Diante da potencialidade apresentada por essas espécies, torna-se importante aprimorar as técnicas de multiplicação dos genótipos, principalmente com boas condições



fitossanitárias. A micropropagação é uma técnica efetiva na propagação em escala de espécies com genótipos de interesse, permitindo, inclusive, realizar a limpeza clonal a fim de se obter culturas livres de patógenos, em curto período de tempo, de forma rápida e eficiente (LIMA *et al.*, 2011).

No entanto, rotineiramente esta técnica usa a produção de plantas em frascos pequenos contendo meio de cultura semi-sólido, o que restringe o número de explantes por frasco e, portanto, tem como desvantagem o custo elevado da produção (TEIXEIRA, 2002; MEHTA *et al.*, 2012; SANTORO *et al.*, 2013).

Nesse contexto, novos sistemas de micropropagação têm sido desenvolvidos para se obter melhorias no processo de produção vegetal *in vitro* em larga escala, visando principalmente aumentar a produtividade e reduzir os custos. Entre os novos sistemas, destacam-se os sistemas semi-automatizados que utilizam biorreatores de imersão temporária (MURCH *et al.*, 2004). Várias espécies medicinais vêm sendo propagadas em larga escala por meio do uso de biorreatores (LIMA *et al.*, 2012; WATT, 2012; POLZIN *et al.*, 2014), apesar de, até o momento, poucos relatos do uso de biorreatores terem sido encontrados para as espécies desse estudo.

O presente trabalho objetivou-se avaliar a propagação *in vitro* das espécies *P. glomerata* e *L. filifolia* em diferentes sistemas de cultivo, com ênfase ao uso de biorreatores de imersão temporária.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Local de realização dos experimentos**

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos II (LCT-II) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em Brasília – DF.

### **2.2. Material Vegetal**

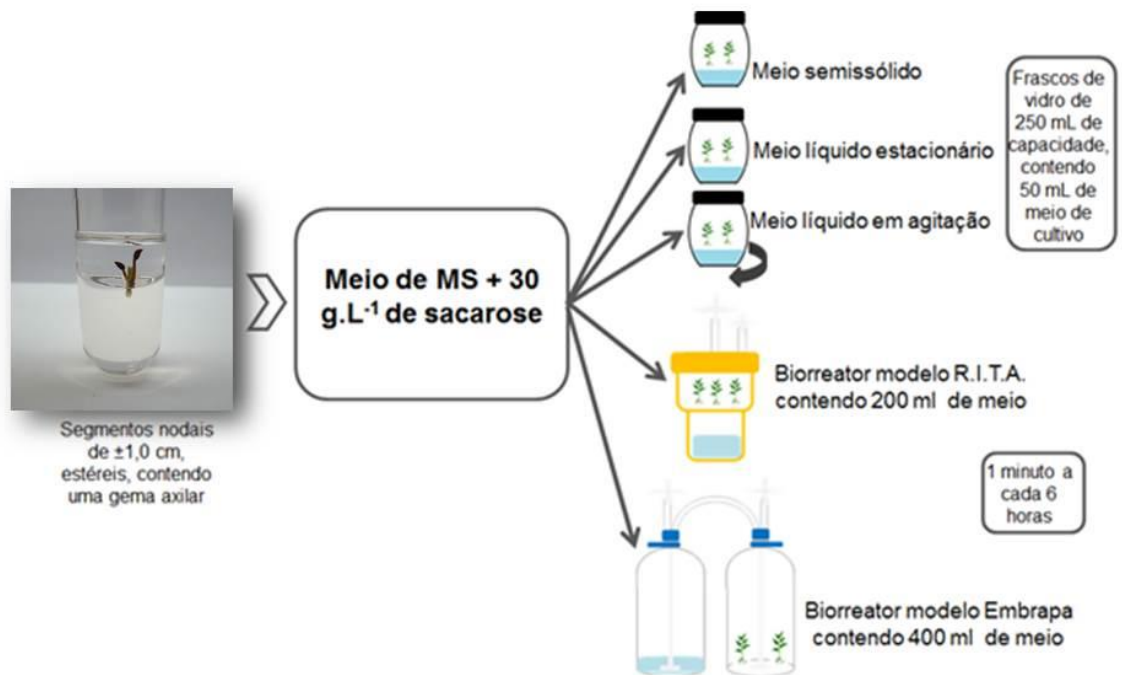
Os explantes iniciais de *Lippia filifolia* e *Pfaffia glomerata* foram obtidos da Coleção de Germoplasma *in vitro* da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF. Os acessos utilizados foram o CCG 150 para *Pfaffia glomerata* e o CCG 46 para *Lippia filifolia*.

### **2.3. Micropropagação em diferentes sistemas de cultivo**

A micropropagação foi realizada a partir da inoculação de segmentos nodais de aproximadamente 1,0 cm de comprimento e com pelo menos uma gema lateral, estéreis em cinco diferentes sistemas de cultivo: 1) semi-sólido, no qual foram utilizados frascos de vidro de 250 mL de capacidade, contendo 50 mL de meio nutritivo (controle); 2) meio líquido estacionário, no qual foram utilizados frascos de vidro 250 mL de capacidade, contendo 50 mL de meio de cultivo; 3) meio líquido, sob agitação orbital de 100 rpm, utilizando frascos de vidro 250 mL de capacidade contendo 50 mL de meio de cultivo; 4) sistema de imersão temporária modelo RITA<sup>®</sup>, com frascos com capacidade de 500 mL, contendo 200 mL de meio líquido, e; 5) sistema de imersão temporária modelo BIT - Embrapa<sup>®</sup> com frasco de 5 L de capacidade, contendo 400 mL de meio líquido (Figura 1).

Em todos os sistemas de cultivo, o meio nutritivo foi composto pela formulação salina e vitaminas de MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose. O pH dos meios foi ajustado para 5,8 ± 0,1 e a autoclavagem realizada à 121 °C por 20 minutos e 1,3 atm de pressão. Ressalta-se que no caso do sistema tradicional de cultivo semi- sólido adicionou-se ao meio o agente gelificante Phytigel (2,5 g.L<sup>-1</sup>) (SIGMA).

Todo o processo de inoculação dos explantes foi realizado em condições assépticas, em câmara de fluxo laminar. Após a inoculação, os frascos foram vedados com filme plástico transparente e os explantes mantidos em sala de crescimento com luminosidade e temperatura controlada. As repetições de cada tratamento consistiram de 5 explantes para os sistemas tradicionais de cultivo (semi-sólido, líquido estacionário e sob agitação), 20 explantes, no caso do RITA<sup>®</sup> e 40 explantes no sistema de biorreator modelo BIT -Embrapa<sup>®</sup>, mantendo-se a relação de 10 mL de meio de cultura por explante.



**Figura 1.** Esquema ilustrativo dos cinco tipos de sistemas de cultivo *in vitro* utilizados durante a micropropagação das espécies *Pfaffia glomerata* e *Lippia filifolia*.

Foram feitas cinco repetições biológicas de 30 dias cada. Após o cultivo, foi avaliada a porcentagem de sobrevivência, a altura dos brotos, a taxa de multiplicação, além de ter sido observado o enraizamento (%). No caso da espécie *P. glomerata* avaliou-se também o peso da massa fresca e seca da parte aérea e da raiz (g). O peso seco dos explantes foi obtido a partir de secagem em estufa de ventilação forçada com temperatura de 65 °C até peso constante.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco repetições por tratamento.

#### 2.4. Descrição dos Biorreatores de imersão temporária

Nos sistemas de biorreatores de imersão temporária, dois tipos foram utilizados para a multiplicação de plantas: RITA<sup>®</sup> (Recipiente de Imersão Temporária Automatizado) (TEISSON *et al.*, 1995) e o Biorreator de imersão temporária tipo frascos gêmeos BIT - modelo da Embrapa<sup>®</sup> (TEIXEIRA, 2002).

O modelo RITA<sup>®</sup> foi constituído por dois compartimentos em um só frasco com capacidade total de 500 mL, onde ocorreu a separação espacial do meio com os explantes. Os

frascos foram conectados por mangueiras de silicone a um compressor ligado a um aparelho digital reverso. Neste estudo, o meio de cultura líquido foi conduzido de 6 em 6 horas para a parte superior do frasco, onde se localizavam os segmentos nodais, que ficavam submersos durante 1 minuto, até que o meio voltasse totalmente para a parte inferior do frasco. O tempo de imersão e a frequência foram controlados por temporizadores eletrônicos. O Sistema tipo frascos gêmeos BIT – modelo Embrapa<sup>®</sup> foi constituído por dois frascos de 5 L cada, conectados por tubos de silicone; num dos frascos ficava estocado o meio de cultura e, no outro, o cultivo dos explantes, modelo similar ao sistema de frascos gêmeos-BIT, utilizado por Escalona *et al.* (1999), que foi desenvolvido por Teixeira (2002).

Nesse sistema, a cada 6 horas o ar fornecido por um compressor foi esterilizado por filtro de membrana de 0,22 µm (Millipore), entrando no frasco que contém o meio de cultura e fazendo com que o líquido fosse transferido para o outro frasco que continha os explantes. Após 1 minuto de imersão, ocorreu a reversão do processo: o meio nutritivo retornava ao frasco original. A frequência e o tempo de imersão foram controlados por temporizadores eletrônicos.

## **2.5. Enraizamento**

Para a *L. filifolia* (uma vez que para *P. glomerata* os brotos sob cultivo enraizaram com facilidade durante a multiplicação) as brotações não enraizadas durante o processo de multiplicação foram individualizadas, e, em seguida, inoculadas em frascos de vidro de 250 mL de capacidade, contendo 50 mL de meio de cultivo, formado pelos sais e vitaminas de MS, acrescidos de 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose. A esse meio de cultura foram testadas as auxinas AIB (ácido indolbutírico), AIA (ácido indolacético) e ANA (ácido naftalenacético), em diferentes concentrações: 0; 0,1; 0,5; 1,0; 2,5 e 5,0 µM. O pH foi ajustado para 5,8± 0,1 antes da adição do agente gelificante Phytigel (2,5 g.L<sup>-1</sup>) e da esterilização por autoclavagem a realizada à 121 °C por 20 minutos e 1,3 atm de pressão.

Na etapa de enraizamento os explantes de *L. filifolia* foram cultivados por até 150 dias, sendo ao final do cultivo avaliados quanto a sobrevivência (%), comprimento da parte aérea (cm), enraizamento (%), além da formação de calos na base do explante (%). As brotações que apresentaram calos tiveram seus calos classificados por meio de uma escala, que compreendeu: 1 (um): ausência de formação de calo; 3 (três): pouca formação de calo; 5 (cinco): média formação de calo, e; 7 (sete): muita formação de calo.

Nesse experimento, o delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com quatro repetições por tratamento, sendo cada parcela constituída por cinco explantes.

## **2.6. Condições do cultivo *in vitro***

Durante os experimentos de microestaquia e enraizamento os cultivos foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de  $25 \pm 2$  °C, fotoperíodo de 16 horas e radiação luminosa de  $52 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , fornecida por lâmpadas LED (Philips - Green Power 20W 60Hz).

## **2.7. Aclimatização**

As plantas enraizadas foram removidas dos seus respectivos frascos de cultivo e lavadas em água corrente para eliminação do meio de cultura. O plantio foi realizado em copos plásticos de 500 mL de capacidade preenchidos com substrato comercial (Bioplant<sup>®</sup>). Os copos plásticos foram cobertos com sacos plásticos transparentes e individuais, furados na parte superior e fixados com uma liga de elástico.

Após o plantio, as mudas foram pré-aclimatizadas por 30 dias em incubadora tipo B.O.D (Percival<sup>®</sup>) com temperatura de  $25 \pm 2$  °C, fotoperíodo de 16 horas e radiação luminosa de  $20 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .

Por fim, as plantas foram transferidas e mantidas por até 30 dias em casa de vegetação com cobertura de filme de polietileno transparente (150 micras), umidade relativa de  $75 \pm 5\%$ , temperatura de  $30 \pm 3$  °C, luminosidade de  $450\text{--}500 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  e fotoperíodo em torno de 12 horas. As irrigações foram realizadas manualmente a cada 2 dias. Após a aclimatização, a sobrevivência (%) das plantas foi avaliada.

## **2.8. Análise estatística**

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo Teste de Scott-Knott a 5% de significância. O programa utilizado para realizar as análises estatísticas foi o Sisvar 4.4 (FERREIRA, 2011).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Micropropagação de *Pfaffia glomerata* em diferentes sistemas de cultivo

Os resultados referentes à propagação de *P. glomerata* em diferentes sistemas de cultivo encontram-se descritos na Tabela 1. Observou-se que, após 30 dias do cultivo *in vitro*, os explantes se desenvolveram eficientemente com a formação tanto de parte aérea quanto de raízes. Com relação a percentagem de sobrevivência, não foram verificadas diferenças significativas entre os sistemas de cultivo estudados, tendo os tratamentos em meio líquido atingido médias superiores a 95%.

**Tabela 1.** Influência de cinco sistemas de cultivo *in vitro* na micropropagação de *Pfaffia glomerata* após 30 dias.

Sistema de cultivo	Sobrevivência (%)	Altura PA (cm)	Taxa de multiplicação	Enraizamento (%)
Semi-sólido	87,5 ± 7,7a	7,7 ± 0,7 a	5,1 ± 0,2 a	97,5 ± 2,5 a
Líquido estacionário	95,0 ± 5,0a	7,4 ± 1,1 a	3,4 ± 0,2 b	98,0 ± 2,0 a
Líquido agitação	100,0 ± 0,0a	9,2 ± 0,7 a	4,0 ± 0,3 a	100,0 ± 0,0 a
RITA <sup>®</sup>	100,0 ± 0,0a	8,7 ± 0,8 a	4,1 ± 0,1 a	100,0 ± 0,0 a
BIT	100,0 ± 0,0a	4,1 ± 0,9 b	3,0 ± 0,5 b	62,7 ± 11,3 b

Médias ± erro padrão seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. RITA<sup>®</sup>= Recipiente de Imersão Temporário Automatizado; BIT= Biorreator de Imersão Temporária (modelo Embrapa); PA= parte aérea.

Para as variáveis altura e percentagem de enraizamento, foi verificado para o cultivo em BIT media significativamente menor que as medias dos demais tratamentos. Já para a taxa de multiplicação, os tratamentos, semi-sólido, líquido sob agitação e RITA se destacaram com taxas médias entre 4,0 e 5,1, não diferindo estatisticamente entre si, mas sendo superiores aos demais sistemas de cultivo testados.

Embora o sistema de cultivo líquido com agitação e o sistema de cultivo semi-sólido tenham sido estatisticamente iguais ao sistema de cultivo de imersão temporária RITA, este sistema de cultivo pode ser o mais recomendado, sobretudo para períodos de cultivo superiores a 30 dias, quando diferenças significativas entre os tratamentos poderão aparecer. A superioridade dos sistemas de cultivo líquido para altura, provavelmente esteja relacionada com o maior contato da superfície dos explantes e de suas raízes com o meio de cultivo, pois estes favorecem a absorção de água e assimilação de nutrientes do meio de cultura (ZIV, 1995; BAQUE *et al.*, 2012; SCHERWINSKI- PEREIRA *et al.*, 2012).

Para a variável taxa de multiplicação, os tratamentos semi-sólido, líquido sob agitação e RITA<sup>®</sup> se destacaram, com taxas médias entre 4,0 e 5,1, não diferindo estatisticamente entre si, mas sendo superiores aos demais sistemas testados.

O sistema de imersão temporária apresenta mais vantagens quando comparado ao sistema semi-sólido, como a redução significativa dos custos com mão-de-obra, não há a necessidade de agentes solidificantes no meio de cultivo, o meio de cultivo pode ser removido sem a necessidade de se trocar o recipiente, maiores recipientes podem ser utilizados, maior quantidade de meio, a uniformização da produção de plantas, as repicagens podem ser reduzidas, a eliminação do estresse gasoso devido a constante renovação do ar do ambiente do frasco. Em comparação com o sistema de cultivo líquido com agitação, o material vegetal não permanece imerso continuamente no meio de cultura, prevenindo assim a hiperhidricidade nos brotos (TEIXEIRA, 2002).

Para Watt (2012), o sistema de cultivo de imersão temporária é considerado simples e de fácil manipulação, aumentando a produção em larga escala podendo ser utilizado por várias espécies vegetais, dentre elas microtuberculos de batata (PEREZ et al., 1999); abacaxi (SILVA et al. 2007), além de diversas plantas medicinais (SAGAWA & KUNIZAKI, 1989; ZHAO et al., 2012). No entanto não há relatos na literatura até o momento sobre a propagação em larga escala de *P. glomerata* através do sistema de imersão RITA<sup>®</sup>, demonstrando a impotência do presente trabalho.

Analisando-se comparativamente os resultados obtidos com o meio semi-sólido, resultados semelhantes foram obtidos durante a micropropagação de *Pfaffia* por Nicoloso et al. (1999) no cultivo *in vitro* de *P. glomerata*, utilizando estacas iniciais de 1,0 cm. Flores et al. (2010) também desenvolveram um protocolo de propagação *in vitro* de *P. glomerata* por meio de segmentos nodais cultivados em meio semi-sólido.

No presente estudo, a percentagem de enraizamento nos sistemas de cultivo semi-sólido, líquido estacionário, líquido sob agitação e RITA<sup>®</sup> demonstrou a eficiência na formação de raízes pela espécie, sem a necessidade de tratamentos específicos, tendo sido observado taxas de 100% de enraizamento dos explantes.

O uso de auxinas ao meio de MS é um procedimento normalmente utilizado para o enraizamento. Entretanto, algumas espécies não necessitam da presença desses reguladores, apresentando resultados satisfatórios na indução de raízes. Alguns autores relatam elevado índice de enraizamento em meio de cultura, isento de auxina, durante o cultivo *in vitro* de plantas como *P. glomerata*, *Tournefortia paniculata*, *Pothomorphe umbellata*, *Artocarpus atilis* e *Phyllanthus caroliniensis* (NICOLOSO et al., 2001; PEREIRA et al., 2000; ROUSE-

MILLER e DUNCAN, 2000; CATAPAN *et al.*, 2000; REDDY *et al.*, 2001). De acordo com Pinto e Lameira (2001) isso pode ocorrer possivelmente devido ao elevado nível endógeno de auxinas nas plantas.

Nesse contexto verifica-se que a micropropagação de *P.glomerata* produz plantas completas em sistemas de cultivo semi-sólido, líquido com e sem agitação e sistema de imersão temporária RITA<sup>®</sup> sem a necessidade da adição de reguladores de crescimento para a indução de raízes.

### 3.1.1. Efeito dos diferentes sistemas de cultivo *in vitro* na produção de massa fresca e seca

Na Tabela 2 são apresentados os resultados referentes à influência dos diferentes sistemas de cultivo na produção de massa fresca e respectiva massa seca de *P. glomerata*.

**Tabela 2.** Análise de massa fresca (MF) e massa seca (MS) de parte aérea (PA) e sistema radicular (RZ) de *Pfaffia glomerata* após 30 dias de cultivo *in vitro*.

Sistema de cultivo	MF PA (mg)	MF RZ (mg)	MS PA (mg)	MS RZ (mg)
Semi-sólido	470,7 ± 99,7 a	58,4 ± 10,7 a	49,4 ± 8,8 a	10,1 ± 1,9 a
Líquido estacionário	316,3 ± 40,3 a	18,3 ± 6,1 a	28,1 ± 3,3 b	5,3 ± 1,5 a
Líquido agitação	640,9 ± 59,9 a	78,7 ± 33,9 a	53,8 ± 7,3 a	11,6 ± 3,4 a
RITA <sup>®</sup>	525,8 ± 110,3 a	53,2 ± 8,6 a	69,4 ± 12,0 a	11,2 ± 1,5 a
BIT	468,3 ± 50,9 a	61,4 ± 8,1 a	53,6 ± 7,2 a	11,9 ± 3,4 a

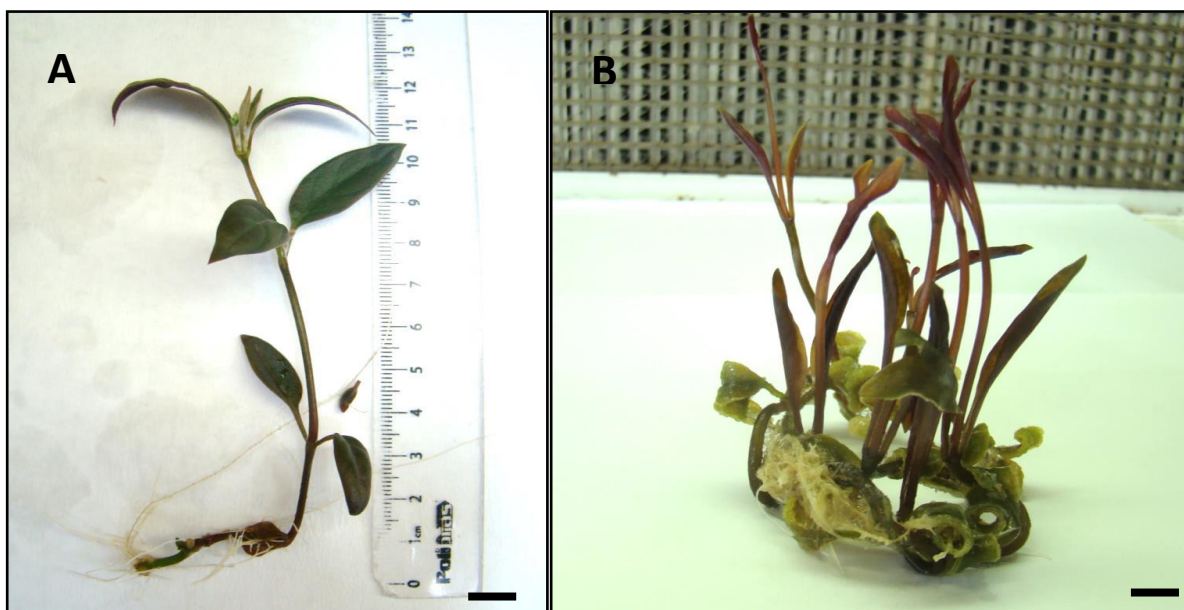
Médias ± erro padrão seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. RITA<sup>®</sup>= Recipiente de Imersão Temporário Automatizado; BIT= Biorreator de Imersão Temporária (modelo Embrapa).

De maneira geral, os tratamentos não diferiram estatisticamente, sendo igualmente eficientes na produção de matéria seca e fresca das plantas cultivadas *in vitro*, com exceção de massa seca da parte aérea para o tratamento líquido estacionário.

Nicoloso e Erig (2002) relatam que segmentos basais proporcionam maior taxa de multiplicação e maior ganho de biomassa fresca e seca em *Pfaffia glomerata*. Entretanto, no presente trabalho o tipo de estaca não foi avaliado para ganho de massa seca e fresca das plantas.

Em relação aos experimentos realizados em cultivo líquido estacionário e sob agitação foi observado que ambos os tratamentos não diferiram no ganho de biomassa fresca e seca das brotações em relação às demais, porém, apresentaram a formação de brotações com aparência hiperhídrica (Figura 2- B), fato não observado quando as mesmas foram cultivadas em meio semi-sólido (Figura 2- A) ou em qualquer dos biorreatores testados.





**Figura 2.** Planta de *Pfaffia glomerata* após 30 dias de cultivo em meio semi-sólido (A); Aspecto hiperhídrico de *Pfaffia glomerata* após 30 dias de cultivo em meio líquido com e sem agitação orbital (B) (Barra de escala= 1cm).

De acordo com Hazarika (2006), o cultivo *in vitro* em meio líquido pode proporcionar desordens fisiológicas no material, pelo acúmulo de água no apoplasto das células. Segundo Teixeira (2002) e Etienne e Berthouly (2002), o ambiente favorável dentro dos frascos de cultivo dos biorreatores, especialmente quanto ao controle das imersões do meio nutritivo líquido, a diminuição de estresses mecânicos, proporcionado pela ausência de agitação, além da aeração são fatores que podem ter contribuído para a ausência de hiperhidricidade nos materiais cultivados nesses sistemas de cultivo.

### 3.1.2. Aclimatização de *Pfaffia glomerata*

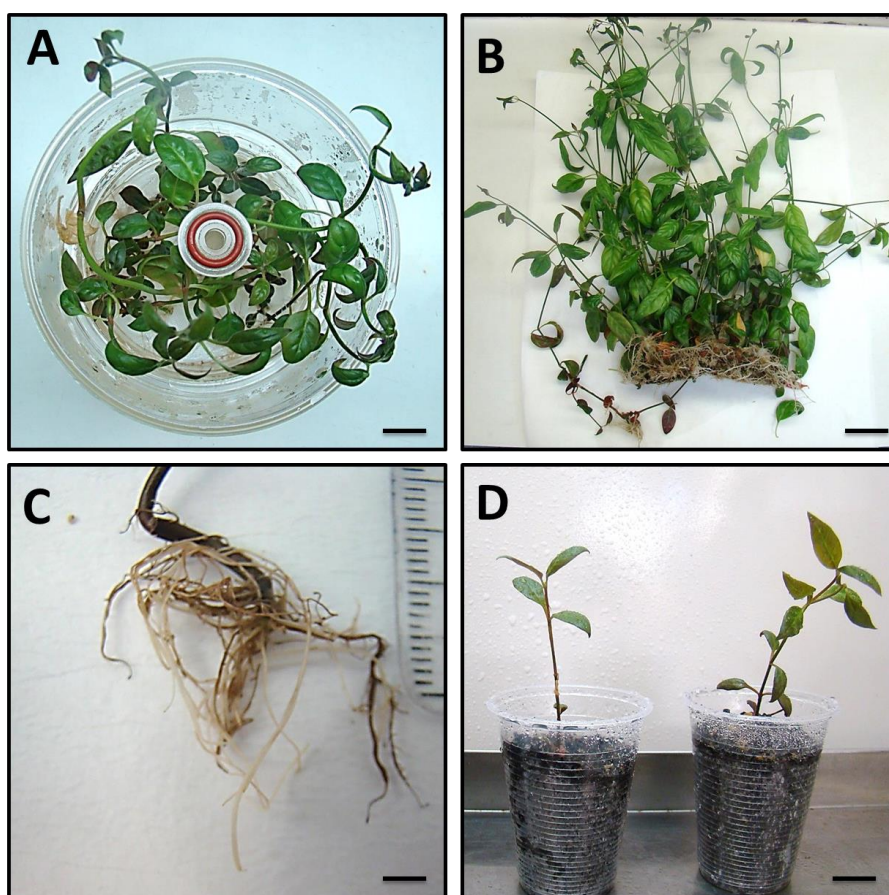
Após 30 dias de aclimatização, as plantas de *P. glomerata*, oriundas dos cinco sistemas de cultivo, testados nesse estudo, apresentaram diferenças estatísticas na taxa de sobrevivência (Tabela 3).

Na análise da sobrevivência, verificou-se que o sistema de cultivo líquido sob agitação, o sistema de cultivo RITA<sup>®</sup> e o sistema de biorreator de imersão temporária modelo Embrapa (BIT) não diferiram estatisticamente entre si. Nesses sistemas, as médias foram significativamente superiores aos demais sistemas de cultivo, com taxas de sobrevivência que atingiram até 100% das plantas aclimatizadas (Figura 3 A-D). Adicionalmente, entre os biorreatores testados, também não foram observadas diferenças significativas para altura das plantas, após 30 dias de aclimatização, embora o número de folhas tenha sido significativamente maior para aquelas plantas oriundas do biorreator modelo Embrapa.

**Tabela 3.** Aclimatização de *Pfaffia glomerata*, após 30 dias de cultivo *in vitro* em diferentes sistemas de cultivo.

Sistema de cultivo	Sobrevivência	Altura (cm)	Nº Folhas
Semi-sólido	56,2 ± 12,8 b	10,1 ± 1,1 a	6,6 ± 1,0 a
Líquido estacionário	62,5 ± 12,5 b	6,7 ± 0,6 b	4,6 ± 0,4 b
Líquido agitação	93,7 ± 6,2 a	7,0 ± 0,6 b	5,0 ± 0,3 b
RITA <sup>®</sup>	81,2 ± 10,07 a	11,6 ± 0,9 a	5,5 ± 0,3 b
BIT	100,0 ± 0,0 a	12,5 ± 0,5 a	7,1 ± 0,8 a

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. RITA<sup>®</sup>= Recipiente de Imersão Temporário Automatizado; BIT= Biorreator de Imersão Temporária (modelo Embrapa).



**Figura 3.** Mudanças de *Pfaffia glomerata* após 30 dias de cultivo na fase de aclimatização, em diferentes sistemas de cultivo. **A)** Regeneração em recipiente de imersão temporária automatizado RITA<sup>®</sup>; **B)** Regeneração em sistema de biorreator Embrapa (BIT); **C)** Detalhe das raízes adventícias formadas no processo; **D)** Aclimatização de mudas de *Pfaffia glomerata* oriundas da micropropagação dos sistemas de imersão temporária (Barra de escala = 1 cm).

Na aclimatização, os brotos são transferidos do ambiente *in vitro* para o ambiente *ex vitro*, passando por importantes mudanças de cultivo, como a redução da umidade relativa do ar, novas condições naturais de luminosidade e a transição do metabolismo heterotrófico para o metabolismo autotrófico. Além disso, associadas às alterações anatômicas, bioquímicas e fisiológicas, tais como variações nas atividades fotossintéticas e na formação e funcionamento dos estômatos, tais fatores podem ser considerados limitantes para o estabelecimento e sobrevivência para muitas espécies de plantas (HOFFMANN, 2002).

Flores *et al.* (2006) observaram que plantas micropropagadas de *P. tuberosa* durante a aclimatização se mostraram sensíveis as novas condições de umidade do ambiente, embora tais mudanças não tenham afetado a sobrevivência e a morfologia das plantas. Já Hoffmann *et al.* (2001) observaram em seu estudo com macieira que, após 20 dias de aclimatização, as plantas apresentaram uma queda de 85% na sobrevivência. Eles relataram que essa queda na sobrevivência foi causada possivelmente pela transição do metabolismo heterotrófico para o autotrófico das plantas nas novas condições de desenvolvimento.

Diante dos resultados apresentados neste estudo, pôde-se observar que as plantas de *P. glomerata* multiplicadas e enraizadas *in vitro* apresentaram, de modo geral, uma alta taxa de sobrevivência *ex vitro* o que finaliza com eficiência todo o processo de micropropagação da espécie.

### **3.2. Micropropagação de *Lippia filifolia* em diferentes sistemas de cultivo**

Os resultados referentes à propagação de *L. filifolia* em diferentes sistemas de cultivo encontram-se na Tabela 4. Nos resultados referentes à percentagem de sobrevivência dos explantes, não foram verificadas diferenças significativas entre os sistemas de cultivo semi-sólido, líquido estacionário e agitação, além do biorreator (BIT) os quais apresentaram valores entre 82,1 e 100%. Ressalta-se que no sistema RITA<sup>®</sup> a taxa de sobrevivência dos explantes foi a mais baixa entre os demais, com valores alcançando 30%. Este fato possivelmente esteja relacionado ao regime de imersão temporal do meio de cultura adotado, uma vez que boa parte dos explantes inoculados apresentaram-se ressecados nos primeiros dias de cultivo.

Em relação ao comprimento da parte aérea (altura), o sistema de cultivo semi-sólido e RITA<sup>®</sup> foram os proporcionaram os melhores resultados, com médias de 7,9 e 8,0 cm. Resultados similares foram observados por Gupta *et al.* (2001), Peixoto *et al.* (2006), Costa *et al.* (2007) e Asmar *et al.* (2012), durante o cultivo *in vitro* de plantas do gênero *Lippia* em meio semi-sólido. No presente estudo, foi possível observar uma distinção na altura dos brotos durante o processo de multiplicação *in vitro*, uma vez que, em alguns casos, especialmente em meio líquido estacionário ou agitação, o alongamento dos entrenós foi

significativamente reduzido, levando à formação de brotos com aspecto anormal (Tabela 4 e Figura 4 C-D).

**Tabela 4.** Efeito dos diferentes sistemas de cultivo na micropropagação de *Lippia filifolia* após 30 dias de cultivo *in vitro*.

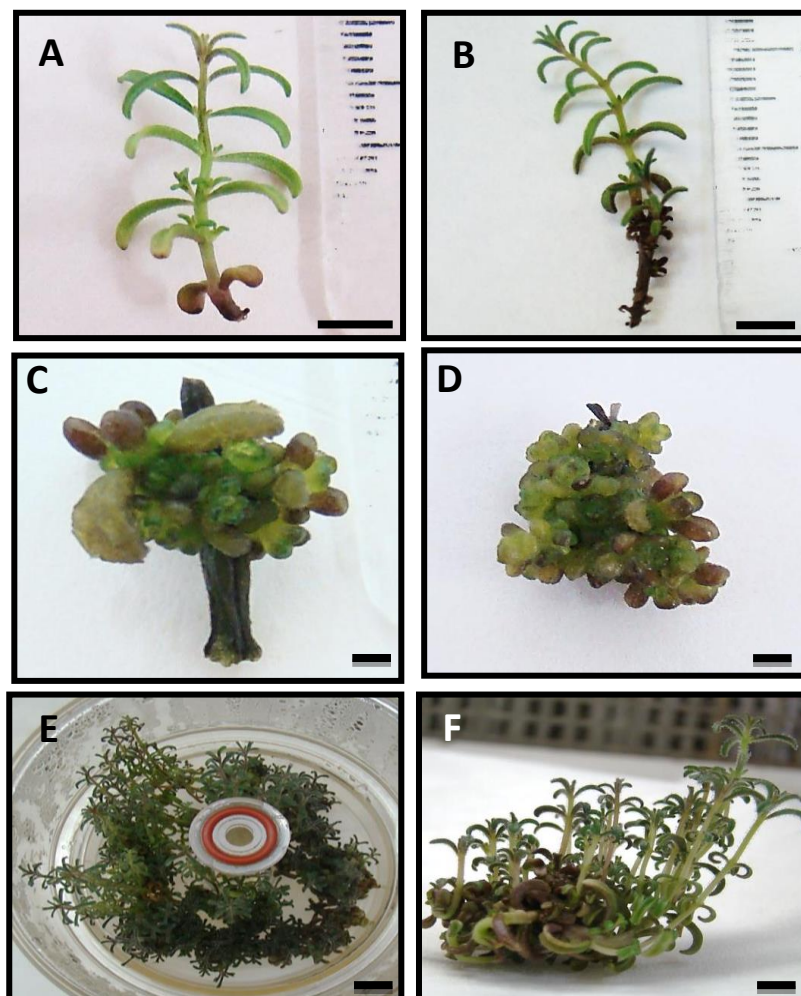
Sistema de cultivo	Sobrevivência (%)	Altura (cm)	Taxa de multiplicação	Enraizamento (%)
Semi-sólido	95,0 ± 3,0 a	7,9 ± 0,9 a	9,7 ± 1,9 b	0,0 ± 0,0 a
Líquido estacionário	100,0 ± 0,0 a	3,0 ± 0,0 b	1,0 ± 0,0 c	0,0 ± 0,0 a
Líquido agitação	100,0 ± 0,0 a	3,0 ± 0,0 b	1,0 ± 0,0 c	0,0 ± 0,0 a
RITA <sup>®</sup>	30,0 ± 3,0 b	8,0 ± 1,0 a	38,7 ± 2,0 a	0,0 ± 0,0 a
BIT	82,1 ± 16,5a	3,3 ± 0,7 b	11,8 ± 2,8 b	0,0 ± 0,0 a

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. RITA<sup>®</sup>= Recipiente de Imersão Temporário Automatizado; BIT= Biorreator de Imersão Temporária (modelo Embrapa).

No entanto, apesar de apresentar uma baixa taxa de sobrevivência em comparação aos demais sistemas, quando se avaliou a taxa de multiplicação, a maior média foi obtida no sistema de cultivo RITA<sup>®</sup> que proporcionou taxas de 38,7 brotos, valores significativamente superiores aos demais sistemas de cultivo testados (Figura 4 E-F).

Os sistemas de cultivo líquido estacionário e agitação apresentaram taxas de multiplicação de 1,0 com nítidas anormalidades morfológicas nos explantes, o que sugere não serem sistemas adequados para a multiplicação *in vitro* de *Lippia*. Segundo Scherwinski-Pereira e Fortes (2003), o contato contínuo de brotos de algumas espécies com o meio de cultura líquido pode gerar estresse hidrodinâmico, tornando os explantes entumecidos, levando-os à morte. Nascimento *et al.* (2012) obtiveram resultados semelhantes no cultivo *in vitro* em meio líquido de *Jacaranda decurrens*.

Quanto à formação de plantas com o sistema radicular, nenhum dos tratamentos proporcionou o desenvolvimento de raízes nas brotações, sugerindo a necessidade de uma etapa complementar de enraizamento. Esses resultados diferem dos resultados obtidos por Gupta *et al.* (2001) nos experimentos de micropropagação de *Lippia alba* que obtiveram 100% de formação de raízes sem o uso de reguladores de crescimento em meio de cultura de MS.



**Figura 4.** Aspectos morfológicos de *Lippia filifolia* nos diferentes sistemas de cultivo *in vitro* avaliados, após 30 dias de cultivo **A)** cultivo em meio semi-sólido; **B)** cultivo em sistema de biorreator de frascos gêmeos (BIT); **C)** meio líquido com agitação orbital; **D)** meio líquido sem agitação orbital (Barra de escala = 2 cm); **E)** cultivo em recipiente de imersão temporária utomatzado (RITA<sup>®</sup>); **F)** Multibrotações após o cultivo em recipiente de imersão temporária automatizado (RITA<sup>®</sup>) (Barras = 1 cm).

### 3.3. Enraizamento *in vitro* de *Lippia filifolia*

Na Tabela 5, estão apresentadas as médias de percentagem de sobrevivência e altura das plantas regeneradas em meio semi-sólido de MS, referentes ao uso do ácido 3-indolacético (AIA), ácido indolbutírico (AIB), e do ácido naftaleno acético (ANA), em diversas concentrações.

Para a porcentagem de sobrevivência, verificou-se que os resultados entre os tratamentos, de modo geral, não apresentaram diferenças significativas com médias superiores a 65% aos 150 dias. No entanto, os tratamentos contendo 0,1; 1,0; 5,0  $\mu\text{M}$  de AIA e 5,0  $\mu\text{M}$  de ANA apresentaram as menores taxas de sobrevivência com médias 50,0; 52,6; 45,0 e 37,5%, respectivamente. Foi verificado também, que as plantas do tratamento controle apresentaram

a maior taxa com 100% de sobrevivência ao longo dos 150 dias de cultivo. Quanto à altura das brotações, verificou-se que os melhores resultados foram obtidos nos tratamentos controle, 0,5 e 2,5  $\mu\text{M}$  de AIA com médias 7,0; 6,2 e 5,9 cm aos 150 dias (Tabela 5).

**Tabela 5.** Análise da sobrevivência e altura da parte aérea, em *Lippia filifolia* na fase de enraizamento *in vitro* sob diferentes concentrações das auxinas ácido 3- indolacético (AIA), ácido indolbutírico (AIB), ácido naftaleno- acético (ANA).

Auxina	Concentração $\mu\text{M}$	Tempo de cultivo (dias)			
		30	90	150	
Sobrevivência (%)					
Controle	0,0	100,0 $\pm$ 0,0 aA	100,0 $\pm$ 0,0 aA	100,0 $\pm$ 0,0 aA	
	0,1	75,0 $\pm$ 9,9 bA	52,6 $\pm$ 11,5 aA	50,0 $\pm$ 11,5 bA	
	0,5	100,0 $\pm$ 0,0 aA	75,0 $\pm$ 9,9 aB	75,0 $\pm$ 9,9 aB	
	AIA	1,0	100,0 $\pm$ 0,0 aA	65,0 $\pm$ 10,9 aB	52,6 $\pm$ 9,9 bB
		2,5	100,0 $\pm$ 0,0 aA	75,0 $\pm$ 10,5 aB	75,0 $\pm$ 10,5 aB
		5,0	75,0 $\pm$ 9,9 bA	65,0 $\pm$ 10,9 aA	45,0 $\pm$ 11,5 bB
AIB	0,1	80,0 $\pm$ 8,9 bA	75,0 $\pm$ 10,4 aA	75,0 $\pm$ 10,0 aA	
	0,5	100,0 $\pm$ 0,0 aA	75,0 $\pm$ 10,0 aB	75,0 $\pm$ 10,0 aB	
	1,0	100,0 $\pm$ 0,0 aA	90,0 $\pm$ 7,0 aA	82,5 $\pm$ 8,0 aA	
	2,5	100,0 $\pm$ 0,0 aA	75,0 $\pm$ 10,0 aB	75,0 $\pm$ 10,0 aB	
	5,0	100,0 $\pm$ 0,0 aA	75,0 $\pm$ 10,0 aB	75,0 $\pm$ 10,0 aB	
ANA	0,1	75,0 $\pm$ 9,0 bA	75,0 $\pm$ 10,0 aA	65,0 $\pm$ 10,0 aA	
	0,5	80,0 $\pm$ 9,2bA	75,0 $\pm$ 10,0 aA	75,0 $\pm$ 10,0 aA	
	1,0	75,0 $\pm$ 10,0 bA	75,0 $\pm$ 10,0 aA	75,0 $\pm$ 10,0 aA	
	2,5	75,0 $\pm$ 10,0 bA	75,0 $\pm$ 10,0 aA	75,0 $\pm$ 10,0 aA	
	5,0	100,0 $\pm$ 0,0 aA	75,0 $\pm$ 10,0 aB	37,5 $\pm$ 9,9 bC	
Altura (cm)					
Controle	0,0	3,0 $\pm$ 0,0 bB	4,0 $\pm$ 0,0 aB	7,0 $\pm$ 0,0 aA	
	0,1	2,8 $\pm$ 0,4 bA	2,8 $\pm$ 0,4 aA	3,4 $\pm$ 1,0 dA	
	0,5	4,0 $\pm$ 0,4 aB	4,0 $\pm$ 0,4 aB	6,2 $\pm$ 0,0 aA	
AIA	1,0	3,9 $\pm$ 0,0 aB	3,6 $\pm$ 0,2 aB	5,2 $\pm$ 0,0 bA	
	2,5	4,0 $\pm$ 0,4 aB	4,0 $\pm$ 0,4 aB	5,9 $\pm$ 0,0 aA	
	5,0	2,8 $\pm$ 0,4 bA	2,8 $\pm$ 0,4 aA	3,4 $\pm$ 1,0 dA	
	AIB	0,1	3,2 $\pm$ 0,4 bB	4,0 $\pm$ 0,4 aB	4,9 $\pm$ 1,0 bA
0,5		4,0 $\pm$ 0,4 aA	4,0 $\pm$ 0,4 aA	4,2 $\pm$ 1,0 cA	
1,0		4,0 $\pm$ 0,4 aB	4,0 $\pm$ 0,4 aB	5,6 $\pm$ 1,0 bA	
2,5		4,0 $\pm$ 0,4 aB	4,0 $\pm$ 0,4 aB	5,0 $\pm$ 1,0 bA	
5,0		4,0 $\pm$ 0,4 aB	4,0 $\pm$ 0,4 aB	5,0 $\pm$ 1,0 bA	
ANA	0,1	2,5 $\pm$ 0,3 bA	3,2 $\pm$ 0,0 aA	3,8 $\pm$ 1,0 cA	
	0,5	3,5 $\pm$ 0,1 aA	3,5 $\pm$ 0,1 aA	4,4 $\pm$ 1,0 cA	
	1,0	3,6 $\pm$ 0,2 aA	3,6 $\pm$ 0,2 aA	4,3 $\pm$ 0,3 cA	
	2,5	3,5 $\pm$ 0,1 aA	3,7 $\pm$ 0,0 aA	4,1 $\pm$ 1,0 cA	
	5,0	3,9 $\pm$ 0,0 aA	4,0 $\pm$ 0,4 aA	4,0 $\pm$ 0,4 cA	

Médias $\pm$  erro padrão seguidas pela mesma letra (minúscula para vertical e maiúscula na horizontal), não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Segundo Ford *et al.* (2001), algumas espécies quando em contato com auxina exógena no meio de cultivo apresentam aumento no seu nível de AIA endógeno, tendo ação inicialmente nos meristemas primário e secundário causando o alongamento celular. Com isso, os níveis de auxina endógena são reduzidos antes da formação das raízes, dificultando

assim, as chances de enraizamento. Em contrapartida, no presente trabalho o uso de AIA exógeno causou a redução do crescimento em altura. Segundo Salisbury & Ross (1991), durante o desenvolvimento de raízes *in vitro*, a adição de auxinas exógenas no meio de cultivo pode ser responsável pela redução do crescimento das plantas, pois as auxinas estimulam a síntese de etileno. Na Tabela 6, são apresentados os resultados referentes à percentagem de plantas com formação de raiz e calo na base dos explantes.

**Tabela 6.** Formação de raízes e calos na fase de enraizamento *in vitro* em *Lippia filifolia* sob diferentes concentrações das auxinas ácido 3- indolacético (AIA), ácido indolbutírico (AIB), ácido naftaleno- acético (ANA).

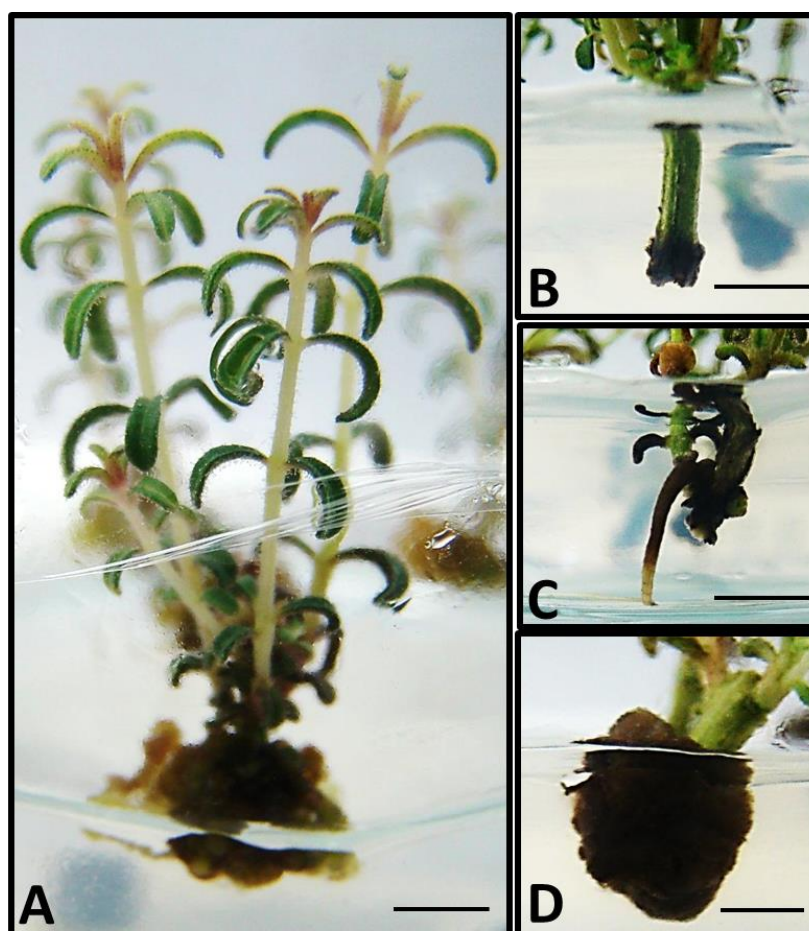
	Concentração μM	Tempo de cultivo (dias)		
		30	90	150
Brotações com raízes (%)				
Controle	0,0	0,0±0,0 aA	0,05±0,0 aA	0,05±0,0 aA
	0,1	0,0±0,0 aA	0,05±0,0 aA	0,1±0,0 aA
	0,5	0,0±0,0 aB	0,0±0,0 aB	0,05±0,0 aA
	1,0	0,0±0,0 aA	0,0±0,0 aA	0,05±0,0 aA
	2,5	0,0±0,0 aA	0,0±0,0 aA	0,05±0,0 aA
	5,0	0,0±0,0 aA	0,0±0,0 aA	0,05±0,0 aA
AIA	0,1	0,0±0,0 aA	0,05±0,0 aA	0,05±0,0 aA
	0,5	0,0±0,0 aA	0,0±0,0 aA	0,05±0,0 aA
	1,0	0,0±0,0 aA	0,0±0,0 aA	0,0±0,0 aA
	2,5	0,0±0,0 aB	0,0±0,0 aB	0,1±0,0 aA
	5,0	0,0±0,0 aA	0,0±0,0 aA	0,0±0,0 aA
	5,0	0,0±0,0 aA	0,0±0,0 aA	0,0±0,0 aA
AIB	0,1	0,0±0,0 aA	0,0±0,0 aA	0,05±0,0 aA
	0,5	0,0±0,0 aA	0,0±0,0 aA	0,05±0,0 aA
	1,0	0,0±0,0 aA	0,0±0,0 aA	0,0±0,0 aA
	2,5	0,0±0,0 aB	0,0±0,0 aB	0,1±0,0 aA
	5,0	0,0±0,0 aA	0,0±0,0 aA	0,0±0,0 aA
	5,0	0,0±0,0 aA	0,0±0,0 aA	0,0±0,0 aA
ANA	0,1	0,0±0,0 aA	0,0±0,0 aA	0,05±0,0 aA
	0,5	0,0±0,0 aB	0,0±0,0 aB	0,1±0,0 aA
	1,0	0,0±0,0 aA	0,0±0,0 aA	0,0±0,0 aA
	2,5	0,0±0,0 aA	0,0±0,0 aA	0,0±0,0 aA
	5,0	0,0±0,0 aA	0,0±0,0 aA	0,0±0,0 aA
	5,0	0,0±0,0 aA	0,0±0,0 aA	0,0±0,0 aA
Calo (%)				
Controle	0,0	0,0±0,0 cA	0,0±0,0 dA	0,0±0,0 eA
	0,1	65,0±10,8 bA	75,0±9,9 bA	75,0±9,9 bA
	0,5	100,0±0,0 aA	100,0±0,0 aA	100,0±0,0 aA
	1,0	95,0±5,0 aA	95,0±5,0 aA	95,0±5,0 aA
	2,5	100,0±0,0 aA	100,0±0,0 aA	100,0±0,0 aA
	5,0	75,0±9,9 bA	75,0±9,9 bA	75,0±9,9 bA
AIA	0,1	5,0±5,0 cA	25,0±9,9 cA	25,0±9,9 dA
	0,5	65,0±10,9 bA	75,0±9,9 bA	75,0±9,9 bA
	1,0	75,0±9,9 bA	70,0±10,5 bA	70,0±10,5 bA
	2,5	100,0±0,0 aA	75,0±9,9 bB	75,0±9,9 bB
	5,0	95,0±5,0 aA	70,0±10,5 bB	70,0±10,5 bB
	5,0	95,0±5,0 aA	70,0±10,5 bB	70,0±10,5 bB
AIB	0,1	0,0±0,0 cB	65,0±10,9 bA	65,0±10,9 cA
	0,5	50,0±11,5 bB	75,0±9,9 bA	75,0±9,9 bA
	1,0	50,0±11,5 bB	75,0±9,9 bA	75,0±9,9 bA
	2,5	75,0±9,9 bA	75,0±9,9 bA	75,0±9,9 bA
	5,0	95,0±5,0 aA	75,0±9,9 bA	50,0±11,5 cB
	5,0	95,0±5,0 aA	75,0±9,9 bA	50,0±11,5 cB
ANA	0,1	0,0±0,0 cB	65,0±10,9 bA	65,0±10,9 cA
	0,5	50,0±11,5 bB	75,0±9,9 bA	75,0±9,9 bA
	1,0	50,0±11,5 bB	75,0±9,9 bA	75,0±9,9 bA
	2,5	75,0±9,9 bA	75,0±9,9 bA	75,0±9,9 bA
	5,0	95,0±5,0 aA	75,0±9,9 bA	50,0±11,5 cB
	5,0	95,0±5,0 aA	75,0±9,9 bA	50,0±11,5 cB

Médias± erro padrão seguidas pela mesma letra (minúscula para vertical e maiúscula na horizontal), não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Quanto ao percentual de enraizamento *in vitro* verificou-se que, de modo geral, a adição de auxinas no meio de cultivo, não promoveu melhoras significativas na indução da rizogênese. De maneira geral, foi verificada baixa percentagem de formação de calo na base

das plantas, exceto nas concentrações 1,0; 2,5; 5,0 de AIA e 5,0 de ANA (Tabela 6) (Figura 5).

Para Alvarenga & Carvalho (1983) as concentrações excessivas de auxina podem inibir o crescimento das raízes e brotações, causar o amarelecimento, necrose ou até mesmo a morte das estacas. Já Hartmann *et al.* (2002) ressaltam que o uso de concentrações de auxina abaixo do nível ideal pode não proporcionar a formação de raízes adventícias. Conforme verificado no presente trabalho, os autores Capote *et al.* (1999), Juliani Junior *et al.* (1999) e Moreno *et al.* (2013) também observaram dificuldades no enraizamento *in vitro* das espécies pertencentes ao gênero *Lippia* mesmo com a utilização de diferentes tipos e concentrações de auxinas no meio de cultivo.



**Figura 5.** A) Aspecto geral de um explante de *Lippia filifolia* sob enraizamento *in vitro*; B) Detalhe de um explante que não respondeu á rizogênese; C) Explante com formação de raiz; D) Explantes com formação de calo (Barra de escala = 2 cm).

Sousa *et al.* (2007), relatam que o desenvolvimento radicial é influenciado por diversos fatores entre eles destacam-se a idade e o genótipo da planta matriz, a quantidade de



auxina endógena, o uso de reguladores de crescimento, o meio de cultura com ou sem carvão ativado. Esses fatores estando associados ou não podem favorecer o processo de rizogênese *in vitro* (DAVIS *et al.*, 1988).

Segundo Lima *et al.* (2007), a idade da planta matriz pode vir a influenciar a fase de indução do sistema radicular, independente da concentração de reguladores de crescimento. As estacas repicadas de plantas mais velhas são mais difíceis de enraizar que as estacas provenientes de plantas mais jovens (GREENWOOD *et al.*, 1991).

Pasqual (2001) relata que a dificuldade de enraizamento de plantas pode ser resolvida durante o processo de micropropagação, por meio da realização de subculturas contínuas, que segundo os autores, resultam no rejuvenescimento dos tecidos, aumentando, assim, a capacidade das plantas enraizarem. No entanto, no presente trabalho embora tenham sido feitos subcultivos contínuos, não foi verificado o aumento na capacidade das plantas enraizarem.

Resultados similares aos do presente trabalho foram observados por Mccown (1988) que relata em seu estudo que algumas espécies lenhosas passaram por elevados números de subculturas e não obtiveram a formação de raízes *in vitro*.

Assis e Teixeira (1998) relatam em seu estudo que além da juvenilidade dos explantes o genótipo também é importante, pois atua diretamente no enraizamento *in vitro*, devido os fatores genéticos que podem estar ligados diretamente ou indiretamente à capacidade de determinadas espécies desenvolver ou não raízes.

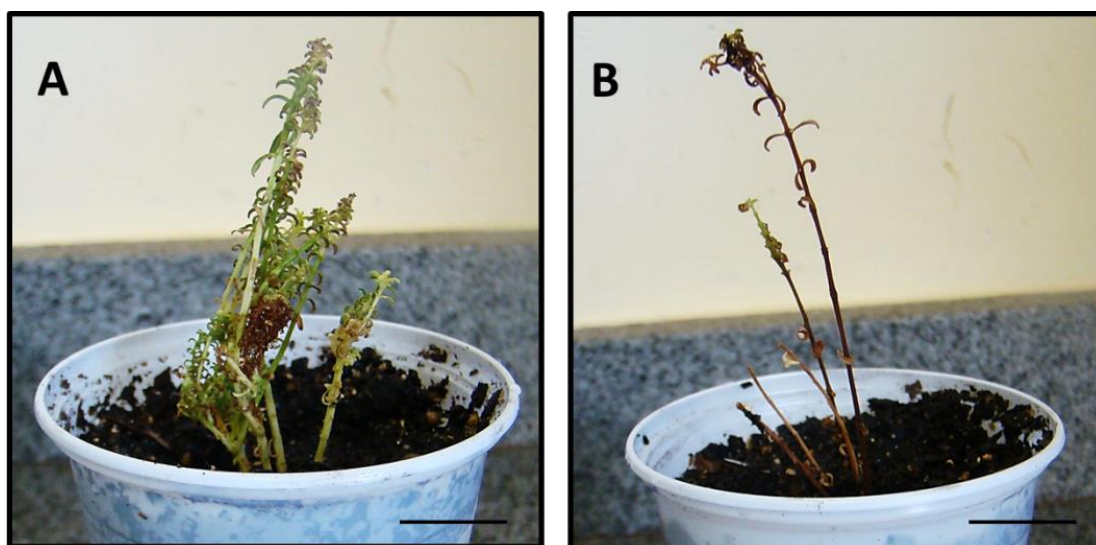
Diferentemente dos resultados apresentados no presente estudo, Pinto & Lameira (2001), relatam que o meio de cultura de MS com metade das concentrações de sais podem permitir melhores resultados no enraizamento de plantas *in vitro*. De acordo com Mccown (1988) a alta concentração de sais que compõem o meio básico de cultivo de MS, mesmo com a presença de auxinas, pode vir a inibir o desenvolvimento de raízes *in vitro*.

Outro fator que vem sendo relatado na literatura para a melhoria do processo de formação de raízes de plantas cultivadas *in vitro* é a suplementação do meio de cultura com carvão ativado. Para Grattapaglia & Machado (1990), o carvão ativado simula a condição de escuro para a etapa de enraizamento *in vitro*, além de possuir efeito diluidor, retendo parte dos compostos fenólicos que podem inibir o crescimento e desenvolvimento vegetal.

Segundo Salisbury e Roos (1991), o carvão ativado no meio de cultura absorve os reguladores de crescimento do meio de cultivo, reduzindo assim a síntese de etileno, causada pelas auxinas, que de forma geral, estimula a produção deste composto, que afeta o processo de alongamento das raízes.

Alguns autores ressaltam que o meio de cultivo suplementado com a auxina ANA induz com maior frequência a formação de calos na base das plantas, embora o AIA e o AIB também possam vir a causar o mesmo efeito durante o processo de formação de raízes *in vitro*. No entanto, os mesmos autores relatam que são indesejáveis a formação de calos nessa etapa, visto que podem interferir no funcionamento do sistema radicular comprometendo assim a aclimatização das plantas e o completo desenvolvimeto do protocolo de micropropagação (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998; COMPTON *et al.*, 2001).

Na aclimatização, foi verificado que independentemente do tratamento testado durante o enraizamento *in vitro*, nenhuma planta de *L. filifolia* sobreviveu ao processo, bem possivelmente devido a ausência de um sistema radicular completo (Figura 6). De acordo com Haase (2008), plantas que apresentam sistema radicular completo sobrevivem melhor do que aquelas que possuem sistema radicular inferior, principalmente nas primeiras semanas de cultivo, quando as condições de estresse provocado pela mudança de ambiente *in vitro* para *ex vitro* podem comprometer o estabelecimento das plantas acarretando, dificuldade na sobrevivência das mesmas.



**Figura 6.** Aclimatização de mudas de *Lippia filifolia* provenientes do cultivo *in vitro* com diferentes tipos e concentrações de auxinas após 30 dias. **A)** Plantas enraizadas em substrato após 1 dia de transferência; **B)** Plantas aclimatizadas após 30 dias da transferência (Barra de escala = 2 cm).

#### 4. CONCLUSÕES

- Biorreatores de imersão temporária podem otimizar a multiplicação *in vitro* de plantas de *P. glomerata* pois melhoram de maneira geral o processo de propagação, especialmente aqueles relacionados como a taxa de multiplicação e altura de plantas;

- Entre os biorreatores de imersão temporária, o modelo RITA<sup>®</sup> é o que se mostra mais eficiente para a multiplicação de *P. glomerata*, inclusive para a formação de plantas enraizadas ao final do processo;

- Plantas de *P. glomerata* produzidas em sistemas de biorreatores modelo Embrapa apresentam índices de sobrevivência de até 100% na aclimatização;

- A micropropagação *in vitro* de *L. filifolia* se mostra viável em biorreator de imersão temporário modelo RITA<sup>®</sup>, com índices de multiplicação do material em cultivo de cerca de três vezes superior ao sistema convencional (semi-sólido);

- O cultivo *in vitro* de *L. filifolia* em meio de cultura líquido estacionário ou agitação induz a formação de brotações com variações morfológicas anormais, o que resulta numa baixa taxa de multiplicação;

- Plantas micropropagadas de *L. filifolia* apresentam baixa taxa de enraizamento *in vitro* sugerindo que novos estudos devam ser realizados com as plantas oriundas do campo para otimizar essa etapa;

- Plantas de *L. filifolia* micropropagadas e desprovidas de raízes não sobrevivem durante a fase de aclimatização.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, L. C. G. G.; BARROS, R. F. M. Plantas medicinais cultivadas em quintais de comunidades rurais no domínio do cerrado piauiense (Município de Demerval Lobão, Piauí, Brasil). **Revista brasileira de plantas medicinais**, v. 14, n. 3, p. 419-434, 2012.

ALVARD, D.; CÔTE F.; TEISSON, C. Comparison of methods of liquid media culture for banana micropropagation. Effects of temporary immersion of explants. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v.32, p. 55-60, 1993.

ALVARENGA, L.R.; CARVALHO, V.D. Uso de substâncias promotoras de enraizamento de estacas de frutíferas. **Informe Agropecuário**, v.9, n.101, p.47-55, 1983.

AMARAL C.L.; SILVA A.B. **Melhoramento biotecnológico de plantas medicinais. Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: Uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios da ansiedade em modelos**, 2003.

ARAGON, C.; CARVALHO, L.; GONZÁLEZ, J.; ESCALONA, M.; AMÂNCIO, S.: Ex vitro acclimatization of plantain plantlets micropropagated in temporary immersion bioreactor. **Biologia Plantarum**. v.54, p. 237-244, 2010.

ARAGÓN, C.; SÁNCHEZ, C.; GONZÁLEZ-OLMEDO, J.; ESCALONA, M.; CARVALHO, L.; AMÂNCIO S. Comparison of plantain plantlets propagated in temporary immersion bioreactors and gelled medium during in vitro growth and acclimatization. **Biologia Plantarum**. v.58, n.1, p. 29-38, 2014.

ASMAR, S. A.; RESENDE, R. F.; ARARUNA, E. C.; MORAIS, T. P.; LUZ, J. M. Q. Concentrações de BAP sobre a proliferação in vitro de brotos de *Lippia alba* [(Mill.) NE Brown]. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.14, p.149-153, 2012.

ASSIS, T.F.; TEIXEIRA, S.L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa-CNPq, v.1, p.261-96, 1998.

BALOGUN, M. O.; MAROYA, N.; ASIEDU, R. Status and prospects for improving yam seed systems using temporary immersion bioreactors. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 15, p. 1614-1622, 2014.

BAQUE, M. A.; MOH, S. H.; LEE, E. J.; ZHONG, J. J., & PAEK, K. Y. Production of biomass and useful compounds from adventitious roots of high-value added medicinal plants using bioreactor. **Biotechnology advances**, v.30, n.6, p. 1255-1267, 2012.

BATISTINI, A. P.; MORO, J. R.; FRANÇA, S. C.; PEREIRA, A. Avaliação de diferentes sistemas de cultivo *in vitro* para a micropropagação de *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, p. 27-35, 2002.

BRAGA, V. F.; MENDES, G. C.; OLIVEIRA, R. T.; SOARES, C. Q.; RESENDE, C. F.; PINTO, L. C., & PEIXOTO, P. H. Micropropagation, antinociceptive and antioxidant activities of extracts of *Verbena litoralis* Kunth (Verbenaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.84, n.1, p.139-148, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 971, de 03 de maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PN-PIC) no Sistema Único de Saúde. **Diário Oficial da União. Poder Executivo**. Brasília, DF, n. 119, p. 2-4, jul.2006.

BRASIL. Presidência da República. Decreto nº 5.813 de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. **Diário Oficial da União. Poder Executivo**. Brasília, 2006.

CATAPAN, E.; OTUKI, M.F.; VIANA, A.M. Cultivo *In vitro* de *Phyllanthus caroliniensis* (Euphorbiaceae). **Plant Cell and Organ Culture**, v.62, p.195-202, 2000.

CAPOTE, A. F. V.; Blanco, N., & Pérez, O. Micropropagação e regeneração de plantas *in vitro* de oreganillo *Lippia micromera* Schau. **Revista Del Jardín Botánico Nacional**, v.10, p.139-42, 1999.

CID, L. P. B.; TEIXEIRA, J. B. Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. In: CID, L. P. B. **Cultivo *in vitro* de plantas**. EMBRAPA-SPI; EMBRAPA-ERGB, p. 15-49, 2010.

COMPTON, M. E.; PIERSON, B. L.; & STAUB, J. E. Micropropagation for recovery of *Cucumis hystrix*. **Plant cell, tissue and organ culture**, v.64, n.1, p.63-67, 2001.

DA COSTA, A. S.; DE FÁTIMA, A.B.M.; BLANK, A. F.; DE MENDONÇA, A. B.; AMANCIO, V. F.; DA S LEDO, A. Estabelecimento de alecrim-pimenta *in vitro*. **Horticultura Brasileira**, v.25,n.1, p. 068-072, 2007.

DAVIS, T.D.; SANKHLA, N. Effect of shoot growth retardants and inhibitors on adventitious rooting. In: DAVIS, T.D.; HAISSIG, B.E.; SANKHLA, N. **Adventitious root formation in cuttings**. Portland: Dioscorides Press, v.2, p.174-84, 1988.

DIÁZ-PÉREZ, J.C; SHACKEL, K.A; SUTTER, E.G. Effects of *in vitro* formed roots and acclimatization on water status and gas exchange of tissue cultured apple shoots. **Journal of the American Society for Horticultural Science** v.120; p.435-440, 1995.

DUTRA, L. F.; SCHWENGBER, J.; TONIETTO, A., & KERSTEN, E. Enraizamento de estacas de ramos de pessegueiro (*Prunus persica* (L.) Batsch). **Current Agricultural Science and Technology**, v.5, n.2, 1999.

EIBL, R.; WERNER, S.; EIBL, D. Disposable bioreactors for plant liquid cultures at Litre-scale. **Engineering in Life Sciences**, v. 9, n. 3, p. 156-164, 2009.

FACHINELLO, J. C.; HOFFMAN, A.; NACHTIGAL, J. C.; KERSTEN, E. Propagação vegetativa por estaquia. **Propagação de plantas frutíferas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p.69-109, 2005.

FERREIRA, D. F.; Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia** v.35, n.6, p.1039-1042, 2011.

FORD, Y. Y.; BONHAM, E. C.; CAMERON, R. W. F.; BLAKE, P. S.; JUDD, H. L.; HARRISON- MURRAY, R. S. Adventitious rooting: examining the role of auxin in an easy- and a difficult-to-root plant. **Plant Growth Regulation**, v.36, n.2, p.149-159, 2002.

- FLORES, R.; MALDANER, J.; NICOLOSO, F. T. Optimization of the micropropagation of *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. **Ciência Rural**, v.36, n.3, p.845-851, 2006.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação, 1990. In: SILVA *et al.* **Aclimação de brotações de abacaxi (*Ananas comosus* L.) produzidas *in vitro*: ação de agromix<sup>®</sup>, humus e kelpak<sup>®</sup>**. R. Um. Alfenas, v.4, p.104-110, 1998
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**, v. 1. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPq, p. 183-260, 1998.
- GEORGIEV, V.; SCHUMANN, A.; PAVLOV, A.; BLEY, T. Review - Temporary immersion systems in plant biotechnology. **Engineering Life Sciences**, v.0, p1-15, 2014.
- GREENWOOD, M.S.; FOSTER, G.S.; AMERSON, H.V. Vegetative propagation of southern pines. In: DURYEY, M.L.; DOUGHERTY, P.M. (Eds.). **Forest regeneration manual**. Dordrecht: Kluwer Academic, p.75-86, 1991.
- GUEYE, B.; MORCILLO, F.; COLLIN, M.; GARGANI, D.; OVERVOORDE, P.; ABERLENC- BERTOSI, F.; VERDEIL, J. L. Acquisition of callogenic capacity in date palm leaf tissues in response to 2, 4-D treatment. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v.99, n.1, p. 35-45, 2009.
- GUPTA, S. K.; KHANUJA, S. P. S.; KUMAR, S. *In vitro* micropropagation of *Lippia alba*. **CURRENT SCIENCE-BANGALORE**, v. 81, n. 2, p. 206-209, 2001.
- HAASE, D. Understanding forest seedling quality: measurements and interpretation. **Tree Plant Notes**, v.52, p. 24-30, 2008.
- HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; DAVIS, JR, F.T.; GENEVE, R.L. **Plant Propagation: principles and practices**. 7th ed. Prentice-Hall, New Jersey, USA, p.880, 2002.
- HAZARIKA, B. N. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. **Scientia Horticulturae**, v.108, p.105-120, 2006.
- HERINGER, A.S., STEINMACHER, D.A., FRAGA, H.P., VIEIRA, L.N., MONTAGNA, T., QUINGA, L.A., GUERRA, M.P. Improved high-efficiency protocol for somatic embryogenesis in Peach Palm (*Bactris gasipaes Kunth*) using RITA<sup>®</sup> temporary immersion system. **Scientia Horticulturae**, v.179, p.284-292, 2014.
- HERRERA-MORENO, A. M.; CARRANZA, C. E.; CHACÓN-SÁNCHEZ, M. I. Establishment of propagation methods for growing promising aromatic plant species of the *Lippia* (Verbenaceae) and *Tagetes* (Asteraceae) genera in Colombia. **Agronomía Colombiana**, v. 31, n. 1, p. 27-37, 2013.
- HOFFMANN, A.; PASQUAL, M.; CHALFUN, N.N.J.; FRÁGUAS, C.B. Efeito de substratos na aclimação de plantas micropropagadas do porta-enxerto de macieira “marubakaido”. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.25, n.2, p.462-467, 2001.
- HOFFMANN, A. Aclimação de mudas produzidas *in vitro* e *in vivo*. **Informe Agropecuário**, v.23, p.21-24, 2002.

- JULIANI JR, H.R.; KOROCH, A.R.; JULIANI, H.R. & TRIPPI, V.S. micropropagation of *Lippia junelliana* (Mold.) Tronc. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** v.59, p.175-179, 1999.
- KONAN, K. E.; KOUADIO, Y. J.; FLORI, A.; DURANT-GASSELIN, T.; RIVAL, A. Evidence for an interaction effect during *in vitro* rooting of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) somatic embryo-derived plantlets. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v.43, p.456-466, 2007.
- LE MOS, E.E.P.; FERREIRA, M.S.; ALENCAR, L.M.C.; OLIVEIRA, J.G.L.; MAGALHÃES, V.S. Micropropagação de clones de banana cv.terra em biorreator de imersão temporária. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. 23, p. 482- 487, 2001.
- LIMA, Y. D. O. U.; RITTER, M.; de ALCÂNTARA, G. B.; LIMA, D. M., FOGAÇA, L. A.; QUOIRIN, M., & BIASI, L. A. , Tipos de estacas e substratos no enraizamento de jambolão. **Scientia agraria**, v.8, n.4, p. 449-453, 2007.
- 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**, Santa Maria, v. 41, n. 8, p. 1354-1361, 2011.
- LIMA, G. P. P.; SILVA, C. R. A.; WILLADINO, L. G.; CÂMARA, T. J., & VIANELLO, F. **Polyamines, Gelling Agents in Tissue Culture, Micropropagation of Medicinal Plants and Bioreactors**, INTECH Open Access Publisher, 2012.
- LORENZO, J.; BLANCO, M.; PELÁEZ, O.; GONZÁLEZ, A.; CID, M.; IGLESIAS, A.; GONZÁLEZ, B.; ESCALONA, M.; ESPINOSA, P.; BORROTO, C.: Sugarcane micropropagation and phenolic excretion. - **Plant Cell Tissue Organ Cult.** v.65, p.1-8, 2001.
- LUDWING-MULLER, J.; EPSTEIN, E. Indole-3-butyric acid in *Arabidopsis thaliana*. III. In vivo biosynthesis. **Plant Growth Regulation**, v. 14, p.7-14, 1994.
- MARINHO, M. J. M.; ALBUQUERQUE, C. C.; MORAIS, M. B.; SOUZA, M. C. G., & SILVA, K. M. B. Establishment of protocol for *Lippia gracilis* Schauer micropropagation. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.13, n.2, p.246-252, 2011.
- MCALISTER, B.; FINNIE, J.; WATT, M.P.; BLAKE, F.C. Use of temporary immersion bioreactor system (RITA) for the production of commercial Eucalyptus clones at Mondi Forests (SA). **Plant Cell. Tissue. Organ Cult.** V. 81p. 347-358, 2005.
- MCCOWN, B.H. Adventitious rooting of tissue cultured plants. In: DAVIS, T.D.; HAISSIG, B.E.; SANKHLA, N. **Adventitious root formation in cuttings**, v.2, p.289-302, 1988.
- MEHTA, J.; NARUKA, R.; SAIN, M.; DWIVEDI, A.; SHARMA, D.; MIRZA, J. An efficient protocol for clonal micropropagation of *Mentha piperita* L. (Pippermint). **Asian Journal of Plant Science and Research**, v. 2, n. 4, p. 518-523, 2012.
- MURCH, S.J.; LIU, C.; ROMERO, R. M.; SAXENA, P.K. *In vitro* culture and temporary immersion bioreactor production of *Crescentia cujete*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.78, p. 63-68, 2004.

NASCIMENTO, M.M.; FERREIRA, M.A.C.; MALOSSO, M.G. Produção de mudas de carobinha (*Jacaranda decurrens* Cham.) em sistema de imersão temporária com biorreatores do tipo R.I.T.A. **Revista Brasileira de plantas medicinais**, v.14, n.2, p.414-417, 2012.

NICOLOSO, F. T., & ERIG, A. C.. Efeito do tipo de segmento nodal e tamanho do recipiente no crescimento de plantas de *Pfaffia glomerata in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 1, pg.1499-1506, 2002.

NICOLOSO, F.T.; FORTUNATO, R.P.; FOGAÇA, M.A.F. Influência da posição da estaca no ramo e do substrato no enraizamento de estacas de *Pfaffia glomerata*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.29, n.2, p.277-283, 1999.

NIZAM, K.; TE-CHATO, S. Optimizing of root induction in oil palm plantlets for acclimatization by some potent plant growth regulators (PGRs). **Journal of Agricultural Technology**, v.5, p.371-383, 2009.

PACURAR, D. L.; PERRONE, I.; BELLINI, C. Auxin is a central player in the hormone cross-talks that control adventitious rooting. **Physiologia plantarum**, v. 151, n. 1, p. 83-96, 2014.

PASQUAL, M. **Cultura de tecidos**. Lavras: UFLA/FAEPE, p. 165, 2001.

PEREIRA, J. E. S.; FORTES, G. R. L.; SILVEIRA, A.O. Influência do número de gemas e da posição de inoculação dos explantes sobre a multiplicação *in vitro* da batata. **Horticultura Brasileira**, v.18, suplemento, p.179-180, 2000.

PEREIRA, A.M.S.; BERTONI, B.W.; APPEZZATO-DA-GLORIA, B.; ARAUJO, A.R.; JANUÁRIO, A.H.; LOURENÇO, M.V.; FRANÇA, S.C. Micropropagation of *Pothomorphe umbelata* via direct organogenesis from leaf explants. **Plant Cell and Organ Culture**, v.60, p.47-53, 2000.

PEREIRA, J.E.S.; FORTES, G.R.L. Protocolo para a produção de material propagativo de batata em meio líquido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, n.9, p.1035-43, 2003.

PEREIRA, J. E. S.; FORTES, G. R. L. Organogênese de ápices meristemáticos de batata em meios de isolamento e multiplicação *in vitro*. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.22, n.2, p.196-200, 2004.

PEIXOTO, P. H. P.; SALIMENA, F. R. G., DE OLIVEIRA, S. M.; DA SILVA G., L.; DE OLIVEIRA P. P. M.; VICCINI, L. F., & OTONI, W. C. *In vitro* propagation of endangered *Lippia filifolia* Mart. and Schauer ex Schauer. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v.42, n.6, p. 558-561, 2006.

PREMKUMAR A; MERCADO, J.A; QUESADA, M.A. Effects of *in vitro* tissue culture conditions and acclimatization on the contents of Rubisco, leaf soluble proteins, photosynthetic pigments, and C/N ratio. **Journal of Plant Physiology** v.158; p.835-840, 2001.

PINTO, J.E.B.; LAMEIRA, O.A. **Micropropagação e metabólitos secundários *in vitro* de plantas medicinais**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001.



RADMANN, E. B.; GONÇALVES, E. D.; FORTES, G. R. L. Concentrações de ácido indolbutírico e período de escuro no enraizamento *in vitro* de amora-preta (*Rubus* sp.) cv. Ébano. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.25, p.124-126, 2003.

REDDY, P.S.; RODRIGUES, R.; RAJASEKHARAN, R. Shoot organogenesis and mass propagation of *Coleus forskohlii* from leaf derived callus. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.66, p.183-8, 2001.

RESENDE, C. F. D.; BRAGA, V. F.; SILVA, C. J. D.; PEREIRA, P. D. F.; RIBEIRO, C.; SALIMENA, F. R. G., & PEIXOTO, P. H. P. An efficient system for *in vitro* propagation of *Bouchea fluminensis* (Vell.) Mold.(Verbenaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 28, n.2, p.184-189, 2014.

RESENDE, C. F. D.; BIANCHETTI, R. E.; OLIVEIRA, A. M. S. D.; BRAGA, V. F.; PEIXOTO, P. H. P. *In vitro* propagation and acclimatization of *Lippia rotundifolia*, an endemic species of Brazilian Campos Rupestres. **Revista Ciência Agronômica**, v.46, n.3, p.582-589, 2015.

ROUSE-MILLER, J.; DUNCAN, J.E. *In vitro* propagation of *Artocarpus altipis* (PARK.) FOSBERG (BREADFRUIT) from mature plant material. **In Vitro Cellular & Development Biology – Plant**, v.36, p.115-7, 2000.

RUSSOWSKI, D.; NICOLOSO, F.T. Nitrogênio e fósforo no crescimento de plantas de ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] cultivadas *in vitro*. **Ciência Rural** v.33, p. 57-63, 2003.

SALDANHA, C. W.; OTONI, C. G.; ROCHA, D. I., CAVATTE, P. C., DETMANN, K. D. S. C., TANAKA, F. A. O. & OTONI, W. C. CO<sub>2</sub>-enriched atmosphere and supporting material impact the growth, morphophysiology and ultrastructure of *in vitro* Brazilian-ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] plantlets. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v.118, n.1, p. 87-99, 2014.

SALISBURY, F.; ROSS, C. **Fisiologia vegetal**. México: Grupo Editorial Iberoamérica, p.759, 1994.

SALISBURY, F. B.; ROOS, C. W. **Plant physiology**, 1991. In: RADMANN, E. B. *et al.* Concentrações de ácido indolbutírico e período de escuro no enraizamento *in vitro* de amora-preta (*Rubus* sp.) cv. Ébano. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.25, p.124-126, 2003.

SANTORO, M. C.; NIEVAS, F.; ZYGADLO, J.; GIORDANO, W.; BANCHIO, E. Effects of growth regulators on biomass and the production of secondary metabolites in peppermint (*Mentha piperita*) micropropagated *in vitro*. **American Journal of Plant Sciences**, v. 4, n. 5, p. 49-55, 2013.

SAVIO, L. E. B., ASTARITA, L. V., & SANTAREM, E. R. Secondary metabolism in micropropagated *Hypericum perforatum* L. grown in non-aerated liquid medium. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.108, n.3, p.465-472, 2012.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; FORTES, G. R. L. Protocolo para produção de material propagativo de batata em meio líquido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, p.1035-1043, 2003.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; LIMA, E. C. A.; SILVA, T. L.; MESQUITA, A. G. G.; MACIEL, S. A.; COSTA, F. H. S. Double-phase culture system for large scale production of pineapple. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.109, p.263-269, 2012.

SKREBSKY, E.C.; NICOLOSO, F.T.; FERRÃO, G.D.E. Sacarose e período de cultivo *in vitro* na aclimatização ex vitro de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen). **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.5, p.1471-1477, 2004.

SKREBSKY, E.C.; NICOLOSO, F.T.; MALDANER, J. Substratos na aclimatização de *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen produzida *in vitro* sob diferentes doses de sacarose. **Ciência Rural**, v.36, n.5, 2006.

SOUZA, A. V.; PEREIRA, M. A. S. Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9, n. 4, p. 103-117, 2007.

SYROS, T.; YUPSANIS, T.; ZAFIRIADIS, H., & ECONOMOU, A. Activity and isoforms of peroxidases, lignin and anatomy, during adventitious rooting in cuttings of *Ebenus cretica* L. **Journal of Plant Physiology**, v.161, n.1, p. 69-77, 2004.

TARMIZI, A. H.; SAMSAUL, K. R.; ZAITON, R.; ROSLI, M. Y. Multiplication of oil palm liquid cultures in bioreactors. **Journal of Oil Palm Research Special Issue on Malaysia-MIT Biotechnology Partnership Programme**, v.1, p.44-50, 2008.

TEIXEIRA, J. B. Biorreatores. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n.24, p.36-41, 2002.

TREWAVAS, A.J. Growth Substance sensitivity: the limiting factor in plant development. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, DK, v.55, p. 60-72, 1982.

TOMAZZOI, M. I.; NEGRELLE, R. R. B., & CENTA, M. D. L. Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapêutica. **Texto Contexto Enferm**, v.15n.1, p.115-21, 2006.

TONIETTO, A.; FORTES, G. D. L., & SILVA, J. D. Enraizamento de miniestacas de ameixeira. **Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal**, v.23, n.3, p.373-376, 2001.

UCHENDU, E.E.; PALIYATH, G.; BROWN, D.C.W.; SAXENA, P.K. *In vitro* propagation of North American ginseng (*Panax quinquefolius* L.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v.47, p.710-718, 2011.

VUJOVIC, T.; RUZIC, D. J.; CEROVIC, R. *In vitro* shoot multiplication as influenced by repeated subculturing of shoots of contemporary fruit rootstocks. *Horticultural Science (Prague)*, v. 39, n. 3, p. 101-107, 2012.

ZHAO, Y., SUN, W., WANG, Y., SAXENA, P. K., & LIU, C. Z. Improved mass multiplication of *Rhodiola crenulata* shoots using temporary immersion bioreactor with

forced ventilation. **Applied biochemistry and biotechnology**, v.166, n.6, p. 1480-1490, 2012.

ZIV, M. The control of bioreactor environment for plant propagation in liquid culture. **Environmental Effects and their Control in Plant Tissue Culture** v.393, p. 25-38, 1995.

YANG, J.; ZHAO, S.; YU, C.; LI, C. Large-Scale Plantlet Conversion and Ex Vitro Transplantation Efficiency of Siberian Ginseng by Bioreactor Culture. **The Scientific World Journal**, 2013.

YANG, S.F.; HOFFMAN, N.E. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 35, p. 155-189, 1984.

WATT, M.P.; BANASIAK, M.; NICHOLSON, T.; MCALISTER, B. Strategies for the selection of uncontaminated Eucalyptus explants for shoot multiplication in a temporary immersion system (RITA) in a commercial laboratory. **African Journal of Biotechnology** , J.v. 206, p.13-22, 2006.

WATT, M. P. The status of temporary immersion system (TIS) technology for plant micropropagation. **African Journal Biotechnology**, v. 11, p. 14025-14035, 2012.

## CAPÍTULO 2

---

### CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE *Pfaffia glomerata* e *Lippia filifolia* COM ÊNFASE AO USO DE ÓLEO MINERAL

## RESUMO

A estratégia de conservação de plantas medicinais sob condições *in vitro* via banco de germoplasma é uma alternativa viável para garantir a preservação de germoplasma para utilização futura. Nesse contexto, o objetivo do trabalho foi desenvolver e aperfeiçoar estratégias de conservação *in vitro* dessas espécies, com ênfase ao uso do óleo mineral. Como explantes, foram utilizados segmentos nodais de *P. glomerata* e *L. filifolia* já estabelecidas *in vitro*. Num primeiro experimento, os segmentos nodais foram inoculados em tubos de ensaio (15 x 150 mm) contendo 10 mL de meio de MS e submetidos aos seguintes tratamentos: 1) cobertos completamente com óleo mineral; 2) cobertos completamente com água destilada e autoclavada, e; 3) desprovidos de cobertura (controle). Adicionalmente, testou-se a influência do uso de um ou dois explantes por tubo de ensaio. Neste experimento, a avaliação referente a sobrevivência (%) e altura de plantas (cm) foi realizada após 120 dias. A partir dos resultados obtidos no primeiro experimento, um segundo experimento foi montado para avaliar diferentes volumes de óleo mineral (5,10 e 15 mL) sobre os explantes, combinados com diferentes temperaturas (15°, 20°, 25°C) de conservação. Neste experimento, além das avaliações referentes a sobrevivência (%) e altura de plantas (cm), também foram realizadas análises anatômicas e histoquímicas nos propágulos conservados. As avaliações foram realizadas por até 360 dias. Para ambos os experimentos, o delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com 12 repetições, sendo cada repetição formada por um tubo de ensaio. Como resultado, verificou-se que no primeiro experimento, ambas as espécies apresentaram as maiores percentagens de sobrevivência e o menor crescimento dos propágulos quando mantidas sob óleo mineral, comparativamente aos demais tratamentos utilizados. Já no experimento onde se avaliou os diferentes volumes de óleo mineral combinados com diferentes temperaturas de conservação, verificou-se que a *P. glomerata* pôde ser mantida por até 360 dias sob temperatura de 15°C e imersa sob óleo mineral, com sobrevivência média acima de 90%. Já para *L. filifolia* a taxa de sobrevivência foi menor, com média de 24,9% na temperatura de 15°C, após os 360 dias de conservação. Anatomicamente e comparando-se ao tratamento controle, as folhas de *P. glomerata* sob 5 mL de óleo mineral apresentaram-se espessas, com células do parênquima do tipo paliçádico. As células do mesofilo apresentaram arranjo compacto com poucos espaços intercelulares, enquanto no tratamento com 15 mL de óleo mineral, as células da epiderme e do mesofilo foram mais volumosas com paredes celulares delgadas. O caule das plantas sob óleo mineral, não apresentaram fistula, diferentemente daquelas do controle. Já para a *L. filifolia* no tratamento com 5 mL de óleo mineral, o mesofilo apresentou parênquima clorofiliano com células

paliçádicas. Nesta espécie foi verificada a presença de tricomas em ambas as faces epidérmicas. No tratamento com 10 mL de óleo mineral foi possível observar um desarranjo das células que compõe o cilindro vascular, com células adjacentes aos feixes vasculares. As plantas conservadas em 15 mL de óleo mineral apresentaram epiderme espessa e mesofilo com células volumosas com vários espaços intercelulares. No caule, os tratamentos com óleo mineral apresentaram células de maior volume quando comparados com o controle. No tratamento com 5 mL, as células do córtex apresentaram formato alongado e vários espaços intercelulares, com feixes vasculares menores. Histoquimicamente evidenciou-se que polissacarídeos neutros e as proteínas foram aparentes como material de reserva nas folhas e no caule das duas espécies, em geral àquelas mantidas sob as maiores quantidades de óleo mineral.

**Palavras-chave:** conservação de germoplasma; óleo mineral; temperatura.

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil é detentor de uma rica biodiversidade e faz uso de sua flora como fonte de produtos terapêuticos. Porém, visando estabelecer a conservação da flora medicinal, a qualidade, eficácia e segurança das plantas medicinais comercializadas, o Brasil criou um conjunto de resoluções e portarias e determinou a implantação da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos destacando-se a Relação Nacional de Espécies Medicinais de interesse ao Sistema Único de Saúde (SUS), que traz o incentivo a pesquisa e o desenvolvimento de plantas medicinais e fitoterápicas (BRASIL, 2006).

*Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen pertence à família Amaranthaceae e ao gênero *Pfaffia*, que apresenta cerca de 33 espécies distribuídas nas Américas Central e do Sul. Dessas 33 espécies, 21 ocorrem no Brasil que é considerado um centro de origem da espécie. Trata-se de um sub- arbusto (relativamente alto, atingindo até 2 metros de altura). Popularmente a *P. glomerata* é conhecida como ginseng brasileiro. O interesse comercial da espécie está nas raízes tuberosas que possuem substâncias com propriedades medicinais. Essas substâncias atuam na inibição do crescimento de células cancerígenas, antidiabétes e tônico afrodisíaco (NISHIMOTO *et al.*, 1986; CORTEZ *et al.*, 1998; MONTANARI *et al.*, 1999). Esta espécie vem sendo objeto de estudo devido aos seus efeitos antiinflamatório, analgésico, sendo esses efeitos ocasionados provavelmente devido a ecdisterona, rubrosterona presente em suas raízes (SHIOBARA *et al.*, 1993).

*Lippia filifolia* Mart & Schauer and Schauer pertence á família Verbenaceae e ao gênero *Lippia*. Apresenta cerca de 200 espécies distribuídas no Brasil, Paraguai, Argentina e África. O Brasil possui cerca de 75% da diversidade das espécies do gênero, sendo considerado centro de diversidade a Cadeia do Espinhaço em Minas Gerais e a Chapada Diamantina na Bahia (PIMENTA *et al.*, 2013). Os Campos rupestres e Cerrados do Brasil são considerados regiões de alto endemismo (VICCINI *et al.*, 2005). Popularmente as espécies do gênero são conhecidas como erva-cidreira, erva-cidreira do campo, alecrim do mato e alecrim do campo (JULIÃO *et al.*, 2003). O interesse econômico pelas espécies de *Lippia* está na propriedade medicinal e aromática dos compostos biológicos ativos, usados na medicina tradicional no tratamento anti- termico e no combate da insônia e da asma (GOMES *et al.*, 1993; PASCUAL *et al.*, 2001).

Contudo, grande parte da produção de plantas medicinais nativas é obtida por extrativismo severo e descontrolado, estando elas sujeitas a sofrer erosão genética, dificultando a obtenção de matéria-prima para suprir a demanda pela indústria fitoterápica (CAMILO *et al.*, 2009). Sendo assim, a conservação *in vitro* pode representar uma garantia da

conservação de genótipos de importância econômica (SCHERWINSKI- PEREIRA *et al.*, 2010).

A estratégia de conservar plantas medicinais *in vitro* é de grande importância para evitar perdas biológicas de espécies com importância econômica em razão de fatores como degradação ambiental ou ataque por pragas, assegurando a manutenção das espécies, e garantir a integridade genética para uso atual e futuro como fonte de variabilidade (NASSAR, 2003).

A conservação *in vitro* baseia-se no cultivo de plantas fora do seu habitat natural e pode ser feita em laboratório por meio de técnicas da cultura de tecidos vegetais (ENGELMANN, 1991). O método de crescimento mínimo por meio da redução do metabolismo celular da planta tem sido amplamente utilizado, uma vez que é possível aumentar ao máximo o espaço de tempo entre cada subcultivo (SARASAN *et al.*, 2006). Para tanto, alterações no ambiente de cultivo, como o uso de baixas temperaturas, baixa intensidade luminosa, meio de cultura com baixa concentração de sais, o uso de agentes osmóticos ao meio de cultura e o uso de uma camada de óleo mineral sobre o explante, torna-se necessário para a redução do crescimento (WHITERS & WILLIAMS, 1998).

O uso do óleo mineral foi relatado pela primeira vez por Caplin em 1959, sobre raízes de cenoura, com o objetivo de armazenar esse material vegetal, com a vantagem de possuir um custo relativamente baixo e sem a demanda por equipamentos caros (ENGELMANN, 1997). A submersão dos materiais em óleo mineral reduz o crescimento dos explantes pela falta de disponibilidade de oxigênio, proporcionando num maior intervalo entre os subcultivos (CAPLIN, 1959). No entanto, apesar de já ter sido citada em outros trabalhos (AUGEURUS, 1986; SHARMA *et al.*, 2012;) ainda são reduzidas ou mesmo inexistentes estudos mais aprofundados sobre os efeitos do Óleo mineral sobre possíveis alterações histoquímicas ou anatômicas, fatores preponderantes para melhor conhecimentos sobre o uso desta substância em protocolos de conservação *in vitro* de recursos genéticos de plantas.

Apesar do conhecimento das propriedades medicinais de *P. glomerata* (MONTANARI *et al.*, 1999) e *L. filifolia* (GUPTA *et al.*, 2001) as informações científicas a respeito da morfologia, anatomia e a histoquímica das espécies conservadas *in vitro* através do uso do óleo mineral ainda é escasso. Dessa forma, o presente trabalho objetivou desenvolver e aperfeiçoar estratégias de conservação *in vitro* de *P. glomerata* e *L. filifolia*, com ênfase no uso de óleo mineral e caracterizar anatomicamente e histoquimicamente as espécies após o período de conservação.



## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Local de realização dos experimentos

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos II (LCT-II) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em Brasília – DF.

### 2.2. Material Vegetal

Os explantes iniciais de *Lippia filifolia* e *Pfaffia glomerata* foram obtidos da Coleção de Germoplasma *in vitro* da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF. Os acessos utilizados foram o CCG 150 de *Pfaffia glomerata* e o CCG 46 de *Lippia filifolia*.

### 2.3. Influência do óleo mineral na conservação *in vitro* de *Lippia filifolia* e *Pfaffia glomerata*

O experimento de conservação foi realizado a partir da inoculação de segmentos nodais de aproximadamente 1,0 cm de comprimento, provenientes de *L. filifolia* e *P. glomerata* cultivadas *in vitro*. Para tanto microestacas das duas espécies foram inoculadas em tubos de ensaio (25 x 150 mm), contendo 10 mL de meio de cultivo semi-sólido.

Nesse experimento o meio nutritivo teve a composição de sais e vitaminas de MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose. O pH foi ajustado para 5,8 ± 0,1 antes da adição do agente gelficante Phytigel (2,5 g.L<sup>-1</sup>) e a esterilização realizada por autoclavagem realizada à 121° C por 20 minutos e 1,3 atm de pressão.

Todo o processo de inoculação dos explantes foi realizado em condições assépticas de câmara de fluxo laminar.

Para cada espécie foram testados seis tratamentos, sendo: 1) tubos com óleo mineral (o óleo mineral foi autoclavado e, logo após o resfriamento, em cada tubo foi colocado 5 mL de óleo mineral sobre o explante, por meio de micropipeta, cobrindo completamente o explante); 2) tubos de ensaio com água destilada (a água destilada foi autoclavada e, logo após o resfriamento, foi colocado 5 mL de água destilada e autoclavada cobrindo completamente o explante), e; 3) tubos de ensaio apenas com o meio de cultura (controle). Adicionalmente, neste experimento também foi avaliada a influência do número de microestacas por recipientes, por meio da inoculação de 1 ou 2 explantes por tubo de ensaio.

Os cultivos foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  fotoperíodo de 16 horas e radiação luminosa de  $52 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , fornecida por lâmpadas LED (Philips - Green Power 20W 60Hz).

As avaliações foram feitas após 30, 60, 90 e 120 dias, observando a percentagem de sobrevivência, altura das brotações (cm) e formação de raízes.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em fatorial 2x3 (número de explantes por tubo de ensaio x tratamento com óleo mineral), com 12 repetições por tratamento. Cada repetição foi formada por um tubo de ensaio por tratamento.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo Teste de Scott-Knott a 5%. O programa utilizado para realizar as análises estatísticas foi o Sisvar 4.4 (FERREIRA, 2011).

#### **2.4. Efeito do óleo mineral e da temperatura na conservação *in vitro* de *Lippia filifolia* e *Pfaffia glomerata***

Uma vez obtidos os resultados do experimento anterior (item 2.3), um novo experimento foi montado, com o objetivo de ajustar e melhorar o protocolo de conservação utilizando óleo mineral. Para tanto, utilizaram-se segmentos nodais de aproximadamente 1,0 cm de comprimento, provenientes de *Lippia filifolia* e *Pfaffia glomerata* cultivadas *in vitro*. Em seguida, duas microestacas foram inoculadas em tubos de ensaio (25 x 150 mm), contendo 10 mL de meio de cultivo semi-sólido.

Neste experimento, foram analisados tratamentos com quatro diferentes volumes de óleo mineral. Para tanto, os explantes foram submersos por 5, 10 e 15 mL de óleo mineral, de forma a cobrir completamente o explante. Fez parte do experimento também o tratamento controle, sem adição de óleo mineral onde os tubos de ensaio foram mantidos apenas com o meio de cultura.

Todos os tratamentos foram submetidos a três temperaturas em câmara incubadora tipo B.O.D (Percival), sob diferentes temperaturas: 15 °C, 20 °C, 25 °C. O fotoperíodo foi de 12 horas e radiação luminosa de  $20 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas.

As avaliações foram feitas a cada 30 dias por um período de até 360 dias, observando a sobrevivência (%), altura dos brotos (cm).

Neste experimento adotou-se delineamento experimental inteiramente casualizado, com doze tratamentos (3 temperaturas de conservação x 4 volumes de óleo mineral). Cada repetição foi formada por um tubo de ensaio (25x150mm), com dois explantes cada.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo Teste de Scott-Knott a 5%. O programa utilizado para realizar as análises estatísticas foi o Sisvar 4.4 (FERREIRA, 2011).

## **2.5. Análise anatômica e histoquímica de *Pfaffia glomerata* e *Lippia filifolia* conservadas *in vitro* sobre efeito do óleo mineral**

### **2.5.1 Análise anatômica**

Para a análise anatômica das plantas de *P. glomerata* e *L. filifolia* desenvolvidas após 360 dias de conservação em óleo mineral sob temperatura de 15°C, amostras de ápices caulinares (2° nó) e folhas de cada tratamento (5, 10, 15mL e controle) foram utilizadas. Para tanto amostras foram fixadas em FAA 70 (Formaldeído, ácido acético, etanol 70% em razão de 1:1:18 v/v) por 48 horas (JOHANSEN, 1940). Em seguida, as amostras foram desidratadas em série etílica crescente (70-100%), por um período de uma hora cada (sob vácuo); e infiltradas em historesina (Leica®), de acordo com as normas do fabricante. Posteriormente, cortes seriados transversais e longitudinais de até 10µm de espessura foram obtidos em micrótomo de rotação manual (Leica® RM 2125 RT) e distendidos sobre água em uma lâmina de vidro, sobre placa aquecedora a 40°C.

Os cortes foram corados com azul de Toluidina (0,5%) para a caracterização estrutural (O' BRIEN e MCCULLY, 1965), seguido da montagem de lâmina- lamínula com Entellan. Os resultados foram visualizados e registrados em fotomicroscópio óptico com sistema de captura de imagens (Leica DM750).

### **2.5.2 Análise histoquímica**

Para a análise histoquímica as amostras foram obtidas a partir do material emblocado para a análise anatômica descrita no item anterior.

As amostras foram coradas e submetidas aos seguintes testes histoquímicos: P.A.S. – “Periodic Acid Schiff” (O' BRIEN e MCCULLY, 1981) usado para identificar polissacarídeos neutros e XP – Xylidine Ponceau utilizado para a identificação de proteínas (O' BRIEN e MCCULLY, 1981).

Os resultados foram registrados em fotomicroscópio óptico com sistema de captura de imagens (Leica DM750).

## 2.6. Recuperação do crescimento e aclimatização

Após o período de 360 dias de conservação, as plantas foram retiradas das condições de crescimento mínimo e inoculadas em tubos de ensaio contendo meio de multiplicação (MS desprovidos de reguladores de crescimento) para a recuperação do crescimento.

O meio de multiplicação foi constituído de sais e vitaminas de MS e suplementado com  $30\text{g L}^{-1}$  sacarose e solidificado com  $2,5\text{ g. L}^{-1}$  de Phytigel e a esterilização realizada por autoclavagem à  $121^\circ\text{ C}$  por 20 minutos e 1,3 atm de pressão.

Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento na presença de luz e temperatura a  $25 \pm 2^\circ\text{ C}$  e fotoperíodo de 16 horas.

Para o processo de aclimatização as plantas que sobreviveram a fase de recuperação do crescimento foram lavadas em água corrente para eliminação do meio de cultura. O plantio foi realizado em copos plásticos de 500 mL de capacidade preenchidos com substrato comercial (Bioplant<sup>®</sup>). Os copos plásticos foram cobertos com sacos plásticos transparentes e individuais, furados na parte superior e fixados com uma liga de elástico.

Após o plantio, as mudas foram pré-aclimatizadas por 30 dias em câmara incubadora tipo B.O.D (Percival<sup>®</sup>) com temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 12 horas e radiação luminosa de  $20\ \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .

Por fim, as plantas foram transferidas para casa de vegetação com cobertura de filme de polietileno transparente (150 micras), umidade relativa de  $75 \pm 5\%$ , temperatura de  $30 \pm 3^\circ\text{C}$ , luminosidade de  $450\text{--}500\ \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  e fotoperíodo em torno de 12 horas. As irrigações foram realizadas manualmente a cada 2 dias.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo Teste de Scott-Knott a 5%. O programa utilizado para realizar as análises estatísticas foi o Sisvar 4.4.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Influência do óleo mineral na conservação *in vitro* de *Pfaffia glomerata* e *Lippia filifolia*

Nas Tabelas 1 e 2 estão apresentados, respectivamente, os resultados referentes à sobrevivência e altura de parte aérea em plantas de *P. glomerata* e *L. filifolia* no processo de conservação *in vitro* após 120 dias de cultivo.

Para *P. glomerata*, não foram verificadas diferenças estatísticas para a sobrevivência entre os tratamentos testados. Os resultados apresentados para a taxa de sobrevivência indicam que o uso de óleo mineral e água, não comprometeram a sobrevivência das plantas submersas *in vitro*, com médias significativamente altas para ambos tratamentos variando entre 83,3 % a 100% respectivamente.

**Tabela 1.** Análise da sobrevivência e altura em plantas de *Pfaffia glomerata* ao longo do período de conservação *in vitro* sob temperatura de 25°C.

		Sobrevivência (%)			
Condições de Cultivo	Nº de microestacas/tubo	Tempo de cultivo			
		30 dias	60 dias	90 dias	120 dias
Controle	1	100±0,0 aA	91,6±8,3 aA	91,6± 8,3aA	91,6± 8,3aA
	2	100±0,0 aA	100±0,0 aA	100±0,0 aA	100±0,0 aA
Água	1	100±0,0 aA	100±0,0aA	91,6±8,3 aA	91,6±8,3 aA
	2	83,3±11,2 aA	83,3±8,3 aA	83,3±11,2 aA	83,3±11,2 aA
Óleo mineral	1	100±0,0 aA	100±0,0 aA	100±0,0 aA	100±0,0 aA
	2	95,8±4,2 aA	95,8±4,2 aA	87,5±9,0 aA	87,5±9,0 aA
		Altura (cm)			
Controle	1	5,1±1,5 bC	9,5 ±1,5aB	13,8±1,2 aA	13,8±1,2 aA
	2	9,0±0,8 aB	11,7±1,0 aA	14,0±0,7 aA	14,0±0,6 aA
Água	1	3,1±0,9 bB	10,2±1,3 aA	12,6±1,6 aA	12,6±1,6 aA
	2	4,5±1,1 bA	6,6±1,4 bA	8,0±1,5 bA	8,4±1,3 bA
Óleo mineral	1	2,1±0,2 bB	4,5±0,1 bB	7,5±1,2 bA	8,0±1,1 bA
	2	2,2±0,2 bB	3,3±0,5 bB	6,0±0,9 bA	6,1±0,9 bA

Médias ± erro padrão seguidas pela mesma letra (maiúscula para comparação horizontal e minúscula para vertical), não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. \* Adicionou-se a quantidade de 5 mL de óleo mineral; ou 5 mL de água destilada.

Para a variável altura aos 30 dias, as plantas submersas em água e contendo apenas um explante não diferiram estatisticamente das plantas do controle, embora tenham apresentado uma redução no crescimento. No entanto, a partir dos sessenta dias de cultivo, verificou-se um menor crescimento em altura das plantas submetidas ao tratamento com óleo

mineral, independentemente do número de microestacas utilizadas por tubo de ensaio com relação aos demais tratamentos testados (Figura 1 A-C).

Já para *L. filifolia* verificaram-se diferenças estatísticas marcantes entre os tratamentos de conservação avaliados. Aos 120 dias de cultivo, as microestacas submersas em água não sobreviveram (Figura 1 F), enquanto que as estacas submersas em óleo mineral apresentaram médias entre 87,5 e 100,0% de sobrevivência (Tabela 2), semelhante ao controle.

Em relação à altura, as plantas de *L. filifolia* submersas no óleo mineral apresentaram uma restrição do crescimento de sua parte aérea com média de até 2,0 cm, quando comparadas com as plantas do controle com média de até 6,4 cm (Figura 1 D-E).

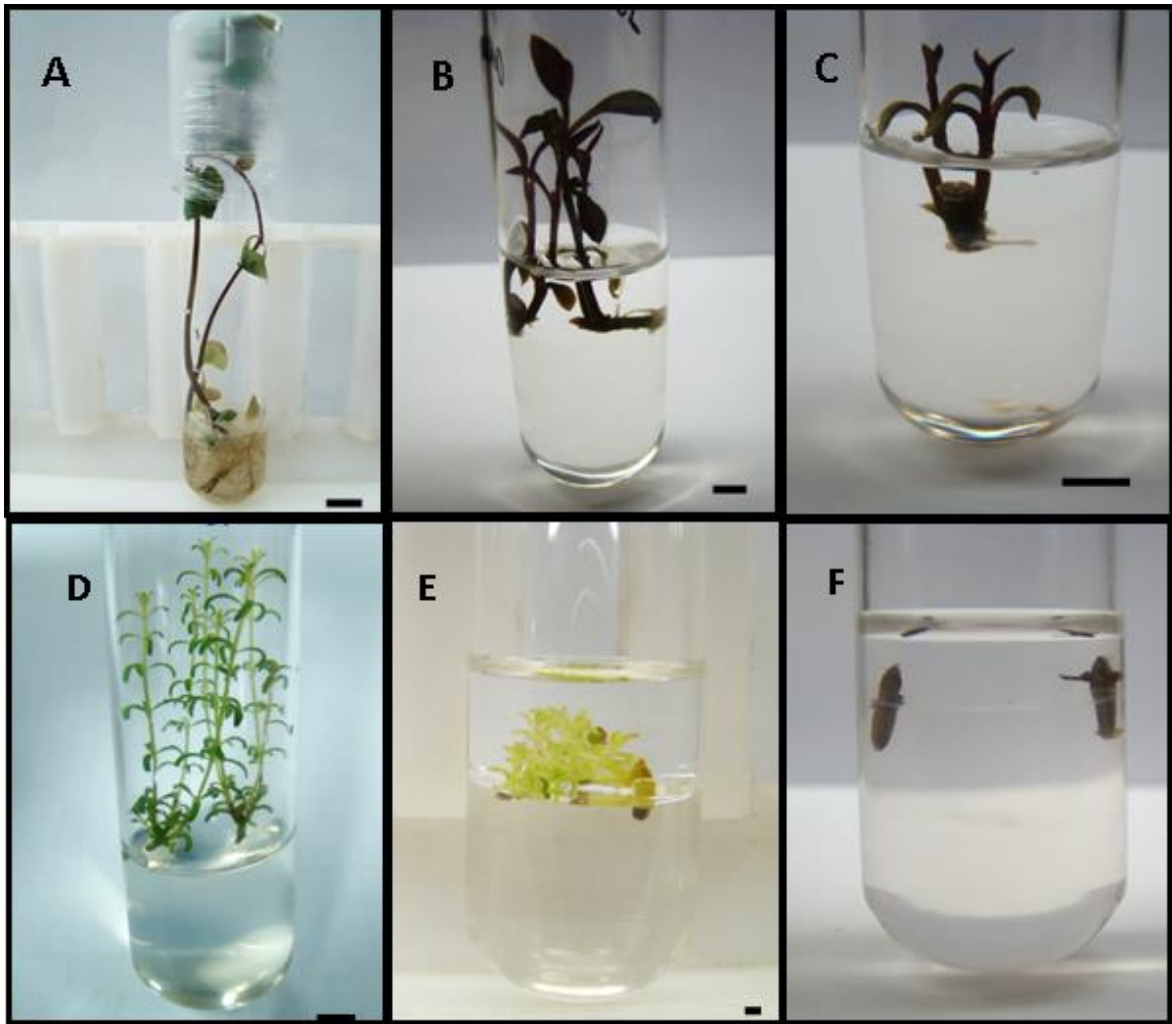
**Tabela 2.** Análise da sobrevivência e altura da espécie *Lippia filifolia* durante o período de conservação *in vitro* com óleo mineral sob temperatura de 25 °C.

Tratamento	N° de microestacas/ tubo	Sobrevivência (%)			
		Tempo de cultivo			
		30 dias	60 dias	90 dias	120 dias
Controle	1	100,0±0,0 aA	50,0±15,0 bB	50,0±15,0 bB	50,0±15,0 bB
	2	100,0±0,0 aA	100,0±0,0 aA	100,0±0,0 aA	100,0±0,0 aA
Água	1	8,3±8,0 bA	8,3±8,0 cA	8,3±8,0 cA	0,0±0,0 cA
	2	8,3±8,0 bA	0,0±0,0 cA	0,0±0,0 cA	0,0±0,0 cA
Óleo mineral	1	100,0±0,0 aA	100,0±0,0 aA	100,0±0,0 aA	100,0±0,0 aA
	2	95,8±4,0 aA	87,5±9,0 aA	87,5±9,0 aA	87,5±9,0 aA

Tratamento	N° de microestacas/ tubo	Altura (cm)			
		30 dias	60 dias	90 dias	120 dias
Controle	1	5,1±0,39 aA	5,1±0,39 aA	5,1±0,39 aA	6,4±1,0 aA
	2	4,6±0,73 aA	5,5±0,73 aA	5,6±0,73 aA	5,6±0,73 aA
Água	1	1,0±0,08 bA	1,0±0,08 bA	1,0±0,08 bA	0,0±0,0 bA
	2	1,0±0,08 bA	0,0±0,0 bA	0,0±0,0 bA	0,0±0,0 bA
Óleo mineral	1	2,0±0,2 bA	2,0±0,2 bA	2,0±0,2 bA	2,0±0,2 bA
	2	1,0±0,08 bA	1,0±0,08 bA	1,0±0,008 bA	1,0±0,08 bA

Médias ± erro padrão seguidas pela mesma letra (maiúscula para comparação horizontal e minúscula para vertical), não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. \* Adicionou-se a quantidade de 5 mL de óleo mineral ou 5 mL de água destilada.



**Figura 1.** Influência do óleo mineral na conservação *in vitro* das espécies *Pfaffia glomerata* e *Lippia filifolia*, após 120 dias sob temperatura de 25 °C; **A)** *Pfaffia glomerata* cultivada em meio de MS, sem óleo mineral; **B)** *Pfaffia glomerata* cultivada em meio de MS, com uma camada de 5 mL de óleo mineral; **C)** *Pfaffia glomerata* conservada com uma camada de 5 mL de água destilada; **D)** *Lippia filifolia* cultivada em meio de MS, sem óleo mineral; **E)** *Lippia filifolia* cultivada em meio de MS, com uma camada de 5 mL de óleo mineral; **F)** *Lippia filifolia* conservada com uma camada de 5 mL de água destilada (Barras = 1cm).

Segundo Caplin (1959), uma camada de óleo mineral pode ser adicionada sobre o tecido vegetal no cultivo *in vitro*, podendo ser considerado eficaz na conservação de espécies, desacelerando o crescimento pela redução da disponibilidade de oxigênio para as culturas. Além disso, de acordo com o autor, essa técnica é simples, apresenta baixo custo financeiro, podendo auxiliar no armazenamento de espécies viáveis por períodos maiores de tempo, sem a necessidade de subcultivos, reduzindo a contaminação das culturas e garantindo, assim, a conservação de germoplasma *in vitro*.

De acordo com George & Davis *et al.* (2008), a absorção de oxigênio pelos tecidos das plantas cultivadas em meio de cultivo semi-sólido, ocorre através das partes que estão expostas acima da superfície do meio de cultura. Porém no presente estudo, o material vegetal não ficou exposto ao microambiente (tubo de ensaio), devido ao acréscimo do óleo mineral que limitou a disponibilidade de oxigênio para a planta, reduzindo assim o crescimento.

Os resultados obtidos no presente trabalho evidenciaram a influência dos tratamentos na viabilidade e conservação das espécies *P. glomerata* e *L. filifolia*, principalmente, na taxa de sobrevivência, corroborando com os resultados obtidos por Dekkers *et al.* (1991) num estudo com *Zingiberaceae*, os quais obtiveram mais de 90% de sobrevivência da espécie, conservando-a durante um ano submersa em óleo mineral. Mannonem *et al.* (1990) obtiveram resultados semelhantes com as espécies *Panax ginseng*, e *Catharanthus roseus*. Neste estudo, os autores conservaram ambas as espécies em óleo mineral durante 6 meses.

Resultados similares aos do presente trabalho em relação à redução do crescimento em altura das plantas submersas em óleo mineral de *P. glomerata* e *L. filifolia* foram obtidos por Sharma *et al.* (2012), em seu estudo com *Bacopa manieri*. Esses autores observaram que o crescimento lento da espécie através do óleo mineral, ocorreu devido à baixa disponibilidade de oxigênio presente nesse ambiente de cultivo, quando comparado ao controle e a água.

Kuble (1927) relatou que o oxigênio e o gás carbônico são mais solúveis em óleo mineral do que na água sob temperatura de 25 °C, porém, a transferência do gás carbônico no óleo mineral para a plantas submersas ocorre lentamente, ficando o mesmo sobre a superfície das plantas. De acordo com Dekkers *et al.* (1991), o crescimento das plantas submersas no óleo mineral é menor do que quando comparado ao crescimento das plantas submersas em água devido a solubilidade do oxigênio ser maior no óleo mineral do que na água. Bridgen *et al.* (1981), relataram que a redução da taxa de oxigênio sobre as culturas de *Nicotiana tabacum* mantidas sob óleo mineral, gerou uma baixa taxa no crescimento das plantas mantendo as mesmas conservadas.

No entanto, no tratamento referente à água, as microestacas de *L. filifolia* não sobreviveram. De acordo com Koslowski & Pallardi (1984), plantas sob condições de alagamento sofrem com a diminuição da difusão de oxigênio, gerando uma baixa disponibilidade desse gás, tendo como consequência, a redução das atividades bioquímicas do metabolismo, como a respiração e a fotossíntese, afetando o crescimento das plantas. A redução desses processos na planta pode causar alterações anatômicas e morfológicas nas



folhas e raízes, a troca da respiração aeróbica pela anaeróbica, e gerar efeitos letais devido ao aumento do consumo de carboidratos e acúmulo de toxinas no citosol, gerando o rompimento das membranas (FUKAO & BAILEY- SERRES, 2004).

De maneira geral, no tratamento controle as plantas de *P. glomerata* e *L. filifolia* apresentaram indivíduos com maior desenvolvimento da parte aérea ao final de 120 dias de cultivo. De fato, a análise comparativa em altura de ambas as espécies do presente trabalho indicou interação significativa entre as espécies com os tratamentos de conservação utilizados, mostrou que o comportamento à imersão em óleo mineral e em água é genótipo dependente. Para a *P. glomerata* a quantidade de 5mL de óleo mineral, não foi suficiente para impedir o crescimento da parte aérea dos brotos, que acabaram ultrapassando o nível do óleo (Figura 1B). Neste caso, recomenda-se analisar uma maior quantidade de óleo mineral nos estudos de conservação para a espécie, com o intuito de reduzir o crescimento, fato tratado nesse trabalho como segue.

### **3.2. Efeito do óleo mineral e da temperatura na conservação *in vitro* de *Pfaffia glomerata* e *Lippia filifolia***

Nas Tabelas 3 e 4, estão apresentados respectivamente os resultados referentes a sobrevivência, das microestacas de *P. glomerata* e *L. filifolia* conservadas *in vitro* sob influência do óleo mineral e temperatura.

**Tabela 3.** Análise da sobrevivência de *Pfaffia glomerata* conservada *in vitro* sob diferentes volumes de óleo mineral e temperaturas.

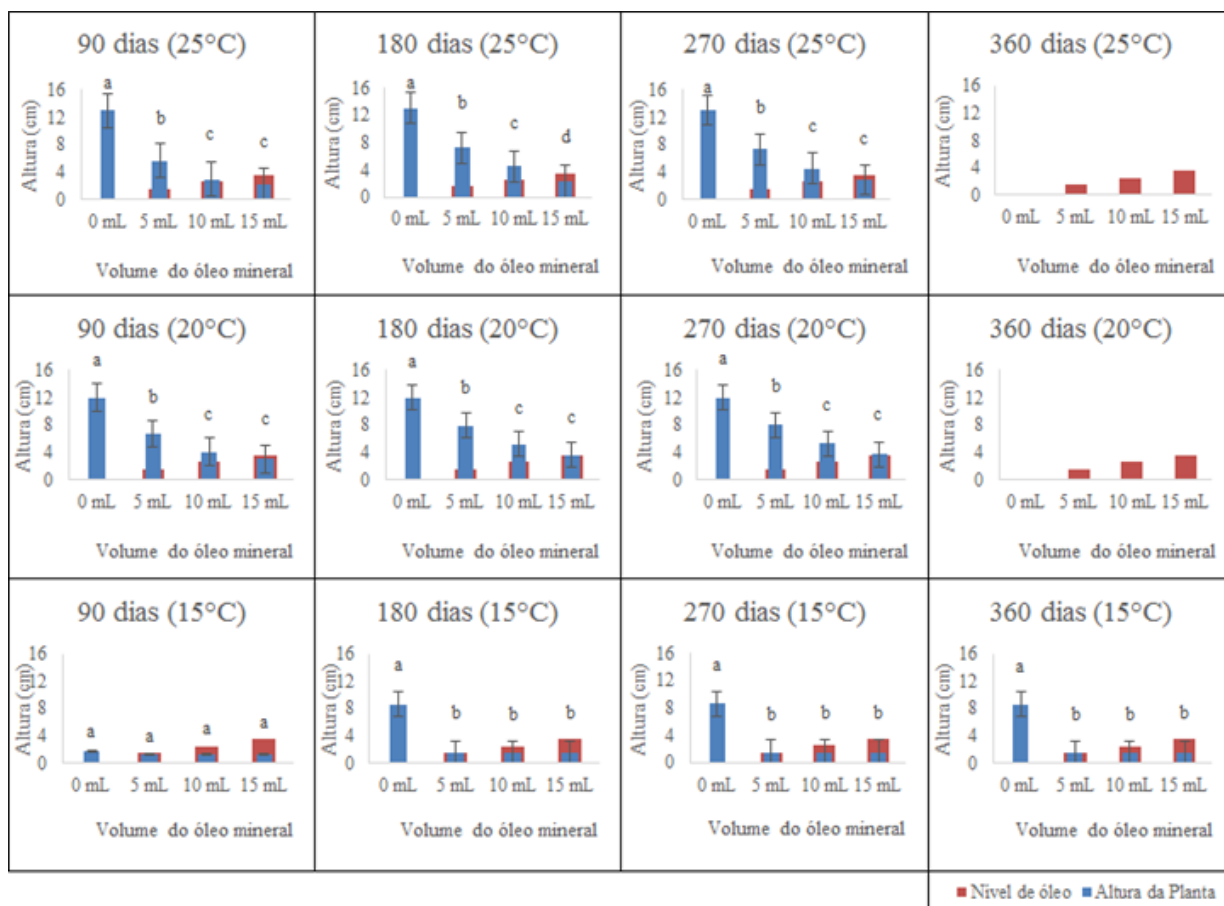
Temperatura	Óleo mineral	Sobrevivência (%)			
		Tempo de cultivo (dias)			
		90	180	270	360
25°C	0 mL	100,0±0,0 aA	100,0±0,0 aA	50,0±2,9 cB	0,0±0,0 cC
	5 mL	100,0 ±0,0 aA	93,7±3,5 bB	0,0±0,0 dC	0,0±0,0 cC
	10 mL	100,0 ±0,0 aA	100,0±0,0aA	50,0±2,9 cB	0,0 ±0,0 cC
	15 mL	100,0±0,0 aA	100,0±0,0 bA	50,0± 2,9 cB	0,0±0,0 cC
20°C	0 mL	100,0±0,0 aA	100,0±0,0 aA	45,8±2,9 cB	0,0±0,0 cC
	5 mL	100,0±0,0 aA	50,0±2,9 cB	50,0±2,9 cB	0,0±0,0 cC
	10 mL	100,0±0,0 aA	100,0±0,0 aA	50,0±2,9 cB	0,0±0,0 cC
	15 mL	100,0±0,0 aA	100,0±0,0 aA	50,0±2,9 cB	0,0 ±0,0 cC
15°C	0 mL	100,0±0,0 aA	95,8±2,9 aA	95,8±2,9 aA	95,8±2,9 aA
	5 mL	100,0±0,0 aA	100,0±0,0 aA	100,0±0,0 aA	100,0±0,0 aA
	10 mL	100,0±0,0 aA	100,0±0,0 aA	79,1±5,1 bB	79,1± 5,1 bB
	15 mL	100,0±0,0 aA	100,0±0,0 aA	95,8±2,9 aB	95,8±2,9 aB

Médias ± erro padrão seguidas pela mesma letra (maiúscula para comparação horizontal e minúscula para vertical), não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Altura do óleo mineral 5mL= 1,5cm; 10mL= 2,5 cm; 15 mL= 3,5cm.

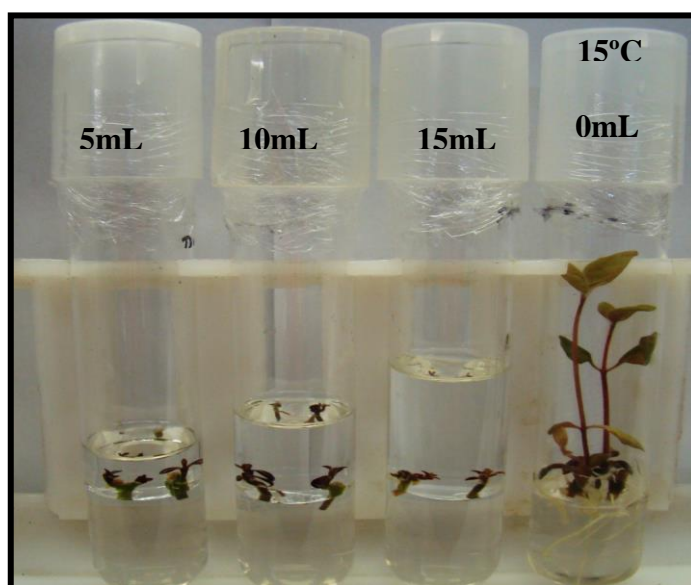
Verificou-se que a conservação de *P.glomerata*, foi influenciada pelas diferentes temperaturas de cultivo, e os diferentes volumes de óleo mineral, que acabaram impactando significativamente a sobrevivência dos explantes. No decorrer dos 180 dias sob temperatura de 25, 20 e 15°C as plantas de *P. glomerata* apresentaram entre 93,7% a 100% de sobrevivência, independentemente do volume de óleo mineral utilizado nos tratamentos. Aos 360 dias de cultivo, as plantas que permaneceram sob temperatura de 15°C e submersas em diferentes volumes de óleo mineral, apresentaram médias de 79,1 a 100% de sobrevivência, enquanto que as plantas sob as temperatura de 25° e 20°C, independentemente do volume de óleo mineral utilizado não sobreviveram (Tabela 3).

Um aspecto importante observado nesse estudo foi que a combinação do óleo mineral independente do volume aplicado, com a temperatura de 15°C reduziu drasticamente o crescimento dos brotos e estes permaneceram submersos e viáveis durante todo o tempo de armazenamento.

Para a variável altura, observou-se que as plantas de *P.glomerata* reduziram seu crescimento significativamente, de acordo, com a redução das temperaturas de conservação. Nas temperaturas de 25 e 20°C as plantas que estavam submersas no óleo mineral apresentam médias entre 4 e 8 cm aos 270 dias, respectivamente, e as plantas que estavam no controle obtiveram um crescimento bem superior chegando até a ultrapassar 12 cm de comprimento na temperatura de 25°C. No entanto, as plantas que estavam sob temperatura de 15°C e submersas em óleo mineral, apresentaram um crescimento bem reduzido chegando até 2,5 cm de comprimento, enquanto que as plantas que estavam no controle chegaram a atingir até 8cm de comprimento. Esse resultado demonstra que a temperatura de 15°C foi a mais apropriada para a conservação *in vitro* de *P.glomerata*, pois as plantas mantidas nessa temperatura sobreviveram até os 360 dias de conservação, sem a necessidade de subcultivos, e apresentaram um crescimento inferior ao crescimento das plantas mantidas nas temperaturas de 20 e 25°C (Figura 2 e 3).



**Figura 2.** Altura de *Pfaffia glomerata* conservada *in vitro* sob diferentes temperaturas (25, 20 e 15°C) e volumes de óleo mineral (0, 5, 10 e 15 mL), por 90, 180, 270 e 360 dias.



**Figura 3.** Aspecto de *Pfaffia glomerata* após 360 dias de conservação *in vitro* sob temperatura de 15°C e imersão em diferentes volumes de óleo mineral 0 (Controle), 5, 10 e 15 mL. Altura do óleo mineral 5mL= 1,5cm; 10mL= 2,5 cm; 15 mL= 3,5cm.

Para a conservação da *L. filifolia* observou-se que o uso do óleo mineral, associado com a redução da temperatura de cultivo apresentou efeito significativo na redução do crescimento das plantas *in vitro* ao longo dos 360 dias (Tabela 4).

De maneira geral, a sobrevivência das brotações de *L. filifolia* submersas em 5 e 15 mL de óleo mineral cultivadas em sala de crescimento sob temperatura de 15°C proporcionaram uma taxa de 66,6% a 100% na sobrevivência durante os primeiros 180 dias de conservação *in vitro*. A partir de então, as brotações que permaneceram sob temperaturas de 25 e 20°C apresentaram amarelecimento das folhas tornando-se necrosadas, especialmente aos 360 dias de cultivo (Tabela 4).

Verificou-se que *L. filifolia* apresentou sensibilidade às condições de armazenamento a que foi submetida, uma vez que a sobrevivência dos brotos diminuiu significativamente aos 360 dias de cultivo, mesmo sob temperatura de 15°C, independente do tratamento com óleo mineral. Ao final dos 360 dias de cultivo, a maior taxa de sobrevivência das plantas foi de 52% sob a temperatura de 15°C.

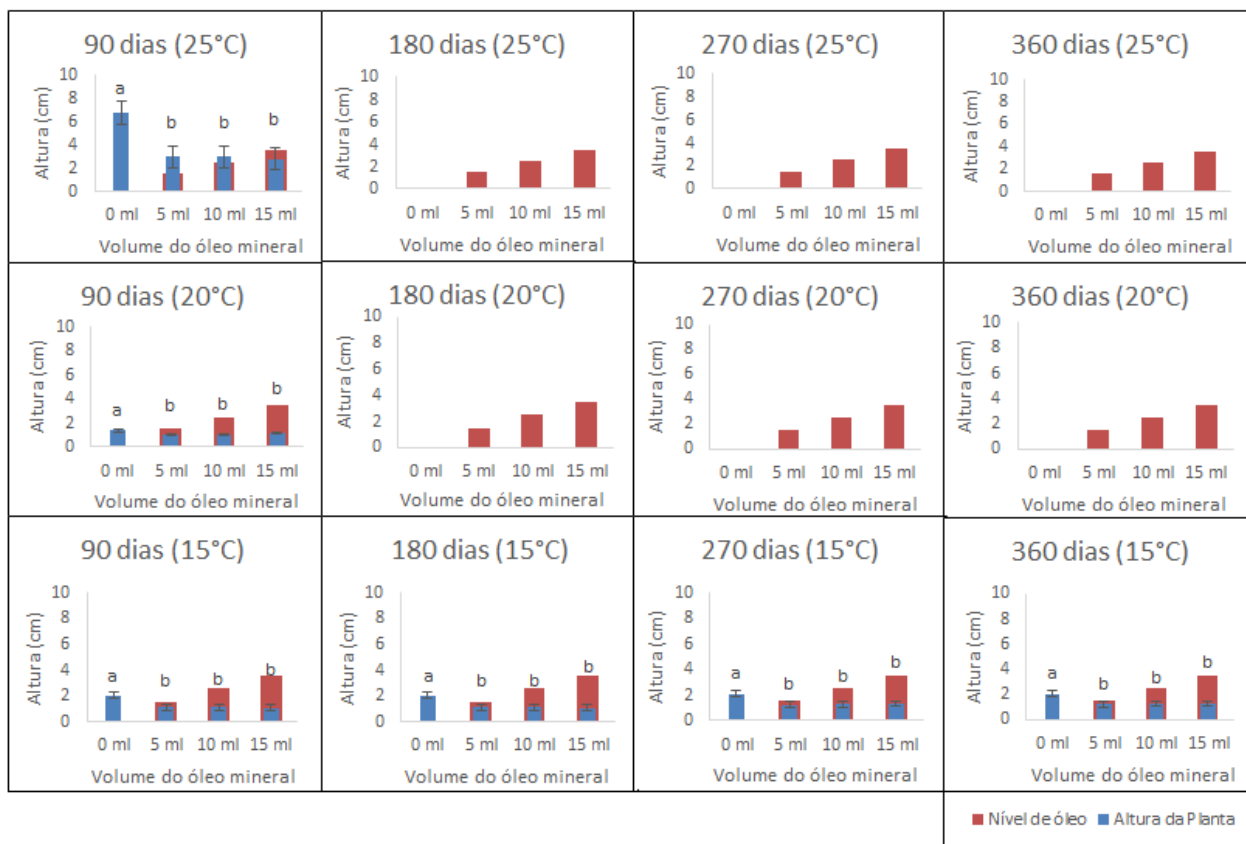
**Tabela 4.** Análise da sobrevivência em *Lippia filifolia* conservada *in vitro* sob diferentes volumes de óleo mineral e temperaturas.

Sobrevivência (%)					
Temperatura	Óleo mineral	Tempo de cultivo (dias)			
		90	180	270	360
25°C	0 mL	75,0±9,0 bA	20,8±7,3 dB	6,2±3,5 cC	0,0±0,0 cC
	5 mL	66,6±9,8 bA	0,0±0,0 eB	0,0±0,0 cB	0,0±0,0 cB
	10 mL	52,0±9,8 cA	0,0±0,0 eB	0,0±0,0 cB	0,0±0,0 cB
	15 mL	50,0±6,0 cA	0,0±0,0 eB	0,0±0,0 cB	0,0±0,0 cB
20°C	0 mL	45,8±10,4 cA	35,4±8,8 cA	8,3±3,9 cB	0,0±0,0 cB
	5 mL	8,3±5,8 eA	0,0±0,0 eA	0,0 ±0,0 cA	0,0±0,0 cA
	10 mL	0,0±0,0 eA	0,0±0,0 eA	0,0±0,0 cA	0,0±0,0 cA
	15 mL	25,0±9,0 dA	0,0±0,0 eB	0,0 ±0,0 cB	0,0±0,0 cB
15°C	0 mL	91,6±5,8 aA	66,6±6,5 bB	29,1±6,7 bC	29,1±6,7 bC
	5 mL	100,0±0,0 aA	100,0±0,0 aA	62,5±4,5 aB	52,0±7,1 aB
	10 mL	66,6±9,8 bA	66,6±9,8 bA	33,3±4,9 bB	6,2±3,5 cC
	15 mL	100,0±0,0 aA	87,5±4,5 aA	62,5±4,5 aB	12,5±6,9 cC

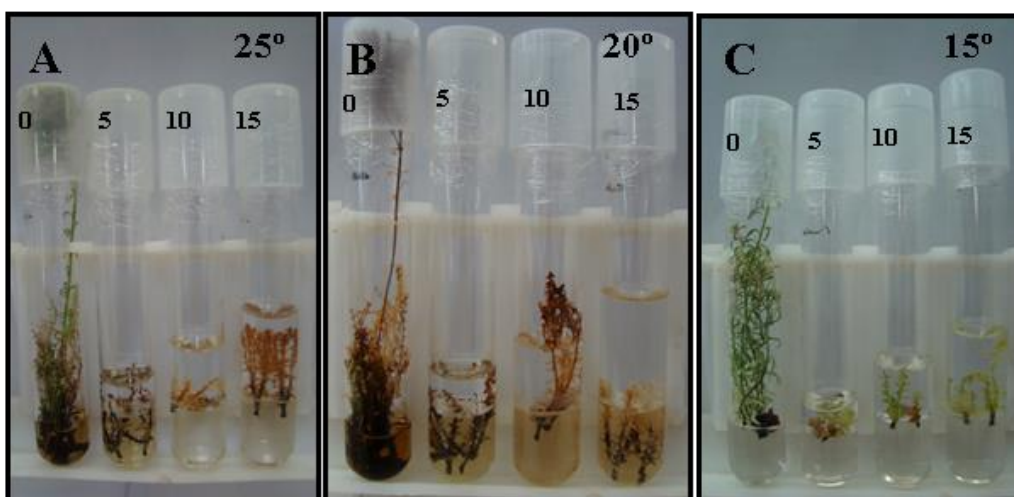
Médias ± erro padrão seguidas pela mesma letra (maiúscula para comparação horizontal e minúscula para vertical), não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Altura do óleo mineral 5mL= 1,5cm; 10mL= 2,5 cm; 15 mL= 3,5cm.

Em relação à altura observa-se um incremento significativo no comprimento de parte aérea, até os 90 dias sob a temperatura de 25°C. Na temperatura de 15°C e 20°C as alturas médias das plantas não sobressaíram os diferentes níveis de óleo mineral do experimento (5 a

15 mL). Isso sugere que a temperatura de 15°C é a mais apropriada para o armazenamento *in vitro*, pois após 360 dias de conservação as plantas apresentaram valores inferiores no crescimento em altura (Figura 4 e 5), sobretudo quando imersas em 5 mL de óleo mineral.



**Figura 4.** Altura de *Lippia filifolia* sob diferentes temperaturas (25, 20 e 15°C) e volumes de óleo mineral (0, 5, 10 e 15 mL), por 90, 180, 270 e 360 dias.



**Figura 5.** Aspecto de *Lippia filifolia* após 360 dias de conservação *in vitro* sob temperatura de 25°C (A), 20°C (B), 15°C (C) e imersão em diferentes volumes de óleo mineral 0 (Controle), 5, 10 e 15 mL. Altura do óleo mineral 5mL= 1,5cm; 10mL= 2,5 cm; 15 mL= 3,5cm.

De acordo com Caplin (1959) e posteriormente por Augereau *et al.* (1986), o uso da camada de óleo mineral é um método baseado na redução dos níveis de oxigênio das culturas armazenadas. Segundo os autores é uma técnica relativamente fácil, simples, eficaz com baixo custo na manutenção e desaceleração do crescimento de espécies conservadas *in vitro*. Esse método de crescimento lento também foi utilizado por Manonnen *et al.* (1990), na conservação *in vitro* das espécies *Panax ginseng* e *Cataranthus roseus* e relataram a eficiência do uso do óleo mineral no armazenamento e viabilidade das espécies regeneradas.

A redução do crescimento por meio do uso do óleo mineral foi relatado por Sharma *et al.* (2012) que obtiveram mais de 90% de sobrevivência após um ano das culturas de *Bacopa monnieri* submersas em óleo mineral, durante a conservação *in vitro* da espécie.

Outro fator importante na conservação *in vitro* de plantas é o efeito da diminuição da temperatura em sala de crescimento capaz de diminuir o tempo entre os subcultivos e, conseqüentemente, aumentando o período de armazenamento (AMARAL, 2005; BERKEET, 2007; CAMILLO *et al.*, 2009).

Segundo Engelmann (2009), espécies tropicais podem ser sensíveis ao armazenamento sob baixas temperaturas. Entretanto, no presente trabalho observou-se que tanto *P. glomerata* como *L. filifolia* toleraram a temperatura de 15°C, adicionalmente à submersão ao óleo mineral promovendo um efeito maior na diminuição do crescimento. Resultados similares ao do presente trabalho foram relatados por Lemos *et al.* (2002), que observaram que a melhor temperatura para desacelerar o crescimento de cana-de-açúcar foi de 15°C.

De Goes (1992) relatou a desaceleração do crescimento *in vitro* de *Ipomoea batatas* pelo uso de óleo mineral, porém, sob temperatura de 25°C. Já Dekkers *et al.* (1991) conseguiram plantas de *Zingiber officinale* viáveis ao longo de 2 anos quando estas foram conservadas em óleo mineral sob temperatura de 24°C.

Após 360 dias de conservação das espécies de *P. glomerata* e *L. filifolia*, sob condições de crescimento mínimo, os brotos de ambas as espécies foram transferidos para o meio de regeneração. Contudo, apenas os brotos de *P. glomerata* apresentaram eficiente recuperação emitindo novas folhas, crescimento de parte aérea, formação de raízes e desenvolvimento de novos brotos. Em seguida as plantas foram aclimatizadas com sucesso e transferidas para a casa de vegetação (Figura 6).



**Figura 6.** Aspecto de plantas de *Pfaffia glomerata* após 40 dias em casa de vegetação, oriundas de conservação *in vitro* com óleo mineral.

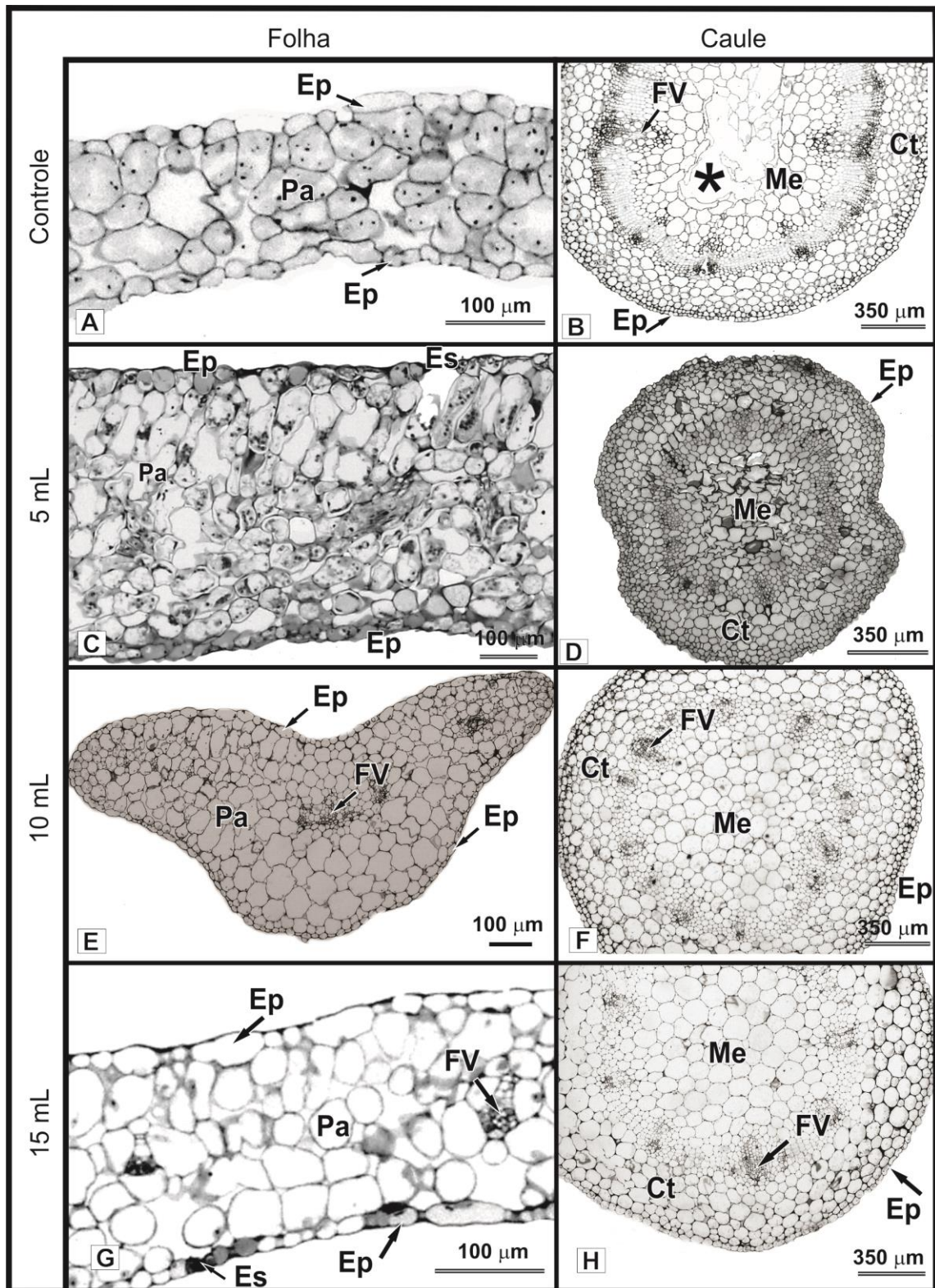
Vale ressaltar, que não há relatos até o momento na literatura sobre o uso de óleo mineral combinado com diferentes temperaturas para a conservação *in vitro* de *P. glomerata* e *L. filifolia*. E, pelos resultados obtidos, o uso do óleo mineral, especialmente combinado ao cultivo em temperatura de 15°C, mostrou-se experimentalmente eficiente, viável, pois as plantas apresentaram uma redução do crescimento em altura e permaneceram vivas submersas no óleo mineral, sugerindo ser uma importante estratégia de conservação para as espécies supracitadas.

### **3.3. Análise histológica e histoquímica de *Pfaffia glomerata* e *Lippia filifolia* sob efeito do óleo mineral na conservação *in vitro***

#### **3.3.1. Análises anatômicas de *Pfaffia glomerata***

Na Figura 7, são apresentados os cortes anatômicos em perspectiva transversal da folha e do caule de *P. glomerata* após 360 dias de conservação *in vitro* sob temperatura de 15°C.





**Figura 7.** Caracterização anatômica da folha e do caule de *Pfaffia glomerata* em seções transversais e coradas com azul de Toluidina após 360 dias de conservação em óleo mineral em 15°C. **A)** Tratamento controle folha; **B)** Tratamento controle caule; **C)** Folha em 5mL de óleo mineral; **D)** Caule em 5 mL de óleo mineral; **E)** Folha em 10 mL de óleo mineral; **F)** Caule em 10 mL de óleo mineral; **G)** Folha em 15 mL de óleo mineral ; **H)** Caule em 15 mL

de óleo mineral. EP= epiderme unisseriada, PA= parênquima paliçádico, FV= feixe vascular, ES= estômato, \* = fístula, ME= medula, CT= córtex.

A lâmina foliar de *P. glomerata* cultivada apenas em meio de cultura (controle), apresenta epiderme unisseriada, com células arredondadas com paredes convexas e células achatadas com paredes periclinais planas e anticlinais convexas, ambas delgadas. O mesofilo apresenta parênquima clorofiliano do tipo homogêneo constituído de cerca de quatro camadas de células poliédricas que delimitam espaços intercelulares de diferentes tamanhos (Figura 7- A). No entanto, Mussury (2003) apresentou resultados contrários aos do presente trabalho, o autor observou em seu estudo com *P. glomerata* que o mesofilo era bifacial com presença de parênquima paliçádico e lacunoso com ausência de espaços intercelulares e com presença de drusas.

O caule também é constituído por epiderme unisseriada, com células epidérmicas de formato arredondado. O córtex apresenta uma camada de colênquima do tipo angular seguido de quatro a cinco camadas de células do parênquima de preenchimento. Menezes *et al.* (1969), observaram em seu estudo anatômico do caule de *P. jubata* que o mesmo apresentou 3 camadas de colênquima e parênquima clorofiliano constituído de seis camadas. O caule é fistuloso, porém envolvido por parênquima de preenchimento. De acordo com Smith & Downs, (1972) *Pfafia glomerata* caracteriza-se pela grande adaptabilidade com distribuição em todo território brasileiro, sendo encontrada em ambientes ensolarados e em margens de rios. Já Vigo *et al.* (2004), relataram que *P. glomerata* apresenta caule delgado e oco quando adulto. Neste sentido, pode-se entender que a fístula possa funcionar como um grande canal aerífero do caule.

No tratamento de conservação utilizando 5 mL de óleo mineral (Figura 7- C), pode-se observar que em plantas cultivadas apresentaram incremento no número de células do parênquima clorofiliano, sendo ainda possível verificar o surgimento de células paliçádicas, indicando a organização de um parênquima do tipo paliçádico nas plantas desse tratamento. De acordo com Henrique *et al.* (2009) algumas espécies desenvolvem mudanças morfológicas dos tecidos para uma melhor adaptação a ausência de oxigênio. Também é possível observar que as células constituintes do mesofilo são menores em relação às observadas no tratamento controle, e elas ainda apresentam um arranjo compacto com poucos espaços intercelulares.

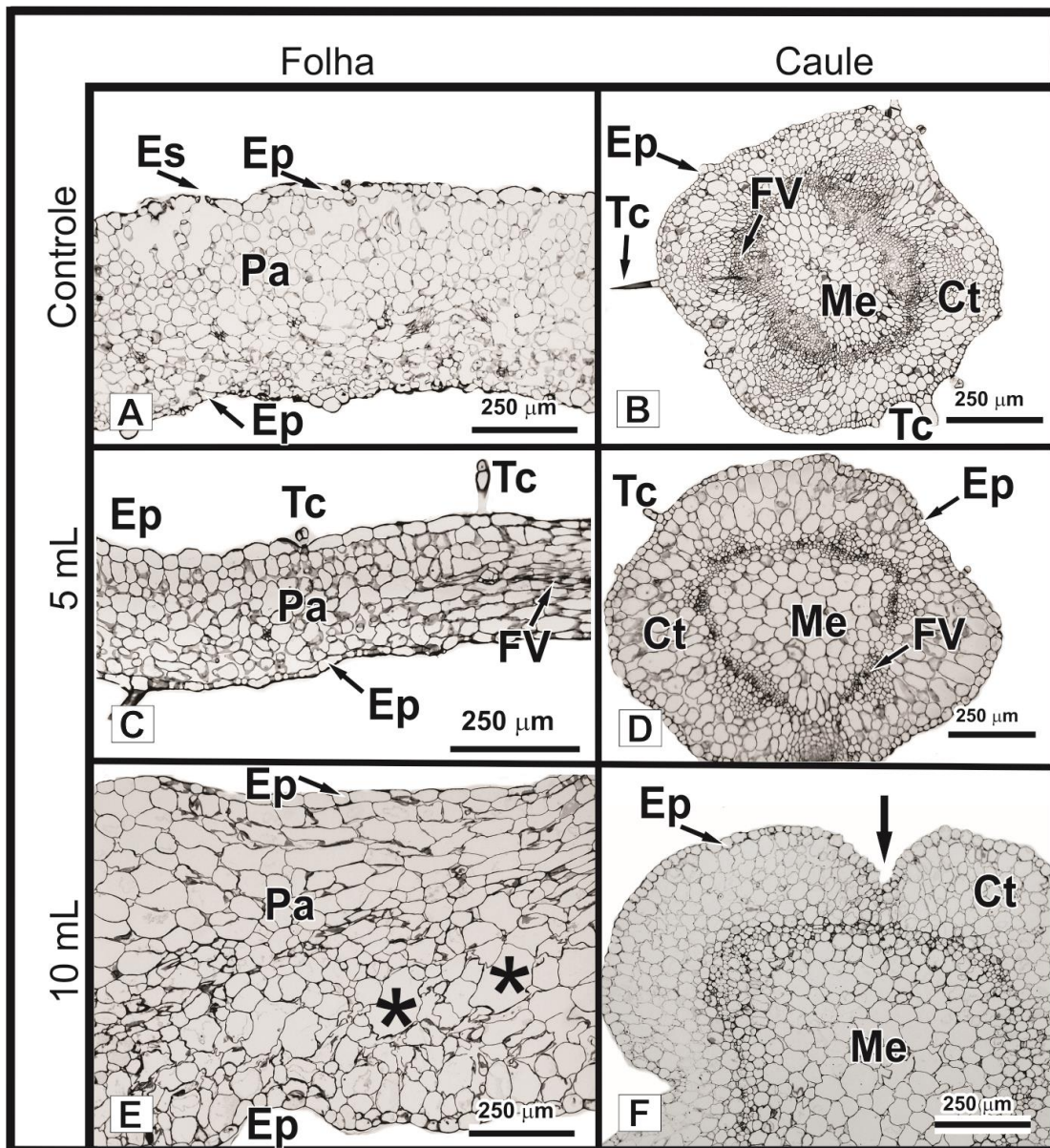
Na Figura 7 E e G, as folhas das plantas conservadas em óleo mineral, 10 e 15 mL respectivamente, também apresentaram características anatômicas semelhantes as plantas

cultivadas com 5 mL de óleo mineral. Porém, no tratamento com 15 mL de óleo, as células constituintes das folhas, tanto da epiderme quanto do mesofilo apresentaram células volumosas, com paredes celulares delgadas.

O caule das plantas que estavam conservadas em óleo mineral, independente do tratamento, não apresentou fístula (Figura B, D, F e H). No tratamento com 5 mL de óleo mineral, foi possível observar um aumento no número de células do córtex e da medula, com um diâmetro menor, compacto, arranjado e com paredes celulares sinuosas e delgadas. O desenvolvimento do feixe vascular foi atenuado, sendo pouco visível. Nos tratamentos com 10 e 15 mL de óleo mineral, os tecidos se apresentaram de forma mais organizada em relação ao tratamento com 5 mL, com feixe vascular visível, porém menos desenvolvido, quando comparado ao controle.

### **3.3.2. Análises anatômicas de *Lippia filifolia***

A Figura 8 ilustra a estrutura morfológica e anatômica da folha e do caule de *Lippia filifolia* submersa em óleo mineral após 360 dias de experimento de conservação *in vitro*.



**Figura 8.** Corte transversal da folha e do caule de *Lippia filifolia* e coradas com azul de Toluidina após 360 dias de conservação em óleo mineral em 15°C **A)** Folha tratamento controle sem óleo mineral; **B)** Caule tratamento controle sem óleo mineral; **C)** Folha tratamento 5mL com óleo mineral; **D)** Caule tratamento 5mL com óleo mineral; **E)** Folha tratamento com 10mL óleo mineral **F)** Caule tratamento com 10 mL óleo mineral. EP= epiderme adaxial e abaxial, ES= estômato, PA= parênquima, TC= tricoma glandular e tector, FV= feixe vascular, ME= medula, \*= espaços intercelulares lisógenos. CT= córtex.

Em *L. filifolia*, plantas do tratamento controle apresentaram folhas com epiderme unisseriada com células de diferentes formatos e parede delgada, estômatos na face adaxial (Figura 8- A). O mesofilo apresenta parênquima clorofiliano do tipo homogêneo, com células de diferentes tamanhos e formas com paredes celulares delgadas, sendo que as células

próximas à face adaxial apresentam maior diâmetro em relação às células próximas à face abaxial.

O caule apresenta epiderme unisseriada com células arredondadas isodiamétricas de parede celular delgada, com vários tricomas tectores e glandulares (Figura 8- B). O cortex é constituído de células parenquimáticas de parede delgada, podendo ser observado cerca de três camadas de células na região adjacente ao feixe vascular, e cinco camadas de células na região interfascicular. O feixe vascular se apresentou bem desenvolvido (Figura 8- B).

Nos tratamentos com 5 mL de óleo mineral (Figura 8- C ), as folhas se apresentaram mais delgadas quando comparadas com o tratamento controle. As células epidérmicas se mostraram mais volumosas com formato arredondado a achatado, diferente do observado no tratamento controle. O mesofilo apresentou parênquima clorofiliano com células paliçádicas, sugerindo a formação de um parênquima do tipo paliçádico e outro do tipo lacunoso, com células arredondadas e achatadas com diversos espaços intercelulares. Já Peixoto *et al* (2017), observou resultados contrários aos do presente trabalho, em seu estudo com *Lippia alba* que apresentou mesofilo com poucos espaços intercelulares. Assim como no controle também foi verificado a presença de vários tricomas em ambas as faces epidérmicas (Figura 8- C).

Em contraste, as plantas conservadas em 15 mL de óleo mineral parece apresentar epiderme mais espessa em relação aos demais tratamentos (Figura 8- E). Para Armstrong *et al.* (2000) o espessamento das células da epiderme funciona como barreira de proteção em plantas submersas a fim de reduzir a perda de oxigênio endógeno. Esse espessamento pode ser justificado pelo volume acentuado das células do mesofilo, as quais também apresentaram um arranjo mais compacto, além da presença de vários espaços intercelulares formados a partir da morte de células do parênquima (Figura 8- E). Com a deficiência de oxigênio a planta modifica a sua rota metabólica passando a produzir energia via glicólise e fermentação, porém essa rota metabólica produz menos energia (2 moles ATP), quando comparada a respiração aeróbica (36 moles ATP), que conseqüentemente, acaba gerando a ruptura das membranas celulares, causando a lise celular (KOZLOWSKI, 1984; LIAO & LIN, 2001; PIMENTEL *et al.*, 2016). No caule, ambos os tratamentos com óleo mineral apresentaram células de maior volume quando comparados com o controle.

No tratamento com 5 mL, as células do córtex apresentaram formato alongado e vários espaços intercelulares (Figura 8- D). De acordo com Pereira *et al.* (2008) plantas submetidas a deficiência de oxigênio produzem lacunas entre as células parenquimáticas como resposta anatômica e fisiológica decorrente da ação da celulase que induz a síntese de etileno endógeno da célula causando alterações observadas na morfogênese anormal da parede

celular. Insausti *et al.* (2001) relata que o maior volume da célula gera aumento de espaços intercelulares no córtex por não apresentarem uma superfície de contato com a parede celular.

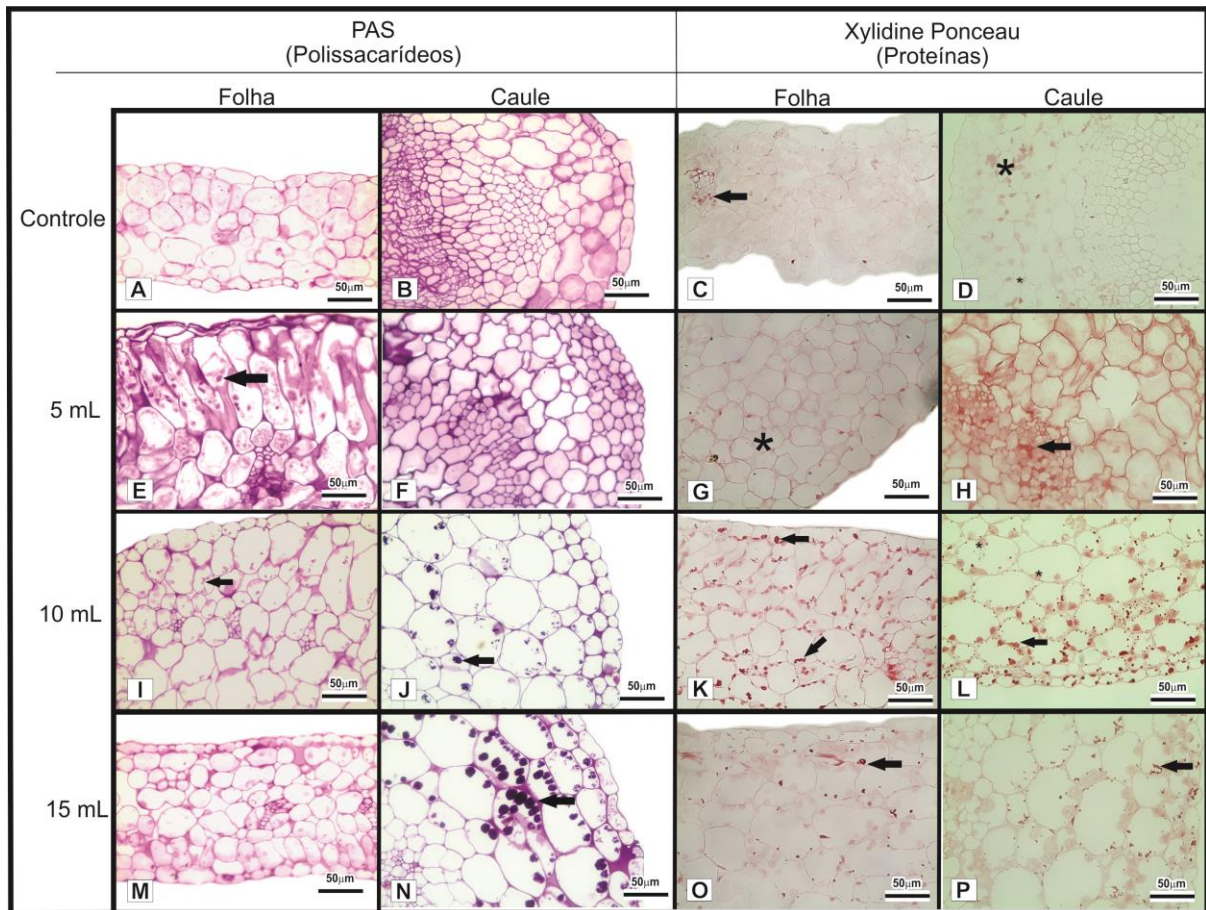
Também foi possível verificar uma diminuição do tamanho dos feixes vasculares, quando comparado com o controle. Já no tratamento com 10 mL de óleo mineral, é possível observar um desarranjo das células que compõe o cilindro vascular, bem como uma maior proliferação de células parenquimáticas na região adjacente aos feixes vasculares, o que não ocorre na região entre os feixes vasculares. Como consequência dessa proliferação vascular a morfologia do caule de *L. filifolia* deixou de ser cilíndrica como no controle e passou a apresentar uma morfologia semelhante a um trevo de quatro folhas, com quatro lóbulos localizados na região do feixe vascular (Figura 8- F).

### **3.4. Análise histoquímica de *Pfaffia glomerata* e *Lippia filifolia***

#### **3.4.1. *Pfaffia glomerata*:**

Na Figura 9 é apresentada a análise histoquímica da folha e do caule de *Pfaffia glomerata* utilizados como explantes na conservação *in vitro* submersas em óleo mineral após 360 dias.

As análises histoquímicas com PAS evidenciaram que em plantas de *P. glomerata* as folhas que foram submetidas a tratamento de conservação com 5 e 10 ml de óleo mineral apresentaram polissacarídeos estocados nas células do parênquima clorofiliano (Figura E e I), porém, quando o órgão avaliado foi o caule, foi verificada a presença de polissacarídeos apenas nos tratamentos com 10 e 15 mL de óleo, sendo neste último mais intenso (Figura J e N). Estudos revelam que plantas submetidas a condições de hipóxia apresentam uma diminuição ou até mesmo uma paralização no crescimento devido à economia de energia que implica no uso controlado das reservas de carboidratos, a fim de controlar e manter as atividades vitais e metabólicas da planta (ARMSTRONG *et al.*, 1994; MEDRI *et al.*, 2002; FERREIRA *et al.*, 2006). Para Lião e Lin (2001) plantas submetidas a ambientes com oxigênio reduzido, a taxa de translocação de carboidratos das folhas para as raízes é reduzida acarretando num acúmulo de carboidratos nas folhas. Já Singh *et al.* (2001) observaram em seu estudo com *G. americana* que a preservação das folhas durante a condição de hipóxia permitiu a planta realizar a fotossíntese mantendo assim o armazenamento de carboidratos nas folhas o que permitiu uma rápida recuperação das plantas após o estresse.

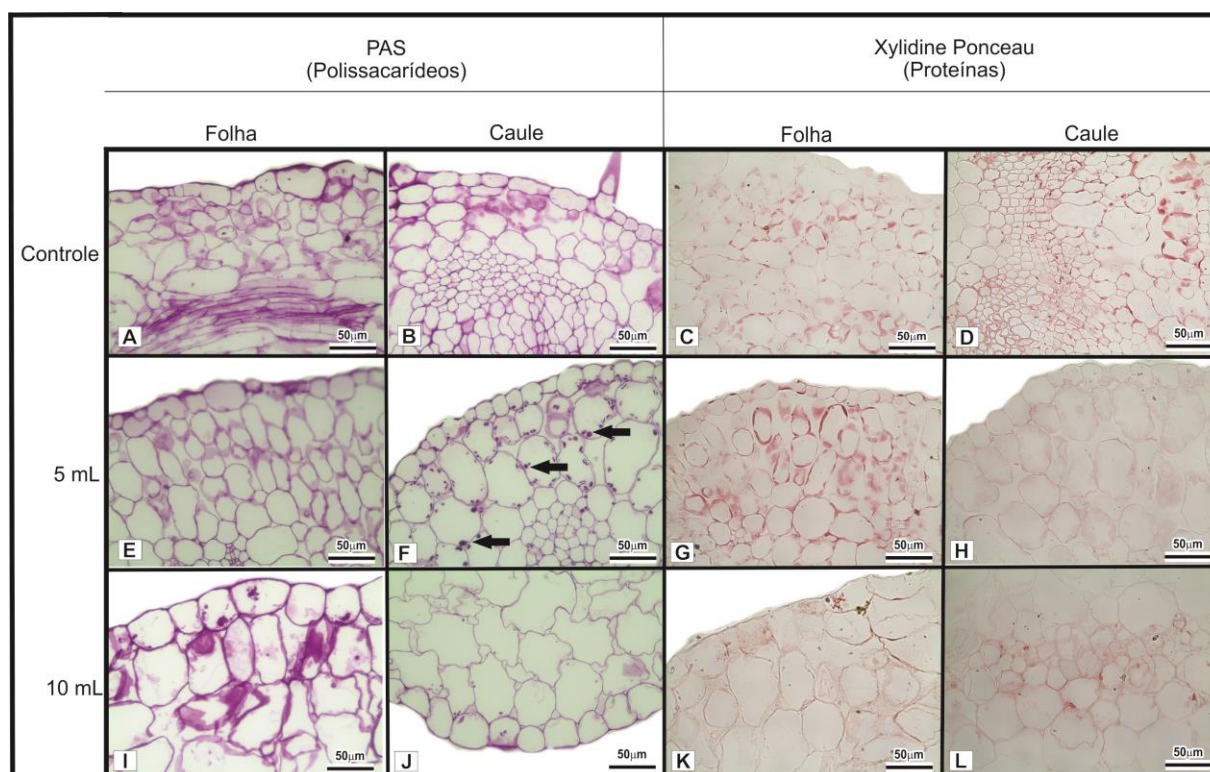


**Figura 9.** Secção transversal da folha e do caule de *Pfaffia glomerata* submetido ao teste com PAS e XP após período de 360 dias de conservação *in vitro* em óleo mineral 15°C. **A.** Explante foliar tratamento controle PAS **B.** Caule tratamento controle PAS **E.** Folha submersa em 5 mL de óleo mineral **F.** Caule submerso em 5 mL de óleo mineral **I.** Folha submersa em 10 mL de óleo mineral **J.** Caule submerso em 10 mL de óleo mineral **M.** Folha submersa em 15 mL de óleo mineral **N.** Caule submerso em 15 mL de óleo mineral **C.** Explante foliar tratamento controle XP **D.** Caule tratamento controle XP **G.** Folha submersa em 5 mL de óleo mineral **H.** Caule submerso em 5 mL de óleo mineral **K.** Folha submersa em 10 mL de óleo mineral **L.** Caule submerso em 10 mL de óleo mineral **O.** Folha submersa em 15 mL de óleo mineral **P.** Caule submerso em 15 mL de óleo mineral.

Já os testes realizados com XP identificaram a presença de proteínas de reserva em células do parênquima clorofiliano de folhas de plantas conservadas com 10 e 15 mL de óleo (Figura 9 K e O), o mesmo sendo observado no caule (Figura 9 L e P). Parolin (2009) relata em seu estudo que a paralização do crescimento de plantas submetidas a condição de hipóxia possibilita a planta manter uma quantidade de reserva suficiente para que, após essa condição de estresse, a planta possa se recuperar e voltar a ter o índice de crescimento normalizado.

### 3.4.2. *Lippia filifolia*:

A Figura 10 apresenta análise histoquímica de *Lippia filifolia* conservada *in vitro* submersa em óleo mineral.



**Figura 10.** Cortes transversais da folha e do caule de *Lippia filifolia* submetido ao teste com PAS e XP após período de 360 dias de conservação *in vitro* em óleo mineral sob 15°C. **A.** Explante foliar tratamento controle PAS **B.** Caule tratamento controle PAS **E.** Folha submersa em 5 mL de óleo mineral **F.** Caule submerso em 5 mL de óleo mineral **I.** Folha submersa em 10 mL de óleo mineral **J.** Caule submerso em 10 mL de óleo mineral **C.** Explante foliar tratamento controle XP **D.** Caule tratamento controle XP **G.** Folha submersa em 5 mL de óleo mineral **H.** Caule submerso em 5 mL de óleo mineral **K.** Folha submersa em 10 mL de óleo mineral **L.** Caule submerso em 10 mL de óleo mineral.

A análise histoquímica revelou que durante o processo de conservação *in vitro*, polissacarídeos neutros parecem ser o principal material de reserva utilizado como fonte de energia durante o período de conservação em óleo mineral, principalmente caule de plantas conservadas com 5 ml de óleo mineral. De acordo com Amaral *et al.* (2007) grãos de amido são um dos principais compostos de reserva em plantas e oferecem suporte para a manutenção da planta em condições de estresse. Segundo Schluter & Crawford (2001), a disponibilidade de açúcares para uso no metabolismo da planta será um dos fatores limitantes, que irá determinar a tolerância e a sobrevivência da mesma, em ambientes com ausência de oxigênio.



Em plantas cultivadas sem óleo mineral e no tratamento com 10 mL, não se observou polissacarídeos no interior das células, bem como de corpúsculos proteicos. Os testes com PAS e XP apenas evidenciaram os polissacarídeos e proteínas cloroplastídicas, respectivamente. Plantas submetidas a ambientes em hipoxia apresentam uma baixa taxa na fotossíntese o que gera um balanço negativo de carboidratos (DENNIS *et al.*, 2000; FELLE, 2005).

#### 4. CONCLUSÃO

- O uso de óleo mineral nos volumes de 5, 10 e 15 mL sobre brotações de *Pfaffia glomerata* e *Lippia filifolia*, especialmente sob temperatura de 15 °C, é uma técnica promissora para conservar germoplasma sob condições *in vitro*;
- Plantas de *P. glomerata* conservadas sob óleo mineral apresentam índices de sobrevivência de até 100% aos 360 dias;
- A recuperação do crescimento dos brotos de *P. glomerata*, após o período de conservação *in vitro* é rápida ao contrário do observado em *L. filifolia* que não sobrevive durante o período de regeneração após a retirada das plantas do óleo mineral;
- A análise histoquímica da folha e do caule de *P. glomerata* conservada sob óleo mineral, mostra a presença de polissacarídeos de reserva e de proteínas;
- A análise histoquímica de *L. filifolia* conservada sob óleo mineral mostrou apenas a presença de polissacarídeo de reserva na folha sobre volume de 5mL;
- As análises anatômicas de *P. glomerata* e *L. filifolia* mostram aparentemente, variações nas células das plantas submersas em óleo mineral.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, L. Conservação e propagação *in vitro* de três cultivares híbridas de Amarílis. Dissertação (Mestrado em Melhoramento Genético Vegetal). **Instituto Agrônomo de Campinas**. Campinas, p.94, 2005.

AMARAL, L. I.; GASPAR, M.; MOREIRA, P.; Buckeridge, M. S. Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais. **Hoehnea**, v. 34, n. 4, p. 425-431, 2007.

ARMSTRONG, W.; BRAENDLE, R.; JACKSON, M. B. Mechanisms of flood tolerance in plants. **Acta Botanica Neerlandica**, Amsterdam, v. 43, n. 4, p.307-358, 1994.

ARNOUS, A. H., SANTOS, A. S., & BEINNER, R. P. C. Plantas medicinais de uso caseiro-conhecimento popular e interesse por cultivo comunitário. **Revista espaço para a saúde**, v.6, n.2, p.1-6, 2005.

AUGEREAU, J.M.; COURTOIS, D.; PETIARD, V. Long term storage of callus cultures at low temperatures or under mineral oil overlayer. **Plant Cell Reports**, v.5, n.5, p.372-376, 1986.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 971, de 03 de maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PN-PIC) no Sistema Único de Saúde. **Diário Oficial da União. Poder Executivo**. Brasília, DF, n. 119, p. 2-4, jul.2006.

BRASIL. Presidência da República. Decreto nº 5.813 de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. **Diário Oficial da União. Poder Executivo**. Brasília, 2006.

BELTRÃO, N.E. de M.; SOUZA, J.G. de; SANTOS, J.W. dos. Conseqüências da anoxia temporária radicular no metabolismo do gergelim. **Revista de Oleaginosas e Fibrosas**, v.4, n. 3, p. 153-161, 2000.

BERKEET, S. A. *In vitro* preservation of Globe artichoke, germplasm. **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, v. 17, n. 1, p. 1-9, 2007.

BRIDGEN, H.P, STABY, G.L.; EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y. **Plant cell culture**, volume I, Macmillan, New-York, p.816-827, 1984.

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.

CAPLIN, S. M. Mineral oil overlay for conservation of plant tissue cultures. **American Journal of Botany**, p.324-329, 1959.

DE CASTRO HENRIQUE, P.; ALVES, J. D.; GOULART, P. D. F. P.; DEUNER, S.; SILVEIRA, N. M.; ZANANDREA, I.; DE CASTRO, E. M. Características fisiológicas e

anatômicas de plantas de sibipiruna submetidas à hipoxia. **Ciência Rural**, v.40, n.1, p. 70-76, 2010.

DEKKERS, A. J.; RAO, A. N.; GOH, C. J. In vitro storage of multiple shoot cultures of ginger at ambient temperatures of 24–29 C. **Scientia Horticulturae**, v. 47, n. 1, p. 157-167, 1991.

DENNIS, E.S.; DOLFERUS, R.; ELLIS, M.; RAHMAN, M.; WU, Y.; HOEREN, F.U.; GROVER, A.; ISMOND, K.P.; GOOD, A.G.; PEACOCK, W.J. Molecular strategies for improving waterlogging tolerance in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 51 p. 89-97, 2000.

DEUNER, S.; NOGUEIRA, R. C.; ZANANDREA, I.; DE CASTRO, E. M.; ALVES, J. D.; MELO, E. F. Respostas anatômicas de plantas de erva-de-bicho (*Polygonum punctatum Elliot*) submetidas ao alagamento. **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, n.1, p.120, 2007.

DREW, M. C. Oxygen deficiency and root metabolism injury and acclimation under hypoxia and anoxia. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology** 48: 223-250,1997.

ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for conserving plant biodiversity. In: **III International Symposium on Acclimatization and Establishment of Micropropagated Plants** n.812, p. 63-82, 2007.

FAHN, A. **Plant anatomy**. Pergamon Press, p. 356, 1982.

FELLE HH. pH regulation in anoxic plants. **Annals of Botany**. v. 96, p. 519–532, 2005.

FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia (UFLA)**, v. 35, n.6, p.1039- 1042, 2011.

FERREIRA, C. S.; PIEDADE, M. T. F.; BONATES, L. C. "Germinação de sementes e sobrevivência de plântulas de *Himatanthus sucuuba* (Spruce) Wood. em resposta ao alagamento, nas várzeas da Amazônia Central." **Acta Amazonica**. N. 36. V.4, 2006.

FESTUCCI-BUSELLI, R.A.; CONTIM, L.A.S.; BARBOSA, L.C.A.; STUART, J.J.; OTONI, W.C. Biosynthesis and potential functions of the ecdysteroid 20- hydroxyecdysone—a review. **Botany** v.86, p.978–987, 2008.

FUKAO, T.; BAILEY-SERRES, J. Plant responses to hypoxia—is survival a balancing act?. **Trends in plant science**, v. 9, n. 9, p. 449-456, 2004.

GEORGE, E.F.; DAVIES, W. Effects of the Physical Environment. In: GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; KLERK, G-J. **Plant Propagation by Tissue Culture**. Dordrecht: Springer, 3rd Edition. p.:423-464, 2008.

GOES, M. D. Studies on the conservation of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) LAM) germplasm (**Doctoral dissertation**, University of Bath), 1993.

GUPTA, S. K.; KHANUJA, S. P. S.; KUMAR, S. *In vitro* micropropagation of *Lippia alba*. **CURRENT SCIENCE-BANGALORE-**, v. 81, n. 2, p. 206-209, 2001.

- JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York, McGraw-Hill Book Co. Incl., 1940.
- KUBLE, L.S. The solubility of O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> in mineral oil and the transfer of CO<sub>2</sub> from oil to air. **Journal Biological Chemistry** n.72, p.545-548, 1927.
- JULIÃO, L. S., TAVARES, E. S., LAGE, C. L. S., & LEITÃO, S. G. Cromatografia em camada fina de extratos de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill) N.E.Br. (erva-cidreira). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, p. 36-38. 2003.
- KONAN, K. E.; KOUADIO, Y. J.; FLORI, A.; DURANT-GASSELIN, T.; RIVAL, A. Evidence for an interaction effect during in vitro rooting of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) somatic embryo-derived plantlets. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v.43, p.456-466, 2007.
- KOZLOWSKI, T. T.; PALLARDY, S. G. Effect of flooding on water, carbohydrate and mineral relation. **Flooding and plant growth**. Orlando: Academic Press, p.165- 188, 1984.
- LEMONS, E. E. P.; FERREIRA, M. S.; ALENCAR, L. M. C.; NETO, C. E. R.; ALBUQUERQUE, M. M. Conservação *in vitro* de germoplasma de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 10, p. 1359-1364, 2002.
- LIAO, C. T.; LIN, C. H. Physiological adaptation of crop plants to flooding stress. In: **Proceedings of the National Science Council, Republic of China. Part B, Life sciences**, v. 25, n. 3, p. 148-57, 2001.
- LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa\ São Paulo: Instituto Plantarum, p.11-19 2008.
- MANNONEN, L.; TOIVONEN, L.; KAUPPIENEN, V. Effects of long-term preservation on growth and productivity of *Panax ginseng* and *Catharanthus roseus* cell cultures. **Plant Cell Reports**, v.9, n.4, p.173-177, 1990.
- MARTHUR, J.; MUKUNTHAKUMAR, S.; GUPTA, S.N.; MATHUR, S.N. Growth and morphogenesis of plant tissue cultures under mineral-oil. **Plant Science** v. 74, p.249–254, 1991.
- MEDRI, M. E.; FERREIRA, A. C.; KOLB, R. M.; BIANCHINI, E.; PIMENTA, J. A.; FABRO, V. M. D.; MEDRI, C. Alterações morfoanatômicas em plantas de *Lithraea molleoides* (Vell.) Engl. submetidas ao alagamento-DOI: 10.4025/actascibiolsoci. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 29, n.1, p. 15-22, 2007.
- MEDRI, C.; MEDRI, M. E.; RUAS, E. A.; SOUZA, L. A.; MEDRI, P. S.; SAYHUN, S.; PIMENTA, J. A. Morfoanatomia de órgãos vegetativos de plantas juvenis de *Aegiphila sellowiana* Cham.(Lamiaceae) submetidas ao alagamento do substrato. **Acta Botanica Brasilica**, v.25, n.2, p. 445-454, 2011.
- MEDRI, M. E.; BIANCHINI, E.; PIMENTA, J. A.; COLLI, S.; MULLER, C. Estudos sobre a tolerância ao alagamento em espécies arbóreas nativas da bacia do rio Tibagi. In: MEDRI, M. E.; BIANCHINI, E.; SHIBATTA, O. A.; PIMENTA, J. A. (Ed.). **A bacia do Rio Tibagi**. Londrina: Edição dos editores, p. 133-172, 2002.

MENDES, F.R. Tonic, fortifier and aphrodisiac: adaptogens in the Brazilian folk medicine. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.21, p.754–763, 2011.

NAIDU, M. M.; SREENATH, H. L. *In vitro* culture of coffee zygotic embryos for germplasm preservation. **Plant cell, tissue and organ culture**, v.55, n.3, p. 227-230, 1998.

O'BRIEN, T. P. & MCCULLY, M. E. **The study of plant structure principles and selected methods**. Melbourne, Termarcarphi Pty Ltd., 1981.

PAROLIN, P. Submerged in darkness: adaptations to prolonged submergence by woody species of the Amazonian floodplains. **Annals of Botany**.v. 103, p. 359–376, 2009.

PEREIRA, F. J.; CASTRO, E. D.; SOUZA, T. D.; MAGALHÃES, P. C. Evolução da anatomia radicular do milho 'Saracura' em ciclos de seleção sucessivos. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.43, n.12, p. 1649-1656, 2008.

PEIXOTO, P. H. P.; SALIMENA, F. R. G.; OLIVEIRA, S. M.; SILVA, G. L.; OLIVEIRA, P. M.; VICCINI, L. F.; & OTONI, W. C. *In vitro* propagation of endangered *Lippia filifolia* Mart. and Schauer ex Schauer. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v.42, n.6, p.558-561, 2006.

PIMENTEL, R. M.; BAYÃO, G. F. V.; LELIS, D. L.; DA SILVA C. A. J.; SALDARRIAGA, F. V.; MELO, C. C. V.; MIRANDA, D. Ecofisiologia de plantas forrageiras. **PUBVET**, v.10, n.9, p. 666-679, 2016.

RESENDE, C.F.; RESENDE, C. F. D.; BIANCHETTI, R. E.; OLIVEIRA, A. M. S. D.; BRAGA, V. F.; PEIXOTO, P. H. P. *In vitro* propagation and acclimatization of *Lippia rotundifolia*, an endemic species of Brazilian Campos Rupestres. **Revista Ciência Agronômica**, v. 46, n.3, p.582-589, 2015.

SARASAN, V.; CRIPPS, R.; RAMSAY, M.M.; ATHERTON, C; MCMICHEN, M.; PRENDERGAST, G.; ROWNTREE, J.K. Conservation *in vitro* of threatened plants—progress in the past decade. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v.42, n.3, p., 206-214, 2006.

SINGULANI, A. P., CERIC, H., & SELBERHERR, S. Thermo-mechanical simulations of an open tungsten TSV. **In Electronics Packaging Technology Conference (EPTC)**, 14th p. 107-111. IEEE, December, 2012.

SINGH, H. P.; SINGH, B. B.; RAM, P. C. Submergence tolerance of rainfed lowland rice: search for physiological marker traits. **Journal of Plant Physiology**, v. 158, n. 7, p. 883-889, 2001.

SCALON, S. D. P. Q.; MUSSURY, R. M.; DE MELLO, E, V. L.; KODAMA, F. M.; KISSMANN, C. Estresse hídrico no metabolismo e crescimento inicial de mudas de Mutambo (*Guazuma ulmifolia* Lam.). **Ciência Florestal**, v.21, n.4, p. 655-662, 2011.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. ; GUEDES, R. S., FERMINO, JR, P. C. P.; SILVA, T. L., & COSTA, F. H. S. Somatic embryogenesis and plant regeneration in oil palm using the thin

cell layer technique. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v.46, n.4,pg. 378-385, 2010.

SCHLÜTER, U.; CRAWFORD, R.M.M. Long-term anoxia tolerance in leaves of *Acorus calamus* L. and *Iris pseudacorus* L. **Journal of Experimental Botany**. v. 52 p. 2213 - 2225. 2001.

VICCINI, L. F., PIERRE, P. M. O., PRAÇA, M. M., DA COSTA, D. S., DA COSTA ROMANEL, E., DE SOUSA, S. M& SALIMENA, F. G. Chromosome numbers in the genus *Lippia* (Verbenaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 256, n. 1, p. 1-4. 2005.