



**Micropropagação visando a conservação *in vitro* de
Aeollanthus suaveolens (catinga de mulata)**

**Micropropagation for *in vitro* conservation of *Aeollanthus
suaveolens* (mulatto wildcard)**

Tássia Alana Alves Ferreira

Doutoranda em Biodiversidade e Biotecnologia

Instituição: Universidade Federal do Pará (UFPA)

Endereço: Av. Rua Augusto Correa, 01, Guamá, Belém - Pará

E-mail: tassia.alana@gmail.com

Maria Sintia Monteiro da Costa

Doutoranda em Biodiversidade e Biotecnologia

Instituição: Universidade Federal do Pará (UFPA)

Endereço: Av. Rua Augusto Correa, 01, Guamá, Belém - Pará

E-mail: sintiamonteiro@hotmail.com.

Ana Caroline Batista da Silva

Graduada em Engenharia Agrônômica

Instituição: Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA)

Endereço: Av. Tancredo Neves, 2501, Terra Firme, Belém - Pará

E-mail: anacarolinebatista79@gmail.com

Alex Santos Guedes

Graduando em Biotecnologia

Instituição: Universidade Federal do Pará (UFPA)

Endereço: Av. Rua Augusto Correa, 01, Guamá, Belém - Pará

E-mail: alex.guedes@icb.ufpa.br

Ana Paula Ribeiro Medeiros

Doutora em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares

Instituição: Secretaria de Estado de Meio Ambiente e Sustentabilidade.

Endereço: Tv. Lomas Valentinas, 2717, Marco, Belém - Pará

E-mail: paula.amedeiros@hotmail.com

Emilly de Jesus Franco Silva

Graduada em Biotecnologia

Instituição: Universidade Federal do Pará (UFPA)

Endereço: Av. Rua Augusto Correa, 01, Guamá, Belém - Pará

E-mail: emilly.franco.silva@icb.ufpa.br



Simone Rodrigues de Miranda

Doutora em Biologia Molecular

Instituição: Embrapa Amazônia Oriental

Endereço: Av. Perimetral, s/n, Marco, Belém - Pará

E-mail: simone.rodrigues@embrapa.br

Osmar Alves Lameira

Doutor em Fitotecnia, Biotecnologia de Plantas

Instituição: Embrapa Amazônia Oriental

Endereço: Av. Perimetral, s/n, Marco, Belém - Pará

E-mail: osmar.lameira@embrapa.br

RESUMO

A *Aeollanthus suaveolens* conhecida popularmente como catinga-de-mulata é uma espécie de origem africana, presente em diversas regiões do Brasil, inclusive na região amazônica. Seu principal uso medicinal é seu efeito sedativo e anticonvulsivo, sendo também usada como matéria-prima de perfumes caseiros. A micropropagação é uma técnica que pode ampliar o conhecimento ou proteger, através da conservação *in vitro*, espécies com potencial uso presente ou futuro. O objetivo do presente trabalho foi desenvolver um protocolo de conservação *in vitro* para *A. suaveolens* visando o crescimento lento. Os explantes foram inoculados em meio MS em duas salas distintas. Sala 1: temperatura de $18 \pm 1^\circ\text{C}$, três diferentes irradiâncias de luz LED branca: 35, 45 e $75 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Sala 2: temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, irradiância de luz fluorescente branca fria: $25 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Na temperatura de $18 \pm 1^\circ\text{C}$, as taxas de sobrevivência foram variadas, sendo que houveram perdas em todos os tratamentos devido a contaminação. Na temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, o tratamento de $25 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ obteve porcentagem de sobrevivência de 100% até o 6º mês (180 dias). Na avaliação da altura, na primeira avaliação, nos tratamentos de 35, 45 e $75 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, a $18 \pm 1^\circ\text{C}$, a altura média das plântulas foi de 1,67; 1,07 e 0,53 cm, respectivamente. Não houve diferença estatística significativa entre os tratamentos. Nas avaliações seguintes, a altura média do tratamento de $75 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ difere estatisticamente entre os tratamentos de 35 e $45 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, sendo que essa diferença permanece até o 9º mês (270 dias), onde ocorre o descarte por senescência. No tratamento de $25 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, em todas as avaliações, a altura média das plântulas foram acima dos tratamentos da sala a $18 \pm 1^\circ\text{C}$. Em relação ao número de brotações, em todas as avaliações, os tratamentos de 35, 45 e $75 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ não apresentaram diferença estatística significativa. Conclui-se que o fator temperatura foi determinante para a redução do crescimento *in vitro* da *A. suaveolens*, sendo uma estratégia eficaz para aumentar o intervalo de subcultivo.

Palavras-chave: irradiância, crescimento lento, proteção de recursos genéticos.

ABSTRACT

Aeollanthus suaveolens, popularly known as mulatto catinga, is a species of African origin, present in several regions of Brazil, including the Amazon region.



Its main medicinal use is its sedative and anticonvulsant effect, and it is also used as raw material for home perfumes. Micropropagation is a technique that can expand knowledge or protect, through in vitro conservation, species with present or future potential use. The objective of this study was to develop an in vitro conservation protocol for *A. suaveolens* for slow growth. The explants were inoculated into MS medium in two distinct rooms. Room 1: temperature $18 \pm 1^\circ\text{C}$, three different irradiances of white LED light: 35, 45 and $75 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Room 2: temperature $25 \pm 1^\circ\text{C}$, irradiance of cold white fluorescent light: $25 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. At a temperature of $18 \pm 1^\circ\text{C}$, survival rates were varied, with losses in all treatments due to contamination. At a temperature of $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $25 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ treatment achieved a 100% survival percentage by month 6 (180 days). In the evaluation of height, in the first evaluation, in the treatments of 35, 45 and $75 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, at $18 \pm 1^\circ\text{C}$, the mean height of the seedlings was 1.67, 1.07 and 0.53 cm, respectively. There was no significant statistical difference between treatments. In the following assessments, the mean treatment height of $75 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ differs statistically between treatments of 35 and $45 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, and this difference remains until the 9th month (270 days), where senescence disposition occurs. In the treatment of $25 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, at $25 \pm 1^\circ\text{C}$, in all evaluations, the mean seedling height was above room treatments at $18 \pm 1^\circ\text{C}$. In relation to the number of sprouts, in all the evaluations, the treatments of 35, 45 and $75 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ did not show any significant statistical difference. It is concluded that the temperature factor was determinant for the reduction of the in vitro growth of *A. suaveolens*, being an effective strategy to increase the subcultivation interval.

Keywords: irradiance, slow growth, protection of genetic resources.

1 INTRODUÇÃO

A flora brasileira possui inúmeras plantas com propriedades medicinais. A *Aeollanthus suaveolens*, família Lamiaceae, conhecida popularmente como catinga-de-mulata (Figura 1), possui origem africana e apresenta grande distribuição no Brasil, inclusive na Amazônia (ARAÚJO et al., 2021). Na medicina popular, é usada no combate a febre, dor de cabeça, efeito sedativo e anticonvulsante (SIMIONATTO et al., 2007). Devido ao seu odor adocicado e intenso, também é utilizada em banhos aromáticos, rituais religiosos e como matéria prima de perfumes (HARLEY, 2012; PEREIRA; FERREIRA, 2017).



Figura 1: Planta de caatinga-de-mulata.



Fonte: Autores (2023).

A conservação *in vitro* de plantas com valor econômico atual e potencial, é uma abordagem fundamental, pois garante a disponibilidade de recursos genéticos para pesquisas futuras (ALVES; AZEVEDO, 2018).

A conservação *in vitro* compreende a manutenção de material genético utilizando-se a micropropagação (cultura de tecidos vegetais), em condições assépticas e controladas de temperatura, luminosidade e meio de cultura, onde o foco é o crescimento lento *in vitro* (MATSUMOTO; CARDOSO; SANTOS, 2010).

A intensidade de luz e a temperatura são fatores determinantes no sucesso da conservação *in vitro*. A combinação desses fatores (luz e temperatura) aumentam o sucesso da conservação *in vitro*, através da redução do desenvolvimento das plantas (SILVA *et al.*, 2016).

O objetivo desse estudo foi avaliar se a temperatura e a luz (irradiância) podem ser usados como estratégias de conservação *in vitro* para *Aeollanthus suaveolens*.



2 METODOLOGIA

2.1 ÁREA DE ESTUDO

O estudo foi realizado no Laboratório de Biotecnologia e Recursos Genéticos (LBRG), da Embrapa Amazônia Oriental, localizada em Belém, Pará, Brasil. Os explantes utilizados neste estudo foram obtidos de plantas micropropagadas em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), pertencentes ao LBRG.

2.2 MATERIAL VEGETAL E CONDIÇÕES DE CULTURA

Os explantes, medindo aproximadamente 1 cm, foram inoculados em frascos de vidro com capacidade para 250 mL, contendo 30 mL de meio de cultura 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.

Na sala de conservação, temperatura de $18 \pm 1^\circ\text{C}$, os frascos foram mantidos sob as fontes de luz: lâmpada LED branca. Nos tratamentos de 35, 45 e $75 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, durante um fotoperíodo de 12 horas/dia.

Esse experimento foi comparado com as condições do tratamento controle (testemunha), usado no laboratório para a produção de mudas: temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, os frascos foram mantidos sob a fonte de luz: lâmpada tubular fluorescente branca fria Empalux®. No tratamento de irradiância de $25 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, durante um fotoperíodo de 14 horas/dia.

2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), com 4 tratamentos e 3 repetições, além de que, cada repetição continha três explantes. Durante 360 dias (12 meses), foram avaliados as alturas das plântulas (medição direta com régua graduada) e o número de brotações. A diferença das amostras (altura e número de brotações) foi calculada com a utilização do software BioEstat versão 5.3. (AYRES et al., 2007). Para verificar a



normalidade dos dados, foi usado o teste de Shapiro-Wilk. As médias foram comparadas pelo teste não-paramétrico Kruskal-Wallis (Dunn). O valor do nível de significância foi de 5%.

3 RESULTADOS

Na sala de conservação, temperatura de $18 \pm 1^\circ\text{C}$, os tratamentos de 35, 45 e $75 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ obtiveram porcentagem de sobrevivência variadas. No tratamento de $35 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, a porcentagem de sobrevivência foi de 33,33% até o 9º mês (270 dias), sendo o descarte por senescência no 10º mês. A perda de 66,66% foi devido a descarte por contaminação bacteriana.

No tratamento de $45 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, a porcentagem de sobrevivência foi de 66,66% até o 12º mês (360 dias). A perda de 33,33% foi devido a descarte por contaminação bacteriana (Figura 2). No tratamento de $75 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, a porcentagem de sobrevivência foi de 33% até o 12º mês (360 dias). A perda de 66,66% foi devido a morte sem contaminação.

Figura 2: Contaminação bacteriana *in vitro* em *A. suaveolens*.



Fonte: Autores (2023).

Na sala de multiplicação, temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, o tratamento de $25 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ obteve porcentagem de sobrevivência de 100% até o 4º mês (120 dias), sendo descartado por senescência no 5º mês (150 dias).



Na avaliação da altura, na primeira avaliação, nos tratamentos de 35, 45 e 75 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, alocados na sala de conservação a $18 \pm 1^\circ\text{C}$, a altura média das plântulas foi de 1,672; 1,072 e 0,531 cm, respectivamente. Não houve diferença estatística significativa entre os tratamentos. Na segunda avaliação, nos tratamentos de 35, 45 e 75 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, a altura média das plântulas foi de 4,722; 1,722 e 0,711 cm respectivamente. Houve diferença estatística significativa do tratamento 35 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ em relação aos tratamentos de 45 e 75 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Tabela 1). Nas avaliações seguintes, essa diferença se manteve com diferença estatística significativa.

O tratamento de 35 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ é o primeiro tratamento alocado na sala de conservação a $18 \pm 1^\circ\text{C}$ a ser descartado por senescência no 9º mês (270 dias).

Tabela 1: Conservação *in vitro* após 360 dias de avaliação mensalmente. Altura média das plântulas de *A. suaveolens* em Irradiância de 35, 45 e 75 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ em $18 \pm 1^\circ\text{C}$ e Irradiância de 25 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ em $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

Altura (cm)

Tratamentos ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	30 dias	60 dias	90 dias	120 dias	150 dias	180 dias	210 dias	240 dias	270 dias	300 dias	330 dias	360 dias
35	1,672 \pm 0,668 a	4,722 \pm 0,785 a	6,725 \pm 0,613 a	9,0 \pm 0,0 a	9,0 \pm 0,0 a	9,0 \pm 0,0 a	9,0 \pm 0,0 a	9,0 \pm 0,0 a	9,0 \pm 0,0 a			
45	1,072 \pm 0,280 a	1,722 \pm 0,603 ab	2,222 \pm 0,504 ab	2,762 \pm 0,794 b	3,00 \pm 0,100 b	3,666 \pm 0,961 b	3,875 \pm 0,167 b	4,028 \pm 1,240 b	4,06 \pm 0,150 b	5,30 \pm 0,12 a	5,83 \pm 0,12 a	6,17 \pm 0,09 a
75	0,531 \pm 0,028 a	0,711 \pm 0,033 b	1,180 \pm 0,044 b	1,840 \pm 0,634 b	2,40 \pm 0,432 b	2,640 \pm 0,336 b	3,40 \pm 0,90 b	4,50 \pm 2,00 b	4,790 \pm 2,0 b	4,87 \pm 1,22 a	5,20 \pm 1,20 a	5,47 \pm 1,17 a
25	6,611 \pm 1,155	7,36 \pm 2,49	9,0 \pm 0,00	9,0 \pm 0,00								

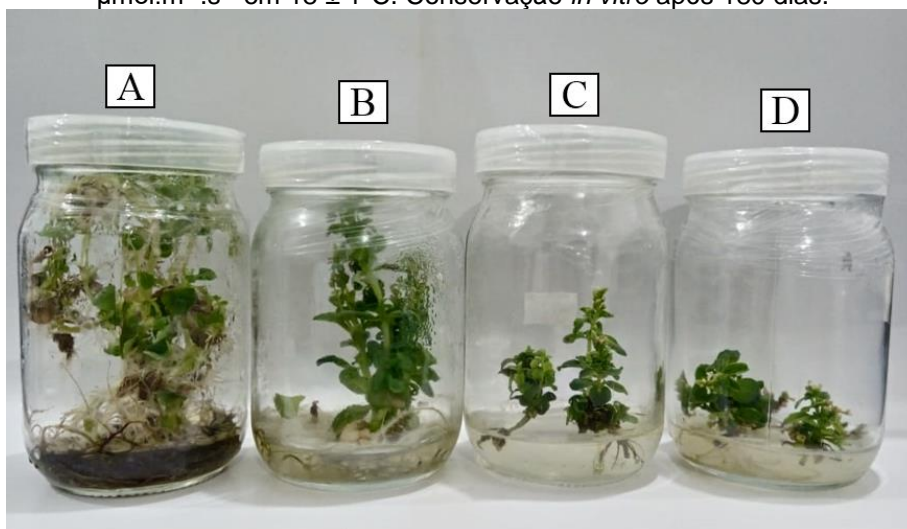
Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste não-paramétrico Kruskal-Wallis (Dunn) ($p < 0,05$).

Fonte: Autores (2023).



Na sala de multiplicação, temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, o tratamento de $25 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ obteve alturas médias acima dos tratamentos 35, 45 e $75 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Figura 3) em todas as avaliações (Tabela 1). A altura máxima de 9 cm foi atingida no 3º mês (90 dias). O descarte por senescência ocorreu no 5º mês (150 dias).

Figura 3: *A. suaveolens in vitro*. A) Irradiância de $25 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ em $25 \pm 1^\circ\text{C}$. B) Irradiância de $35 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ em $18 \pm 1^\circ\text{C}$. C) Irradiância de $45 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ em $18 \pm 1^\circ\text{C}$. D) Irradiância de $75 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ em $18 \pm 1^\circ\text{C}$. Conservação *in vitro* após 180 dias.



Fonte: Autores (2023).

Na avaliação do número de brotações, em todas as avaliações, os tratamentos de 35, 45 e $75 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ não apresentaram diferença estatística significativa.

4 DISCUSSÃO

A redução do crescimento *in vitro* das plântulas pode ser obtida pela manipulação de fatores inerentes ao cultivo *in vitro* como a temperatura, a luz, o uso de reguladores de crescimento, a redução de nutrientes no meio de cultura, entre outros fatores (MANSUR *et al.*, 2009; COSTA; SPEHAR; SERENO, 2012).

No sistema de crescimento lento, os intervalos de subcultivo são aumentados. Em uma cultura *in vitro*, o intervalo regular de subcultivo, depende



da espécie, mas geralmente ocorre no intervalo entre 3 a 5 semanas (BENELLI *et al.*, 2022).

Da Silva e colaboradores (2023) relataram que o padrão de desenvolvimento de *A. suaveolens in vitro*, em diferentes irradiâncias de fótons, apresentaram diferenças significativas no crescimento apical, no número de brotos e na produção dos pigmentos fotossintéticos.

Araújo e colaboradores (2023) relataram que a constituição química de *A. suaveolens in vitro*, em diferentes comprimentos de onda, alteraram o crescimento, os pigmentos fotossintéticos e os compostos orgânicos voláteis.

Assim, diferentes fatores como a luz e a temperatura podem alterar de forma significativa o crescimento *in vitro*. Assim, a diminuição do crescimento *in vitro*, sugere que a temperatura foi determinante na diminuição do metabolismo *in vitro* de *A. suaveolens*, sendo o uso de menores temperaturas como estratégia de conservação *in vitro* de plantas (COSTA; SPEHAR; SERENO, 2012).

Na conservação *in vitro* de *A. suaveolens*, em 360 dias (52 semanas), não foi necessário a realização do subcultivo, sendo uma metodologia eficaz para a conservação *in vitro* dessa espécie.

A perda de biodiversidade, especialmente, plantas com potencial medicinal, tem demonstrado a necessidade de desenvolver estratégias de conservação desses recursos genéticos (HOWES *et al.*, 2020).

5 CONCLUSÕES

- Para a conservação *in vitro*, o fator temperatura é determinante no sucesso da diminuição do crescimento das plântulas de *A. suaveolens*.
- Para a conservação *in vitro*, o fator irradiância não retarda o desenvolvimento das plântulas de *A. suaveolens*.
- Na conservação *in vitro* de *A. suaveolens*, o prolongamento entre os subcultivos é de pelo menos 360 dias (52 semanas).



CUADERNOS DE

EDUCACIÓN

Y DESARROLLO

Europub European Publications

ISSN: 1989-4155

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

ALVES, A. A. C.; AZEVEDO, V. C. R. Embrapa network for brazilian plant genetic resources conservation. **Biopreservation and Biobanking**, v. 16, n. 5, p. 350–360, 2018.

ARAÚJO, D. X. et al. Photon flux density and wavelength influence on growth, photosynthetic pigments and volatile organic compound accumulation in *Aeollanthus suaveolens* (Catinga-de-mulata) under in vitro conditions. **Industrial Crops and Products**, v. 168, n. April, 2021.

ARAÚJO, D. X. et al. Volatile organic compound (VOC) profile and plantlet growth of *Aeollanthus suaveolens* under conventional and alternative membrane systems. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 153, n. 2, p. 333–342, 2023.

AYRES, M. et al. **BioEstat: aplicações estatísticas nas áreas das ciências Bio-médicas**. 5ª edição. Belém: Sociedade Civil Mamirauá, 2007, p. 364

BENELLI, C. et al. In Vitro Conservation through Slow Growth Storage Technique of Fruit Species: An Overview of the Last 10 Years. **Plants**, v. 11, n. 23, p. 1–18, 2022.

COSTA, A. M.; SPEHAR, C. R.; SERENO, J. R. B. **Conservação de recursos genéticos no Brasil**. 1ª edição ed. Brasília, DF: Embrapa, 2012.

DA SILVA, A. C. B. et al. Efeito da intensidade de luz no desenvolvimento de especies medicinais e aromáticas em condições in vitro. **Contribuciones a Las Ciencias Sociales**, v. 16, n. 5, p. 2632–2649, 2023.

DA SILVA, R. L. et al. 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, 2016.

HARLEY, R. M. Checklist and key of genera and species of the Lamiaceae of the Brazilian Amazon. **Rodriguesia**, v. 63, n. 1, p. 129–144, 2012.

HOWES, M. J. R. et al. Molecules from nature: Reconciling biodiversity conservation and global healthcare imperatives for sustainable use of medicinal plants and fungi. **Plants People Planet**, v. 2, n. 5, p. 463–481, 2020.

MANSUR, E.; PACHECO, G.; VIEIRA, M. L. C. **Conservação in vitro de germoplasma**. In: BORÉM, A.; LOPES, M. T. G.; CLEMENT, C. R. (editores). Domesticação e melhoramento: espécies amazônicas. Editor Suprema. Viçosa, p. 171-191, 2009.

MATSUMOTO, K.; CARDOSO, L. D.; SANTOS, I. R. I. Manual de Curadores de Germoplasma – Vegetal: Avaliação de Germoplasma. **Documentos / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, 318, n. 7, p. 1–11, 2010.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays



with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473–497, 1962.

PEREIRA, M. G. S.; FERREIRA, M. C. Uso e diversidade de plantas medicinais em uma comunidade quilombola na Amazônia Oriental, Abaetetuba, Pará. **Biota Amazônia**, v. 7, n. 3, p. 57-68, 2017.

SIMIONATTO, E. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from *Aeolanthus suaveolens* Mart. ex Spreng. **Quimica Nova**, v. 30, n. 8, p. 1923–1925, 2007.