

## Multiplicação e conservação *in vitro* de *Mentha x villosa*

Rafaela Fonseca Lopes<sup>1</sup>, Weliton Antônio Bastos de Almeida<sup>2</sup>, Mariane de Jesus da Silva de Carvalho<sup>3</sup>, Vânia Jesus dos Santos Oliveira<sup>4</sup>, Claudia Cecilia Blaszkowski Jacob<sup>5</sup>

Faculdade Maria Milza, Caixa Postal 53, Rodovia BR-101, km 215, 44350-000, Governador Mangabeira, Brasil

\*Autor para correspondência: rafaellalopes008@hotmail.com.

**RESUMO:** *Mentha x villosa*, conhecida popularmente como hortelã miúda, é uma planta medicinal muito utilizada para o tratamento de distúrbios gastrointestinais. Através das metodologias de cultivo de tecidos vegetais tem sido possível a multiplicação e conservação *in vitro* de fontes vegetais, possibilitando o desenvolvimento comercial de várias espécies. Neste sentido, objetivou-se no presente trabalho estabelecer um protocolo de multiplicação e conservação *in vitro* da *Mentha x villosa*, visando à disponibilização de mudas para gestores de saúde e estabelecimento de farmácias vivas. Para isso, segmentos nodais retirados de plantas cultivadas em campo foram devidamente desinfestados e inoculados em placas de Petri contendo o meio de cultura MS, suplementado com 30 g/l de sacarose e mantidos em sala de crescimento sob condições controladas. Após 21 dias, os explantes responsivos foram reintroduzidos em placas de Petri contendo o mesmo meio de cultura, suplementado 1,0 mg/l de BAP. Com 45 dias de cultivo, os explantes foram transferidos para frascos contendo o meio MS, suplementado com 30 g/l de sacarose e BAP nas concentrações de 0,0; 0,5; 1,0; 1,5 mg/l. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente causalizado, com 6 repetições, sendo cada repetição constituída de um frasco contendo três segmentos nodais. Após 60 dias, foram avaliados o percentual de explantes responsivos (explantes com desenvolvimento de brotos) e o número de brotações por explantes. Posteriormente, as plantas foram aclimatizadas, por 30 dias, sendo avaliada a porcentagem de sobrevivência ao final da aclimatização. Algumas plantas oriundas da micropropagação foram utilizadas em ensaios de conservação *in vitro*, onde segmentos nodais com aproximadamente 1,5 cm, foram inoculados em meio de cultura MS em diferentes concentrações (MS, MS/2 e MS/4) e com distintas concentrações de sacarose (15 e 30 g/l), mantidos em câmara climatizada BOD sob temperatura de 20 °C. Após 30 dias de cultivo, as plantas foram avaliadas, utilizando as seguintes variáveis: altura da planta, número de folhas senescentes, número de ramificações e número de raízes. Após 120 dias, foi realizada outra avaliação para verificar a viabilidade das plantas em relação aos tratamentos, com as variáveis descritas anteriormente. A adição do BAP no meio de cultura proporcionou um aumento na multiplicação *in vitro* de brotos de hortelã, com máxima proliferação na concentração de 1,5 mg/l. Na aclimatização observou-se sobrevivência de 100% das plantas. Os resultados indicam que é possível a conservação *in vitro* de plantas de hortelã sem subcultivar por um período de 120 dias, utilizando o meio MS a 1/4 de sua concentração e adição de 30 g/l de sacarose. **Palavras-chave:** Hortelã Rasteira. Planta Medicinal. Micropropagação. Crescimento mínimo.

**ABSTRACT:** *In vitro* multiplication and conservation of *Mentha x villosa*. *Mentha x villosa*, commonly known in Brazil as *hortelã miúda* (small mint), is a medicinal plant widely used to treat gastrointestinal disorders. Vegetal tissue culture enables the *in vitro* multiplication and conservation of many species that are or might become commercially important. Thus this research aims to develop an *in vitro* multiplication and conservation protocol of *Mentha x villosa* in order to supply health managers and pharmacies belonging to the *Farmácia Viva* project with seedlings. To achieve our objective nodal segments of plants growing in the fields were disinfected and transferred to Petri dishes containing MS culture medium supplemented with 30 g/l sucrose, and kept under controlled conditions. After 21 days the responsive explants were transferred to Petri dishes containing the same culture medium supplemented with 1.0 mg/l BAP. On the 45<sup>th</sup> day the explants were transferred to flasks with MS medium supplemented with sucrose and BAP in the concentrations of 0.0; 0.5; 1.0; and 1.5 mg/l. A completely randomized factorial experiment with 6 repetitions consisting of 6 flasks with 3 nodal segments each was

Recebido para publicação em 27/11/2017

Aceito para publicação em 31/01/2022

Data de publicação em 06/06/2022

ISSN 1983-084X

© 2020 Revista Brasileira de Plantas Medicinais/Brazilian Journal of Medicinal Plants.

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

designed. After 60 days the percentage of responsive explants (explants with shoot development) and the number of shoots per explant were evaluated. Plants were acclimatized for 30 days before survival assessment. Some micropropagated plants were used for *in vitro* conservation experiments during which nodal segments of approximately 1.5 cm were inoculated in different concentrations of MS medium (MS, MS/2 e MS/4) and sucrose (15 e 30 g/l). The flasks were kept in an acclimatization BOD chamber at 20 °C. On the thirtieth culture day the following variables were evaluated: height, number of senescent leaves, and number of branches and roots. After 120 days plant feasibility in different treatments was determined using the same variables mentioned above. The addition of BAP to the culture medium increased the *in vitro* multiplication of mint shoots, maximum proliferation being obtained in the concentration of 1,5 mg/l. Hundred percent survival was observed during acclimatization. Our results show that *in vitro* conservation of mint plants without cultivars during 120 days is a feasible process when using MS medium a quarter of its concentration with addition of 30 g/l sucrose.

**Keywords:** Mint. Medicinal Plant. Micropopagation. Minimum Growth.

## INTRODUÇÃO

*Mentha x villosa* Huds. é uma planta de fácil cultivo, porém, não suporta deficiência de água (Carrionde 1996; Castro e Chemale 1995). O cultivo da hortelã rasteira se concentra no Brasil em regiões do Sul do país, onde os dias são longos e clima ameno, devido à facilidade da espécie se desenvolver (Lorenzi e Matos 2008).

A região sul do Brasil merece destaque devido à produção em larga escala de hortelã, conferindo ao país o título de maior exportador mundial de óleo essencial, entretanto, passou a grande importador devido às baixas produções tecnológicas (Lorenzi e Matos 2008). A manutenção da variabilidade genética de espécies vegetais é de extrema importância, pois evita a erosão genética intensa causada pelo extrativismo ou mesmo pela seleção de poucos genótipos (Silveira et al. 2009). No Brasil as plantas medicinais são colhidas através do extrativismo e as que estão sendo cultivadas encontram-se no estágio inicial de domesticação. Este extrativismo dispensa o cultivo sistematizado, provocando degradação do meio ambiente, gera baixa qualidade do material vegetal, ocasiona variação do produto e coloca em risco a perpetuação das espécies (Chaves 2001).

Considerando-se tais limitações, torna-se fundamental o desenvolvimento de estratégias, que tenham como propósito a produção de mudas homogêneas, gerando biomassa em larga escala para estudos químicos e farmacológicos, além de servir para proteger o germoplasma existente (Lima et al. 2007; Oksman-Caldentey e Inezé 2004). Neste contexto, a aplicação das técnicas de cultura de tecidos em plantas medicinais tem se mostrado uma estratégia promissora na exploração sustentável das espécies medicinais (Morais et al. 2012).

Tendo em vista a inserção de terapias alternativas através das plantas medicinais no âmbito do Sistema Único de Saúde - SUS, assim

como o interesse das indústrias farmacêuticas pela espécie *M. x villosa*, não só pela produção de óleo essencial, como também pelo seu valor medicinal, apontam a necessidade de produção em larga escala e conservação desta planta. Dessa forma, objetivou-se no presente trabalho estabelecer um protocolo de multiplicação e conservação *in vitro* de *M. x villosa*, visando à disponibilização de mudas para gestores de saúde e estabelecimento de farmácias vivas.

## MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia Aplicada à Saúde da Faculdade Maria Milza-FAMAM. Como material vegetal, foram utilizados segmentos nodais provenientes de plantas de *M. x villosa* cultivadas em uma residência localizada no município de Sapeaçu-BA.

### Estabelecimento *in vitro*

Os segmentos nodais foram lavados em água corrente e posteriormente passaram por um processo de desinfestação, onde inicialmente foram imersos em álcool a 70% durante um minuto, seguida da imersão em solução de hipoclorito de sódio (NaOH) e água na proporção de 1:1, sob agitação durante 15 min e, em seguida, passaram por uma tríplex lavagem em água estéril em câmara de fluxo laminar. Posteriormente, os explantes foram introduzidos em placas de Petri (100 x 15 mm) contendo o meio de cultura MS (Murashige e Skoog 1962), suplementado com 30 g/l de sacarose, 1,0 mg/l do fungicida Carbomax® solidificado com ágar (0,7%) e pH ajustado em 5,8. Foram utilizados 3 a 4 explantes por placa. Após a inoculação, os explantes foram mantidos, durante 21 dias, em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 16 h e 40 µM/m<sup>2</sup>/s de intensidade luminosa.

### **Multiplicação *in vitro***

Os explantes responsivos foram reintroduzidos em placas de Petri contendo meio de cultura MS, suplementado com 30 g/l de sacarose e 1,0 mg/l de 6-benzilaminopurina (BAP). Após 45 dias de cultivo, segmentos nodais das plantas oriundas das brotações, com aproximadamente 1,5 cm de tamanho, foram transferidos para frascos contendo o meio de cultura MS, suplementado com 30 g/l de sacarose e BAP nas concentrações de 0,0; 0,5; 1,0; 1,5 mg/l. Ao final dos 60 dias, foram avaliados o percentual de explantes responsivos (explantes com desenvolvimento de brotos) e o número de brotações por explantes. Após a etapa de multiplicação, os explantes foram transferidos para meio de cultura MS sem adição de BAP, visando o desenvolvimento de raízes e posterior aclimatização dos materiais.

### **Aclimatização**

Nesta etapa, as plantas foram retiradas dos frascos e as raízes lavadas em água corrente com o objetivo de retirar o excesso do meio de cultura. Posteriormente, foram transferidas para garrafas plásticas do tipo PET (2 l), com quatro pequenos furos na base para escoar o excesso de água. A transferência das plantas do ambiente *in vitro*, que apresenta alta umidade em decorrência do ar, assepsia, iluminação, temperatura e fotoperíodo controlados, para o ambiente *ex vitro* deve ser gradual (Brito 2007). Isso foi conseguido por meio da disposição das plantas dentro da garrafa PET, com abertura gradual das tampas. Para isso, as garrafas foram cortadas na metade de sua altura para facilitar a adição do substrato (terra vegetal autoclavada) e a inoculação da planta e, em seguida, foram novamente fechadas por sobreposição das metades. No primeiro dia após a aclimatização, no período matutino, retirou-se a tampa da garrafa por 10 min, no segundo dia por 20 min e foi aumentando-se o tempo gradualmente até a retirada completa da mesma, quando as mudas já estavam adaptadas ao meio ambiente. Após 30 dias, as mudas encontravam-se totalmente aclimatizadas. Durante o período de aclimatização, as plantas foram irrigadas com auxílio de um borrifador, de forma a manter o substrato úmido. Esta exposição progressiva das plantas às condições ambientais teve o objetivo de minimizar o estresse e aumentar o número de plantas sobreviventes. A porcentagem de sobrevivência foi avaliada ao final da aclimatização.

### **Conservação *in vitro***

Algumas plantas oriundas da micropopulação foram utilizadas em ensaios de conservação *in vitro*, onde segmentos nodais com aproximadamente 1,5 cm, foram inoculados em

meio de cultura MS nas seguintes concentrações: MS, MS/2 e MS/4, com diferentes concentrações de sacarose (15 e 30 g/l) e mantidos em câmara climatizada BOD na temperatura de 20 °C, com fotoperíodo de 16 h e 40  $\mu\text{M}/\text{m}^2/\text{s}$  de intensidade luminosa.

Após 30 dias de cultivo foi realizada a primeira avaliação utilizando as seguintes variáveis: altura de planta (AP), em cm, número de folhas senescentes (NFS), número de ramificações (NRF) e número de raízes (NR). Posteriormente, foi realizada uma segunda avaliação aos 120 dias de cultivo, para verificar a viabilidade das plantas em relação aos tratamentos, com as variáveis descritas anteriormente.

### **Delineamento experimental e análise dos dados**

O delineamento experimental utilizado no experimento da etapa de micropopulação foi inteiramente casualizado, analisando cinco concentrações de BAP (0,0; 0,5; 1,0; 1,5 mg/l), com 6 repetições, sendo cada repetição constituída por um frasco contendo três segmentos nodais.

Na conservação *in vitro*, o experimento foi estabelecido em delineamento experimental inteiramente casualizado, em esquema fatorial (3 x 2 x 2) do tipo parcela subdividida no tempo, analisando três concentrações de meio de cultura (MS, MS/2 e MS/4), duas concentrações de sacarose (15 e 30 g/l) em duas épocas de avaliações (30 e 120 dias).

Os dados resultantes das avaliações das plantas foram submetidos à análise variância (ANOVA). As médias dos diferentes tratamentos foram comparadas pelo teste F e Tukey a 5% de probabilidade. As variáveis NFS, NRF e NR foram transformadas para  $\sqrt{x+0,5}$ , visando o atendimento das pressuposições da ANOVA. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software estatístico SAS – statistical analysis system (Sas Institute 2004).

## **RESULTADO E DISCUSSÃO**

### **Multiplicação *in vitro***

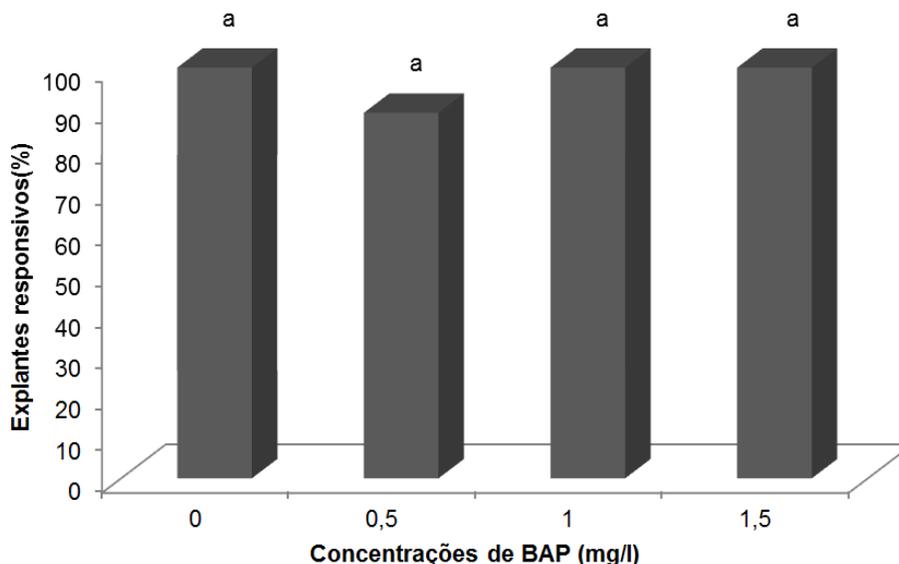
Na etapa de micropopulação, observou-se que não houve diferenças significativas entre os tratamentos para o percentual de explantes responsivos, sendo de 100% nas concentrações de 0,0; 1,0 e 1,5 mg/l de BAP (Figura 1). Este resultado sugere que o nível hormonal endógeno foi suficiente para assegurar a retomada da diferenciação celular, com conseqüente desenvolvimento da parte aérea, em virtude do tratamento com ausência do BAP apresentar 100% de explantes responsivos. Diferentemente desta resposta, Morais et al. (2014), trabalhando com plantas do mesmo gênero (*Mentha*

x *piperita* L.) o BAP favoreceu a regeneração dos segmentos nodais inoculados *in vitro* e, quando combinado ao GA<sub>3</sub>, a brotação dos explantes. Da mesma forma, efeito relevante da citocinina BAP foi observado por Brito (2007), trabalhando com a babosa (*Aloe vera* (L.) Burm.f.), onde verificou que no processo de desenvolvimento *in vitro* da planta, as brotações apresentaram um bom desempenho tanto no desenvolvimento da parte aérea quanto no radicular, apresentando uma percentagem de 100% de plantas enraizadas. Apesar da resposta positiva, na ausência de BAP, para o desenvolvimento da parte aérea dos brotos, constatou-se que essa concentração (0,0 de BAP) não favoreceu à elevada formação de gemas adventícias, como verifica-se na Figura 2.

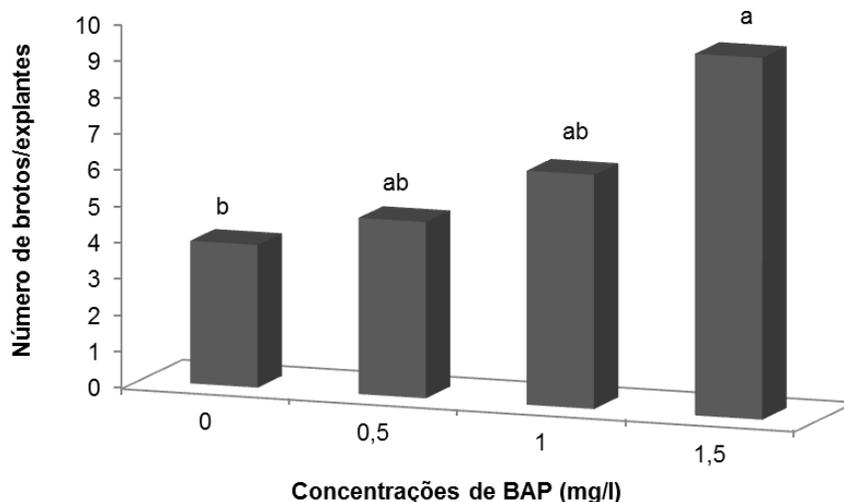
Em relação ao número de brotos por explantes, o meio MS contendo 1,5 mg/l de BAP

foi aquele que apresentou a melhor resposta, com média de 9,2 brotos. Por outro lado, a ausência deste regulador vegetal resultou em baixa produção de brotos (média de 4 brotos/explantes) (Figura 2). Neste sentido, a adição da citocinina BAP foi um fator determinante para o incremento da taxa de multiplicação *in vitro* da espécie.

A citocinina BAP (6-benzilaminopurina) tem sido muito eficaz para viabilizar a multiplicação *in vitro* em diversas espécies, sendo apontada em vários trabalhos como excelente fitoregulador. Pode-se citar como exemplo dessa eficácia a multiplicação de brotações de *Mentha arvensis* L. (PHATAK & HEBLE, 2002), *Amburana acreana* (Ducke) A.C.Sm. (Fermino Júnior e Pereira 2012) e *Mimosa caesalpinifolia* Benth. (Bezerra et al. 2014). Os resultados descritos nessas espécies, assim como no presente trabalho, indicam que o aumento



**FIGURA 1.** Percentagem de explantes responsivos em função das concentrações de BAP. Fonte: Dados da pesquisa 2017.



**FIGURA 2.** Número de brotos/explante em função das concentrações de BAP. Fonte: Dados da pesquisa 2017.

na concentração desse regulador (BAP) foi decisivo para o aumento do número de brotações.

Resultado semelhante ao observado neste trabalho foi encontrado por Asmar et al. (2012), onde utilizou-se concentrações de BAP no cultivo *in vitro* de brotos de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. ex Britton & P.Wilson e evidenciaram que a concentração de 1,5 mg/l de BAP promoveu a multiplicação da espécie. Estudo realizado por Navroski et al. (2014), constatou que na multiplicação *in vitro* da segurelha (*Satureja hortensis* L.), a citocinina BAP induziu o aumento de brotações da espécie. No que se refere ao efeito do BAP no cultivo *in vitro* de plantas medicinais, Vicente et al. (2009) trabalhando com *Vernonia condensata* Baker, constataram que a concentração de 1,0 mg/l de BAP foi a que proporcionou a melhor resposta em relação ao número de brotos por explantes.

Nesta perspectiva, podemos verificar que o efeito benéfico do BAP na multiplicação das brotações está associado com a influência desse regulador de crescimento na divisão celular e na quebra de dominância apical (Brum et al. 2002).

#### Aclimatização

Na etapa de aclimatização, observou-se que 100% das plantas sobreviveram e apresentaram desenvolvimento satisfatório, independente da concentração de BAP utilizada na etapa de multiplicação, o que comprova a eficiência da metodologia utilizada neste trabalho para aclimatização das plantas.

Resultados semelhantes foram observados nas espécies medicinais alumã (*V. condensata*) e anador (*Justicia pectoralis* Jacq.), onde Vicente et al. (2009) observaram que na fase de aclimatização houve 100% de sobrevivência, independente da concentração de BAP utilizada. Conforme Rocha et al. (2008) a aclimatização é a etapa mais crítica do cultivo *in vitro* e pode comprometer a produção das mudas de algumas espécies, uma vez que as plantas são expostas às condições ambientais, sofrendo variações drásticas, sendo a perda de água um dos principais problemas. Nesse sentido, a obtenção de microplantas com as raízes bem desenvolvidas é de suma importância para a sua existência e crescimento em novas condições ambientais, como as correspondentes na aclimatização (Pio et al. 2002).

A metodologia utilizada neste trabalho para a aclimatização das microplantas de hortelã mostrou-se eficiente e pode ser recomendada para plantas oriundas da micropopulação desta espécie medicinal. Além disso, constitui-se em uma alternativa de reciclagem para as garrafas do tipo PET, contribuindo assim para a sustentabilidade ambiental.

#### Conservação *in vitro*

Para a característica altura de planta (AP), observou-se que com 30 dias de cultivo não houve diferença significativa entre as concentrações do meio de cultura MS, assim como entre as concentrações de sacarose analisadas. No entanto, após 120 dias a menor média de AP foi observada utilizando o meio de cultura MS a 1/4 de sua concentração e adição de 30 g/l de sacarose, conforme podemos observar na tabela 1. Este resultado é um indicativo de que a menor concentração de nutrientes no meio de cultura MS associada a uma maior concentração de sacarose foi favorável para a condição de crescimento mínimo, o que é desejável, visto que um dos principais objetivos da conservação *in vitro* é aumentar o tempo de permanência da planta no mesmo meio de cultura, prolongando, conseqüentemente, o intervalo entre os subcultivos.

O resultado obtido no presente trabalho, em relação a variável altura da planta, contrapõe com os encontrados por Lima (2016) na conservação *in vitro* de *Orthophtum mucugense* no qual aponta que quanto maior a concentração de sacarose utilizada no meio de cultura, maior será o comprimento da parte aérea das plantas cultivadas *in vitro*. Em estudo com a cultura da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), Oliveira (2011) também evidenciou maior incremento da parte aérea de plantas cultivadas *in vitro* quando aumentou a concentração do carboidrato. Carvalho et al. (2014) destaca que podem ocorrer variações entre plantas de um mesmo genótipo conservadas *in vitro*, por isso que são necessários estudos com outros genótipos

**TABELA 1.** Valores médios de altura de planta (cm) de *Mentha x villosa*, cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações do meio de cultura MS e de sacarose durante 30 e 120 dias.

Concentrações do meio MS	Concentrações de sacarose (g/l)	
	15	30
Após 30 dias		
1/1	3,92 aA	5,25 aA
1/2	5,98 aA	7,24 aA
1/4	5,66 aA	6,64 aA
Após 120 dias		
1/1	13,21 bB	16,90 bA
1/2	20,30 aB	24,15 aA
1/4	14,58 bA	9,02 cB

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ( $P < 0,05$ ) e médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste F ( $P < 0,05$ ). Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

para definir protocolos de conservação *in vitro*. Corroborando com os autores supracitados, Watt et al. (2000) ressaltam que espécies e cultivares possuem características genéticas próprias, dessa forma, o sucesso da tecnologia de crescimento lento requer o desenvolvimento de protocolos específicos para cada um deles.

Santos et al. (2012) observou que ao reduzir a concentração dos sais do meio MS para 1/4 da sua concentração total plantas de vetiver (*Chrysopogon zizanioides* (L.) Roberty) podem ser mantidas *in vitro* na temperatura de 18 °C por um período de 270 dias, corroborando com os resultados evidenciados no presente estudo. Lima-Brito et al. (2011) confrontando os efeitos da sacarose, do sorbitol e do manitol na conservação *in vitro* de *Comanthera mucugensis* (Giul.) L.R.Parra & Giul. subsp. *mucugensis*, observaram que as menores médias para o comprimento da parte aérea na espécie ocorreram em concentrações maiores de sacarose (45 e 60 g/l).

Visando estabelecer um banco de germoplasma *in vitro* de *Pfaffia glomerata*, Alves et al. (2010) verificou que o meio MS na metade da sua concentração total, com 2% de sacarose e 4% sorbitol na temperatura de 16 ± 1 °C favoreceu o crescimento mínimo das plantas cultivadas *in vitro*, prorrogando o subcultivo por um período de seis meses.

Vale destacar que as plantas cultivadas *in vitro* precisam estar vigorosas e em condições favoráveis para a propagação no final do período de conservação proposto. Neste sentido, com relação à variável número de ramificações, após 30 dias de cultivo as maiores médias para esta característica foram observadas utilizando o meio de cultura MS na sua concentração normal e na metade de sua concentração, com adição de 15 g/l, não ocorrendo diferenças entre os valores médios dessa característica com relação às concentrações do meio MS quando se utilizou 30 g/l de sacarose. Já com 120 dias, as maiores médias de NRF foram observadas utilizando o meio MS na sua concentração total e metade da sua concentração com 30 g/l de sacarose (Tabela 2), o que é vantajoso, pois no que se refere ao objetivo proposto pela presente pesquisa, teoricamente as plantas de *M. x villosa* oferecerão uma maior quantidade de explantes para serem utilizados quando houver a necessidade de realizar a propagação *in vitro* dessa espécie para disponibilizar mudas para gestores de saúde, assim como para implantação de farmácias vivas.

Na conservação *in vitro* de cana de açúcar Lemos et al. (2002) evidenciou que os tratamentos nos quais se combinou temperatura de 15 °C com 10 g/l ou 20 g/l de sacarose resultaram em valores

**TABELA 2.** Valores médios do número de ramificações de plantas de *Mentha x villosa*, cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações do meio de cultura MS e de sacarose durante 30 e 120 dias.

Concentrações do Meio MS	Concentrações de sacarose (g/l)	
	15	30
Após 30 dias		
1/1	3,75 aA	2,25 aA
1/2	2,45 abA	3,65 aA
1/4	1,05 bA	3,10 aA
Após 120 dias		
1/1	25,45 aB	38,75 aA
1/2	25,95 aB	42,75 aA
1/4	13,45 bA	10,60 bB

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (P < 0,05) e médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste F (P < 0,05). Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

mais baixos em relação às outras temperaturas (12 °C e 25 °C) e concentrações de sacarose testadas (10, 20 e 40 g/l). Neste sentido, podemos verificar que o aumento da temperatura e da concentração de sacarose favoreceu negativamente para o crescimento mínimo da planta. Contudo, no presente estudo podemos destacar que a temperatura de 20 °C e o aumento da concentração de sacarose para 30 g/l favoreceu a condição de crescimento lento, mantendo as plantas viáveis até 120 dias.

Resultados encontrados por Rocha (2010) corroboram os encontrados no presente estudo, pois verificou que ao final do período proposto de 360 dias o incremento do número de folhas verdes ocorreu quando utilizou-se o meio MS na metade de sua concentração total combinado com a concentração de 30 g/l de sacarose, na temperatura de 21 ± 2 °C. Tal como o autor citado anteriormente, Lima (2016) observou que plantas de *Orthophytum mucugese* Wand. apresentaram maiores números de folhas verdes quando utilizando-se 1/3 da concentração de sais do meio de cultura MS e 45 g/l de sacarose, utilizando a temperatura de 25 °C por um período de 60 dias. Estes resultados corroboram com os encontrados na presente pesquisa, pois à medida em que a concentração de sais do meio de cultura MS foi reduzida as plantas necessitaram de concentrações maiores de carboidrato.

Na conservação *in vitro*, plantas mantidas por períodos de tempo prolongados, muitas vezes, iniciam a senescência, que pode ser ocasionada

por vários fatores, tais como a exaustão do meio de cultura e produção de etileno ou mesmo devido ao efeito fitotóxico do inibidor de crescimento, que pode culminar na morte das plantas (Neponuceno 2012).

De acordo com os resultados encontrados para número de folhas senescentes, podemos observar que após 30 dias de cultivo as menores médias do NFS ocorreram utilizando o meio de cultura MS na sua concentração normal. No entanto, após 120 dias de cultivo as menores médias do NFS foram observadas nas plantas cultivadas em meio MS a 1/4 de sua concentração (Tabela 3). A análise da variável número de folhas senescentes é importante para os trabalhos de conservação *in vitro*, uma vez que serve como indicativo do estágio fisiológico da planta, pois expressa o processo de envelhecimento da planta (Carvalho et al. 2016).

**TABELA 3.** Valores médios do número de folhas senescentes de *Mentha x villosa*, cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações do meio de cultura MS durante 30 e 120 dias.

Concentrações do meio MS	Épocas de cultivo (dias)	
	30	120
1/1	1,60 bB	10,20 bA
1/2	2,80 abB	15,15 aA
1/4	4,02 aA	5,22 cA

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ( $P < 0,05$ ) e médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste F ( $P < 0,05$ ). Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

Segundo Canto et al. (2004) e Neponuceno (2012) a senescência não é o que se espera na conservação *in vitro*, pois requer que seja efetuado o subcultivo para recuperação do vigor da planta, objetivando sua capacidade de regeneração. Uma vez que, a senescência foliar ocasiona depreciação e destruição de tecidos e órgãos foliar, provocando perda da energia potencial da planta (Taiz e Zeiger 2013).

Com 30 dias de cultivo não houve diferenças entre as concentrações do meio MS com relação ao número de raízes. Entretanto com 120 dias as maiores médias observadas para esta característica foi quando se utilizou o meio MS na sua concentração total e metade de sua concentração (Tabela 4). Pesquisa realizada por Menezes (2014) sobre conservação *in vitro* de três espécies de orquídeas (*Catasetum macrocarpum* Rich. ex Kunth, *Oeceoclades maculata* (Lindl.) Lindl. e *Polystachya estrellensis* Rchb.f.), onde avaliou-se

as concentrações de sais do meio MS (100, 75, 50 e 25%) e temperatura (18 e 25 °C) do ambiente de cultivo, verificou que não houve diferenças significativas com relação as concentrações do meio de cultura MS para a espécie *Polystachya estrellensis* Rchb.f., com 100% de enraizamento para todos os tratamentos.

**TABELA 4.** Valores médios do número de raízes de plantas de *Mentha x villosa*, cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de meio de cultura MS durante 30 e 120 dias.

Concentrações de sacarose (g/l)	Épocas de cultivo (dias)	
	30	120
1/1	8,32 aB	10,95 aA
1/2	8,48 aA	9,48 aA
1/4	7,88 bB	9,00 aA

[Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ( $P < 0,05$ ) e médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste F ( $P < 0,05$ ). Fonte: Dados da pesquisa, 2017.

Em relação aos valores médios do número de raízes em função das concentrações do meio de cultura e de sacarose, observou-se as maiores médias do NR quando as plantas foram cultivadas em meio de cultura MS na metade de sua concentração e adição de 30 g/l de sacarose, assim como quando utilizou-se 15 g/l de sacarose no meio de cultura MS na sua concentração normal e a 1/4 de sua concentração (Tabela 5).

Assim como no presente trabalho, Alves et al. (2010) pesquisando sobre a influência de diferentes meios de cultura no crescimento mínimo de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen, constataram que nenhum tratamento (MS + 2% de sacarose + 4% de sorbitol; MS/2 + 2% de sacarose

**TABELA 5.** Valores médios do número de raízes de plantas de *Mentha x villosa*, cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações do meio de cultura MS e de sacarose.

Concentrações do Meio MS	Concentrações de sacarose (g/l)	
	15	30
1/1	10,52 aA	8,75 aA
1/2	7,25 bB	10,70 aA
1/4	10,35 aA	6,52 bB

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ( $P < 0,05$ ) e médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste F ( $P < 0,05$ ). Fonte: dados da pesquisa, 2017.

+ 4% de sorbitol; MS + 2% de sacarose + 4% de sorbitol + 2 mg/l de pantotenato de cálcio; MS/2 + 2% de sacarose + 4% de sorbitol + 2 mg/l de pantotenato de cálcio; MS + 2% de sacarose + 3% de manitol + 2 mg/l de pantotenato de cálcio; MS/ 2 + 2% de sacarose + 3% de manitol + 2 mg/l de pantotenato de cálcio) inibiu a formação de raízes, ocorrendo 100% de enraizamento em explantes de *P. glomerata* nas condições do experimento.

Utilizando temperatura mais elevada 27 ± 1 °C, Faria et al. (2006) verificaram que é possível conservar sob crescimento reduzido plantas de *Passiflora gibertii* N.E.Br. com bom desenvolvimento radicular e número de folhas satisfatórias em meio de cultura MS suplementado com 15 g/l de sacarose e 20 g/l de sorbitol quando cultivadas por um período de 120 dias. Neste sentido, para Camolesi et al. (2010) a presença de raízes pode sugerir que as plantas estão se desenvolvendo normalmente ou que as condições de cultivo não estão gerando restrições que possam prejudicar seu desenvolvimento posteriormente.

A partir da conservação *in vitro* de *Piper aduncum* L. e *Piper hispidinervum* C.DC. via crescimento lento, Silva e Scherwinski-Pereira (2011) verificaram que as espécies podem ser conservadas durante seis meses em meio MS na temperatura de 20 °C, sem perder a capacidade de regeneração e sem alterações morfológicas.

Os resultados observados no presente trabalho evidenciaram uma variação nas características das plantas em função dos fatores avaliados nas duas épocas (30 e 120 dias), sendo estes: meio de cultura e concentração de sacarose. No entanto, de forma geral, observou-se que a fonte de carbono utilizada no presente estudo influenciou significativamente a maioria das características estudadas. Neste sentido, conforme Carvalho (2013) as variáveis observadas nas plantas devem ser analisadas e correlacionadas paralelamente nas avaliações, com o objetivo de se estabelecer uma condição de crescimento mínimo. No entanto, estas condições podem sofrer variação de uma espécie para outra e dependerão, além disso, do genótipo utilizado, como também dos procedimentos adotados pelo pesquisador na conservação *in vitro*.

Em relação às concentrações do meio de cultura MS e de sacarose, observou-se que o meio de cultura MS na metade da sua concentração e a 1/4 da sua concentração total acrescido 30 g/l de sacarose proporcionaram o menor desenvolvimento *in vitro* da *M. x villosa*. Neste sentido, é possível inferir que na presente pesquisa, mesmo com a diminuição das concentrações salinas do meio de cultura MS para 50 e 25%, o que favorece consideravelmente o aspecto econômico, as plantas necessitaram de uma concentração maior de

carboidrato para se manterem viáveis nas condições de crescimento lento.

Embora não haja um protocolo específico para todos os genótipos de todas as espécies, o que se pretende no manejo das grades coleções de plantas *in vitro* é a possibilidade de se obter uma metodologia que possa ser utilizada para o maior número de acessos possíveis, favorecendo o planejamento dos subcultivos das plantas conservadas *in vitro* sem afetar sua estabilidade genética, como também otimizando o trabalho em ambiente laboratorial (Carvalho et al. 2016).

## CONCLUSÕES

Com base nos resultados, podemos concluir que a multiplicação *in vitro* de brotos de *M. x villosa* constitui-se em um processo possível e viável nas condições avaliadas. A adição de 1,5 mg/l de BAP no meio de cultura MS, na fase de multiplicação, utilizando explantes oriundos das plantas estabelecidas em meio de cultura MS com 1,0 mg/l de BAP, proporcionou a máxima proliferação de brotos. A aclimatização de plantas oriundas do cultivo *in vitro* de *M. x villosa*, utilizando garrafas do tipo PET, constitui-se em um processo possível e viável nas condições avaliadas. Nas condições em que o trabalho foi executado o meio de cultura MS a 1/4 de sua concentração total, associado à adição de 30 g/l de sacarose é uma condição viável para conservação *in vitro* de plantas de *M. x villosa* sob regime de crescimento mínimo por um período de 120 dias.

## CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram que não há conflito de interesses.

## REFERÊNCIAS

- Alves RBN, Bertoni BW, Vieira RF, França SC, Ming LC, Pereira AmS (2010) Influência de diferentes meios de cultura sobre o crescimento de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae) para conservação *in vitro*. Rev Bras Plantas Med 12:510-515. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722010000400016>
- Asmar SA, Resende RF, Araruna EC, Morais TP, Luz JMQ (2012) Concentrações de BAP sobre a proliferação *in vitro* de brotos de *Lippia alba* [(Mill.) N. E. Brown]. Rev Bras Plantas Med 14:149-153. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722012000500004>
- Bezerra RM de, F Aloufa MAI, Freire FA de M, Santos DD dos (2014) Efeito de 6-benzilaminopurina sobre a propagação *in vitro* de *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth. (Fabaceae). Rev Árvore 38:771-778. <https://doi.org/10.1590/S0100-67622014000500001>
- Brito C. F de (2007) Micropropagação de babosa (*Aloe vera* L.). 43p. Dissertação (Mestrado) - Universidade

- Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, Brasil.
- Brum GR, Silva AB, Pasqual M (2002) Efeito de diferentes concentrações de bap e ana na propagação *in vitro* da figueira (*Ficus carica* L.). Ciênc Agrotec ed. esp:1403-1409. <https://docplayer.com.br/49205279-Efeito-de-diferentes-concentracoes-de-bap-e-ana-na-propagacao-in-vitro-da-figueira-ficus-carica-l-1.html>
- Camolesi MR, Martins NA, Souza LD de, Saconi CG (2010) Enraizamento *in vitro* de mudas micropropagadas de bananeira (*Musa* sp.) em diferentes meios de cultivo. Ciênc Agrotec 34:1446-1451. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542010000600013>
- Canto AMME, Souza F VI D, Costa MAC, Souza A da S, Ledo C A da S, Cabral José Renato Souza (2004) Conservação *in vitro* de germoplasma de abacaxi tratado com paclobutrazol. Pesq Agropec Bras 39:717-720. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2004000700014>
- CARVALHO M de JS (2013) Adequação da condição de crescimento mínimo para a conservação *in vitro* de germoplasma de citros. 84p. Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. Cruz das Almas, Brasil.
- Carvalho M de J da S de, Santos EB, Souza A da S, Ledo CA da S, Filho Soares W dos S, Mendes ISM (2014) Fatores que afetam a conservação *in vitro* de plantas do limoeiro 'Rugoso da Flórida'. Magistra 26:178-185. <https://magistraonline.ufrb.edu.br/index.php/magistra/article/viewFile/453/350>
- Carvalho M de J da S de, Souza A da S, Santos EB, Filho Soares W dos S, Ledo CA da S, Souza FVD (2016) Univariate and multivariate statistical tools for *in vitro* conservation of citrus genotypes. Acta Sci Agro 38:129-137. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v38i1.26433>
- Castro LO, Chemale VM (1995) Plantas medicinais, condimentares e aromáticas; descrição e cultivo. Guaíba: Agropecuária. 180-183p.
- Chaves FCM (2001) Produção de biomassa, rendimento e composição de óleo essencial de alfavaca-cravo (*Ocimum gratissimum* L.) em função da adubação orgânica e épocas de corte. 144p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônomicas, São Paulo, Brasil.
- Faria GA, Costa MAP de C, Junghans TG, Ledo CA da S, Souza A da S (2006) Efeito da sacarose e sorbitol na conservação *in vitro* de *Passiflora gibertii* N.E.Brow. Rev Bras Frutic 28:267-270. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452006000200025>
- Fermino Junior PCP, Pereira JES (2012) Germinação e propagação *in vitro* de cerejeira (*Amburana acreana* (Ducke) A.C. Smith - Fabaceae). Ciênc Florest 22:1-9. <https://doi.org/10.5902/198050985074>
- Lima CSM, Bandeira J de M, Rubin S, Ribeiro MV, Benitez L, Peters JA, Braga EJB (2007) Influência de fitoreguladores no crescimento *in vitro* de partes aérea de *Mentha viridis*. Rev Bras Biocien 5:669-671. <https://www.seer.ufrgs.br/rbrasbioci/article/view/115219/62516>
- Lima APPS (2016) Micropropagação e conservação *in vitro* de *Orthophytum mucugense* Wand. e Conceição. 92 p. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Recursos Genéticos Vegetais)- Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, Brasil.
- Brito AL, Albuquerque MMS, Alvim BFM, Resende SV, Bellintani MC, Santana JRF de (2011) Agentes osmóticos e temperatura na conservação *in vitro* de sempre-viva. Cien Rural 41:1354-1361. <https://repositorio.ufba.br/handle/ri/5460r>
- Lemos EEP de, Ferreira M de S, Alencar LMC de, Ramalho Neto CE, Albuquerque MM de (2002) Conservação *in vitro* de germoplasma de cana-de-açúcar. Pesq Agropec Bras 37: 1359-1364. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2002001000002>
- Lorenzi H, Matos FJA (2008) Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. 2ª. ed. Nova Odessa-SP: Instituto Plantarum. 544p.
- Menezes TSA (2014) Conservação *in vitro* e aclimação de Epidendroideae (Orchidaceae) do Estado de Sergipe. 43f. Dissertação (Mestrado em Agricultura e Biodiversidade) - Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, Brasil.
- Morais TP, Asmar AS, Luz JMQ (2014) de crescimento vegetal no cultivo *in vitro* de *Mentha x Piperita* L. Rev Bras Plantas Med, 16:350-355. [https://doi.org/10.1590/1983-084X/13\\_017](https://doi.org/10.1590/1983-084X/13_017)
- Morais TP, Luz, JMQ, Silva, S.M, Resende RF, Silva AS (2012) Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais. Rev Bras Plantas Med 14:110-121. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722012000100016>
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol Plant 15:473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Navroski MCI, Waldow DAG, Reiniger LRS, Golle DP, Curti AR, Pereir MO (2014) Multiplicação *in vitro* de segmentos apicais caulinares de segurelha (*Satureja hortensis* L.). Rev Bras Plantas Med 16:117-121. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722014000100017>
- Neponuceno CF (2012) Propagação e conservação *in vitro* de *Martianthus leucocephalus* (Mart. ex Benth.) J.F.B. Pastore. 179p. Doutorado (Tese) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Departamento de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Botânica. Feira de Santana, Brasil.
- Oksman-Caldentey KID, Inezé D (2004) Plant cell factories in the post-genomic era: newways to produce designer secondary metabolites. Trends Plant Sci 9:433-440. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.07.006>
- Oliveira TG de (2011) Micropropagação e conservação *in vitro* de *Croton antisiphiliticus* Mart. Botucatu. 69p. Dissertação (Mestrado)-Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônomicas, Botucatu, Brasil.
- Pio R, Ramos J D, Pio L A S, Mendonça V, Silva A B da, Moacir P (2002) Enraizamento *in vitro* de brotações de porta-enxerto de citros *Tangerina sunki* x *Trifoliata english* 63- 256 com o uso de sacarose e ácido indol-butírico. Ciênc Agrotec 26:66-70. [http://cienciaeagrotecnologia.ufla.br/images/artigos-publicados/2003/2002/26-1-2002\\_08.pdf](http://cienciaeagrotecnologia.ufla.br/images/artigos-publicados/2003/2002/26-1-2002_08.pdf)
- Rocha MAC (2010) Multiplicação e conservação de Bromeliaceae ornamentais. Cruz das Almas, 99p. Tese (Doutorado)-Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, Brasil.
- Rocha MAC da, Costa MAP de C, Silva SA, Ledo CA da S, Maria JSM, Lucimário PB (2008) Enraizamento *in vitro* e aclimação de genótipos de jenipapeiro (*Genipa americana* L.). Rev Bras de Frutic 30:769-774. <https://>

- doi.org/10.1590/S0100-29452008000300035
- Santos TC, Arrigoni-Blank M de F, Blank AF, Menezes MML de A (2012) Conservação *in vitro* de acessos de vetiver, *Chrysopogon zizanioides* (L.) Roberty (Poaceae). *Biosci J* 28:963-970 <https://docs.bvsalud.org/biblioref/2018/09/914341/conservacao-in-vitro-de-acessos-de-vetiver.pdf>
- Sas Institute (2004) SAS user's guide: statistic: version 9.1.3. Cary: SAS Institute. 846p.
- Scherwinski-Pereira JE, Costa FHS (2010) Conservação *in vitro* de recursos genéticos de plantas: estratégias, princípios e aplicações. In: Barreto Cid, L.P. (Org.). *Cultivo in vitro de plantas*. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, p.177-234.
- Silveira DG (2009) Micropropagação e variabilidade genética de populações naturais de caroá [*Neoglaziovia variegata* (Arruda) Mez]. 172p. Tese (Doutorado em Botânica) - Programa de Pós-Graduação em Botânica, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, Brasil.
- Taiz L, Zeiger E (2013) *Fisiologia Vegetal*. 5ª. ed. São Paulo: Artmed, 918p.
- Vicente MAA, Almeida WAB, Carvalho ZS (2013) Multiplicação *in vitro* e aclimatação de *Vernonia condensata* Baker. *Rev Bras Plantas Med* 11:176-183. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722009000200011>
- Watt M, Thokoane NL, Blakeway F (2000) *In vitro* storage of *Eucalyptus grandis* germplasm under minimal growth conditions. *Plant Cell, Tissue Organ Cult* 6:161-164. <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1006447506869>