



ISSN: 2230-9926

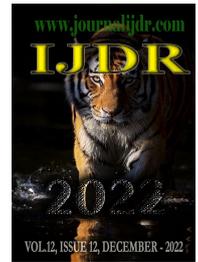
Available online at <http://www.journalijdr.com>

IJDR

International Journal of Development Research

Vol. 12, Issue, 12, pp. 60828-60831, December, 2022

<https://doi.org/10.37118/ijdr.25880.12.2022>



RESEARCH ARTICLE

OPEN ACCESS

CONSERVAÇÃO IN VITRO ATRAVÉS DA MICROPROPAÇÃO DE CONOBEA SCOPARIOIDES (CHAM. & SCHLTDL.) BENTH. (PATAQUEIRA)

Tássia A. A. Ferreira^{*1}, Ana C. B. da Silva², Mila C. A. dos Santos³, Alex S. Guedes⁴
and Osmar A. Lameira⁵

¹Estudante de Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia, Universidade Federal do Pará (UFPA), Belém, Pará, Brasil; ²Estudante de Graduação em Agronomia, Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), Belém, Pará, Brasil; ³Estudante de Mestrado em Botânica, Universidade Estadual de Brasília (UNB), Brasília, Goiás, Brasil; ⁴Estudante de Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Pará (UFPA), Belém, Pará, Brasil; ⁵Pesquisador na Embrapa Amazônia Oriental, Belém, Pará, Brasil

ARTICLE INFO

Article History:

Received 11th September, 2022

Received in revised form

27th October, 2022

Accepted 20th November, 2022

Published online 25th December, 2022

KeyWords:

Germoplasma, Baixa temperatura, Crescimento lento, Recursos genéticos vegetais.

*Corresponding author:

Tássia A. A. Ferreira

ABSTRACT

A *Conobea scoparioides* conhecida como pataqueira é usada no preparo de banhos aromáticos, mas estudos relatam que essa espécie possui aplicações diversas como o tratamento de doenças como a beribéri, além do potencial antileishmaniose. O objetivo do presente trabalho foi desenvolver um protocolo de conservação *in vitro*, para a pataqueira, baseado no crescimento lento. Foram utilizados três diferentes concentrações de meio de cultura: MS completo, ½ de MS e ¼ MS. A temperatura de 18 ± 1°C foi testada com três diferentes níveis de irradiâncias de luz LED branca: 35, 45 e 75 μmol.m⁻².s⁻¹. A temperatura de 25 ± 1°C foi testada com a irradiância de luz fluorescente branca fria de 25 μmol.m⁻².s⁻¹. Na temperatura de 18 ± 1°C, a sobrevivência foi de 0% e na temperatura de 25 ± 1°C, a sobrevivência foi acima de 50% nos tratamentos contendo as três concentrações do meio MS nos 4 meses de avaliação. O tratamento de ¼ MS obteve maiores médias, com diferença estatística (p ≤ 0,05), na altura e brotações. Conclui-se que a pataqueira é intolerante a temperaturas mais baixas e que a redução de sais no meio de cultura estimula seu crescimento *in vitro*.

Copyright©2022, Tatiana Rodrigues da Silva Dantas et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Citation: Tássia A. A. Ferreira, Ana C. B. da Silva, Mila C. A. dos Santos, Alex S. Guedes and Osmar A. Lameira. "Conservação in vitro através da micropropagação de conobea scoparioides (Cham. & Schltdl.) Benth. (Pataqueira)", *International Journal of Development Research*, 12, (12), 60828-60831.

INTRODUCTION

As plantas amazônicas possuem diferentes propriedades medicinais, aromatizantes ou condimentares (RAMOS; SOUZA, 2021). Dentre as diversas espécies, a *Conobea scoparioides* (Cham. & Schltdl.) Benth., popularmente conhecida como "pataqueira" ou "vassourinha-dobrejo" (Figura 1A), é uma herbácea aromática encontrada na Amazônia, sendo sua ocorrência em áreas úmidas e alagadas (Figura 1B) (DE LIMA *et al.*, 2020). As aplicações da pataqueira são diversas, sendo usada no preparo de banhos aromáticos, no tratamento de doenças como a beribéri (MAIA *et al.*, 2001), atividade contraceptiva (BARRIGA, 1992 *apud* DE LIMA *et al.*, 2020), além de que o extrato de *C. scoparioides* demonstrou potencial antileishmaniose (WENIGER *et al.*, 2001). O óleo essencial dessa espécie também demonstrou atividade antioxidante (REBELO *et al.*, 2009). Entretanto, o extrativismo indiscriminado e o desmatamento da floresta em regiões de ocorrência de espécies vegetais com potencial econômico tem resultado no desaparecimento de espécies e

suas variantes genéticas (SABÁ *et al.*, 2002), inclusive da *C. scoparioides*. Assim, adotar estratégias de conservação de recursos genéticos vegetais (CRGV) é essencial para a manutenção da variabilidade genética de espécies que tenham potencial para uso futuro (ALVES; AZEVEDO, 2018). Dentre as diversas estratégias de CRGV, há duas principais: a conservação *in situ* e a conservação *ex situ*. A conservação *in situ* envolve a localização, gestão ativa e monitoramento das espécies vegetais dentro de seus habitats naturais. A conservação *ex situ* envolve a localização, transferência e armazenamento das espécies vegetais em um local diferente do seu habitat natural. Há várias técnicas de conservação *ex situ*: armazenamento de sementes (banco de germoplasma), as plantas vivas (banco ativo de germoplasma), a criopreservação e a conservação *in vitro* (FAO, 2017). Os principais fatores responsáveis pelo sucesso e insucesso na conservação *in vitro* são a temperatura, a luminosidade e o meio de cultura (DA SILVA *et al.*, 2016). A intensidade de luz tem grande importância no cultivo *in vitro* de plantas, tendo efeitos na realização da fotossíntese.



Figura 1. A) Plantas de *Conohea scoparioides*. B) Ambiente de ocorrência natural de *Conohea scoparioides*. Fonte: BRASIL, 2022

Além disso, seu controle tem influência direta na formação de brotações, no crescimento e na regeneração dos explantes (ALMEIDA; MUNDSTOCK, 2001). A diminuição da temperatura pode ser combinada com outros fatores como a redução da intensidade de luz ou a redução dos nutrientes disponíveis no meio de cultivo (SÁNCHEZ-CHIANG, N.; JIMÉNEZ; 2010). Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar se a temperatura, a luminosidade através da irradiância e diferentes concentrações de sais (restrição nutricional) no meio de cultura, podem ser usadas como estratégias de conservação *in vitro* através do crescimento lento para a pataqueira.

METODOLOGIA

O estudo foi realizado no Laboratório de Biotecnologia e Recursos Genéticos (LBRG), da Embrapa Amazônia Oriental, localizada em Belém, Pará. Os explantes utilizados neste estudo foram obtidos de plantas micropropagadas em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), pertencentes ao LBRG. Os explantes de pataqueira, segmentos nodais medindo aproximadamente 1 cm, foram inoculados em frascos de vidro com capacidade para 250 mL, contendo 30 mL de meio de cultura. Foram utilizados 3 diferentes concentrações de meio de cultura: MS completo, $\frac{1}{2}$ de MS e $\frac{1}{4}$ MS. Os meios foram suplementados com sacarose ($30,0 \text{ g.L}^{-1}$), o pH foi ajustado a $5,7 \pm 0,1$ e em seguida gelificados com Phytigel™ ($3,0 \text{ g.L}^{-1}$). Os frascos contendo os meios de cultura foram autoclavados a 120°C por 15 minutos.

Experimento 1: Na sala de conservação, temperatura de $18 \pm 1^\circ\text{C}$, os frascos foram mantidos sob as fontes de luz: lâmpada LED branca. No tratamento 1, (9 W) irradiância de $35 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$; tratamento 2, (12 W) irradiância de $45 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e tratamento 3, (15 W) irradiância de $75 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, durante um fotoperíodo de 12 horas/dia.

Experimento 2: Na sala de multiplicação, temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, os frascos foram mantidos sob a fonte de luz: lâmpada tubular fluorescente branca Empalux®. No tratamento 4, (20 W) irradiância de $25 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas/dia luz branca fria. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado (DIC), perfazendo um fatorial $3 \times 4 \times 2$ (3 meios de cultura \times 4 irradiâncias \times 2 temperaturas) com oito repetições cada, além de que cada repetição teve três explantes. Foram avaliados durante 150 dias, mensalmente, indicadores fenotípicos quantitativos e qualitativos como contaminação (fungo ou bactéria), altura da planta, número de brotações e sobrevivência. A medição direta aproximada ocorreu com régua graduada, ocorrendo sem que houvesse a remoção da planta de dentro do frasco. Os dados foram analisados através de análise de variância (ANOVA), as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5

% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software BioEstat versão 5.3 (AYRES, M. et al., 2007).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os tratamentos de MS completo, $\frac{1}{2}$ de MS e $\frac{1}{4}$ MS, alocados na sala de conservação a $18 \pm 1^\circ\text{C}$, tiveram a porcentagem de sobrevivência de 0% no primeiro mês de avaliação. Não foi observado a contaminação por fungo ou bactéria. Logo, infere-se que a pataqueira é um espécie intolerante a temperaturas mais baixas, sendo a temperatura um fator inadequado para o crescimento lento nesta espécie. Os tratamentos alocados na sala de multiplicação a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, tiveram porcentagem sobrevivência variadas dependendo do tratamento. No tratamento de MS completo, a porcentagem de sobrevivência foi 67%, 58%, 58% 58% e 17%, respectivamente, no dia 30, 60, 90, 120 e 150. No tratamento de $\frac{1}{2}$ MS, a porcentagem de sobrevivência foi 100%, 100%, 96%, 71% e 0%, respectivamente, no dia 30, 60, 90, 120 e 150. No tratamento de $\frac{1}{4}$ MS, a porcentagem de sobrevivência foi 75%, 63%, 63%, 63% e 0%, respectivamente, no dia 30, 60, 90, 120 e 150 (Figura 2).

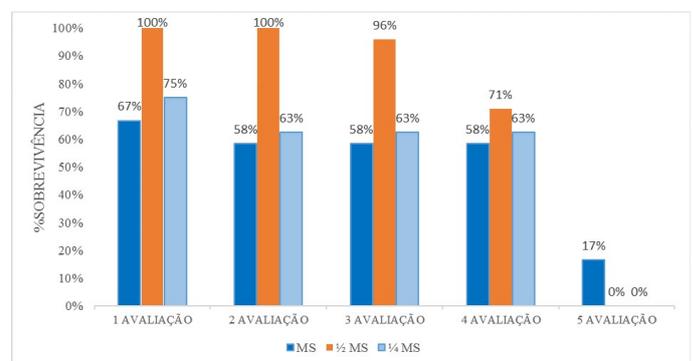
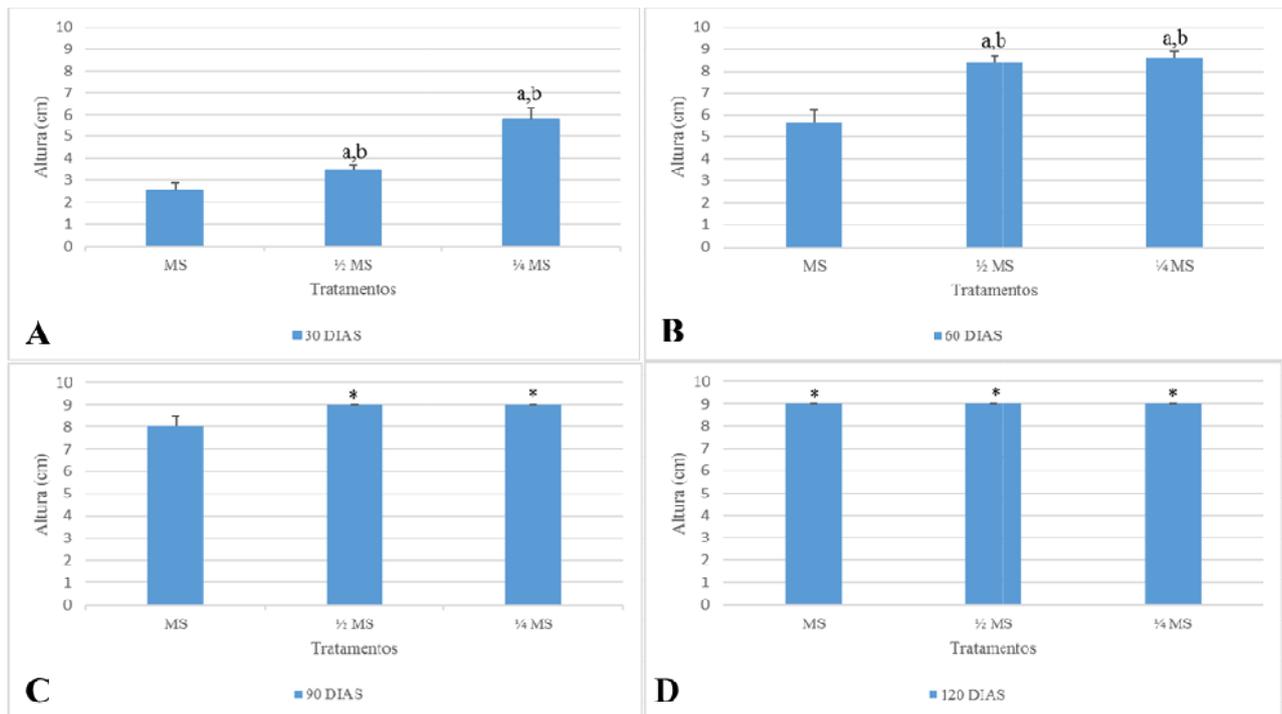


Figura 2. Porcetagem de sobrevivência das plantas de *Conohea scoparioides*, nos tratamentos MS completo, $\frac{1}{2}$ MS e $\frac{1}{4}$ MS, em 150 dias de avaliação, avaliadas mensalmente, em temperatura $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Fonte: Autores, 2022

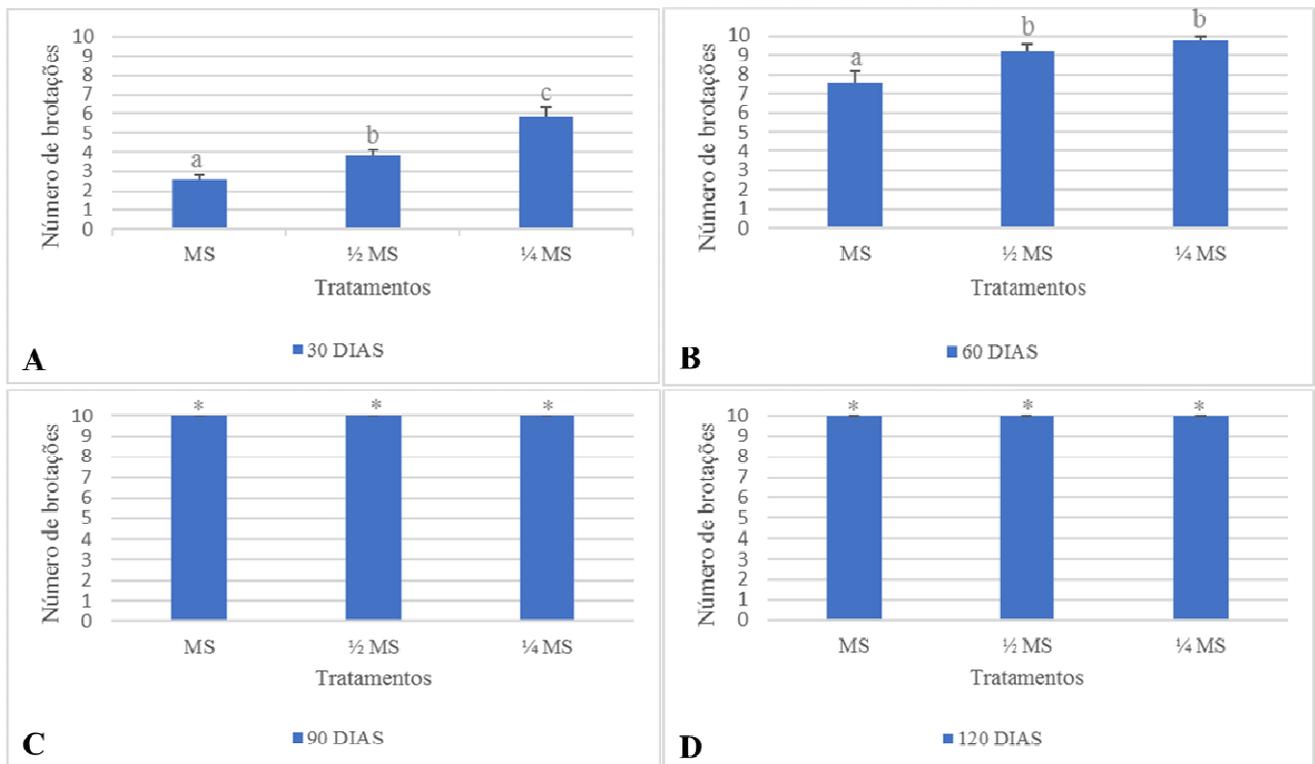
O tratamento de $\frac{1}{2}$ MS obteve maiores taxas de sobrevivência nos 120 dias avaliados. A sobrevivência na sala de multiplicação a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ condiz com estudos de Costa (2016) que estabeleceu a micropropagação *in vitro* de pataqueira com uma temperatura de $25 \pm 3^\circ\text{C}$. Em relação a altura das plantas, alocadas na sala de multiplicação a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, o tratamento de MS completo, a altura média nos dias 30, 60, 90, 120 e 150, respectivamente, foram de 2,5 cm; 5,6 cm; 8,0 cm e 9 cm. No tratamento de $\frac{1}{2}$ de MS, a altura média nos dias 30, 60, 90 e 120, respectivamente, foram de 3,4 cm; 8,3 cm; 9 cm e 9 cm. No tratamento de $\frac{1}{4}$ MS, a altura média nos dias 30, 60, 90 e 120, respectivamente, foram de 5,8 cm; 8,6 cm; 9 cm e 9 cm (Figura 3). Vale ressaltar que a altura de 9 cm é o limite de crescimento dentro do frasco. O intervalo entre os subcultivos depende na taxa de crescimento da planta: a 25°C , o subcultivo é normalmente necessário a cada 4-6 semanas (GEORGE; HALL; DE KLERK, 2008).

Em relação ao número de brotações, alocadas na sala de multiplicação a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, o tratamento de MS completo obteve a média do número de brotações nos dias 30, 60, 90 e 120, respectivamente, foram de 2,56; 7,57; 10 e 10. No tratamento de $\frac{1}{2}$ de MS, a média do número de brotações nos dias 30, 60, 90 e 120, respectivamente, foram de 3,83; 9,2; 10 e 10. No tratamento de $\frac{1}{4}$ MS, a média do número de brotações nos dias 30, 60, 90 e 120, respectivamente, foram de 5,87; 9,73; 10 e 10 (Figura 4). Nota-se que o número de brotos atingiu o limite para a contagem (10 brotos) no mês da 3 avaliação, cuja altura também atingiu seu limite. Infere-se que a pataqueira, é um espécie com baixa tolerância a temperaturas mais baixas, sendo inviável a utilização do fator temperatura como estratégia de crescimento lento para essa espécie.



Letras diferentes nas colunas diferem estatisticamente entre si pela análise de variância (ANOVA), sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). *Limite de altura de 9 cm.

Figura 3. Altura média das plantas de *Conochea scoparioides*, nos tratamentos MS completo, 1/2 MS e 1/4 MS. A) 30 dias de avaliação. B) 60 dias de avaliação. C) 90 dias de avaliação. D) 120 dias de avaliação. Em temperatura $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Fonte: Autores, 2022



Letras diferentes nas colunas diferem estatisticamente entre si pela análise de variância (ANOVA), sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

*Limite de 10 brotações contadas visualmente.

Figura 4. Média do número de brotações das plantas de *C. scoparioides*, nos tratamentos MS completo, 1/2 MS e 1/4 MS. A) 30 dias de avaliação. B) 60 dias de avaliação. C) 90 dias de avaliação. D) 120 dias de avaliação. Em temperatura $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Autores, 2022

Em relação ao fator luminosidade, como a sobrevivência foi de 0% na sala de conservação, não foi possível comparar as diferentes intensidades de luzes entre os diferentes tratamentos. O fator meio de cultura, a análise estatística demonstrou que menores concentrações de nutrientes, apresentaram maiores médias para as variáveis altura e

número de brotações. Schwalbert e colaboradores (2014), em estudo sobre a *Desmodium incanum*, também observaram que reduzir o meio de cultura em 1/2 MS resultou em maiores médias para a altura e número de brotações. Araújo e colaboradores (2017) investigaram a interação de diferentes concentrações de sais no meio de cultura MS

com a citocinina benzilaminopurina (BAP) em *C. scoparioides*. Como resultado, o meio com ¼ MS + 2 mg.L⁻¹ de BAP apresentou maior número médio de brotos. O meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) é caracterizado pela elevada concentração de sais. Cada espécie vegetal possui exigências nutricionais específicas, logo, menores concentrações de nutrientes estimulam o desenvolvimento *in vitro* de *C. scoparioides*. Menores concentrações de sais no meio MS são uma estratégia ineficiente para promover o crescimento lento em *C. scoparioides*.

CONCLUSÕES

Temperaturas mais baixas inviabilizam o crescimento lento em pataqueira, sendo uma estratégia ineficaz para a conservação *in vitro* desta espécie. A conservação *in vitro* de pataqueira é viável em temperatura mais elevadas, sendo possível cultivar essa espécie por até 4 meses. Menores concentrações de sais no meio de cultura *in vitro* estimulam o crescimento e aumentam o número de brotações da pataqueira. É necessário o estudo de outros fatores (reguladores de crescimento, fotoperíodo, decréscimo na intensidade de luz) que podem ser usados como estratégia de conservação *in vitro* da pataqueira.

Agradecimentos: O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação Amazônia de Amparo a Estudos e Pesquisas (FAPESPA), da Embrapa Amazônia Oriental e da Universidade Federal do Pará (UFPA).

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, M. L.; MUNDSTOCK, C. M. 2001. O afolhamento da aveia afetado pela qualidade de luz em plantas sob competição. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 31, n. 3, p. 393-400.
- ALVES, A. A. C.; AZEVEDO, V. C. R. 2018. Embrapa network for brazilian plant genetic resources conservation. *Biopreservation and Biobanking*, v. 16, n. 5, p. 350-360.
- AYRES, M. et al. 2007. *BioEstat: aplicações estatísticas nas áreas das ciências Bio-médicas*. 5 edição. Belém: Sociedade Civil Mamirauá, p. 364.
- BARRIGA, H.G., 1992. *Flora Medicinal de Colombia*. Tercer Mundo Editores, Bogota.
- BRASIL. 2022. Ministério do Meio Ambiente. Secretaria de Biodiversidade. Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro: região norte / editores: Lidio Coradin, Julcécia Camillo e Ima Célia Guimarães Vieira. – Brasília, DF: MMA, cap. 5, p. 584-585.
- COSTA, M. P. 2016. *PROTOCOLO DE MICROPROPAGAÇÃO DA Conobea scoparioides Benth-PLANTAGINACEAE*. Tese (Doutorado), programa pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, da Universidade Federal do Ceará, p. 57.
- DA SILVA, R. L. et al. 2016. Viability and genetic stability of pineapple germplasm after 10 years of *in vitro* conservation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 127, n. 1, p. 123-133.
- DE LIMA, E. J. S. P. et al. 2020. Essential oil from leaves of *Conobea scoparioides* (Cham. & Schltdl.) Benth. (Plantaginaceae) causes cell death in HepG2 cells and inhibits tumor development in a xenograft model. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, v. 129, p. 1-8.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). 2017. *Voluntary guidelines for the conservation and sustainable use of crop wild relatives and wild food plants*. Rome: FAO, p. 92.
- GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. 2008. *Plant Propagation by Tissue Culture*. Volume 1. 3rd Edition. Dordrecht: Springer, p. 501.
- MAIA, J. G. et al. 2000. Essential oils from *Conobea scoparioides* (Cham. & Schltdl.) Benth. *Flavour and Fragrance Journal*. v. 15, n. 6, p. 413-414.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, v. 15, n. 3, p. 473-497.
- RAMOS, L. M. P.; SOUZA, G. O. 2021. Uma revisão integrativa sobre o uso de plantas aromáticas encontradas na Amazônia na promoção da fitoterapia. *Research, Society and Development*, v. 10, n. 14, p. 1-9.
- REBELO, M. M. et al. 2009. Antioxidant capacity and biological activity of essential oil and methanol extract of *Hyptis crenata* Pohl ex Benth. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 19, n. 1, p. 230-235.
- SÁNCHEZ-CHIANG, N.; JIMÉNEZ, V. M. 2010. Técnicas de conservación *in vitro* para el establecimiento de bancos de germoplasma en cultivos tropicales. *Agronomía Mesoamericana*, v. 21, n. 1, p. 193-205.
- SCHWALBERT, R. et al. 2014. CONCENTRAÇÕES DE SAIS DO MEIO MS NO CULTIVO *in vitro* DE *Desmodium incanum*. *ENCICLOPÉDIA BIOSFERA*, v.10, n.18, p. 1009-1015.
- WENIGER, B. et al. 2001. Antiprotozoal activities of Colombian plants. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 78, n. 2-3, p. 193-200.
