

Influência do meio de cultura na germinação de sementes *in vitro* e taxa de multiplicação de *Melissa officinalis* L.

Érika Soares Reis¹
José Eduardo B. P. Pinto¹
Luciana Domiciano Silva Rosado¹
Ricardo Monteiro Corrêa¹

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a germinação *in vitro* de sementes de *Melissa officinalis* e sua taxa de multiplicação. Diferentes concentrações de sacarose (3 e 1,5%) e dos sais do meio MS (MS, MS/2 e MS/4) foram testadas para a germinação das sementes. Na avaliação da taxa de multiplicação, plantas de *M. officinalis* foram cultivadas em meio MS, com ou sem a suplementação de 4,44 $\mu\text{mol/L}$ de BAP. Os experimentos foram implantados em delineamento inteiramente casualizado, sendo o primeiro (experimento de germinação) com seis repetições e cinco tubos por parcela e o segundo (experimento de taxa de multiplicação) com 11 repetições e cada parcela composta por quatro tubos de ensaio. No primeiro experimento avaliaram-se o índice de velocidade de germinação (IVG), a percentagem de germinação e o comprimento do maior broto. No segundo, foram avaliados o número de brotos, número de nós, comprimento do maior broto e número de raízes principais. Observou-se que o meio MS/4 proporcionou maior IVG e maior percentagem de germinação, enquanto para o comprimento da parte aérea verificou-se que no meio MS as plântulas apresentaram maior comprimento. No segundo experimento constatou-se que plântulas de *M. officinalis* subcultivadas em meio MS contendo 4,44 $\mu\text{mol/L}$ de BAP apresentaram maior número de brotos, mas com pequeno número de nós e comprimento de broto, não havendo também formação de raízes. A maior taxa de multiplicação foi obtida em meio MS sem a adição de regulador de crescimento.

Palavras-chave: *Melissa officinalis*, planta medicinal, cultura de tecidos.

ABSTRACT

Influence of culture medium on *in vitro* seed germination and multiplication rate of *melissa officinalis* L.

The present work was carried out aiming to evaluate *in vitro* germination of *Melissa officinalis* seeds and multiplication rate. Different sucrose (3% and 1.5%) and MS medium salt concentration (MS, MS/2 and MS/4) were tested for seed germination. For evaluation of multiplication rate, *M. officinalis* plants were cultured in MS medium (whole concentration) supplemented or not with 4.44 $\mu\text{mol/L}$ BAP. The experiments were carried out in completely randomized design, being the first (germination) with 6 repetitions with 5 tubes and the second (multiplication rate) with 11 repetitions and each one with 4 tubes. In the first experiment, GVI (germination velocity index), seed germination percentage and shoot length were evaluated, whereas in the second experiment shoot number, nodal number, shoot length and root number were evaluated. MS/4 medium led to higher germination velocity index and germination percentage, but greater shoot length was obtained in MS medium. In the second experiment, shoots of *M. officinalis* cultivated in MS medium containing 4.44 $\mu\text{mol/L}$ of BAP presented larger shoot number, but with a small number of nodes and shoot length, as well as without root formation. Higher multiplication rates were achieved in MS medium.

Key words: *Melissa officinalis* L., medicinal plant, tissue culture.

¹ Departamento de Agricultura – Universidade Federal de Lavras. C.P. 3037. CEP 37200-000. Lavras-MG. Brasil. E-mail: jeduardo@ufla.br; erikasreis@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

Melissa officinalis, conhecida popularmente como erva-cidreira ou melissa, é uma planta arbustiva de origem mediterrânica e asiática, da família Lamiaceae, podendo atingir de 20 a 80 cm de altura. As folhas são de cor verde-intenso, na parte superior, e verde-claro, na parte inferior. As flores, quando surgem, são brancas ou amareladas, podendo se tornar rosadas com o passar do tempo (Morelli, 1977).

É uma planta aromática com aplicações na medicina, culinária (condimento) e perfumaria (constituintes aromáticos). A infusão das folhas é usada como sedativa e propriedades antiespasmódicas (Morelli, 1977).

Houve expressivo aumento na utilização de plantas medicinais pela população mundial nos últimos tempos. De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 80% da população mundial faz uso de algum tipo de erva na busca de alívio de alguma sintomatologia dolorosa ou desagradável. Desse total, pelo menos 30% se dá por indicação médica (Martins *et al.*, 1998).

Devido à grande busca da população pelo uso de produtos naturais, o mercado de plantas medicinais está em constante ascensão, e dentro desse mercado encontra-se a espécie *Melissa officinalis*.

Faz-se necessário otimizar o processo de cultivo de plantas medicinais *in vitro* mediante pesquisas que visam estabelecer condições ideais de crescimento e multiplicação dessas plantas.

A cultura de tecidos vem sendo uma técnica amplamente utilizada como ferramenta biotecnológica para o estudo de metabolismo, fisiologia, desenvolvimento e reprodução de plantas com propriedades medicinais, promovendo assim maior número de plantas em menor tempo.

Mercier e Nievola (2003) consideram que a germinação de sementes *in vitro* é ótima opção para se conseguir plantas assépticas, e a partir delas iniciar-se a cultura de explantes, como folhas, segmentos nodais, entre outras.

Na germinação *in vitro* de cubiu (*Solanum sesseliflorum*) observou-se que a variedade Santa Luzia apresentou maior percentagem de germinação em meio MS/2, enquanto o meio MS completo resultou em uma maior percentagem de germinação para a variedade Thaís (Jurack *et al.*, 2003).

Pesquisas de Pereira *et al.* (2006) ao estudar a germinação *in vitro* de embriões zigóticos de murmuru (*Astrocaryum ulei*) mostraram que concentrações de sacarose acima e 1,5% inibiram a germinação de embriões dessa espécie.

Segundo Grattapaglia e Machado (1990), as plantas cultivadas *in vitro* requerem uma fonte de energia exógena, pois não dispõem de condições adequadas para a realização da fotossíntese. Diante disso, a sacarose tem sido a fonte de carbono mais utilizada, estando pre-

sente em meios de cultura em concentrações que variam de 20 a 40 g.L⁻¹ (Ferreira *et al.*, 2002).

Variações na concentração desse carboidrato no meio de cultivo afetam as condições osmóticas e o metabolismo da planta *in vitro*, influenciando no crescimento e no metabolismo das culturas (Kumar *et al.*, 1984; Ozaias-Akins & Vasil, 1982).

Vários protocolos de micropropagação têm sido estudados para diversas espécies. No entanto, o sucesso desse processo depende de alguns fatores, como o genótipo, o regulador de crescimento e sua dose, o meio de cultivo, as condições de cultivo *in vitro*, dentre outros fatores (Deschamps, 1993).

Grattapaglia e Machado (1998) afirmam que o tipo e a concentração de citocinina no meio de cultura são os fatores que mais influem no sucesso da multiplicação *in vitro*, e o excesso pode ser tóxico e comprometer o desenvolvimento das culturas.

Pesquisas de Oliveira & Silva (1997) mostraram que na micropropagação de banana (*Musa sp.*) o meio ideal foi o MS suplementado com 17,76 µmol/L de BAP, em que foram obtidas taxas de multiplicação de 2,1 brotações de banana cultivar “Nanicão” e 2,4 a cultivar “Grande Naine”.

O presente trabalho teve como objetivo estudar o efeito do meio de cultura e sacarose na germinação de sementes, bem como avaliar a presença ou ausência de regulador de crescimento na multiplicação de *Melissa officinalis L. in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, e a análise de variância foi realizada utilizando-se o software Sisvar (Ferreira, 2000).

Experimento I: Germinação *in vitro* de *Melissa officinalis L.*

A) Assepsia das sementes

Para a realização deste trabalho foram utilizadas sementes de *M. officinalis* coletadas em 2005. Inicialmente, elas foram imersas em solução de hipoclorito de sódio 40% por 20 minutos; em seguida, levadas para a câmara de fluxo laminar e lavadas três vezes em água destilada e autoclavada.

B) Condução do ensaio

Após a desinfestação e lavagem, as sementes foram inoculadas em tubos de ensaio de 25 x 150 mm contendo 12 mL do meio de cultura, sendo inoculadas seis sementes por tubo.

O meio de cultura utilizado constituiu-se do meio MS (Murashige e Skoog, 1962) suplementado com diferentes concentrações de sacarose, de acordo com os seguintes

tratamentos: T1) 100% dos sais do MS + 3% de sacarose; T2) 50% dos sais do MS + 3% de sacarose; T3) 25% dos sais do MS + 3% de sacarose; T4) 100% dos sais do MS + 1,5% de sacarose; T5) 50% dos sais do MS + 1,5% de sacarose; e T6) 25% dos sais do MS + 1,5% de sacarose.

Os meios de cultura foram solidificados com 0,6% de ágar (Merceck®), sendo o pH ajustado para $5,7 \pm 0,1$ e em seguida autoclavado a 120 °C e 1 atm por 20 minutos.

Os tubos inoculados com as sementes foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16/8 horas luz/escuro sob intensidade luminosa de $25 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, à temperatura de 26 ± 1 °C.

C) Avaliações

As avaliações iniciaram-se aos três dias após a inoculação das sementes, quando da protusão das radículas. Para cálculo do IVG (Índice de Velocidade de Germinação), foi realizada a contagem, durante sete dias seguidos, do número de sementes em que houve a protusão da radícula em cada tratamento, sendo nesse mesmo período avaliada a percentagem de germinação, e após 30 dias avaliou-se o comprimento da parte aérea das plântulas germinadas.

O experimento foi conduzido em esquema fatorial 3×2 , com três concentrações dos sais MS e duas de sacarose, com seis repetições. Cada parcela experimental foi composta por cinco tubos e seis sementes por tubo.

Experimento II: Multiplicação *in vitro* e aclimatização de *Melissa officinalis* L.

A) Fonte de explantes e meios para multiplicação

Plântulas obtidas da germinação de sementes *in vitro* de *Melissa officinalis* foram utilizadas como fonte de explantes para o presente experimento, sendo segmentos nodais os explantes utilizados. Os tratamentos consistiram do meio MS (concentração completa dos sais) em ausência ou presença de regulador de crescimento (6-BAP, benzilaminopurina), ou seja, T1) MS sem adição de BAP; e T2) MS suplementado com $4,44 \mu\text{mol/L}$ de BAP.

Os meios de cultura utilizados foram solidificados com 0,6% de agar, suplementado com 3% de sacarose e pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, sendo utilizados tubos de ensaio de 75 x 25 mm, contendo 12 mL de meio por tubo. Em seguida os meios foram autoclavados a 120 °C e 1 atm de pressão por 20 minutos.

B) Multiplicação *in vitro*

Segmentos nodais retirados de plântulas pré-estabelecidas *in vitro* foram inoculados nos meios indutores, conforme descritos no item A. A inoculação dos explantes foi realizada em câmara de fluxo laminar, colocando-se um segmento nodal por tubo.

O experimento constou de 11 repetições, e cada parcela experimental foi composta por quatro tubos de ensaio. Em seguida, os tubos contendo os explantes foram levados para sala de crescimento e mantidos sob fotoperíodo de 16/8 horas de luz/escuro e intensidade luminosa de $25 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, à temperatura de 26 ± 1 °C.

O estudo da taxa de multiplicação *in vitro* de *M. officinalis* foi feito realizando-se três subcultivos (3 cultivos seguidos) das plântulas com intervalos de 30 dias entre cada um. Para cada subcultivo foi utilizado o delineamento experimental (DIC) contendo o mesmo número de repetições (11) e de plântulas por parcela (4). As avaliações foram feitas ao final de cada subcultivo, analisando-se o número de brotos e de nós, comprimento do maior broto e número de raízes principais.

Para o tratamento 1 das plântulas obtidas no primeiro subcultivo, após avaliadas, foram retirados explantes (segmentos nodais) para o segundo subcultivo. Após a avaliação deste, as plântulas obtidas serviram como fonte de explante para o terceiro, sendo esses explantes inoculados em meio MS sem a adição de regulador de crescimento.

No tratamento 2 com a formação de múltiplos brotos, esses foram individualizados e utilizados como explantes para os subcultivos seguintes, sendo o meio MS com $4,44 \mu\text{mol/L}$ de BAP usado em todas as três multiplicações.

De posse das avaliações de crescimento dos tratamentos 1 e 2, foi estimado por inferência o número de plântulas obtidas a partir de um único explante ao final dos seis subcultivos. Esta inferência foi realizada considerando que a partir do segundo subcultivo, em meio MS sem regulador de crescimento, manteve-se a produção de plântulas com quatro nós, sendo fonte assim de quatro explantes para o próximo subcultivo, obtendo o estande no final de seis meses.

Para as plântulas subcultivadas em meio MS acrescido de BAP, a inferência foi realizada considerando que a partir do segundo subcultivo manteve-se a produção de três brotações por plântula, obtendo assim também o número de plântulas em seis meses de subcultivo. Para tal, considerou-se uma taxa de multiplicação de três brotações por brotação inicial inoculada ao final de 30 dias.

C) Aclimatização

Plântulas micropropagadas e microestacas (pequenas plântulas sem raízes) oriundas de subcultivos em meio MS sem BAP (Tratamento 1) e meio MS com BAP (Tratamento 2), respectivamente, foram transplantadas para bandejas de isopor de 128 células contendo substrato comercial Plantmax®. As bandejas foram colocadas em casa de vegetação para o processo de aclimatização, sendo esse processo feito reduzindo gradativamente a irrigação e aumentando a luminosidade.

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

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

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento I: Germinação *in vitro* de *Melissa officinalis* L.

A concentração dos sais do meio MS e a percentagem de sacarose influenciaram significativamente na germinação de sementes e no comprimento da parte aérea de *M. officinalis* ($p < 0,05$ – Figuras 1, 2 e 3). A interação entre os tipos de meio e concentrações de sacarose não foi significativa para todas as variáveis estudadas.

O IVG foi maior para o tratamento constituído do meio MS/4, seguido do MS/2, sendo o meio MS o que apresentou menor IVG (Figura 1).

Resultado semelhante foi observado para a variável percentagem de germinação, em que maior número de sementes germinadas (64,75 %) ocorreu no meio MS/4 (Figura 2) e a menor percentagem de germinação no meio MS (37 %), sendo estes tratamentos diferentes entre si estatisticamente.

George (1993) afirma que a adição de componentes ao meio de cultura, especialmente macronutrientes e fontes de carbono, representa decréscimo considerável no potencial osmótico do meio. Isso explica os resultados encontrados para o IVG e para a percentagem de germinação.

A presença de maior concentração de sais no meio de cultura interferiu no potencial osmótico e, conseqüentemente, na disponibilidade de água para o processo de embebição da semente na germinação.

Para o comprimento da parte aérea observou-se que no meio MS (concentração completa dos sais) as plântulas apresentaram maior comprimento (8,86 cm), seguido do meio MS/2, tendo no meio MS/4 as plântulas apresentado menor comprimento de parte aérea (2,5 cm) (Figura 3).

O maior comprimento da parte aérea obtido em meio de cultura com concentração completa dos sais, ocorreu em conseqüência da maior disponibilidade de nutrientes e vitaminas, proporcionando assim melhor desenvolvimento das plântulas presentes naquele meio.

Com relação ao efeito da sacarose, independentemente do tipo de meio, pode-se observar que a concentração de 1,5% proporcionou melhores resultados para as três variáveis analisadas (Tabela 1).

Tais constatações, provavelmente, devem-se ao fato de que a semente já possui em sua reserva nutritiva um teor de sacarose que lhe permita a emissão da plúmula e da radícula. Adicionalmente, a maior concentração de

sacarose presente no meio extracelular pode ter provocado maior perda de água devido à pressão osmótica exercida sobre a semente.

Fato este confirmado por Neto e Otoni (2003), quando afirmam que a contribuição osmótica da fonte de carbono (sacarose) tem relação inversa com a concentração da fonte de carbono.

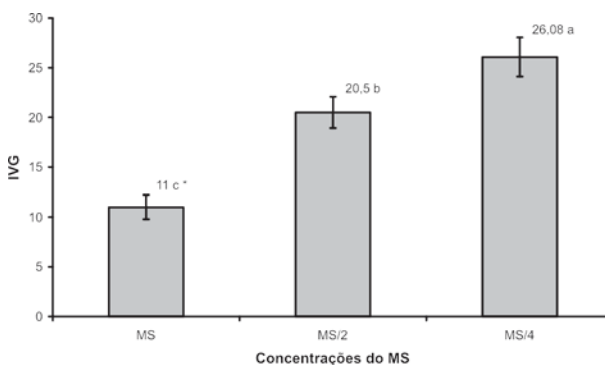


Figura 1. Índice de velocidade de germinação de *Melissa officinalis* L. em função de tipos de meio de cultura.

* As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo Teste Scott & Knott a 5% de probabilidade.

As barras indicam o erro-padrão de cada tratamento.

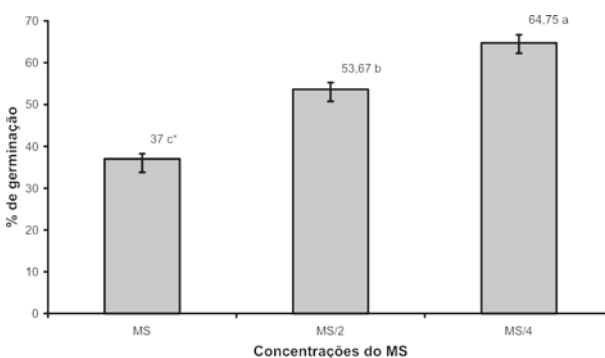


Figura 2. Percentagem de germinação de sementes de *Melissa officinalis* L. em função de tipos de meio de cultura.

* As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo Teste Scott & Knott a 5% de probabilidade.

As barras indicam o erro-padrão de cada tratamento.

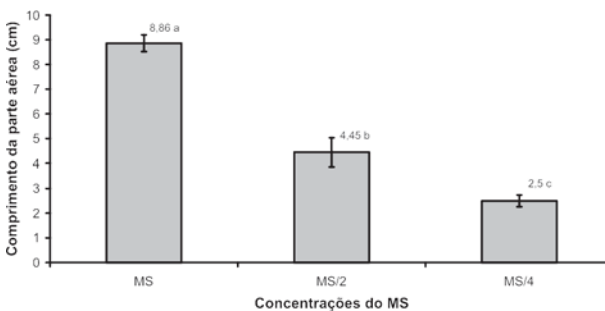


Figura 3. Comprimento da parte aérea de plântulas germinadas de sementes de *Melissa officinalis* L. em função de tipos de meio de cultura.

* As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo Teste Scott & Knott a 5% de probabilidade.

As barras indicam o erro-padrão de cada tratamento.

Tabela 1. Índice de velocidade de germinação (IVG), percentagem de germinação (%) e comprimento da parte aérea de *Melissa officinalis* L. em função de concentrações de sacarose

Concentrações de sacarose (%)	Valores Médios		Comprimento da parte aérea (cm)
	IVG (%)	Germinação (%)	
1,5	22,33 a*	57,78 a	6,38 a
3,0	16,06 b	45,84 b	4,16 b

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

Segundo George (1993), a diminuição da percentagem de germinação com o aumento da concentração de sacarose é decorrente da regulação osmótica do meio de cultura, visto que concentrações elevadas de sacarose fazem com que o meio de cultura não possua água disponível para a embebição das sementes, impossibilitando o início do processo de germinação. Esse fato explica os menores valores de IVG e a percentagem de germinação no meio contendo maior concentração de açúcar. O mesmo pode ser observado para a concentração de sais do meio, em que o meio com menores concentrações proporciona maiores taxas de germinação.

Por outro lado, concentrações superiores de nutriente no meio, embora possam reduzir a germinação, produzem plântulas maiores, mais vigorosas (resultados observados pela variável comprimento da parte aérea) e condicionam a plântula na transferência para a casa de vegetação, aumentando a reserva dos tecidos, o que é importante para as etapas iniciais de aclimatização.

Resultados semelhantes aos do presente trabalho foram encontrados por Souza *et al.* (2003), os quais, estudando a germinação *in vitro* de embriões de *Lychnophora pinaster*, observaram que o meio MS, por conter elevadas concentrações de nutrientes, inibiu a germinação de embriões desta espécie, ao passo que os meios com menores concentrações salinas (WPM e MS/4) proporcionaram maiores taxas de germinação.

Já Naves (2001), na propagação *in vitro* de bromélia imperial, avaliou a germinação de sementes utilizando meio MS em diferentes concentrações (0, 25, 50, 75, 100 e 125%) e observou uma maior velocidade e percentagem de ger-

minação nas sementes presentes nos meios com concentrações superiores a 75% do MS, sendo o mesmo observado para altura final das plântulas. Assim, é importante conhecer os fatores que afetam a germinação de sementes de cada espécie para se obter sucesso no processo de estabelecimento de plântulas *in vitro*.

Experimento II: Multiplicação *in vitro* e aclimatização de *Melissa officinalis*

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

Para a variável número de brotos no primeiro subcultivo não houve diferença no número médio de brotos para as plântulas presentes no meio MS e no meio MS + 4,44 μM de BAP (1,91 e 1,98 brotos por plântula, respectivamente). Já no segundo e terceiro subcultivos, as plântulas presentes no meio com BAP apresentaram número médio de brotos significativamente maior que as plântulas presentes no meio MS sem a presença de BAP (Tabela 2).

Hu e Wang (1983) afirmam que as citocininas são utilizadas para quebrar a dominância apical dos brotos e aumentar a taxa de multiplicação. Desse modo, ocorre grande número de brotações por meio do crescimento de meristemas laterais.

Pesquisas de Erig *et al.* (2002), ao estudarem a ação de BAP e ácido naftaleno acético na multiplicação *in vitro* da amoreira-preta, mostraram que as concentrações de 2 e 4 $\mu\text{mol/L}$ de BAP foram responsáveis pelo maior número de brotações.

Com relação ao número de nós, observou-se que, para os três subcultivos, as plântulas presentes no meio MS na ausência de BAP apresentaram maior número de nós (média de 3,8), comparativamente às plântulas presentes no meio com a presença de 4,44 $\mu\text{mol/L}$ de BAP (média de 2,5 nós para os três subcultivos) (Tabela 2).

A partir dos resultados de número de brotos e número de nós pode-se calcular a taxa de multiplicação das plântulas presentes no meio sem e com a presença de BAP, sendo que as plântulas presentes no meio MS sem BAP foram

Tabela 2. Valores médios do número de brotos, número de nós, comprimento do maior broto e número de raízes de *Melissa officinalis* em função do meio de cultura nos três subcultivos

Tratamentos	Número de brotos			Número de nós			Comprimento de broto (cm)			Número de raízes		
	1º sub.	2º sub.	3º sub.	1º sub.	2º sub.	3º sub.	1º sub.	2º sub.	3º sub.	1º sub.	2º sub.	3º sub.
MS	1,91 a*	1,59 b	2 b	3,54 a	3,42 a	4,6 a	3,79 a	4,30 a	4,4 a	1,97 a	2,86 a	1,7 a
MS + BAP	1,98 a	3,25 a	3,7 a	1,06 b	2,73 b	3,6 b	0,81 b	1,33 b	1,8 b	0,0 b	0,0 b	0,0 b

sub. = subcultivo

* As médias seguidas de mesma letra na coluna para cada variável não diferem entre si, pelo Teste de F, a 5 % de probabilidade

multiplicadas em segmentos nodais a partir do número de nós, e com as plântulas presentes no meio MS com a presença de BAP realizou-se a individualização de brotos em vez da multiplicação a partir de segmentos nodais.

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

Com esses resultados obteve-se a taxa de multiplicação de *M. officinalis* subcultivada nos dois meios de cultura; podendo-se dessa forma concluir a necessidade ou não de regulador de crescimento no meio de cultura para uma maior taxa de multiplicação da espécie estudada.

Dessa forma, considerando a média de quatro nós por plântula para as plântulas presentes no meio MS sem a presença de BAP, pode-se obter no final de seis meses de subcultivos um total de 1.024 plântulas. Já para as plântulas presentes no meio MS com a presença de 4,44 µmol/L de BAP, considerando a média de três brotos por plântula ao final de seis subcultivos (seis meses), obtém-se um total de 486 plântulas (Figuras 4 e 5).

Esses resultados mostram que a taxa de multiplicação de *M. officinalis* é cerca de 2,1 vezes maior para plântulas subcultivadas em meio MS que para aquelas subcultivadas em meio MS na presença de BAP.

Gratapaglia e Machado (1998) afirmam que, embora o principal objetivo da fase de multiplicação seja produzir o maior número de plantas possível, no menor espaço de tempo, alguns aspectos qualitativos importantes devem ser considerados.

O importante é obter uma taxa de multiplicação satisfatória com o mínimo de variação entre explantes, sendo o meio de cultura uma das variáveis que podem ser utilizadas para este estudo.

Para a variável comprimento do maior broto, observou-se que plântulas presentes no meio MS sem a presença de BAP apresentaram-se com maior comprimento do que as presentes no meio MS na presença de BAP (Tabela 2).

Leshem *et al.* (1988) afirmam que o uso de citocinina estimula maior produção de partes aéreas, mas o seu excesso é tóxico e caracteriza-se, principalmente, pelo demasiado entufamento (formação de múltiplos brotos) e pela falta de alongamento das culturas, além de outras conseqüências, o que leva a sérios problemas na fase de enraizamento.

Giacobbo *et al.* (2003), estudando a multiplicação *in vitro* de porta-enxerto de macieira com diferentes níveis de BAP e ANA, observaram que doses superiores a 0,49 µmol/L de BAP proporcionaram decréscimo no crescimento das brotações de macieira.

Pasqual e Barros (1992), trabalhando com barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*), avaliaram o efeito de combinações de BAP e ANA adicionados ao meio MS sobre a proliferação de brotos e verificaram melhores resultados na ausência de reguladores de crescimento.

Com relação ao número de raízes, nos três subcultivos, observou-se que as plântulas presentes no meio MS, sem BAP, tiveram, em média, 2,2 raízes por plântula. Já nas plântulas presentes no meio contendo BAP não houve a formação de raízes em nenhum dos subcultivos (Tabela 2).

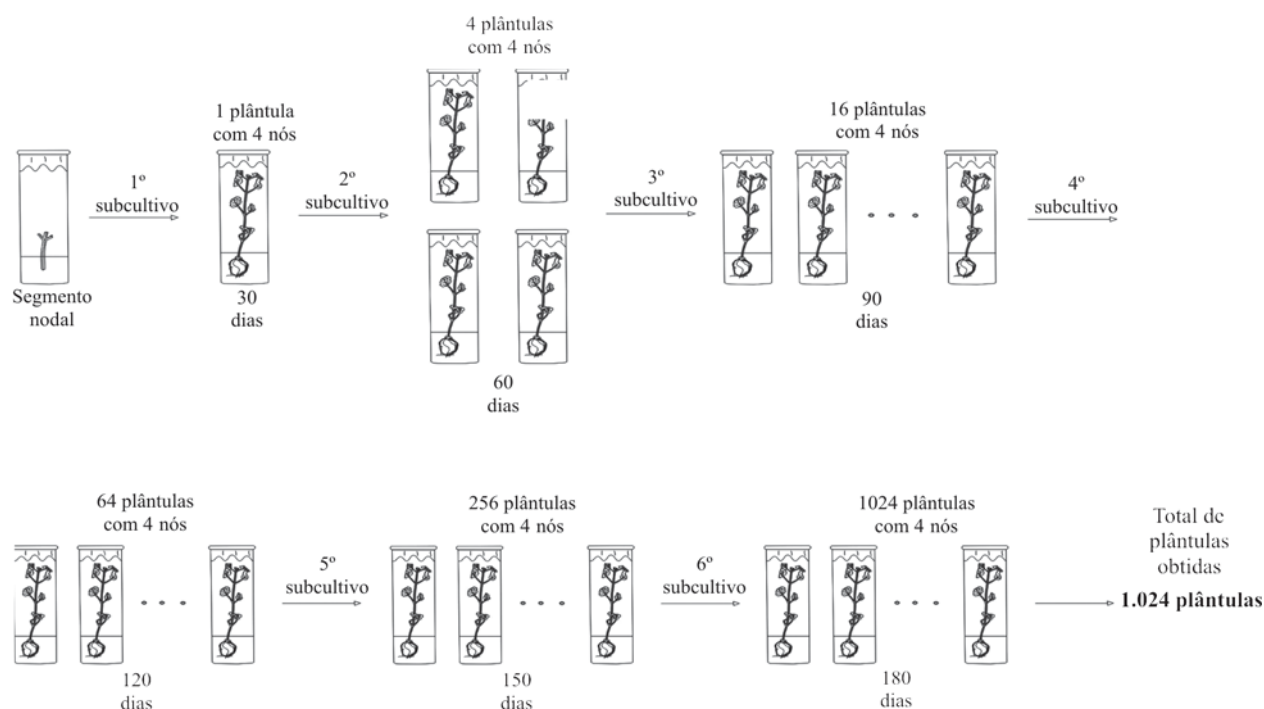


Figura 4. Multiplicação *in vitro* de *Melissa officinalis* L. subcultivada seis meses em meio MS.

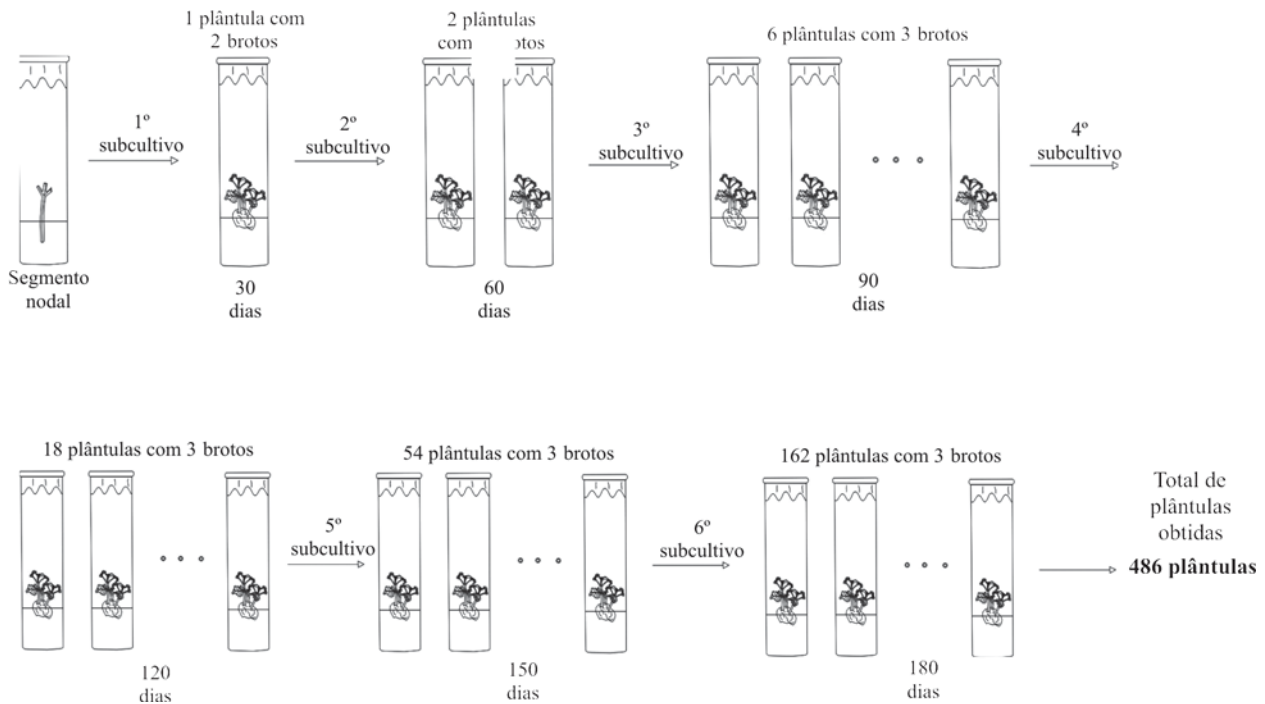


Figura 5. Multiplicação *in vitro* de *Melissa officinalis* L. subcultivada seis meses em meio MS + 4,44 $\mu\text{mol/L}$ de BAP.

Esses resultados explicam o que foi observado ao se tentar aclimatar as plântulas presentes nos dois meios de cultura. Observou-se que houve 70% de sobrevivência das plântulas que estavam presentes no meio MS, sem BAP, e 0% de sobrevivência das plântulas provenientes de subcultivos em meio MS com 4,44 $\mu\text{mol/L}$ de BAP. Esse resultado deve-se à presença de raízes nas plântulas vindas do cultivo em meio MS e ausência nas plântulas cultivadas em meio com BAP. Além disso, as plântulas cultivadas em meio MS apresentavam-se com maior comprimento e mais vigorosas.

Juliani *et al.* (1999), na propagação *in vitro* de *Lippia junelliana* (Verbenácea) utilizando brotos apicais e segmentos nodais, inoculando-se os explantes em meio MS completo suplementado com 4,4 μM de BAP ou 0,04 μM de AIB + 4,4 μM de BAP, constataram que o enraizamento dos brotos foi maior (100%) em meio MS completo, porém sem regulador de crescimento.

Em *Notocactus magnificus*, utilizando-se o meio MS suplementado com oito concentrações de BAP e ANA, observou-se que o maior número de brotos ocorreu em meio MS suplementado de 22,2 $\mu\text{mol/L}$ de BAP (Medeiros *et al.*, 2006). Constatou-se, ainda, que o enraizamento dos brotos ocorreu na presença de meio MS sem a adição de reguladores e que somente as plântulas enraizadas *in vitro* apresentaram desenvolvimento normal no cultivo em casa de vegetação.

Assim, é necessário que se faça um estudo do desenvolvimento *in vitro* de cada espécie, partindo da sua germinação, avaliando sua taxa de multiplicação até sua aclimatização e posterior transplante para o campo.

CONCLUSÃO

As concentrações de sais do meio MS e de sacarose afetaram significativamente a germinação de sementes de *M. officinalis*.

O maior índice de velocidade de germinação e a maior porcentagem de germinação foram obtidos na presença do meio MS/4.

No meio MS houve a formação de plântulas com maior comprimento de parte aérea.

A concentração de 1,5% de sacarose proporcionou melhores resultados para o índice de velocidade de germinação, a porcentagem de germinação e o comprimento da parte aérea.

O meio de cultura influenciou significativamente a taxa de multiplicação de *Melissa officinalis*.

A partir do segundo subcultivo, o número de brotos foi maior nas plântulas cultivadas em meio MS com a presença de 4,44 $\mu\text{mol/L}$ de BAP.

O meio MS sem a presença de BAP proporcionou a formação de plântulas com maior número de nós, maior comprimento e com presença de raízes.

A taxa de multiplicação das plântulas subcultivadas no meio MS sem a presença de BAP foi 2,1 vezes maior do que a das plântulas subcultivadas em meio MS com a presença de BAP.

Na aclimatização obteve-se 70% de sobrevivência das plântulas que estavam presentes no meio MS sem a presença de BAP e 0% de sobrevivência das provenientes de subcultivos em meio MS com 4,44 $\mu\text{mol/L}$ de BAP.

REFERÊNCIAS

- Deschamps C (1993) Propagação vegetativa *in vitro* de Sarandi (*Sebastiania schottiana* MUELL. ARG.), espécie florestal de mata ciliar. Dissertação de Mestrado. Lavras, Escola Superior de Agricultura de Lavra, 128p.
- Erig AC, Rossi A de, Fortes GR de L. (2002) 6-benzilaminopurina e ácido indolbutírico na multiplicação *in vitro* da amoreira-preta (*Rubus idaeus* L.), cv. Tupy. *Ciência Rural*, 32: 765-770.
- Ferreira DF (2000) Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: 45ª Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria, São Carlos. Anais, UFSCar. p. 255-258.
- Ferreira MGR, Cárdenas FHN, Carvalho CHSC, Carneiro AA & Dantas Filho CF (2002) Resposta de eixos embrionários de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum.) à concentração de sais, doses de sacarose e renovação do meio de cultivo. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 24: 246-248.
- George EF (1993) Plant propagation by tissue culture: part 1 – The technology. 2 ed. Edington, Exegetics Limited, 1574p.
- Giacobbo CL, Gomes FRC, Kroth LL, Conceição MK & Fortes GR de L (2003) Multiplicação *in vitro* de porta-enxerto de macieira Cv. Marubakaio (*Malus prunifolia*) com diferentes níveis de benzilaminopurina e ácido naftalenoacético. *Revista Brasileira de Agrociência*, 9: 31-33.
- Grattapaglia D & Machado MA (1998) Micropropagação. In: Torres AC, Caldas LS & Buso JA (Eds.) *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília, EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPq. p. 183-260.
- Grattapaglia D & Machado MA (1990) Micropropagação. In: Torres AC & Caldas LS (Eds.) *Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas*. Brasília, ABCTP/EMBRAPA-CNPq. p. 99-169.
- Hu CY & Wang PJ (1983) Meristem, shoot tip and bud culture. In: Evans DA & Sharp WR (Eds.) *Handbook of plant cell cultures*. New York, Macmillan, v. 1. p. 177-227.
- Juliani JR HR, Koroch AR, Juliani HR & Trippi VS (1999) Micropropagation of *Lippia junelliana* (Mold.) Tronc. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 49:175-179.
- Jurack DJ, Da Luz CL, Luz CL, Dall'Oglio EI, Gonçalves LM, Schuelter AR & Stefanello S (2003) Germinação *in vitro* e aclimação de cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal). In: XIV Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais e I Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas. Lavras. Anais, UFLA p. 201.
- Kumar A, Bender L & Neumann KH (1984) Growth regulation, plastid differentiation and the development of a photosynthetic system in cultured carrot root explants as influenced by exogenous sucrose and various phytohormones. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 4:11-28.
- Leshem B, Werker E & Shalev DP (1988) The effect of cytokinins on vitrification in melon and carnation. *Annals of Botany*, 62: 271-276.
- Martins, E. R., Castro DM, Castellani DC & Dias J E (1998) *Plantas medicinais*. Viçosa, Editora UFV. 220 p.
- Medeiros LA, Ribeiro CS, Gallo LA, Oliveira ET & Demattê MESP (2006) *In vitro* propagation of *Notocactus magnificus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 84:165-169.
- Mercier H & Nievola GB (2003) Micropropagation of ornamental bromeliads (Bromeliaceae). In: Bajaj YPS (Ed.) *Biotechnology in agriculture and Forest*. 40: High tech and micropropagation VI. Berlin, Springer-Verlag. p. 43-57.
- Morelli I (1977) Costituenti e usi della *Melissa officinalis*. *Bollettino Chimico Farmaceutico*, 116: 334-340.
- Murashige T & Skoog F (1962) A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15:473-497.
- Naves VC (2001) Propagação *in vitro* de bromélia imperial *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms. Dissertação de Mestrado. Lavras, Universidade Federal de Lavras. 76p.
- Neto VB de P & Otoni WC (2003) Carbon sources and their osmotic potential in plant tissue culture: does it matter? *Scientia Horticulturae*, 97:193-202.
- Oliveira RP & Silva SO (1997) Avaliação da micropropagação comercial de bananeira. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 32: 415-420.
- Ozaías-Akins P & Vasil IK (1982) Plant regeneration from cultured immature embryos and inflorescences of *Triticum aestivum* L.: evidence for somatic embryogenesis. *Protoplasma*, 110: 95-105.
- Pasqual M & Barros de I (1992) Efeitos do ácido naftaleno acético e 6-benzilaminopurina sobre a proliferação de brotos *in vitro* em barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville]. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 27:1017-1019.
- Pereira JES, Maciel TMS, Costa FHS & Pereira MAA (2006) Germinação *in vitro* de embriões zigóticos de murmuru (*Astrocaryum ulei*). *Ciência e Agrotecnologia*, 3: 251-256.
- Souza AV, Pinto JEBP, Bertolucci SKV, Corrêa RM & Castro EM (2003) Germinação de embriões e multiplicação *in vitro* de *Lychnophora pinaster* Mart. *Ciência e Agrotecnologia, Edição Especial*: 1532-1538.