







Adequação das condições de crescimento mínimo para a conservação *in vitro* de *Vernonia condensata*

Assessment of minimum growth conditions for the *in vitro* conservation of *Vernonia condensata*

Rafaela Fonseca Lopes¹  | Karolina Silva Leite de Santana¹  | Vânia de Jesus dos Santos¹  |
Eva Maria Rodrigues Costa¹  | Mariane de Jesus da Silva de Carvalho¹  | Weliton Antonio Bastos de Almeida¹ 

¹Centro Universitário Maria Milza. Governador Mangabeira, Bahia, Brasil

Resumo: Este trabalho tem por objetivo estabelecer condições de crescimento mínimo, visando o desenvolvimento de um protocolo de conservação *in vitro* de *Vernonia condensata* Baker, para ser utilizada em pesquisas e inserção na saúde pública do Recôncavo da Bahia. Foram utilizados segmentos nodais de aproximadamente 1,5 cm de tamanho, provenientes de plantas de alumã previamente cultivadas *in vitro*. Estes explantes foram inoculados em tubos de ensaio contendo o meio de cultura MS (MS, MS/2 e MS/4), suplementado com 15 g L⁻¹ e 30 g L⁻¹ de sacarose, mantidos em sala de crescimento (25 ± 1 °C) e em BOD (20 ± 1 °C) durante 120 dias, sendo realizadas avaliações em intervalos de 30 dias, utilizando as variáveis: altura da planta, número de folhas verdes, número de folhas senescentes e número de raízes. O meio MS com adição de 15 g L⁻¹ de sacarose proporcionou o menor desenvolvimento *in vitro* de plantas de *V. condensata*. Para a manutenção de plantas da *V. condensata* por um período de 120 dias com menor altura e número de folhas verdes satisfatórios, deve ser considerado o meio de cultura MS com 15 g L⁻¹ de sacarose, associado ao ambiente de cultivo com temperatura de 25 °C.

Palavras-chave: Plantas medicinais. Micropropagação. Crescimento lento.

Abstract: This work aims to establish minimum growth conditions for the development of an *in vitro* conservation protocol for *Vernonia condensata* Baker, to be used in research and to be inserted in public health service in the Recôncavo da Bahia. Nodal segments of approximately 1.5 cm in size were used, from *V. condensata* cultivated *in vitro* beforehand. These explants were inoculated into test tubes containing MS culture medium (MS, MS/2 and MS/4), supplemented with 15 g L⁻¹ and 30 g L⁻¹ of sucrose, kept in a growth room (25 ± 1 °C) and in a BOD (20 ± 1 °C) for 120 days. Evaluations were carried out at intervals of 30 days of cultivation, using the variables: plant height, number of green leaves, number of senescent leaves and number of roots. The MS with the addition of 15 g L⁻¹ of sucrose provided the lowest *in vitro* growth of *V. condensata* plants. For the maintenance of *V. condensata* plants for a period of 120 days with lower height and satisfactory number of green leaves, an MS culture medium should be considered with 15 g L⁻¹ of sucrose associated with a culture environment at a temperature of 25 °C.

Keywords: Medicinal plants. Micropropagation. Slow growth.

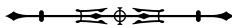
Lopes, R. F., Santana, K. S. L., Santos, V. J., Costa, E. M. R., Carvalho, M. J. S., & Almeida, W. A. B. (2023). Adequação das condições de crescimento mínimas para a conservação *in vitro* de *Vernonia condensata*. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Naturais*, 18(1), e2023-e792. <http://doi.org/10.46357/bcnaturais.v18i1.792>

Autora para correspondência: Eva Maria Rodrigues Costa. Rua Embrapa SN, Cruz das Almas, BA, Brasil. CEP 44380-000, Caixa Postal 007 (evamrc_9@hotmail.com).

Recebido em 07/09/2021

Aprovado em 16/01/2023

Responsabilidade editorial: Ana Carla Feio dos Santos



INTRODUÇÃO

Vernonia condensata Baker é uma planta medicinal muito cultivada em jardins e hortas no Brasil, sendo popularmente conhecida como boldo-baiano, alumã, figatil, boldo-do-chile, necroton e alcachofra (J. Silva et al., 2013; Lorenzi & Matos, 2002; Pizziolo et al., 2011). *Vernonia* é um importante gênero da família Asteraceae, com aproximadamente 1.500 espécies. Muitas propriedades medicinais são atribuídas a *Vernonia* sp., que tem sido utilizada comumente para tratar vários tipos de enfermidades, incluindo doenças de origens inflamatórias, verminoses, diurese, câncer e distúrbios gastrointestinais (J. Silva et al., 2013, 2018; Boeing et al., 2016; Sharifi-Rad et al., 2018).

A espécie em estudo possui várias finalidades terapêuticas, podendo ser preparada de diversas formas, como infusão, macerações etc. O principal uso da planta se dá pelas folhas, através de infusões. Esta espécie medicinal apresenta relevância econômica, uma vez que faz parte da lista da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS), que contém espécies vegetais com potencial para avanços na cadeia produtiva, as quais podem gerar produtos fitoterápicos de interesse para o SUS. Além disso, é encontrada no formulário da farmacopeia brasileira, onde está indicada para o tratamento de úlcera gástrica e dispepsia (Brasil, 2009, 2011, 2014).

Em virtude da crescente ocupação de áreas de vegetação nativa e da sensível erosão genética notada em muitas espécies de plantas medicinais, torna-se evidente a necessidade do desenvolvimento e do aperfeiçoamento de técnicas de conservação de germoplasma dessas espécies, para que esteja acessível para utilização futura (A. Sá et al., 2011). Neste sentido, a biotecnologia proporciona algumas vantagens e possibilidades de grande interesse como complemento ou alternativa para preservar espécies de plantas medicinais, a exemplo da conservação *in vitro*, que implica a manutenção de plantas sob crescimento mínimo (K. Silva et al., 2021; Menezes-Sá et al., 2022).

A partir de mudanças no ambiente de cultivo, como redução da temperatura e da intensidade luminosa, redução na concentração de sais e nutrientes no meio de cultura, adição de inibidores de crescimento e agentes osmóticos, é possível desacelerar ou suprimir totalmente o crescimento de células, tecidos e órgãos (Lima et al., 2021; J. Sá et al., 2021).

Portanto, a conservação *in vitro* de germoplasma é um método complementar à conservação em campo, sendo considerada efetiva na preservação do material em médio prazo, permitindo a rápida multiplicação e armazenamento de germoplasma de plantas em ambiente asséptico, livre de patógenos e de baixo custo, em comparação com a conservação no campo (M. Santos et al., 2011; Trueman et al., 2018).

Cada espécie exige condições particulares para a sua conservação *in vitro*, o que justifica estudos específicos para adequação de protocolos de conservação. Entre os fatores de grande importância para o estabelecimento de protocolos de conservação *in vitro*, destacam-se concentração do meio de cultura, controle de temperatura e concentração de sacarose (Lima-Brito et al., 2011; Almeida et al., 2020; Oliveira & Aloufa, 2022).

A crescente utilização de *Vernonia condensata*, por suas propriedades terapêuticas, justifica a necessidade de implementação de métodos complementares para a sua conservação. Dessa maneira, este trabalho tem por objetivo estabelecer condições de crescimento mínimo, visando ao desenvolvimento de um protocolo de conservação *in vitro* de *Vernonia condensata*, para ser utilizada em pesquisas e inserida na saúde pública do Recôncavo da Bahia.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia Aplicada à Saúde, da Faculdade Maria Milza (FAMAM). As plantas de *Vernonia condensata* utilizadas como fonte de explante neste trabalho foram oriundas da pesquisa desenvolvida por Almeida et al. (2020), sendo estabelecidas

e multiplicadas *in vitro* por esses autores, totalizando um período de cultivo *in vitro* de aproximadamente sete meses antes da utilização na presente pesquisa. É válido destacar que, após a etapa de multiplicação realizada por Almeida et al. (2020), as plantas foram mantidas em meio de cultura Murashige e Skoog (MS) (Murashige & Skoog, 1962) durante mais dois subcultivos, com intervalos de 30 dias.

Os segmentos nodais, com aproximadamente 1,5 cm, foram inoculados em tubos de ensaios de vidro contendo 15 mL do meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), com diferentes concentrações de sais: 100% (MS), 50% (MS/2) e 25% da concentração salina (MS/4). Também foram avaliadas duas concentrações de sacarose (15 e 30 g L⁻¹). Os tubos foram vedados com filme PVC, sendo, em seguida, mantidos em câmara climatizada *Biochemical Oxygen Demand* (BOD) com temperatura de 20 °C ± 1 °C, e em sala de crescimento com temperatura de 25 °C ± 1 °C, ambos com fotoperíodo de 16 horas de luz e 40 μM m⁻² s⁻¹ de intensidade luminosa. As lâmpadas utilizadas nas prateleiras e BOD foram do tipo LED, sendo duas lâmpadas por prateleira, em cada divisão, e quatro lâmpadas na BOD.

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

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial (6 x 2), seis tipos de meio MS suplementados com sacarose (MS com 15 g L⁻¹ de sacarose, MS com 30 g L⁻¹ de sacarose, MS/2 com 15 g L⁻¹ de sacarose, MS/2 com 30 g L⁻¹ de sacarose, MS/4 com 15 g L⁻¹ de sacarose, MS/4 com 30 g L⁻¹ de sacarose) e dois ambientes de cultivo (20 °C ± 1 °C na BOD e 25 °C ± 1 °C em sala de crescimento), com 15 repetições.

Os dados resultantes das avaliações das plantas foram submetidos ao teste F da análise de variância

(ANAVA), considerando-se o delineamento inteiramente casualizado em esquema de parcelas subdivididas no tempo, em que foram avaliados os tratamentos do fatorial 6 x 2 nas parcelas e as épocas de avaliação e suas respectivas interações com os tratamentos das parcelas nas subparcelas. As médias dos tipos de meio foram agrupadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade e as médias de temperaturas e épocas de avaliação foram submetidas à análise da variância e contrastadas pelo teste F de Fischer a 5% de probabilidade. As variáveis NFV, NFS e NR foram transformadas para $\sqrt{x + 0,5}$, visando ao atendimento das pressuposições da ANAVA. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa estatístico R (R Core Team, 2021).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com 30 dias de cultivo, as menores alturas foram observadas no ambiente com 20 °C, independente da composição do meio de cultura. Entretanto, com 120 dias de cultivo, os explantes apresentaram menor altura quando foram conservados em meio MS com 15 g L⁻¹ de sacarose e mantidos em ambiente com 25 °C, bem como quando cultivados em meio MS/4 com 30 g L⁻¹ de sacarose e mantidos a 20 °C (Tabela 1).

Em pesquisa realizada por T. Santos et al. (2012), acessos de vetiver [*Chrysopogon zizanioides* (L.) Roberty] foram conservados sob o regime de crescimento lento por um período de 270 dias, reduzindo-se a concentração dos sais do MS para 25% de sua concentração total (MS a 1/4), à temperatura de 18 °C. Ainda para os autores supracitados, a redução das concentrações de sais do meio básico de cultivo é outra estratégia amplamente empregada para a conservação sob regime de crescimento mínimo. Porém, no estabelecimento *in vitro* de um banco de germoplasma da espécie *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pederson, Lima et al. (2021) observaram que a redução de 50% dos sais do meio de cultura MS foi a mais indicada para conservação *in vitro* de *N. mucugensis*, por ter promovido menor crescimento das plantas, além do alto índice de sobrevivência.

Tabela 1. Valores médios de altura de plantas de *Vernonia condensata* Baker (cm) cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações do meio de cultura MS, suplementado com sacarose, em ambientes de cultivo com temperaturas de 20 °C (BOD) e de 25 °C (sala de crescimento), durante 30 e 120 dias. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade e médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de F a 5% de probabilidade.

Meio	Ambientes de cultivo	
	20 °C (BOD)	25 °C (Sala de crescimento)
30 dias		
MS com 15 g L ⁻¹ de sacarose	1,13 aA	2,57 aA
MS com 30 g L ⁻¹ de sacarose	1,32 aA	6,60 cB
MS/2 com 15 g L ⁻¹ de sacarose	1,14 aA	4,13 bB
MS/2 com 30 g L ⁻¹ de sacarose	0,86 aA	6,71 cB
MS/4 com 15 g L ⁻¹ de sacarose	1,63 aA	5,20 bB
MS/4 com 30 g L ⁻¹ de sacarose	1,02 aA	7,99 cB
120 dias		
MS com 15 g L ⁻¹ de sacarose	16,33 cB	7,13 aA
MS com 30 g L ⁻¹ de sacarose	13,93 bA	17,79 cB
MS/2 com 15 g L ⁻¹ de sacarose	16,71 cB	13,43 bA
MS/2 com 30 g L ⁻¹ de sacarose	11,83 bA	19,50 dB
MS/4 com 15 g L ⁻¹ de sacarose	10,89 bA	16,07 cB
MS/4 com 30 g L ⁻¹ de sacarose	7,43 aA	16,96 cB
CV (%)	27,52	

A partir da conservação *in vitro* de amoreira-preta via crescimento lento, N. Silva et al. (2016) ressaltam a importância de ajustar as concentrações das substâncias osmorreguladoras, objetivando promover o crescimento lento e facilitar a recuperação de explantes após o período de conservação *in vitro* recomendado.

Após 120 dias de cultivo, as plantas mantidas em temperatura de 20 °C apresentaram menor altura, quando cultivadas em meio suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, já quando mantidas em ambiente com 25 °C a suplementação do meio com 15 g L⁻¹ de sacarose foi mais eficiente na redução do desenvolvimento das plantas (Tabela 1). Nesta perspectiva, podemos perceber que as concentrações de sacarose adicionadas nos meios nutritivos como reguladores osmótico e fontes de carbono tiveram influência significativa no que se refere à altura da planta.

Baixas temperaturas estão relacionadas à restrição na absorção de água e de nutrientes (Sharma et al., 2005),

pois há redução das reações químicas, ocasionando menos energia metabólica acessível (Larcher, 2006). Em pesquisa realizada por Vettorazzi et al. (2017), objetivando a conservação *in vitro* de plantas de batata-doce, foi possível observar, aos 90 dias, que a redução da temperatura, dos sais e da sacarose no meio de cultura MS proporcionou menor crescimento das plantas. Resultado semelhante foi observado por Pedroso et al. (2010), ao avaliarem a influência da temperatura sobre o crescimento e a morfologia de plantas de *Vriesea inflata* mantidas *in vitro*. Esses autores evidenciaram que plantas da espécie mencionada podem ser mantidas *in vitro* em baixas temperaturas (15 °C) por 24 meses, com o objetivo de estabelecer uma coleção *in vitro* visando à preservação da espécie.

Independentemente da composição do meio de cultura, o maior número de folhas verdes (NFV) foi observado nas plantas cultivadas em ambiente com

temperatura de 25 °C (Tabela 2). Aos 120 dias de cultivo, os maiores valores médios dessa característica foram constatados nas plantas cultivadas em meio MS/2 com 15 g L⁻¹ de sacarose. Neste sentido, foi possível constatar que o aumento na concentração de sacarose adicionada aos meios de cultura não foi um fator determinante para o aumento do número de folhas verdes, uma vez que os maiores valores foram observados em concentração menor.

Maior número de folhas verdes é um aspecto indicativo de uma planta vigorosa e com maior chance de sobrevivência após os subcultivos, principalmente após um período longo de conservação *in vitro*, sendo importante destacar que as plantas apresentaram valores satisfatórios de NFV ao final do período de cultivo avaliado (120 dias), considerando-se os diferentes tratamentos, com exceção do meio MS/4 suplementado com ambas as concentrações de sacarose, associado à temperatura de 20 °C, assim como o MS/2 com 30 g L⁻¹ de sacarose, associado a essa

temperatura, onde ocorreu os menores valores do NFV, o que pode reduzir a viabilidade das plantas e a chance de sobrevivência após o período de cultivo (Tabela 2).

Lima-Brito et al. (2011), comparando duas temperaturas (18 e 25 °C) na conservação *in vitro* de sempre-viva (*Syngonanthus mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis*), observaram que as maiores médias para o número de folhas verdes foram obtidas na temperatura de 18 °C, independente da concentração de carboidrato utilizado. Assim como os autores supracitados, Menezes-Sá et al. (2019), ao compararem duas temperaturas de cultivo (18 e 25 °C), observaram que a temperatura de 18 °C proporcionou maiores médias atribuídas ao número de folhas verdes na conservação *in vitro* das espécies *Polystachya estrellensis* Rchb. f. e *Oeceoclades maculata* (Lindl.) Lindl., contudo verificaram que, para a espécie *Catasetum macrocarpum*, independentemente dos reguladores osmóticos observados, a temperatura de 25 °C foi a mais adequada para a variável analisada.

Tabela 2. Valores médios do número de folhas verdes de plantas de *Vernonia condensata* Baker, cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações do meio de cultura MS, suplementado com sacarose, em ambientes de cultivo com temperaturas de 20 °C (BOD) e de 25 °C (sala de crescimento), durante 30 e 120 dias. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade e médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de F a 5% de probabilidade.

Meio	Ambientes de cultivo	
	20 °C (BOD)	25 °C (Sala de crescimento)
30 dias		
MS com 15 g L ⁻¹ de sacarose	4,27 aB	6,67 aA
MS com 30 g L ⁻¹ de sacarose	2,69 bB	8,36 aA
MS/2 com 15 g L ⁻¹ de sacarose	5,73 aB	8,73 aA
MS/2 com 30 g L ⁻¹ de sacarose	1,57 bB	8,27 aA
MS/4 com 15 g L ⁻¹ de sacarose	4,73 aB	8,20 aA
MS/4 com 30 g L ⁻¹ de sacarose	2,85 bB	8,60 aA
120 dias		
MS com 15 g L ⁻¹ de sacarose	9,00 bB	12,53 bA
MS com 30 g L ⁻¹ de sacarose	8,29 bB	12,83 bA
MS/2 com 15 g L ⁻¹ de sacarose	11,42 aB	15,73 aA
MS/2 com 30 g L ⁻¹ de sacarose	4,22 cB	9,13 cA
MS/4 com 15 g L ⁻¹ de sacarose	4,36 cB	10,86 bA
MS/4 com 30 g L ⁻¹ de sacarose	3,00 cB	6,08 dA
CV (%)	16,56	



De acordo com Vila-Verde et al. (2021), o número de folhas determina o potencial de propagação da planta. Carvalho et al. (2016) destacaram a importância de verificar a correlação existente entre essas variáveis, constatando uma baixa correlação entre AP e NFV ($r = 0,17^*$; $r = 0,25^{**}$, respectivamente) em plantas de citros cultivadas *in vitro*, ressaltando a possibilidade de obtenção de materiais com menor altura e com número adequado de folhas verdes como condição fundamental para a conservação *in vitro*. Resultado semelhante foi observado no presente trabalho ($r = 0,45^{**}$, dados não apresentados).

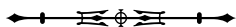
Em relação à característica do número de folhas senescentes (NFS), após 30 dias de cultivo, observou-se que não houve diferença entre as composições de meio de cultura e temperaturas utilizadas. Após 120 dias de cultivo, o menor valor de NFS foi observado quando as plantas foram cultivadas em meio de cultura MS com 15 g L⁻¹

de sacarose e mantidas na temperatura de 25 °C. Este resultado pode estar atrelado ao fato de que o meio MS na sua concentração salina completa pode apresentar concentrações de macro e micronutrientes necessários ao desenvolvimento *in vitro* do alumã. Além disso, concentração ótima de sacarose no meio de cultura é fundamental para o estabelecimento da condição de crescimento mínimo, uma vez que o objetivo da conservação é retardar o desenvolvimento da planta sem afetar sua vitalidade. É importante observar que, no ambiente de cultivo com temperatura de 25 °C, quando os meios de cultura foram suplementados com 15 g L⁻¹ de sacarose, as plantas apresentaram menor NFS em relação às plantas cultivadas em meios com adição de 30 g L⁻¹ de sacarose (Tabela 3).

T. Santos et al. (2012) afirmam, em relação à coloração das folhas das plantas conservadas *in vitro*, que

Tabela 3. Valores médios do número de folhas senescentes de plantas de *Vernonia condensata* Baker, cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações do meio de cultura MS, suplementado com sacarose, em ambientes de cultivo com temperaturas de 20 °C (BOD) e de 25 °C (sala de crescimento), durante 30 e 120 dias. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade e médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de F a 5% de probabilidade.

Meio	Ambientes de cultivo	
	20 °C (BOD)	25 °C (Sala de crescimento)
30 dias		
MS com 15 g L ⁻¹ de sacarose	0,27 aA	0,00 aA
MS com 30 g L ⁻¹ de sacarose	1,08 aA	0,21 aA
MS/2 com 15 g L ⁻¹ de sacarose	1,73 aA	0,00 aA
MS/2 com 30 g L ⁻¹ de sacarose	0,79 aA	0,20 aA
MS/4 com 15 g L ⁻¹ de sacarose	0,53 aA	0,00 aA
MS/4 com 30 g L ⁻¹ de sacarose	1,38 aA	0,13aA
120 dias		
MS com 15 g L ⁻¹ de sacarose	9,20 aB	1,40 aA
MS com 30 g L ⁻¹ de sacarose	10,86 aB	7,92 cA
MS/2 com 15 g L ⁻¹ de sacarose	11,00 aB	4,00 bA
MS/2 com 30 g L ⁻¹ de sacarose	11,33 aA	11,60 dA
MS/4 com 15 g L ⁻¹ de sacarose	10,57 aA	9,43 cA
MS/4 com 30 g L ⁻¹ de sacarose	9,00 aA	11,00 dA
CV (%)	31,08	



é necessário ponderar plantas mais vigorosas, ainda que estas aparentem ser um pouco menores do que se deseja.

Segundo Divakaran et al. (2006), altas concentrações de sacarose contribuem para o crescimento acelerado da planta, e a exaustão de outras substâncias no meio de cultura faz com que as folhas amarelecem e até caiam. Nesse sentido, plantas cultivadas em meios com déficit de nutrientes podem ficar mais vulneráveis à senescência, quando o meio nutritivo não conseguir suprir as necessidades nutricionais de que a planta precisa.

Estudo realizado por Maldaner et al. (2018) evidenciou resultado positivo em relação às taxas de crescimento e à sobrevivência das plantas de *Desmodium incanum* DC com metade da concentração padrão de sais do meio de cultura MS.

Estudando sobre efeito dos agentes osmóticos (sacarose, manitol e sorbitol) na conservação *in vitro* de *Amburana cearensis* (Allemão) A.C.Smith, Alvim et

al. (2020) constataram que os menores valores para o número de folhas senescentes foram obtidos nos tratamentos contendo a maior concentração de sacarose ($90,66 \text{ g L}^{-1}$) isolada, na temperatura de $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

Pesquisa realizada por Carvalho et al. (2016) revelou que o ambiente de cultivo com temperatura de $22 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, intensidade luminosa de $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e 12 h de fotoperíodo mostrou-se mais eficiente para reduzir o crescimento de plantas de genótipos de citros conservados *in vitro*, prolongando o tempo de subcultivo e mantendo as plantas viáveis. Por outro lado, estudo realizado por Vettorazzi et al. (2017) evidenciou que, na conservação *in vitro* de batata-doce, a temperatura de cultivo de $27 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ é mais aconselhável quando comparada com a temperatura de $18 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$.

Foi observado, aos 30 dias de cultivo, maior número de raízes (NR) nas plantas quando elas foram cultivadas em meio MS/4 com 15 g L^{-1} de sacarose (Tabela 4).

Tabela 4. Valores médios do número de raízes de plantas de *Vernonia condensata* Baker, cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações do meio de cultura MS suplementado com sacarose, em ambientes de cultivo com temperaturas de $20 \text{ }^\circ\text{C}$ (BOD) e de $25 \text{ }^\circ\text{C}$ (sala de crescimento), durante 30 e 120 dias. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade e médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de F a 5% de probabilidade.

Meio	Ambientes de cultivo	
	20 °C (BOD)	25 °C (Sala de crescimento)
30 dias		
MS com 15 g L^{-1} de sacarose	3,13 bA	2,20 bA
MS com 30 g L^{-1} de sacarose	1,85 cB	4,57 aA
MS/2 com 15 g L^{-1} de sacarose	2,73 bA	3,73 aA
MS/2 com 30 g L^{-1} de sacarose	1,00 cB	4,20 aA
MS/4 com 15 g L^{-1} de sacarose	4,80 aA	4,40 aA
MS/4 com 30 g L^{-1} de sacarose	0,46 cB	4,40 aA
120 dias		
MS com 15 g L^{-1} de sacarose	4,80 bA	2,47 cB
MS com 30 g L^{-1} de sacarose	5,57 bA	6,08 bA
MS/2 com 15 g L^{-1} de sacarose	5,50 bA	5,60 bA
MS/2 com 30 g L^{-1} de sacarose	6,67 aA	7,73 aA
MS/4 com 15 g L^{-1} de sacarose	6,29 aB	7,64 aA
MS/4 com 30 g L^{-1} de sacarose	4,43 bB	8,25 aA
CV (%)	16,04	



Resultado similar foi encontrado por T. Santos et al. (2012), em pesquisa sobre propagação e conservação *in vitro* de vetiver, onde identificaram que a conservação *in vitro* da espécie é possível em meio MS semissólido com 25% dos sais MS e temperatura de 18 °C, por um período de 270 dias. Por outro lado, Alves et al. (2010), pesquisando sobre a influência de diferentes meios de cultura sobre o crescimento de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen para conservação *in vitro*, verificaram que nenhum tratamento utilizando diferentes concentrações salinas de meio MS e fonte de carbono (sacarose e sorbitol) inibiu a formação de raízes, ocorrendo 100% de enraizamento em explantes da espécie sob temperatura de 16 ± 1 °C no período proposto (seis meses).

Lima-Brito et al. (2011), quando avaliaram o efeito de agentes osmóticos e da temperatura na conservação *in vitro* de *Syngonanthus mucugensis* Giul. Subsp. *mucugensis*, demonstraram o potencial da técnica de cultivo *in vitro* para a espécie em estudo, destacando que a utilização de meio de cultura MS na metade de sua concentração salina, contendo 15 g L⁻¹ de sacarose e mantendo as plantas em temperatura a 18 °C, possibilita a conservação dessa espécie por até 180 dias, sem subcultivo. Souza et al. (2020) também observaram que o meio MS com metade da concentração de sais e 15 g L⁻¹ de sacarose permitiu a conservação *in vitro* de *Passiflora edulis* Sims por um período de cultivo de 120 dias, com 100% de sobrevivência após aclimação.

Ao reduzir a concentração salina do meio para MS para 1/4, observou-se, aos 120 dias de cultivo, um maior número de raízes quando as plantas foram cultivadas no ambiente a 25 °C (Tabela 4). Avaliando as concentrações de sais do meio MS (100, 75, 50 e 25%) e temperatura (18 e 25 °C) do ambiente de cultivo, Menezes-Sá et al. (2019) verificaram que, na temperatura de 25 °C, não houve diferenças significativa entre as três espécies dentro de cada tratamento. Além disso, observou que houve melhor enraizamento na temperatura de 18 °C para a espécie *Catasetum macrocarpum*, em todas as concentrações

de sais do meio MS avaliadas, enquanto para a espécie *Polystachya estrellensis* Rchb. f. não houve diferenças significativas entre as concentrações salinas do meio, com 100% de enraizamento em todos os tratamentos. Já na espécie *Oeceoclades maculata* (Lindl.) Lindl., houve diferença na porcentagem de enraizamento apenas quando foram utilizados 100% dos sais do meio MS.

Levando-se em consideração a suplementação dos meios nutritivos com sacarose em função das temperaturas do ambiente de cultivo, os maiores valores médios do número de raízes foram observados no ambiente com temperatura de 25 °C, utilizando 30 g L⁻¹ de sacarose no meio de cultura (Tabela 4). Trabalhando com espécies de orquídeas, Menezes-Sá et al. (2019) verificaram que a porcentagem de plantas enraizadas atingiu valores de 90% para todas as espécies de orquídeas estudadas, independente da fonte de carbono utilizada, tanto na temperatura de 18 °C como de 25 °C, exceto para a espécie *Catasetum macrocarpum*, com 24,6% de enraizamento quando mantida em 18 °C. Além disso, verificaram, aos 360 dias de cultivo, que houve 100% de enraizamento na espécie *Vanilla planifolia* Andrews, com a redução da temperatura para 22 °C.

A sacarose, assim como outros agentes osmóticos, quando empregada em altas concentrações na conservação *in vitro*, reduz o potencial hídrico do meio de cultura, o que dificulta a absorção de água e nutrientes pelo explante, restringindo o crescimento *in vitro* (Engelmann, 1991; Caldas et al., 1998). Nesse sentido, Alvim et al. (2020) afirmam que a utilização de elevadas concentrações de sacarose favorece a conservação *in vitro* de *Amburana cearensis* (Allemão) A.C.Smith, proporcionando altas taxas de sobrevivência ao final de 300 dias.

Em relação às coleções de germoplasma vegetal *in vitro*, observa-se que, na coleção de bananeiras da Bioversity, com intervalo médio de subcultivos de 12 meses, vem sendo utilizado 30 g L⁻¹ de sacarose, enquanto a concentração utilizada para mandioca no *International Center for Tropical Agriculture* (CIAT) é de 20 g L⁻¹ e no

International Institute of Tropical Agriculture (IITA) é de 30 g L⁻¹, com intervalos de subcultivos entre 4 e 19 meses (Carvalho et al., 2022; CGIAR, 2012).

A partir dos resultados, observou-se variação nas características das plantas em função dos fatores avaliados nas duas épocas (30 e 120 dias), sendo estes: composição do meio de cultura e temperatura do ambiente de cultivo. No entanto, de forma geral, observou-se que o meio de cultura MS na sua concentração salina completa com adição de 15 g L⁻¹ de sacarose proporcionou o menor desenvolvimento *in vitro* de *Vernonia condensata* Baker. Além disso, ficou evidente nas condições avaliadas nesta pesquisa que o ambiente com temperatura de 25 °C foi o mais favorável para a maioria das características estudadas.

Apesar de alguns trabalhos citados anteriormente estarem relatando a redução de temperatura para conservação *in vitro*, observou-se, no presente trabalho, que as melhores respostas para o estabelecimento de condições de crescimento mínimo de plantas de alumã foram observadas em temperaturas comumente utilizadas em salas de crescimento.

De acordo com Faria et al. (2007) e Flores et al. (2011), as espécies podem apresentar diferentes desempenhos para o cultivo *in vitro*, ou seja, o comportamento de cada genótipo é determinado por fatores genéticos. Nesse sentido, Carvalho et al. (2014) afirmam que, embora seja possível conservar plantas do limoeiro 'Rugoso da Flórida' sem subcultivos por um período de 12 meses, utilizando o meio de cultura *Wood Plant Medium* (WPM) em sua concentração salina completa e volume de 20 mL, serão necessários estudos com outros genótipos para definir o protocolo de conservação *in vitro* para as espécies de citros, visto que pode ocorrer variação entre as plantas de um mesmo genótipo conservadas *in vitro*. De acordo com os trabalhos citados anteriormente, é possível observar que espécies e cultivares possuem características genéticas específicas. Dessa maneira, recomenda-se que os protocolos de conservação *in vitro* sejam avaliados

e ajustados individualmente, tanto durante a etapa de crescimento mínimo como na subsequente retomada, visando a conservação da diversidade genética (K. Silva et al., 2021).

Protocolos de conservação *in vitro* visam manter as plantas sob condições de crescimento mínimo por longos períodos de cultivo, a partir da redução do metabolismo e do desenvolvimento das plantas, favorecendo a manutenção das espécies por um extenso intervalo de tempo, em um mesmo recipiente contendo meio de cultura, reduzindo a necessidade de realizar subcultivos periódicos, proporcionando a redução de custos e diminuindo os riscos de variação somaclonal. Dessa maneira, estudos futuros relacionados à conservação *in vitro* de *Vernonia condensata* precisam ser realizados avaliando outros fatores, como composições de meio de cultura distintas das empregadas nesta pesquisa, bem como a avaliação de concentrações de retardantes de crescimento, como o ácido abscísico (ABA) e o paclobutrazol (PBZ), com vistas a alcançar um período de conservação *in vitro* de plantas de *V. condensata* superior a 120 dias de cultivo.

CONCLUSÃO

O meio de cultura MS com adição de 15 g L⁻¹ de sacarose, associado à temperatura do ambiente de cultivo a 25 °C, favorece a conservação *in vitro* de *Vernonia condensata* Baker a partir de plantas com menor altura e número de folhas verdes satisfatórios, por um período de 120 dias.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Centro Universitário Maria Milza (UNIMAM), por fornecer a infraestrutura física e pelo apoio financeiro, essenciais para a realização deste estudo.

REFERÊNCIAS

Almeida, L. V. S., Oliveira, V. J. S., Jacobi, C. C. B., Almeida, W. A. B., & Carvalho, M. J. S. (2020). *Vernonia condensata* Baker: an alternative for large-scale seedling production. *Ciência Rural*, 50(3), e20180941. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20180941>



- Alves, R. B. N., Bertoni, B. W., Vieira, R. F., França, S. C., Ming, L. C., & Pereira, A. M. S. (2010). Influência de diferentes meios de cultura sobre o crescimento de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae) para conservação *in vitro*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 12(4), 510-515. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722010000400016>
- Alvim, B. F. M., Souza, A. V. V., Lima-Brito, A., Fonseca, P. T., Soares, T. L., & Santana, J. R. F. (2020). *In vitro* conservation of *Amburana cearensis* (Fabaceae). *Ciência Rural*, 50(7), e20190729. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20190729>
- Boeing, T., Da Silva, L. M., Somensi, L. B., Cury, B. J., Costa, A. P. M., Petreanu, M., . . . Andrade, S. F. (2016). Antiulcer mechanisms of *Vernonia condensata* Baker: a medicinal plant used in the treatment of gastritis and gastric ulcer. *Journal of Ethnopharmacology*, 184, 196-207. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.02.049>
- Brasil. (2009). *RENISUS-Relação de Plantas Mediciniais de Interesse ao SUS*. Ministério da Saúde.
- Brasil. (2011). *Formulário de fitoterápicos da farmacopéia brasileira*. Ministério da Saúde/ANVISA.
- Brasil. (2014). *Monografia da espécie Vernonia condensata ("boldobaiano")*. Ministério da Saúde/ANVISA.
- Caldas, L. S., Haridasan, P., & Ferreira, M. E. (1998). Meios nutritivos. In A. C. Torres, L. S. Caldas & J. A. Bujo (Eds.), *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas* (pp. 87-132). EMBRAPA-CNPQ.
- Carvalho, M. J. S., Santos, E. B., Souza, A. S., Ledo, C. A. S., Filho, W. S. S., & Mendes, M. I. S. (2014). Fatores que afetam a conservação *in vitro* de plantas do limoeiro 'Rugoso da Flórida'. *Magistra*, 26(2), 178-185.
- Carvalho, M. J. S., Souza, A. S., Santos, E. B., Filho, W. S. S., Ledo, C. A. S., & Souza, F. V. D. (2016). Univariate and multivariate statistical tools for *in vitro* conservation of citrus genotypes. *Acta Science Agronomy*, 38(1), 129-137. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v38i1.26433>
- Carvalho, M. J. S., Souza, A. S., Santos, E. B., Filho, W. S. S., Ledo, C. A. S., Costa, E. M. R., & Souza, F. V. D. (2022). *In vitro* conservation of 'Florida Rough' lemon plants. *Ciência Rural*, 52(12), e20210276. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20210276>
- Consultative Group for International Agricultural Research (CGIAR). (2012). *Slow growth storage of banana germplasm*. Bioversity International. http://cropgenebank.sgrp.cgiar.org/index.php?option=com_content&view=article&id=547&Itemid=742
- Divakaran, M., Babu, K. N., & Peter, K. V. (2006). Conservation of *Vanilla species*, *in vitro*. *Scientia Horticulturae*, 110(2), 175-180. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.07.003>
- Engelmann, F. (1991). *In vitro* conservation of tropical plant germoplasma: a review. *Euphytica*, 57(3), 227-243. <https://doi.org/10.1007/BF00039669>
- Faria, G. A., Costa, M. A. P. C., Ledo, C. A. S., Junghans, T. G., Souza, A. S., & Cunha, M. A. P. (2007). Meio de cultura e tipo de explante no estabelecimento *in vitro* de espécies de maracujazeiro. *Bragantia*, 66(4), 535-543. <https://doi.org/10.1590/S0006-87052007000400002>
- Flores, A. V., Reiniger, L. R. S., Curti, A. R., Cunha, A. C. M. C. M., Golle, D. P., & Bassan, J. S. (2011). Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. *Ciência Florestal*, 21(1), 175-182. <https://doi.org/10.5902/198050982760>
- Larcher, W. (2006). *Ecofisiologia vegetal*. Rima.
- Lima, A. P. P. S., Bastos, F. J. O., Lima-Brito, A., Fernandes, G. B., & Santana, J. R. F. (2021). Modulação do meio de cultura na conservação *ex situ* de *Neoregelia mucugensis* Leme (Bromeliaceae). *Revista Caatinga*, 34(4), 763-771. <http://dx.doi.org/10.1590/1983-21252021v34n403rc>
- Lima-Brito, A., Albuquerque, M. M. S., Alvim, B. F. M., Resende, S. V., Bellintani, M. C., & Santana, J. R. F. (2011). Agentes osmóticos e temperatura na conservação *in vitro* de sementeira. *Ciência Rural*, 41(8), 1354-1361. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782011000800010>
- Lorenzi, H., & Matos, F. J. A. (2002). *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas* (2. ed.). Instituto Plantarum.
- Maldaner, J., Schwalbert, R., Steffen, G. P. K., Saldanha, C. W., Flores, R., & Conterato, I. F. (2018). Concentração de nutrientes durante o cultivo *in vitro* é crucial para a aclimatização de *Desmodium incanum* DC. *Pesquisa Agropecuária Gaúcha*, 24(1-2), 46-54. <https://doi.org/10.36812/pag.2018241/246-54>
- Menezes-Sá, T. S. A., Arrigoni-Blank, M. F., Costa, A. S., Feitosa-Alcantara, R. B., Blank, A. F., & Luz, J. M. Q. (2019). Conservação e aclimatização *in vitro* de Epidendroideae (orchidaceae) de Sergipe, Brasil. *Bioscience Journal*, 35(2), 356-366. <https://doi.org/10.14393/BJ-v35n2a20198-38776>
- Menezes-Sá, T. S. A., Costa, A. S., Arrigoni-Blanc, M. F., Blanc, A. F., Moura, G. M. S., & Soares, C. A. (2022). *In vitro* propagation and conservation of *Cattleya tigrina* A. Rich. *Ciência Rural*, 52(5), e20200517. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20200517>
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Oliveira, K. S., & Aloufa, M. A. I. (2022). Slow growth *in vitro* culture for conservation of *Hancornia speciosa* Gomes. *Floresta*, 52(1), 7-16. <http://dx.doi.org/10.5380/rf.v52i1.69209>



- Pedroso, A. N. V., Lazarini, R. A. M., Tamaki, V., & Nievola, C. C. (2010). *In vitro* culture at low temperature and *ex vitro* acclimatization of *Vriesea inflata* an ornamental bromeliad. *Revista Brasileira de Botânica*, 33(3), 407-414. <https://doi.org/10.1590/S0100-84042010000300004>
- Pizzio, V. R., Brasileiro, B. G., Oliveira, T. T., & Nagem, T. J. (2011). Plantas com possível atividade hipolipidêmica: uma revisão bibliográfica de livros editados no Brasil entre 1998 e 2008. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 13(1), 98-109. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722011000100015>
- R Core Team. (2021). *R: a language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing.
- Sá, A. J., Léo, A. S., & Léo, C. A. S. (2011). Conservação *in vitro* de mangabeira da região nordeste do Brasil. *Ciência Rural*, 41(1), 57-62. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782011000100010>
- Sá, J. F., Silveira, D. M. S., Santos, K. C. F., Souza, A. S., Ledo, C. A. S., & Carvalho, M. J. S. (2021). Efeitos de diferentes doses de paclobutrazol e sacarose no crescimento mínimo *in vitro* de espécies silvestres de Manihot. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, 16(2), 1-8. <https://doi.org/10.5039/agraria.v16i2a8657>
- Santos, M. C., Léo, A. S., Léo, C. A. S., Souza, F. V. D., & Junior, J. F. S. (2011). Efeito da sacarose e do sorbitol na conservação *in vitro* de segmentos nodais de mangabeira. *Revista Ciência Agronomia*, 42(3), 735-741. <https://doi.org/10.1590/S1806-66902011000300020>
- Santos, T. C., Arrigoni-Blank, M. F., & Blank, A. F. (2012). Propagação e conservação *in vitro* de vetiver. *Horticultura Brasileira*, 30(3), 507-513. <https://doi.org/10.1590/S0102-05362012000300025>
- Sharifi-Rad, M., Fokou, P. V. T., Sharopov, F., Martorell, M., Ademiluyi, A. O., Rajkovic, J., . . . Sharifi-Rad, J. (2018). Antiulcer agents: from plant extracts to phytochemicals in healing promotion. *Molecules*, 23(7), 1751-1787. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES23071751>
- Sharma, P., Sharma, N., & Deswal, R. (2005). The molecular biology of the low-temperature response in plants. *Bioessays*, 47(10), 1048-1059. <https://doi.org/10.1002/bies.20307>
- Silva, J. B., Temponi, V. S., Gasparetto, C. M., Fabri, R. L., Aragão, D. M. O., Pinto, N. C. C., . . . Alves, M. S. (2013). *Vernonia condensata* Baker (Asteraceae): a promising source of antioxidants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013, 698018. <https://doi.org/10.1155/2013/698018>
- Silva, J. B., Bessa, M. E., Mayorga, O. A. S., Andrade, V. T., Costa, Y. F. G., Mendes, R. F., . . . Alves, M. S. (2018). A promising antibiotic, synergistic and antibiofilm effects of *Vernonia condensata* Baker (Asteraceae) on *Staphylococcus aureus*. *Microbial Pathogenesis*, 123, 385-392. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.07.031>
- Silva, K. B., Reiniger, L. R. S., Rabaiolli, S. M. S., Serrote, C. M. L., & Stefanel, C. M. (2021). Crescimento mínimo e retomada de crescimento *in vitro* em brotações de *Luehea divaricata*. *Brazilian Journal of Forestry Research*, 41, e201902026. <https://doi.org/10.4336/2021.pfb.41e201902026>
- Silva, N. D. G., Dutra, L. F., Bianchi, V. J., Sommer, L. R., Vargas, D. P., & Peters, J. A. (2016). Conservação *in vitro* de amoreira-preta: crescimento lento. *Plant Cell Culture & Micropropagation*, 12(1), 7-12.
- Souza, M. S. O., Silva, E. C., Ciano, G. S. O. S., Jacobi, C. C. B., Bonsucesso, J. S., Almeida, W. A. B., & Carvalho, M. J. S. (2020). Assessment of minimum growth conditions for *in vitro* conservation of *Passiflora edulis* Sims. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(8), 351-365.
- Trueman, S. J., Hung, C. D., & Wendling, I. (2018). Tissue culture of *Corymbia* and *Eucalyptus*. *Forests*, 9(2), 84. <https://doi.org/10.3390/f9020084>
- Vettorazzi, R. G., Carvalho, V. S., Sudré, C. P., & Rodrigues, R. (2017). Developing an *in vitro* optimized protocol to sweet potato lardraces conservation. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 39(3), 359-367. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v39i3.32700>
- Vila-Verde, D. S., Mendes, M. I. S., Souza, A. S., Pinto, C. R., Nobre, L. V. C., Melo, J. E. S., & Ledo, C. A. S. (2021). Ácido ascórbico e polivinilpirrolidona no cultivo *in vitro* de *Dioscorea* spp. *Research, Society and Development*, 10(9), 1-12. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i9.17812>

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

R. F. Lopes contribuiu com metodologia, investigação e escrita (rascunho original); K. S. L. Santana com metodologia e investigação; V. J. Santos com conceituação e investigação; E. M. R. Costa com análise formal e escrita (revisão e edição); M. J. S. Carvalho com análise formal, curadoria de dados e escrita (revisão e edição) e W. A. B. Almeida com administração de projeto, supervisão e escrita (revisão e edição).

