



Estabelecimento *in vitro*, propagação e aclimatização de melissa (*Melissa officinalis* L.)

FLÁVIA ANGELO BEDUHN¹, SIMONE RIBEIRO LUCHO², CRISTINI MILECH³, ALÍCIA MORAES KLEINOWSKI⁴, DÉBORA BARWALDT DUTRA⁵, MARINA FRANCO GALLI⁶, EUGENIA JACIRA BOLACEL BRAGA⁷

RESUMO

Melissa (*Melissa officinalis* L.), também conhecida como bálsamo limão ou erva cidreira é uma planta herbácea perene, aromática, ramificada desde a base, nativa da Europa e Ásia. É muito conhecida por sua atividade calmante, antiespasmódica, analgésica e antiviral, além de ser utilizada externamente como repelente de insetos. Esta planta contém em sua composição química vários tipos de óleos essenciais, além de ácidos triterpenoides, flavonoides, mucilagens, resinas e substâncias amargas, bem como glicosídeos. Em razão da gama de possibilidades que esta espécie oferece, estudos com a mesma se fazem necessários, porém a variação nas condições ambientais a que ela está exposta durante seu crescimento, provoca flutuações fisiológicas, bioquímicas e moleculares. Desta forma, estratégias biotecnológicas, como o cultivo *in vitro*, podem auxiliar no cultivo destas plantas, com a finalidade de diminuir estas flutuações externas e com isso tentar uma padronização na produção dos seus compostos bioativos. O objetivo deste trabalho foi otimizar um protocolo de estabelecimento *in vitro* e micropropagação de *M. officinalis*, visando a produção de mudas uniformes e de boa qualidade fitossanitária. Para a realização do estabelecimento *in vitro* foram utilizadas sementes de *M. officinalis* desinfestadas com hipoclorito de sódio em três diferentes concentrações (1,0; 1,5; 2,0%) acrescidas de duas gotas de detergente, em três períodos de exposição (10, 20 e 30 minutos) e mantidas em meio MS (50%) por 45 dias. Para a multiplicação *in vitro* foram utilizados segmentos nodais de plântulas cultivadas *in vitro* e inoculadas em meio MS (100%), acrescido de 0; 1,0 e 2,0 mgL⁻¹ de BAP (benzilaminopurina) e 0; 0,25 e 0,50 mgL⁻¹ de ANA (ácido naftalenoacético). A aclimatização das plantas oriundas da fase de multiplicação foi realizada em garrafas de 2L tipo PET, utilizando como substrato casca de arroz carbonizada e solo. Aos 30 dias de cultivo, houve maior desenvolvimento dos brotos e gemas axilares, quando tratadas com 2,0 mg L⁻¹ de BAP, sob a ausência de ANA. O número de raízes formadas e a altura obtida não apresentaram diferenças significativas nas combinações utilizadas. Durante a aclimatização observou-se um aumento no número de brotações e de gemas axilares desenvolvidos em plantas advindas das concentrações de 2,0 mg L⁻¹ de BAP e 0,25 mg L⁻¹ de ANA. Os diferentes tempos de exposição e concentrações de hipoclorito de sódio não diferiram significativamente na percentagem de contaminação dos explantes no estabelecimento *in vitro*. A presença de BAP em alta concentração e a ausência de ANA proporcionou maior formação de brotos e gemas axilares nos explantes durante a fase de multiplicação, contudo a ausência de ambos resulta em um aumento no número médio de raízes e de comprimento das plantas. As diferentes combinações de BAP e ANA utilizadas durante a etapa de multiplicação *in vitro* não influenciaram na altura média das plantas aclimatizadas. Plantas de *M. officinalis*

foram estabelecidas, multiplicadas *in vitro* e aclimatizadas com sucesso em larga escala, curto período e espaço reduzido.

PALAVRAS-CHAVE: plantas medicinais, micropropagação, bálsamo limão

Establishment *in vitro*, propagation and acclimatization melissa (*Melissa officinalis* L.)

ABSTRACT

Melissa (*Melissa officinalis* L.), also known as balsam limão or erva cidreira is a perennial, aromatic herbaceous plant, branched from the base, native to Europe and Asia. It is well known for its soothing, antispasmodic, analgesic and antiviral activity, and is used externally as insect repellent. This plant contains various types of essential oils, triterpenoid acids, flavonoids, mucilage, resins, bitter substances and glycosides in its chemical composition. Because of the range of possibilities it offers, various studies are needed, however, the variation in the environmental conditions to which it is exposed during growth causes physiological, biochemical and molecular fluctuations. Thus, biotechnological strategies, such as *in vitro* culture can assist in the cultivation of these plants in order to reduce these external fluctuations and also try to standardize the production of the bioactive compounds. The objective of this study was to optimize an *in vitro* establishment protocol and micropropagation of *M. officinalis*, aimed at producing uniform seedlings and good quality plant. To carry out the *in vitro* establishment we used *M. officinalis* seed disinfected with sodium hypochlorite at three different concentrations (1.0, 1.5, 2.0%) plus two drops of detergent in three periods of exposure (10, 20 and 30 minutes) and maintained on MS medium (50%) for 45 days. For *in vitro* multiplication nodal segments we used seedlings grown *in vitro* on MS medium and inoculated (100%), plus 0; 1.0 and 2.0 mg L⁻¹ BAP (benzilamonipurine) and 0; 0.25 and 0.50 mg L⁻¹ of NAA (naphthaleneacetic acid). The acclimatization of plants from the multiplication phase was held in 2L PET type bottles, using as substrate carbonized rice husk and soil. After 30 days of cultivation, further development of buds and axillary buds when treated with 2.0 mg L⁻¹ BAP was found, in the absence of ANA. The number of roots formed and the height obtained showed no significant differences in the combinations used. During the acclimatization we observed an increased number of shoots and axillary buds developed in plants resulting in concentrations of 2.0 mg L⁻¹ BAP and 0.25 mg L⁻¹ NAA, but the height showed no residual effect of growth regulators which were used in the multiplication phase. The different exposure times and sodium hypochlorite concentrations did not differ significantly in the proportion of contamination of the explants *in vitro* establishment. The presence of BAP in high concentration and the absence of NAA provided increased formation of explant's buds and axillary buds during the multiplication stage, yet the absence of both results in an increase in the average number of roots and plant length. The different combinations of BAP and NAA used during *in vitro* multiplication stage was not influenced by higher average of acclimatization. *M. officinalis* plants were established, multiplied *in vitro* and acclimatized in a large scale, short time and reduced space.

KEYWORDS: micropropagation, medicinal plants, bálsamo limão

INTRODUÇÃO

Melissa officinalis L., conhecida popularmente como, melissa, bálsamo de limão ou erva cidreira é uma planta herbácea perene, aromática, ramificada desde a base, nativa da Europa e Ásia (AWADet al., 2009). É muito conhecida por sua atividade calmante, anti-espasmódica, analgésica e anti-viral (WINIARCZYK et al., 2016), além de ser utilizada externamente como repelente de insetos (SILVA et al., 2001).

Esta planta contém em sua composição química óleo essencial rico em citral, citronelal, citronelol, limonemo, linalol, geraniol além de ácidos triterpenoides, flavonoides, mucilagens, resinas e substâncias amargas, bem como glicosídeos (MACHERINlet al., 2007). Seu óleo essencial apresenta também ação farmacológica bacteriostática (LORENZI; MATOS, 2002).

A multiplicação de *Melissa officinalis* L. é realizada através de estacas e sementes, e sua produção é possível apenas nas regiões sul do Brasil (LORENZI; MATOS, 2002). A propagação tradicional por sementes é ineficiente para o estabelecimento de uma população clonal de boa qualidade e a propagação vegetativa por estaquia também é limitada devido ao baixo número de indivíduos que podem ser obtidos simultaneamente de uma única planta.

A cultura de tecidos de plantas é uma ferramenta importante para o melhoramento genético associado à produção de metabólitos secundários, padronizando os explantes quanto à sua composição química, uma vez que fornece plantas geneticamente uniformes e em grande número (JAIN et al., 2008).

A obtenção de uma metodologia de estabelecimento e multiplicação *in vitro* ajustada ao genótipo é a primeira etapa para a produção de plantas (FRANÇA, 2002). Embora a contaminação de tecidos vegetais por microrganismos como fungos e bactérias representa uma grande barreira na etapa de estabelecimento *in vitro* de muitas espécies, este problema ocorre especialmente quando os explantes são obtidos de plantas matrizes coletadas no campo (SHARRY, 2001). Os microrganismos contaminantes competem com os explantes pelos nutrientes do meio de cultura e provocam danos diretos e indiretos pela colonização de seus tecidos, podendo eliminar no meio, metabólitos tóxicos às plantas (MONTARROYOS, 2000).

Na fase de multiplicação *in vitro* o balanço entre a concentração auxina/citocinina, a fim de produzir partes aéreas e radiculares deve ser otimizado (TAIZ; ZEIGER, 2004), pois estas devem ser suficientemente alongadas para permitir a passagem do vegetal para a aclimatização. A aclimatização também representa uma etapa crítica da micropropagação,

por causa da dificuldade de transferir, com sucesso, plantas da condição *in vitro* para a casa de vegetação e, posteriormente, para o campo (MONFORT et al., 2015).

O presente trabalho teve por objetivo otimizar um protocolo de estabelecimento *in vitro* e micropropagação de melissa (*Melissa officinalis* L.), visando a produção de mudas com melhor qualidade fitossanitária

MATERIAL E MÉTODOS

Os trabalhos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, do Departamento de Botânica, no Instituto de Biologia, da Universidade Federal de Pelotas.

Estabelecimento de protocolo de desinfestação

Foram utilizadas sementes de melissa, colhidas de plantas obtidas por estaquia, cultivadas a campo, em pleno florescimento e frutificação. Em laboratório as sementes foram colocadas em frasco e previamente lavadas em água destilada, sob agitação, durante 15 minutos. Posteriormente as sementes foram imersas em etanol 70% por 10 segundos, e tríplice lavagem com água estéril. Após, foram imersas em soluções de hipoclorito de sódio compostas de três diferentes concentrações (1,0; 1,5 e 2,0% de cloro ativo) acrescidas de duas gotas de detergente, em três períodos de exposição (10, 20 e 30 minutos), totalizando nove tratamentos. Na sequência, as sementes foram lavadas três vezes em água estéril e secas em papel filtro, e semeadas em frasco contendo meio MS.

O meio de cultura básico foi constituído da concentração de sais e vitaminas do MS (MURASHIGE; SKOOG. 1962), reduzido em 50% dos macronutrientes no meio inteiro, adicionado de 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 30 g L⁻¹ de sacarose, sem suplementação hormonal. O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da adição de 7 g L⁻¹ de ágar. Foram utilizados frascos tampados com papel alumínio, contendo 25 mL de meio, os quais foram autoclavados a 121°C a 1,5 atm por 20 minutos. Em condições assépticas, em câmara de fluxo laminar, foram inoculadas cinco sementes por frasco.

Os frascos contendo as sementes foram mantidos no escuro com temperatura de 25 ± 2°C, por um período de sete dias e posteriormente transferidos para sala de crescimento com 16 horas de fotoperíodo, densidade de fluxo luminoso de 48 μmoles m⁻²s⁻¹, providas por lâmpadas fluorescentes branca-fria e com temperatura de 25 ± 2°C.

A resposta das sementes aos diferentes tratamentos foi avaliada através da percentagem de contaminação aos sete dias e a percentagem de germinação, realizada em seis avaliações, com intervalos semanais. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3x3, sendo três concentrações de hipoclorito de sódio (1,0; 1,5 e 2,0%) e três diferentes tempos de exposição ao agente

desinfestante (10, 20 e 30 minutos). Cada tratamento foi constituído de cinco repetições, sendo a unidade experimental constituída por um frasco com cinco sementes (Tabela 1).

TABELA 1 – Identificação dos tratamentos utilizados no experimento de desinfestação de sementes para o estabelecimento *in vitro* de *Melissa officinalis*

Identificação do tratamento	Concentração de hipoclorito de sódio	Período de exposição em min
T1	1.0	10
T2	1.5	10
T3	2.0	10
T4	1.0	20
T5	1.5	20
T6	2.0	20
T7	1.0	30
T8	1.5	30
T9	2.0	30

Multiplicação *in vitro*

As plântulas obtidas do ensaio anterior foram utilizadas como material inicial na etapa de multiplicação *in vitro*.

Para a multiplicação foram utilizados segmentos nodais e os sais minerais e constituintes orgânicos do meio de cultura MS, acrescidos de 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 30 g L⁻¹ de sacarose, três concentrações de BAP (0, 1 e 2 mg L⁻¹) e três concentrações de ANA (0; 0,25 e 0,5 mg L⁻¹), totalizando nove tratamentos (Tabela 2). Os meios tiveram o pH ajustado para 5,8 e, posteriormente o ágar foi adicionado na concentração de 7 g L⁻¹.

Os explantes permaneceram em sala de crescimento com 16 horas de fotoperíodo, densidade de fluxo luminoso de 48µmoles m⁻²s⁻¹, fornecida por lâmpadas fluorescentes branca-fria e com temperatura de 25 ± 2°C.

Após 30 dias de cultivo foram avaliados número de brotos, número de gemas axilares, número de raízes e altura obtidas em cada planta. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com quatro repetições por tratamento, sendo cada repetição constituída de um frasco com quatro explantes. O esquema fatorial utilizado foi 3x3, sendo as concentrações de BAP (0,0; 1,0 e 2,0 mg L⁻¹) e de ANA (0,0; 0,25 e 0,5 mg L⁻¹), os fatores analisados.

TABELA 2 – Composição dos meios de cultura empregados na multiplicação *in vitro* de *Melissa officinalis*

Identificação do meio	Composição básica
M1	MS
M2	MS + 0 mg L ⁻¹ de BAP + 0,25 mg L ⁻¹ de ANA
M3	MS + 0 mg L ⁻¹ de BAP + 0,5 mg L ⁻¹ de ANA
M4	MS + 1,0mg L ⁻¹ de BAP + 0,0 mg L ⁻¹ de ANA
M5	MS + 1,0mg L ⁻¹ de BAP + 0,25 mg L ⁻¹ de ANA
M6	MS + 1,0mg L ⁻¹ de BAP + 0,5 mg L ⁻¹ de ANA
M7	MS + 2,0mg L ⁻¹ de BAP + 0,0 mg L ⁻¹ de ANA
M8	MS + 2,0mg L ⁻¹ de BAP + 0,25 mg L ⁻¹ de ANA
M9	MS + 2,0mg L ⁻¹ de BAP + 0,5 mg L ⁻¹ de ANA

Aclimatização

As plantas originadas do ensaio anterior foram retiradas dos frascos, lavadas em água corrente, visando à retirada do excesso de meio de cultura de suas raízes e transferidas para garrafas plásticas de 2L, tipo PET, adaptadas com perfurações, de maneira que o excesso de água não permanecesse no fundo. Estes continham como substrato uma mistura de solo e casca de arroz carbonizada na proporção 1:1.

O material permaneceu sob 24 horas de fotoperíodo, densidade de fluxo luminoso de $48 \mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$, disponibilizadas por lâmpadas fluorescentes branca-fria e com temperatura de $18 \pm 5^\circ\text{C}$, sendo realizadas regas periódicas a cada quatro dias. Após 30 dias de transplântio foram avaliadas as seguintes variáveis: número de brotos, número de gemas axilares e altura obtida em cada planta.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3x3, sendo três concentrações de BAP (0,0; 1,0 e 2,0 mg L⁻¹) e três concentrações de ANA (0,0; 0,25 e 0,5 mg L⁻¹). Cada tratamento foi constituído de três repetições, onde cada repetição foi composta de três plantas em cada recipiente.

Análises dos dados

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos comparadas estatisticamente pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade, com auxílio do software WINSTAT (MACHADO; CONCEIÇÃO, 2002). Os resultados da etapa de estabelecimento *in vitro*, expressos em percentagem de sementes contaminadas e germinadas por frasco foram transformados para arco seno da raiz quadrada de $x/100$, onde x é o percentual obtido. Para os dados obtidos nos experimentos de multiplicação *in vitro* e aclimatização, as variáveis número de gemas axilares e a altura média das plantas (em mm) foram transformados em raiz quadrada de $x + 1$, onde x é o número médio obtido, e para a variável número médio de brotosos dados foram transformados em raiz quadrada de $x + 0,5$, onde x foi o número médio obtido.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a variável percentagem de contaminação de sementes, avaliada sete dias após o início do experimento, a análise de variância indicou que a interação das diferentes concentrações de hipoclorito de sódio com os diferentes períodos de exposição não teve efeito significativo.

A percentagem de contaminação máxima foi de 73,23% em hipoclorito de sódio a 1% pelo período de 10 minutos, e a mínima (23,28%) em hipoclorito de sódio a 1,5% durante 30 minutos.

TABELA 3 – Percentagem de germinação de sementes de *Melissa officinalis*, em meioMS (50%), após 45 dias da inoculação, sob os diferentes tratamentos de desinfestação

Tratamentos	Germinação de sementes (%)						Total
	Semanas						
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a	6 ^a	
T1	-	-	4	4	-	4	12
T2	-	-	8	4	-	-	12
T3	-	-	-	8	-	-	8
T4	-	-	-	8	-	4	12
T5	-	-	1	1	-	-	2
T6	-	-	-	-	-	4	4
T7	-	-	-	-	-	-	-
T8	-	-	-	12	-	12	24
T9	-	-	8	8	8	12	36

Embora não tenha apresentado diferenças significativas, o aumento das concentrações e tempos de exposição dos explantes ao agente desinfestante favoreceu a descontaminação do material até atingir a concentração de 1,5% durante a imersão por 30 minutos. O aumento da concentração de hipoclorito de sódio para 2%, não melhorou a eficiência de desinfestação, confirmando a hipótese que com o aumento da concentração de cloro ativo ocorre um aumento no pH da solução desinfestante dificultando a ação do produto, uma vez que há a formação de íons hipocloritos (OCl^-) nas soluções alcalinas fortes, o qual constitui a forma menos ativa (HIRATA; MANCINI, 2002).

A germinação das sementes de melissa (Figura 1A) foi diferenciada durante o período de avaliação (Tabela 3), apresentando a taxa máxima (36%) em hipoclorito a 2% de cloro ativo em 30 minutos de exposição (T9) e, nula sob a mesma concentração em 10 minutos de exposição (T7), indicando que as mesmas não são suscetíveis a diferentes concentrações de hipoclorito de sódio e aos diferentes tempos de exposição.

Em sementes de *Ruta graveolens* L. obtidas em comércio local e desinfestadas com hipoclorito comercial em diferentes concentrações (0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5%) de cloro ativo, aumentou sua taxa de germinação quando foram utilizadas as concentrações de 0,5 e 2,0% tanto na primeira quanto na segunda avaliação realizada (BASSAN, 2004).

Em experimentos de estabelecimento com três cultivares de *Prunus*, Chaves (2003) afirmou que as altas taxas de sobrevivência dos explantes foram resultantes não somente do uso de hipoclorito de sódio como agente desinfestante, mas também do estado fisiológico de plantas matrizes, que estavam em pleno crescimento vegetativo. No presente experimento, as plantas-matrizes de melissa encontravam-se em estágio reprodutivo, fase em que suas flores desenvolveram-se em tempos diferenciados, não havendo uniformidade na maturação das sementes, ocorrendo, portanto a coleta das mesmas em vários estádios de desenvolvimento, o que provavelmente influenciou o ritmo de germinação destas.

Para a variável, número médio de brotações, não houve interação significativa entre os fatores, porém os mesmos foram significativos isoladamente (Tabela 4 e 5).

O maior número médio de brotações foi atingido quando se utilizou a concentração de 2,0 mg L⁻¹ de BAP, observando-se a formação máxima de 3,99 brotos por explante, entretanto, observações visuais permitiram verificar que após 30 dias de cultivo, algumas plantas crescidas sob esta mesma concentração apresentavam-se vitrificadas (Figura 1B).

Em um estudo com *Cussonia paniculata*, Tetiana; Van Staden (2001) obtiveram maior número de brotos quando cultivaram segmentos nodais provenientes de plântulas germinadas *in vitro* em meio MS contendo 2,5 mg L⁻¹ de BAP, enquanto que para *Anthemis nobilissos* maiores números médios de brotações foram observados quando utilizados menores concentrações de BAP(0,1 mg L⁻¹) no meio de cultura, formando aproximadamente 1,53 brotos/explante (SOUZA, 2004), esta variação de respostas frente a concentração de hormônio utilizada confirma que não existe uma concentração de hormônio ideal para a ocorrência de maiores médias de brotações, pois as respostas morfofisiológicas são intimamente ligadas a espécie.

TABELA 4 –Número médio de brotações formadas por explante em *Melissa officinalis* cultivadas por 30 dias

BAP (mg L ⁻¹)	Nº de brotos
0	1,90 c*
1	2,78 b
2	3,99 c

*Médias seguidas de letras distintas, diferem entre si pelo teste de Duncan, ao nível de 5%.

De acordo com Fracaro; Echeverrigaray (2001) para a proliferação de brotos de *Cunila galioides* não é necessário a presença de auxina, pois quando utilizado apenas o regulador de crescimento BAP observou-se as maiores médias. Estes resultados corroboram nosso estudo, onde a ausência de ANA no meio de cultura propiciou os melhores resultados para esta variável (3,64 brotos/explantes), e as demais concentrações utilizadas 0,25 e 0,5 mg L⁻¹ apresentaram efeito prejudicial, produzindo 2,70 e 2,23 brotos/explante, respectivamente.

TABELA 5 – Número médio de brotações formadas por explante em *Melissa officinalis* cultivadas por 30 dias

ANA (mg L ⁻¹)	Nº de brotos
0	3,64 a*
0,25	2,70 b
0,5	2,23 b

*Médias seguidas de letras distintas, diferem entre si pelo teste de Duncan, ao nível de 5%.

As diferentes concentrações dos reguladores de crescimento no meio de cultivo tiveram efeito significativo isolado sobre o desenvolvimento dos explantes, demonstrando

maiores resultados na concentração de 2,0 mg L⁻¹ de BAP, na qual houve a produção média de 10,53 gemas axilares por planta (Tabela 6).

Segundo Chaves (2003), BAP tem sido muito eficaz para promover a multiplicação das partes aéreas e indução de gemas, além de possuir um menor custo quando comparado com os outros reguladores de crescimento.

TABELA 6 – Número médio de gemas axilares formadas por explante em *Melissa officinalis* cultivadas por 30 dias

BAP (mg L ⁻¹)	Nº de gemas axilares
0	5,84 c*
1	7,93 b
2	10,53 a

*Médias seguidas de letras distintas, diferem entre si pelo teste de Duncan, ao nível de 5%.

Para o desenvolvimento das gemas axilares a ausência de ANA promoveu a melhor resposta para esta variável (10,62 gemas), demonstrando não ser indicado o uso de auxina para o desenvolvimento das mesmas.

TABELA 7 –Número médio de gemas axilares formadas por explante em *Melissa officinalis* cultivadas por 30 dias

ANA (mg L ⁻¹)	Nº médio de gemas axilares
0	10,62 a*
0,25	7,37 b
0,50	6,28b

*Médias seguidas de letras distintas, diferem entre si pelo teste de Duncan, ao nível de 5%.

Souza (2004) observou que para a micropropagação de *Anthemis nobilis* a adição de ANA ao meio de cultura não é necessária, pois a presença deste fitorregulador demonstrou efeitos benéficos apenas para a variável número médio de folhas formadas e sua ausência inclusive causa um incremento nas outras variáveis analisadas.

TABELA 8 – Número médio de raízes formadas por explante em *Melissa officinalis* cultivadas por 30dias

BAP (mg L ⁻¹)	Nº de raízes
0	3,88 a*
1	1,34 b
2	0,61 b

*Médias seguidas de letras distintas, diferem entre si pelo teste de Duncan, ao nível de 5%.

As combinações das diferentes concentrações de ANA e de BAP não teve influência significativa sobre a formação de raízes, porém BAP demonstrou atuar negativamente (Tabela 8), reduzindo o número médio de raízes formadas(3,88 raízes/plantas). Em *Matricaria chamomilla*, Souza (2004) também verificou que não houve diferença significativa para esta variável, quando se utilizou BAP e ANA no meio de cultura.

A altura média das plantas não foi influenciada pela presença do BAP no meio de cultura, porém em relação ao ANA observou-se efeito negativo, à medida que aumentou a concentração, observando-se o comprimento médio máximo de 27,8 mm na ausência deste fitorregulador (Tabela 9).

Em um trabalho com *Prunus cerasifera* visando à propagação *in vitro* observou-se desempenho semelhante para esta variável, pois as maiores médias de comprimento da parte aérea foram verificadas nas plantas crescidas em meio MS na ausência de fitorreguladores (SCZEPANSKI, 2001).

TABELA 9 –Altura média (mm) obtida por explante em *Melissa officinalis* cultivadas por 30 dias

ANA (mg L ⁻¹)	Altura (mm)
0	27.8 a*
0.25	21.1 b
0.5	21.7 b

*Médias seguidas de letras distintas, diferem entre si pelo teste de Duncan, ao nível de 5%



Figura 1: Sementes e plantas de *M. officinalis* cultivadas *in vitro* e *ex vitro*. (A) Fase de germinação; (B) Fase de multiplicação *in vitro* (T7: 2,0 mg L⁻¹ de BAP) e (C) Recipientes adaptados utilizados para a fase de aclimatização.

Para o número médio de brotações formadas na etapa de aclimatização (Tabela 10), os resultados demonstraram que houve influência significativa dos diferentes tratamentos aplicados durante a fase de multiplicação, os quais manifestaram efeito residual no processo de aclimatização. A maior produção de brotos (3,00) foi atingida quando se utilizou a concentração de 2,00 mg L⁻¹ de BAP e 0,25 mg L⁻¹ de ANA (Figura 1C).

TABELA 10 – Número médio de brotações formadas em plantas de *Melissa officinalis*, durante a fase de aclimatização, após serem submetidas às diferentes concentrações de BAP e ANA na multiplicação *in vitro*

BAP(mg L ⁻¹)	ANA (mg L ⁻¹)		
	0	0.25	0.5
0	1.60 aA*	1.00 bA	1.00 bA
1	1.48 aA	1.57 bA	2.21 aA
2	1.00 aB	3.00 aA	1.70 abB

*Médias seguidas pelas mesmas letras, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem estatisticamente ao nível de 5% pelo teste de Duncan.

Silva et al. (2003) relatam que plantas de gloxínia (*Sinningia speciosa* Lood. Hiern.) apresentaram maior número de brotos no processo de aclimatização, quando provenientes de cultivo *in vitro* com 1 mg L⁻¹ de BAP, obtendo 1,45 brotos/planta.

O número médio de gemas axilares formados nas plantas aclimatizadas teve influência significativa dos reguladores de crescimento usados na multiplicação *in vitro*. Neste estudo foi possível observar (Tabela 11) que as combinações de 2,0mg L⁻¹ de BAP e 0,25 mg L⁻¹ de ANA(12,0 gemas axilares/planta), e de 1,0 mg L⁻¹ de BAP e 0,5 mg L⁻¹ de ANA (9,01gemas axilares/planta)propiciaram os maiores números médios desta variável.

TABELA 11 – Número médio de gemas axilares formados em plantas de *Melissa officinalis*, durante a fase de aclimatização, após serem submetidas as diferentes concentrações de BAP e ANA na multiplicação *in vitro*

BAP(mg L ⁻¹)	ANA (mg L ⁻¹)		
	0	0.25	0.5
0	8.33 aA*	3.79 bAB	2.32 bB
1	7.16 aA	7.29 abA	9.01 aA
2	2.96 bB	12.0 aA	5.37 abAB

*Médias seguidas pelas mesmas letras, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem estatisticamente ao nível de 5% pelo teste de Duncan.

Pela análise de variância observou-se que a interação entre as diferentes concentrações de BAP e ANA, bem como os fatores isolados não foram significativas para a altura das plantas, não havendo, portanto efeito residual destes fitorreguladores sobre esta variável neste experimento, porém foi possível observar que a concentração de 1,0 mg L⁻¹ de BAP e 0,5 mg L⁻¹ de ANA favoreceu um aumento no comprimento das plantas, atingindo o valor máximo de 131,2 mm de altura (dados não demonstrados).

A utilização de altas concentrações de BAP (2,0 mg L⁻¹) durante a multiplicação *in vitro* demonstrou efeitos negativos, pois promoveu o menor crescimento na altura das plantas (18,2 mm).

CONCLUSÕES

Os diferentes tempos de exposição e concentrações de hipoclorito de sódio não tem influência significativa na redução da percentagem de contaminação dos explantes no estabelecimento *in vitro*, podendo ser utilizados menores tempos de exposição e concentrações deste agente desinfestante.

A presença de BAP em alta concentração e a ausência de ANA proporciona maior formação de brotos e gemas axilares por explantes durante a fase de multiplicação, contudo a ausência de ambos resulta em um aumento no número médio de raízes e de comprimento das plantas.

As diferentes combinações de BAP e ANA utilizadas na etapa de multiplicação *in vitro* não influenciaram na altura média das plantas aclimatizadas.

Plantas de *M. officinalis* foram estabelecidas, multiplicadas *in vitro* e aclimatizadas com sucesso em larga escala, curto período e espaço reduzido.

REFERÊNCIAS

AWAD, R.; MUHAMMAD, A.; DURST, T.; TRUDEAU, V. L.; ARNASON, J. T. Bioassay-guided fractionation of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) using an *in vitro* measure of GABA transaminase activity. **Phytother. Res.** v. 23, p.1075-1081, 2009.

BASSAN, J.S.; VARGAS, D.P.; ARDANAZ, F.C.; BOBROWSKI, V.L. Desinfestação de *Rutagraveolens* com hipoclorito comercial. In: **XIII CIC-Congresso de Iniciação Científica/ VI ENPOS – Encontro de Pós-graduação**. Pelotas, UFPel, 2004.

CHAVES, A.C. **Micropropagação de porta-enxertos para fruteiras de caroço**. 2003. 59f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Pelotas, 2003.

FRACARO, F. ECHEVERRIGARAY, S. Micropropagation of *Cunilagalioides*, a popular medicinal plant Brazil. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.64, n.1, p.1-4, 2001.

FRANÇA, S. C. Abordagens biotecnológicas para a produção de substâncias ativas. In: SIMÕES et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Porto Alegre/UFRGS, 2002, p.105-164.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, 1998. v.1, p.43-76.

HIRATA, M.H.; MANCINI F.J. **Manual de Biossegurança**. 1ª Edição. Editora Mauole, Barueri, São Paulo, 2002. 496p.

JAIN, P.; KACHHWAHA, S.; KOTHARI, S.L. Improved micropropagation protocol and enhancement in biomass and chlorophyll content in *Stevia rebaudiana* (Bert.) by using high copper levels in the culture medium. **Scientia Horticulturae**. v.119, p. 315–319, 2008.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas Medicinais do Brasil**. Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA. Nova Odessa, São Paulo, 2002, 543p.

MACHADO, A., CONCEIÇÃO, A.R. Programa estatístico WinStat – Sistema de Análise Estatístico para Windows, versão 2.0. Pelotas, RS, 2002.

MENCHERINI, T., PICERNO, P., SCESA. Triterpene, antioxidant, and other microbial compounds from *Melissa officinalis*. **J. Nat. Prod.** v. 70, p. 1889-1894, 2007.

MONFORT, L. E. F.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; ROSSI, Z. T. T.; LIMA, A. F.; SILVA, S. T.; SILVA, G. M. Micropropagação e germinação de sementes *in vitro* de atoveran. **Rev. Ceres**, v. 62, n.2, p. 215-223, 2015.

MONTARROYOS, A.V.V. Contaminação *in vitro*. **ABCTP Notícias**. Brasília, p-5-10, 2000.

MURASHIGE, T., SKOOG, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. **Physiology of Plant**. v. 15, p.473–497.7, 2003.

SOUZA, J.A. **Cultivo *in vitro* e caracterização isoenzimática de espécies de camomila**. Pelotas, 48 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal), UFPel, 2004

SHARRY, S. **Problemas associados ao cultivo de tecidos de espécies lenhosas**. In: IV Encontro Latino-americano de Biotecnologia Vegetal, Goiás, 2001, p. 40.

SILVA, S.; SATO, A.; ESQUIBEL, M. A.; LAGE, C. L. S. Produção de mudas de *Melissa officinalis* L. In: **Encontro Latino-Americano de Biotecnologia Vegetal**, 2001, Goiânia.

SILVA, A.B.; Pasqual, M.; Rezende, A. L. M.; Dutra L. F. BAP e substratos na aclimatização de plântulas de gloxínia (*Sinningia speciosa* Lood. Hiern.) provenientes de cultura de tecidos. **Ciênc. agrotec.** Lavras. v. 27, p.255-260, 2003.

SCZEPANSKI, P. H. G. **Propagação *in vitro* do porta enxerto de ameixeira mirabolano (*Prunus cerasifera* Ehrh.)**. 2001. 51 f. Dissertação (Mestrado em Fruticultura de Clima Temperado) - Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2001.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**, 3. Ed., Artmed, 2004. 719p.

TETYANA, P.; VAN STADEN, J. Micropropagation of *Cussonia paniculata* - a medicinal plant with horticultural potential. **South African Journal of Botany**. v. 67, p. 367-370, 2001.

WINIARCZYK, K.; SEIDLER-ŁOŻYKOWSKA K.; GȨBURA, J.; BOCIANOWSKI, J. Vitality and germination of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) seeds. **Journal of Applied Botany and Food Quality**. v. 89, p. 156-162, 2016.