

Micropropagação *in vitro* de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown
***In vitro* micropropagation of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown**

Lucas Loff Lunkes¹, Bianca Maria Morais Biondo², Ana Raquel Ribeiro e Souza², Glauco Vieira Miranda³

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um método de desinfestação para a micropropagação *in vitro* de *Lippia alba*, uma planta perene da família Verbenaceae amplamente utilizada na medicina tradicional para tratar doenças respiratórias e também tem atividade antimicrobiana em superfícies. Para o cultivo *in vitro*, segmentos nodais de *L. alba* foram colocados em placas de petri contendo meio de cultura MS tratados com 30 mg de ácido indolacético (AIA) e 5 mg de Benzilamina Purina (BAP) e mantidas em BOD a uma temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 16 horas de luz. A desinfecção foi realizada por lavagem de 10 minutos em água corrente e detergente neutro, seguido de imersão por 4 minutos em álcool 70%. Foram avaliados os tempos de imersão de oito, onze e quatorze minutos em hipoclorito de sódio a 0,6% de concentração. Após 30 dias de crescimento, o tratamento de onze minutos foi o que obteve a maior taxa de sobrevivência e os números de brotos e folhas diminuíram à medida que o tempo de imersão aumentou.

PALAVRAS-CHAVE: Desinfecção; Inoculação; Protocolo.

ABSTRACT

The objective of this work was to develop a disinfection method to *in vitro* micropropagation of *Lippia alba*, a perennial plant from the Verbenaceae family widely used in traditional medicine to treat respiratory diseases and also have antimicrobial activity on surfaces. For *in vitro* cultivation, nodal segments of *L. alba* were used, inoculated in petri dishes containing MS culture medium treated with 30 mg of indoleacetic acid (IAA) and 5 mg of Benzylamine Purine (BAP), in BOD at a temperature of 25 °C and a photoperiod of 16 hours of light. Disinfection was carried out by washing for 10 minutes in running water and neutral detergent, followed by immersion for 4 minutes in 70% alcohol. The immersion times of eight, eleven and fourteen minutes in sodium hypochlorite at 0.6% concentration were evaluated. After 30 days of growing, the eleven-minute treatment achieved the highest survival rate and the number of shoots and leaves decreased as the immersion time increased.

KEYWORDS: Disinfection; Inoculation; Protocol.

INTRODUÇÃO

A *Lippia alba* é conhecida popularmente como erva cidreira brasileira, falsa melissa ou erva-cidreira-brava (ALBUQUERQUE; PATIL; MÁTHÉ, 2018), pertence à família Verbenaceae que possui dois gêneros que compreendem cerca de 80% dos indivíduos dessa família, os gêneros *Lantana* e *Lippia*, que se destacam pela propriedade fitoquímica e medicinal (COSTA et al., 2017 *apud* PINTO; AMOROSO; FURLAN; 2006). Esse último gênero é descrito por possuir espécies de ervas, arbustos e pequenas árvores, possui seus mais expressivos centros de dispersão em países no hemisfério sul, além de alguns países localizados em áreas tropicais da América do Norte (COSTA et al., 2002). A *L. alba* caracteriza-se como uma planta de ciclo perene com hábito arbustivo ramificado, é encontrada em lugares de clima tropical ou temperados em solos úmidos de textura arenosa e possui alogamia (BARROS et al., 2022). Popularmente, a erva

¹ Bolsista. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Santa Helena, Paraná, Brasil. E-mail: lunkeslucas11@gmail.com. ID Lattes: 8979539107877484.

² Bolsista. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Santa Helena, Paraná, Brasil. E-mail: biankaamorais@icloud.com. ID Lattes: 4625937889282856.

² Engenheira Agrônoma. Mestre em Produção Vegetal pela Universidade Estadual do Norte Fluminense. Email: araquelsouza1@gmail.com. ID Lattes: 9481967576383996.

³ Orientador. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Santa Helena, Paraná, Brasil. Email: glaucovmiranda@professores.utfpr.edu.br. ID Lattes: 1581269691451530.



cidreira brasileira é utilizada para tratar resfriados, bronquites, asma, febre, insônia, dores abdominais etc. (ALBUQUERQUE; PATIL; MÁTHÉ, 2018), e no combate de microrganismos em superfícies como carne, bancada e objetos (PEREIRA *et al.*, 2008).

A propagação vegetativa se embasa no princípio de que as células vegetais são capazes de formar uma outra planta (MORANDI, 2020). Apresenta vantagens de ser em larga escala, uso de menor área e tempo de reprodução, multiplicação de um único genótipo superior pré-selecionado, manutenção de germoplasma existente e diminuir os ciclos de melhoramento de espécies perenes (OLIVEIRA *et al.*, 2013). Dentre as formas de propagação vegetativa, o cultivo *in vitro* configura-se como o cultivo de células vegetais em meio de cultura em ambiente estéril (MORANDI, 2020 apud TREVIZAN, 2005; GEORGE *et al.*, 2008). Desse modo, é necessário fornecer um ambiente com luz, temperatura, pH, umidade adequados à espécie, fornecer ao tecido vegetal fitorreguladores de crescimento que auxiliam para uma produção de plântulas em larga escala. Por outro lado, a micropropagação apresenta desvantagens por apresentar altas taxas de contaminação dos explantes, sendo uma das fases mais delicadas, a inoculação por necessitar de um meio adequado, um laboratório e colaboradores especializados (MORANDI, 2020).

O processo de cultura de tecidos e células vegetais pode ser dividido em três fases: na primeira, os explantes são selecionados para posterior desinfecção de todos os microrganismos e inoculação no meio de cultura; na segunda, são feitos a multiplicação dos tecidos; na terceira, a indução do enraizamento e a aclimação no substrato (MURASHIGE, 1974). Dentre essas fases, o processo de desinfecção é uma etapa primordial para o sucesso da cultura *in vitro* e deve começar pelo fornecimento de um ambiente bem sanitizado para as matrizes e depois com o tratamento das mesmas contra patógenos até a esterilização dos explantes com produtos como hipoclorito de sódio (NaOCl), etanol e detergente neutro (CARVALHO; SILVA; MEDEIROS, 2006)

Portanto, o objetivo deste trabalho foi elaborar um protocolo de desinfestação eficiente para o cultivo *in vitro* de tecidos vegetais de *Lippia alba* para o laboratório de Biotecnologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná *Campus* de Santa Helena.

MATERIAL E MÉTODO

Os experimentos foram realizados no laboratório de Biotecnologia da UTFPR - Câmpus Santa Helena. As plantas matrizes foram cultivadas no Laboratório Agroindoor, contêiner de cultivo *indoor* de plantas com iluminação artificial com intensidade de 48,27 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}^1$. Quinze dias antes da incubação dos explantes foram tratadas com Abacus®HC. Dessas matrizes foram coletados segmentos nodais, com gemas axiais e um pedaço do caule de 1,5 cm de *L. alba*. As ramificações e folhas foram reduzidas, e em seguida os ramos foram colocados em banho em água corrente com detergente neutro por 10 minutos.

Em uma câmara de fluxo laminar os explantes foram imersos em álcool 70% por 4 minutos, e em NaOCl a uma concentração de 0,6% por oito, onze, e catorze minutos, em seguida, foram enxaguados três vezes em água destilada autoclavada, secados e inoculados em placas de petri contendo 35 ml de meio de cultura MS (Murashige & Skoog) suplementado com 5 mg de Benzilamina Purina (BAP) e 30 mg de Ácido

Indol-3-Acético (AIA), contendo 10 g L⁻¹ de ágar e 30 g L⁻¹ de sacarose com pH 5,8 antes da autoclavagem. Por fim, as placas foram vedadas com plástico filme e condicionado em uma BOD com temperatura de 25 °C, fotoperíodo de 16 horas de luz e intensidade luminosa de 108,17 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ oriundas de lâmpadas fluorescentes brancas. O experimento foi inteiramente casualizado com três tratamentos e sete repetições.

Trinta dias após a implantação (DAI), as placas foram avaliadas quanto à porcentagem de contaminação, números de brotos e número de folhas dos explantes. Os dados foram sujeitos à análise de variância pelo programa estatístico SISVAR. As médias dos tratamentos foram submetidas ao teste de Tukey a 5% de probabilidade e a análise de regressão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os tratamentos oito, onze e catorze minutos de imersão obtiveram as taxas de sobrevivência dos explantes de 57,14%, 85,71% e 71,43% respectivamente, demonstrando que o tempo de onze minutos está próximo do ideal.

As análises de variâncias foram significativas e os testes de médias mostraram diferença entre os tempos de imersão dos explantes no hipoclorito de sódio para os números de brotos e folhas (Tabela 1). Os coeficientes de variação para ambas variáveis foram próximos a 50%. O número de brotos foi oito vezes maior para o tempo de 11 minutos de imersão do que para o tempo de 14 minutos e com uma diferença significativa pelo teste de Tukey a 5%. O número de brotos foi semelhante entre os tempos de imersão de 8 e 11 minutos pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. O número de folhas foi quatro vezes maior para o tempo de 11 minutos de imersão em relação ao tempo de 14 minutos e com uma diferença significativa pelo teste de Tukey a 5%. O número de folhas foi semelhante entre os tempos de imersão de 8 e 11 minutos pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 1 – Médias dos números de brotos e folhas para tempos de imersão dos explantes em NaOCI

Tempo de imersão (Minutos)	Números de brotos	Número de folhas
8	4,20 ab*	27,2 ab*
11	4,71 a	32,4 a
14	0,57 b	7,8 b
CV (%)	51,27	58,50

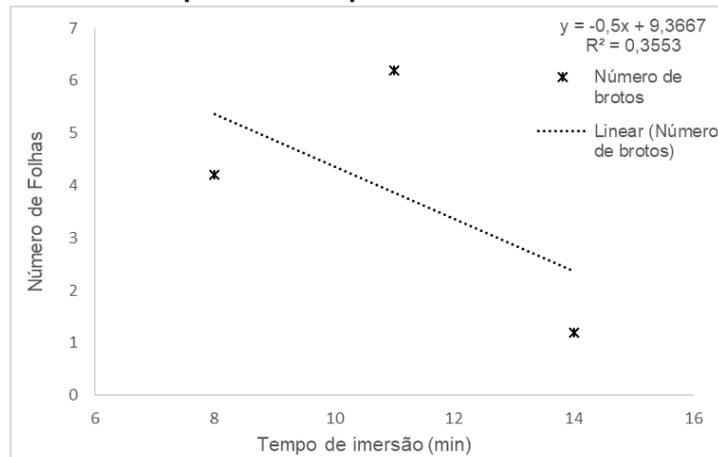
* Médias seguidas pela mesma letra na coluna são semelhantes pelo Teste de Tukey a 5% de Probabilidade.

Fonte: Elaborado pelos autores (2023).

A análise de regressão tem o objetivo de proporcionar uma interpretação biológica de todos os tempos de imersão dos explantes em hipoclorito de sódio entre o intervalo de

8 e 14 minutos. Devido ao coeficiente da regressão ser negativo, observou-se a tendência do número de brotos diminuir à medida que o tempo de imersão aumenta (Figura 1). Também, interpreta-se que o valor do coeficiente de determinação (R^2) mostrou-se muito baixo, sendo não significativo pelo teste de F na análise de variância.

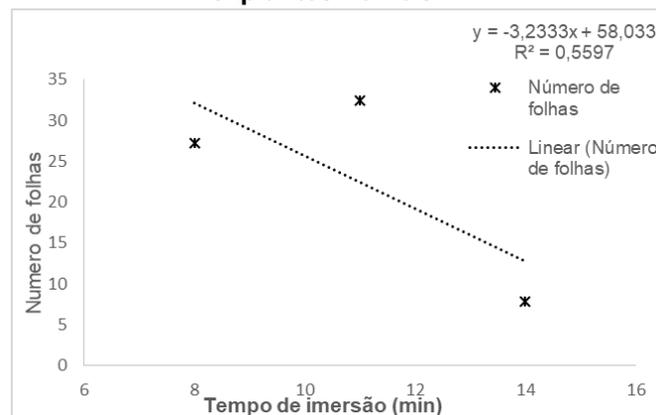
Figura 1 – Análise de regressão para número de brotos em função do tempo de imersão dos explantes no hipoclorito de sódio



Fonte: Elaborado pelos autores (2023).

A análise de regressão para o número de folhas demonstrou que à medida que o tempo de imersão do explante no explante aumentou, o número de folhas diminuiu, o que foi representado por uma reta decrescente e o coeficiente de regressão negativo (Figura 2). Novamente, o coeficiente de determinação (R^2) foi baixo não sendo significativo pelo número de repetições utilizadas.

Figura 2 – Análise de regressão para número de folhas em função do tempo de imersão dos explantes no NaOCI



Fonte: Elaborado pelos autores (2023).

A fim de aprimorar a precisão dos resultados na avaliação dos tratamentos, é necessário aumentar o número de repetições nos experimentos. Além disso, é essencial avançar no desenvolvimento dos protocolos subsequentes, a indução da calogênese, para possibilitar a multiplicação dos explantes em diversas plântulas, posteriormente, a

indução maior para produção de raízes, que desempenham um papel crucial na absorção de nutrientes do meio ambiente externo. Para isso, é necessário conduzir testes que envolvam diferentes reguladores de crescimento e desenvolvimento, em diferentes concentrações, e analisar sua eficiência sozinho e as interações entre eles.

Por fim, é de suma importância a elaboração de um protocolo eficaz para a aclimatação das plântulas, incluindo a experimentação com diversos tipos de substratos e a avaliação da influência da qualidade e quantidade de luz, a fim de identificar as condições ideais para o estabelecimento e o crescimento ideal das plântulas.

CONCLUSÃO

O método mais eficiente de desinfestação para *Lippia alba* foi o de submeter o explante por quatro minutos em álcool 70%, depois 11 minutos em hipoclorito de sódio a 0,6% e enxaguar três vezes em água autoclavada.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Universidade Federal do Paraná - Câmpus Santa Helena e seus colaboradores pelo apoio e locais para serem realizadas as pesquisas e auxílios.

Conflito de interesse

Não há conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, Ulysses Paulino; PATIL, Umesh; MÁTHÉ, Ákos (org.). Dordrecht, **Medicinal and Aromatic Plants of South America: Brazil**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2018. (Medicinal and Aromatic Plants of the World). v. 5. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-94-024-1552-0>. Acesso em: 24 out. 2023.

BARROS, Luana De Sousa Peixoto et al. Chemometric analysis of the seasonal variation in the essential oil composition and antioxidant activity of a new geraniol chemotype of *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. ex Britton & P. Wilson from the Brazilian Amazon. **Biochemical Systematics and Ecology**, [s. l.], v. 105, p.104503, 2022. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0305197822001235>. Acesso em: 24 out. 2023.

CARVALHO, Julita Maria Frota Chagas; SILVA, Marina Medeiros de Araújo; MEDEIROS, Maria Jaislanny Lacerda. **Fatores inerentes à micropropagação**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006. 28p. (Embrapa Algodão. Documentos, 148). Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/276578/1/DOC148.pdf>. Acesso em: 24 out. 2023.

COSTA, Patrícia Silva et al. Atividade antimicrobiana e potencial terapêutico do gênero *Lippia* sensu lato (Verbenaceae). **Hoehnea**, [s. l.], v. 44, n. 2, p. 158–171, 2017. Disponível

em:http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2236-89062017000200158&lng=pt&tlng=pt. Acesso em: 24 out. 2023.

GEORGE, Edwin F.; HALL, Michael A.; KLERK, Geert-Jan De. The Components of Plant Tissue Culture Media I: Macro- and Micro-Nutrients. In: GEORGE, Edwin F.; HALL, Michael A.; KLERK, Geert-Jan De (org.). **Plant Propagation by Tissue Culture**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2007. p. 65–113. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4020-5005-3_3. Acesso em: 24 out. 2023.

MORANDI, Marília Aparecida. Desenvolvimento de protocolos de propagação in vitro de erva-mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hil.). 2020. text - Universidade de São Paulo, [s. l.], 2020. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/64/64133/tde-19112021-114147/>. Acesso em: 24 out. 2023.

MURASHIGE, Toshio. Plant Propagation Through Tissue Cultures. *Annual Review of Plant Physiology*, [s.l.], v. 25, n. 1, p. 135–166, 1974. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.25.060174.001031>. Acesso em: 24 out. 2023.

OLIVEIRA, Leandro Silva de; DIAS, Poliana Coqueiro; BRONDANI, Gilvano Ebling. Micropropagação de espécies florestais brasileiras. **Pesquisa Florestal Brasileira**, [s. l.], v. 33, n. 76, p. 439–453, 2013. Disponível em: <https://pfb.cnpf.embrapa.br/pfb/index.php/pfb/article/view/481>. Acesso em: 24 out. 2023.

PINTO, Erika De Paula Pedro; AMOROZO, Maria Christina De Mello; FURLAN, Antonio. Conhecimento popular sobre plantas medicinais em comunidades rurais de mata atlântica - Itacaré, BA, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, [s. l.], v. 20, n. 4, p. 751–762, 2006. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-33062006000400001&lng=pt&tlng=pt. Acesso em: 24 out. 2023.

PEREIRA, Alcilene de Abreu; DE MORAIS, Augusto Ramalho. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E EFEITO Caracterização química e efeito inibitório...INIBITÓRIO DE ÓLEOS ESSENCIAIS887SOBRE O CRESCIMENTO DE *Staphylococcus aureus* E *Escherichia coli*. **Ciênc. agrotec.**, [s. l.], v. 32, n. 3, 2008. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cagro/a/VTqVrFTqNlWRCjTZdKyHm/>. Acesso em: 24 out. 2023.

TREVIZAM, Raquel. **Análises histológicas e bioquímicas em calos de *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake cultivados in vitro sob interação nutricional de boro e cálcio**. 2005. Doutorado em Recursos Florestais - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11150/tde-03062005-141807/>. Acesso em: 25 out. 2023.