

LOURDES IAREMA

***Lippia filifolia* MART. (VERBENACEAE) CULTIVADA *in vitro*: ANATOMIA  
FOLIAR, EFEITO DE IRRADIÂNCIAS E DE FITORREGULADORES**

Tese apresentada à Universidade  
Federal de Viçosa, como parte  
das exigências do Programa de  
Pós-Graduação em Botânica para  
obtenção do Título de *Magister  
Scientiae*

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2004

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

I11s  
2004

Iarema, Lourdes, 1976-  
*Lippia filifolia* Mart. (Verbenaceae) cultivada *in vitro*:  
anatomia foliar, efeito de irradiâncias e de fitorreguladores  
/ Lourdes Iarema. – Viçosa : UFV, 2004.  
x, 85f. : il. ; 29cm.

Viçosa.

Orientador: Wagner Campos Otoni.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de

Inclui bibliografia.

1. Verbenáceas - Cultivo *in vitro*. 2. Verbenáceas - Efeito de níveis de irradiância. 3. Verbenáceas - Reguladores de crescimento. 4. Verbenáceas - Anatomia foliar. 5. Verbenáceas - Histoquímica. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

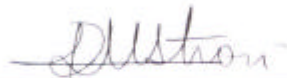
CDD 20.ed. 583.88

LOURDES IAREMA

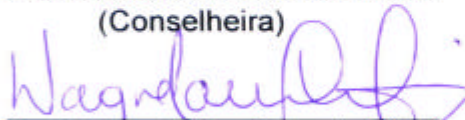
***Lippia filifolia* MART. (VERBENACEAE) CULTIVADA *in vitro*: ANATOMIA  
FOLIAR, EFEITO DE IRRADIÂNCIAS E DE FITORREGULADORES**

Tese apresentada à Universidade  
Federal de Viçosa, como parte das  
exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Botânica para obtenção  
do Título de *Magister Scientiae*

APROVADA: 20 de fevereiro de 2004.



Prof. Renata M. S. Alves Meira  
(Conselheira)



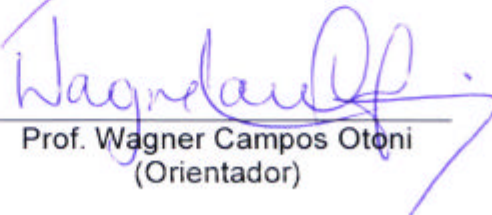
Prof. Eldo A. Monteiro da Silva



Prof. Marília Contin Ventrella  
(Conselheira)



Prof. Lyderson Faccio Viccini



Prof. Wagner Campos Otoni  
(Orientador)

**“Se não houver frutos  
Valeu pela beleza das flores  
Se não houver flores  
Valeu pela sombra das folhas  
Se não houver folhas  
Valeu pela intenção da semente...”  
(Henfil)**

A Deus, ao meu marido, Rogério, aos meus  
pais, Miguel e Erna, a minha irmã, Alice, a minha  
sogra, Laci (*in memoriam*),  
**Dedico.**

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar sempre ao meu lado.

À minha família, pela confiança, apoio e compreensão durante todas as etapas importantes da minha vida.

À Universidade Federal de Viçosa e, em especial, ao Departamento de Biologia Vegetal, pela oportunidade de realizar o curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Aos Professores Eldo A. Monteiro da Silva e Wagner Campos Otoni, pela orientação, pelo carinho, amizade e confiança.

Às professoras Marília Ventrella e Renata Meira, pelos aconselhamentos, sempre com valiosas críticas e sugestões.

A professora Rosane Aguiar e a técnica Cláudia, pelo carinho e auxílio na microscopia eletrônica de varredura.

Ao professor Lyderson, pelas críticas, sugestões e atenção sempre dispensada.

Ao professor Paulo Cecon, pela colaboração nas interpretações estatísticas.

Aos professores José Maria Moreira, Aloísio Xavier e Vicente Casali, pela disponibilidade de espaços para a condução dos experimentos.

À professora Catarina e a amiga Dani, pelo auxílio na utilização do micrótomo de congelamento.

A todos os professores envolvidos, direta ou indiretamente, em minha formação, em especial, à professora Aristéia Azevedo.

À Lili, pela sempre disponibilidade em ajudar, pelos ensinamentos, amizade e carinho.

Ao Osvaldo, Marcos, Magela, Zé Maria, Rogério (UCP) e Joaquim, pelo auxílio na casa de vegetação.

À Ronelza, pela valiosa ajuda na montagem dos experimentos.

Ao técnico Carlos Raimundo, pela atenção e auxílio nas extrações.

Ao Marcinho e a Miranda, pela dedicação e compreensão.

À amiga Ana Rossi, pelo constante incentivo e apoio.

À Marcela, Andréia e Fabiana, pelo auxílio, críticas, sugestões e, principalmente pela amizade.

Aos amigos do LCT II, Andréia, Fabiana, Luciano, Carmem, Malu, Leandro, Elisa, Ana Paula, Alexandra, Letícia, Edgar, Léo, Rejane.

Aos amigos do Laboratório de Anatomia Vegetal pelos momentos compartilhados.

Aos meus colegas de turma: Simone, Marcela, Andréia, Virgínia, Lorayne, Juliana, Alcemar e Priscila.

Ao Rogério, pelo companheirismo, incansável apoio, carinho e atenção.

Enfim, a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

**Muito Obrigado!!!**

## **BIOGRAFIA**

LOURDES IAREMA, filha de Miguel Iarema Sobrinho e Erna Iarema, nasceu em 29 de agosto de 1976, em Matelândia, Estado do Paraná.

No ano de 1999 concluiu o Curso de Licenciatura Plena em Ciências Biológicas pela Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT) – Campus Universitário de Alta Floresta.

Em agosto de 2001 iniciou, na UNEMAT, o Programa de Pós-Graduação “Lato Sensu” em Educação Ambiental para Conservação da Amazônia Norte-Matogrossense, submetendo-se à defesa em 19 de agosto de 2003.

Em março de 2002 iniciou o curso de Mestrado em Botânica, na Universidade Federal de Viçosa – MG, submetendo-se à defesa de tese em 20 de fevereiro de 2004.

## ÍNDICE

RESUMO .....	vii
ABSTRACT .....	ix
INTRODUÇÃO GERAL .....	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	5
CAPÍTULO I. INFLUÊNCIA DE NÍVEIS DE IRRADIÂNCIA E DE REGULADORES DE CRESCIMENTO NO DESENVOLVIMENTO <i>in vitro</i> DE <i>Lippia filifolia</i> MART. & SCHAU. ....	8
RESUMO .....	9
INTRODUÇÃO .....	10
MATERIAL E MÉTODOS .....	13
Obtenção do material vegetal .....	13
Concentração dos pigmentos fotossintéticos .....	14
Crescimento e desenvolvimento das plantas .....	15
Esquema experimental .....	16
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	17
Concentração de pigmentos .....	17
Crescimento e desenvolvimento .....	26
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	43
CAPÍTULO II. ESTUDO ANATÔMICO E HISTOQUÍMICO EM FOLHAS DE <i>Lippia filifolia</i> MART. & SCHAU. CULTIVADA <i>in vitro</i> .....	48
RESUMO .....	49
INTRODUÇÃO .....	51

MATERIAL E MÉTODOS .....	54
Material vegetal .....	54
Microscopia de luz .....	56
Microscopia eletrônica de varredura .....	57
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	58
Caracterização anatômica .....	58
Histoquímica .....	70
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	78
CONCLUSÕES GERAIS .....	85

## RESUMO

IAREMA, Lourdes, M.S., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro, 2004.  
***Lippia filifolia* Mart. (Verbenaceae) cultivada *in vitro*: anatomia foliar, efeito de irradiâncias e de fitorreguladores.** Orientador: Wagner Campos Otoni. Conselheiros: Renata Maria Strozi Alves Meira e Marília Contin Ventrella.

O gênero *Lippia* (Verbenaceae) possui importância econômica devido aos diferentes usos do óleo essencial presente em suas espécies, que ocorrem em grande número no Brasil. *Lippia filifolia* Mart. & Schau. é endêmica da Cadeia do Espinhaço, em Minas Gerais, e está ameaçada de extinção. Plantas estabelecidas *in vitro* demonstraram que a espécie é sensível à mudanças de ambiente, durante o processo de aclimação. O primeiro objetivo deste trabalho foi avaliar o cultivo *in vitro* de *L. filifolia*, analisando a influência de níveis de irradiância e de meios de cultivo suplementados com diferentes reguladores de crescimento, visando subsidiar a produção de plantas mais tolerantes à aclimação. Ápices caulinares foram cultivados nos meios MSO, MS + ANA (0,1 mg L<sup>-1</sup>), MS + BAP (0,5 mg L<sup>-1</sup>), MS + ANA (0,1 mg L<sup>-1</sup>) + BAP (0,5 mg L<sup>-1</sup>) e, submetidos aos níveis de irradiância 40, 104 e 172 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Interações significativas entre as variáveis níveis de irradiância e meios de cultivo foram obtidas para as características concentração de carotenóides, crescimento em altura, número de brotações e área foliar. As clorofilas *a*, *b* e totais foram influenciadas somente pela irradiância, diminuindo a concentração de acordo com o aumento da irradiância. O fator meio de cultivo influenciou o número e o tamanho das raízes, o peso de matéria fresca da parte aérea e a concentração de antocianinas. Não houve interação para as características

peso de matéria fresca e seca do sistema radicular e peso de matéria seca da parte aérea, no entanto, os fatores irradiância e meio de cultivo, analisados isoladamente, foram significativos para tais características. Os níveis de irradiância e os meios de cultivos utilizados influenciaram no desenvolvimento da parte aérea, mas, não comprometendo a sobrevivência da planta no decorrer do experimento. As variações nos níveis de irradiância não influenciaram a biossíntese de antocianinas, demonstrando que as condições a que *L. filifolia* foi submetida, não induziram elevados níveis de estresse para as plantas. O segundo objetivo deste trabalho foi caracterizar anatomicamente, mediante microscopia de luz e eletrônica de varredura, a folha de *L. filifolia* cultivada *in vitro*, e identificar por técnicas histoquímicas, as principais substâncias presentes no órgão. As avaliações histoquímicas foram conduzidas em material fresco e em amostras incluídas em resina sintética. A estrutura foliar segue o padrão descrito para outras espécies do gênero, todavia, apresentando características anatômicas, geralmente, relacionadas às plantas cultivadas *in vitro*, como cutícula delgada, grandes espaços intercelulares, ausência de tecidos de sustentação e folhas finas. Em ambas as superfícies epidérmicas ocorrem um grande número de tricomas tectores e secretores. Três tipos de tricomas secretores foram observados: o tipo I, caracterizado por 1-2 células basais, pedículo de 2-3 células e uma cabeça secretora elíptica, constituída por 4-8 células; o tipo II, possui base e pedículo unicelular e cabeça bicelular globular; e o tipo III possui base, pedículo e cabeça esférica todos unicelulares. Os testes histoquímicos confirmaram a presença de óleos essenciais nos tricomas secretores e por todo o mesofilo; de polissacarídeos no tricoma glandular tipo II; e sugere a presença de proteínas na substância secretada pelos tricomas glandulares. As reações para detectar alcalóides, compostos fenólicos, amido e ligninas foram negativas. A presença de substâncias lipofílicas, dentre elas os óleos essenciais e as oleoresinas, evidencia a grande importância do gênero. A estrutura foliar segue os padrões relatados para a família, contudo, apresentando as características anatômicas relacionadas ao cultivo *in vitro*. Estes resultados podem contribuir para melhor compreensão do comportamento da espécie durante o processo de aclimação.

## ABSTRACT

IAREMA, Lourdes, M.S., Universidade Federal de Viçosa, february 2004. ***In vitro* culture of *Lippia filifolia* Mart. (Verbenaceae): leaf anatomy, and effect of light irradiances and growth regulators.** Adviser: Wagner Campos Otoni. Committee Members: Renata Maria Strozi Alves Meira and Marília Contin Ventrella.

The genus *Lippia* (Verbenaceae) has great economical importance due to different applications of the essential oils present in several species occurring in Brazil. *Lippia filifolia* Mart. & Schau. is an endemic species of the “Serra do Espinhaço”, Minas Gerais State, Brazil, and is considered as an endangered species. Following to the establishment and *in vitro* propagation of the species, it proved to be sensitive to the environmental changes that acclimatization process brings about. This way, the present study was conducted to evaluate histological and histochemical aspects of *in vitro* grown plants, and the influence of irradiance levels and growth regulators on *in vitro* culture performance of *L. filifolia*, aiming to obtain plants more tolerant to the acclimatization process. For anatomical studies leaf samples were characterized under photonic and scanning electron microscopy. The histochemical analyses were carried out using both fresh and hystoresin embedded samples. Apical segments were cultured onto a semi-solid MS-based medium supplemented with either NAA (0.1 mg L<sup>-1</sup>), BAP (0.5 mg L<sup>-1</sup>), and NAA (0.1 mg L<sup>-1</sup>) plus BAP (0.5 mg L<sup>-1</sup>), and submitted to three irradiance levels (40, 104, and 172 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>). Significant interactions between irradiance levels and culture were achieved for carotenoid content, plant height, average shoot number and leaf area. The contents of chlorophylls ‘a’ and ‘b’ were affected only by irradiance, lessening their concentrations with increasing irradiance levels. The growth regulator

composition influenced the number and average size of the roots, the fresh mass of the aerial parts, and the anthocyanin concentration. For fresh and dry root weight and aerial fresh weight there was no interaction between irradiance levels and growth regulator combinations, although when analyzed isolated they influenced the measured characteristics. The irradiance levels did not affect carotenoid biosynthesis as revealed by carotenoid contents with increasing irradiance levels, suggesting that the species tolerates higher irradiance levels without any prejudice to the development, and may reflect possible positive effects during acclimatization. The leaf structure fits on the previously described pattern for the family, however, presenting thin cuticle and mesophyll size, large intercellular spaces, absence of supporting tissue, though consistent with those induced by *in vitro* conditions. In both epidermis surfaces there are a great number of tector and secretory trichomes. The latter presented three types: type I, formed by 1-2 basal cells, 2-3 pedicel cells, and an elliptical secretory head with 4-8 cells; type II, posses unicellular base and pedicel, and a globular bicellular head; type III, has base, pedicel, and a spherical head, all unicellular. The histochemical tests confirmed the presence of essential oils within secretory trichomes and spread throughout the mesophyll; polysaccharides in glandular trichomes type II; and suggest the presence of proteins in the secreted substance by glandular trichomes. The specific reactions for alkaloids, phenolic compounds, starch and lignins were negative. The presence of lypophilic substances, among them, essential oils and oleoresins, evidenced the great importance of the genus. The results may contribute for further work on acclimatization attempts of the species.

## INTRODUÇÃO GERAL

A família Verbenaceae inclui, aproximadamente, 2.600 espécies reunidas em 100 gêneros com distribuição pantropical, sendo *Lippia* o quarto maior gênero (Cronquist, 1988). Contudo, de acordo com Judd et al. (1999), são 1.035 espécies distribuídas em 36 gêneros, e *Lippia* é o segundo maior gênero da família. Ambos consideram a família pertencente à ordem Lamiales. Na flora dos campos rupestres a família Verbenaceae se destaca com os gêneros *Lippia* e *Stachytarpheta* (Mendonça & Lins, 2000). *Lippia* é um dos principais gêneros da família que inclui espécies medicinais (Di Stasi & Hiruma-Lima, 2002). O gênero compreende cerca de 200 espécies, muitas delas aromáticas, podendo ser herbáceas, subarborescentes ou arbóreas de pequeno porte (Terblanché & Kornelius, 1996; Pascual et al., 2001). Com ampla distribuição, são encontradas, principalmente, nas Américas do Sul e Central (Troncoso, 1952), e na África Tropical (Terblanché & Kornelius, 1996). O Brasil possui cerca de 150 espécies, sendo o principal centro de diversidade a Cadeia do Espinhaço em Minas Gerais e a Chapada Diamantina na Bahia, com algumas espécies ocorrendo também em Goiás (Salimena-Pires, 1991; Salimena, 2000).

Diversos estudos em farmacognosia têm sido realizados com espécies do gênero *Lippia*, sendo os terpenóides os principais fitoquímicos observados, apresentando-se na forma de óleos essenciais (Craveiro et al., 1981; Terblanché & Kornelius, 1996; Pascual et al., 2001; Kunle et al., 2003). Diferentes formas de utilização do óleo atribuem ao gênero grande importância econômica (Salimena, 2002). Muitas espécies possuem propriedades medicinais já comprovadas (Pascual et al., 2001; Di Stasi & Hiruma-Lima, 2002). O gênero apresenta um perfil consistente de composição química,

atividade farmacológica e usos populares, sendo utilizadas principalmente as folhas e flores (Pascual, 2001).

A espécie de *Lippia* mais estudada quimicamente é *L. sidoides* (Di Stasi & Hiruma-Lima, 2002); já o maior número de referências sobre anatomia encontrado no gênero está relacionado à espécie *L. alba* (Corrêa, 1992; Ventrella, 2000; Castro, 2001; Tavares, 2003).

*Lippia filifolia* (Figs.1A-D), é endêmica na Cadeia do Espinhaço, em Minas Gerais. As plantas medem de 0,5 a 1 m de altura e, ocorrem na forma herbácea, arbustos ou semi-arbustos. Os ramos são aromáticos e lenhosos, mas, muito frágeis. O formato é tetragonal, com poucas ramificações restritas à porção superior. As folhas são filiformes, ternárias ou verticiladas, sésseis, subtetragonais-filiformes, inclinadas, aromáticas e com coloração verde-brilhante. As flores apresentam cálice piloso, bífido e pontiagudo, sendo a corola amarela ou laranja (Moldenke, 1965).

A região dos campos rupestres concentra o maior número de espécies de distribuição exclusiva, sendo a flora composta, principalmente, de elementos endêmicos tanto para gêneros quanto para espécies (Mendonça & Lins, 2000). Neste local, muitas espécies estão ameaçadas (Salimena-Pires, 1991) ou em vias de extinção, em razão da pequena área que ocupam e da forte ação antrópica e/ou do fogo (Mendonça & Lins, 2000).

*Lippia filifolia* Mart. & Schau. apresenta potencial no estabelecimento *in vitro*, com elevadas taxas de multiplicação (Peixoto et al., submetido), no entanto, apresenta sensibilidade às mudanças ambientais. A cultura de tecidos torna-se, assim, ferramenta de grande potencial na propagação e conservação de recursos genéticos, de modo especial, daquelas em vias de extinção. No entanto, as plantas cultivadas *in vitro* crescem em condições específicas, como elevadas concentrações de fonte de carbono no meio de cultura, baixas irradiâncias, limitada concentração de CO<sub>2</sub> na fase gasosa e alta umidade relativa (Galzy & Compan, 1992; Viña et al., 1999), resultando em baixo desempenho fotossintético. Informações sobre fotossíntese na cultura de tecidos e os efeitos de alterações das condições ambientais *in vitro* podem ser utilizadas na obtenção de plantas mais tolerantes à aclimação (Lee et al., 1985).



**Figura 1.** *Lippia filifolia* em condições de campo (A-B) e de casa de vegetação (C-D); aspecto geral da planta (A e C); detalhe da parte aérea (B) e da folha (D).

Os efeitos das variações nas condições que prevalecem no cultivo *in vitro*, em particular, a irradiância, podem ser utilizados para determinar condições de cultura *in vitro* otimizadas (Marks & Simpson, 1999). No entanto, poucos estudos têm sido conduzidos em culturas de *Lippia*, em resposta às diferentes condições *in vitro*.

Plantas cultivadas *in vitro*, freqüentemente, exibem peculiaridades no seu desenvolvimento anatômico, morfológico e fisiológico (Majada et al., 2000). A anatomia e a ultra-estrutura dessas plantas são, geralmente, diferentes daquelas crescidas em casa de vegetação ou de campo (Wetzstein et al., 1981). Em geral, apresentam-se pouco lignificadas, com células de paredes pouco espessadas, abundância de espaços intercelulares, sistema vascular pouco desenvolvido, e reduzida quantidade de tecidos de sustentação (Donnelly et al., 1985). Após sua transferência para casa de vegetação ou campo, mudanças substanciais na morfologia e na anatomia são observadas, sobretudo, nas características epidérmicas, no espessamento da folha, na diferenciação do mesofilo, no número e na estrutura dos cloroplastos (Pospíšilová et al., 1999). O órgão que melhor reflete as variações estruturais dos vegetais são as folhas, sendo o local de maior síntese de princípio ativo dentre as espécies estudadas do gênero *Lippia* (Corrêa, 1992; Ventrella, 2000; Castro, 2001; Tavares, 2003). Diante disso, a caracterização anatômica e histoquímica de *Lippia filifolia* cultivada *in vitro*, buscou subsidiar posteriores estudos comparativos da espécie em condições de campo e/ou casa de vegetação, verificando possíveis alterações estruturais e histoquímicas. Além disso, objetivou-se avaliar condições de irradiâncias associadas a reguladores de crescimento visando-se aumentar a sobrevivência das plantas no processo de aclimação.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CASTRO, D.M. *Efeito da variação sazonal, colheita selecionada e temperaturas de secagem sobre a produção de biomassa, rendimento e composição de óleos essenciais de folhas de **Lippia alba** (Mill.) N.E.Br.ex Britt. & Wilson (Verbenaceae)*. Botucatu: Tese de Doutorado em Agronomia, Universidade Estadual Paulista. 110 p., 2001.

CORRÊA, C.B.V. Contribuição ao estudo de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. ex Britt. & Wilson – erva cidreira. *Revista Brasileira de Farmácia*, 73(3):57-64, 1992.

CRAVEIRO, A.A.; ALENCAR, J.W.; MATOS, F.J.A.; ANDRADE, C.H.S.; MACHADO, M.I.L. Essential oils from Brazilian Verbenaceae genus *Lippia*. *Journal of Natural Products*, 44(5):598-901, 1981.

CRONQUIST, A. *The evolution and classification of flowering plants*. 2<sup>nd</sup> ed. New York: The New York Botanical Garden, 555 p., 1988.

DI STASI, L.C.; HIRUMA-LIMA, C.A. *Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica*. São Paulo: UNESP. (2<sup>a</sup> ed), 603 p., 2002.

DONNELLY, D.J.; VIDAVER, W.E.; LEE, K.Y. The anatomy of tissue cultured red raspberry prior to and after transfer to soil. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 4:43-50, 1985.

GALZY, R.; COMPAN, D. Remarks on mixotrophic and autotrophic carbon nutrition of *Vitis* plantlets cultured *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 31:239-244, 1992.

JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOGG, E.A.; STEVENS, P.F. *Plant systematics: a phylogenetic approach*. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc., 464 p., 1999.

KUNLE, O.; OKOGUN, J.; EGAMANA, E.; EMOJEVWE, E.; SHOK, E. Antimicrobial activity of various extracts and carvacrol from *Lippia multiflora* leaf extract. *Phytomedicine*, 10:59-61, 2003.

LEE, N.; WETZSTEIN, Y.; SOMMER, H.E. Effects of quantum flux density on photosynthesis and chloroplast ultrastructure in tissue-cultured plantlets and seedlings of *Liquidambar styraciflua* L. towards improved acclimatization and field survival. *Plant Physiology*, 78:637-641, 1985.

MAJADA, J.P.; TADEO, F.; FAL, M.A.; SÁNCHEZ-TAMÉS, R. Impact of culture vessel ventilation on the anatomy and morphology of micropropagated carnation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 63: 207-214, 2000.

MARKS, T. R.; SIMPSON, S. E. Effect of irradiance on shoot development *in vitro*. *Plant Growth Regulation*, 28:133-142, 1999.

MENDONÇA, M.P.; LINS, L.V. *Lista vermelha das espécies ameaçadas de extinção da flora de Minas gerais*. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, Fundação Zoo-Botânica de Belo Horizonte, 160 p., 2000.

MOLDENKE, H.N. Material towards a monograph of *Lippia* I. *Phytologia*, 12:6-71, 1965.

PASCUAL, M.E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; SÁNCHEZ MATA, D.; VILLAR, A. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *Journal of Ethnopharmacology*, 76:201-214, 2001.

PEIXOTO, P.H.P.; SALIMENA, F.R.G.; LEITE, M.N.; GARCIA, L.S.; PIERRE, P.M.O.; VICCINI, L.F. Micropropagação de *Lippia filifolia* Mart. & Schau. *Submetido*.

POSPÍŠILOVÁ, J.; TICHÁ, I.; KADLECEK, P.; HAISEL, D.; PLZÁKOVÁ, Š. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. *Biologia Plantarum* 42(4):481-497, 1999.

SALIMENA-PIRES, F.R. *Verbenaceae da Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil*. São Paulo: Dissertação de Mestrado em Botânica. Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo, 302 p., 1991.

SALIMENA, F.R.G. *Revisão taxonômica de **Lippia** L. sect. *Rhodolippia* Schauer (Verbenaceae)*. São Paulo: Tese de Doutorado. Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo, 2000.

SALIMENA, F.R.G. Novos sinônimos e tipificações em *Lippia* sect. *Rhodolippia* (Verbenaceae). *Darwiniana*, 40(1-4):121-125, 2002.

TAVARES, E.S. *Estudos integrados em **Lippia alba** (Mill.) N.E.Br. – uma planta de interesse econômico e medicinal*. Rio de Janeiro: Tese de Doutorado em Biotecnologia Vegetal, Universidade Federal do Rio de Janeiro. 160 p., 2003.

TERBLANCHÉ, F.C.; KORNELIUS, G. Essential oil constituents of the genus *Lippia* (Verbenaceae) – A literature review. *Journal of Essential Oil Research*, 8:471-85, 1996.

TRONCOSO N. Descripción de algunas espécies nuevas o críticas de *Lippia* de la flora argentina. *Darwiniana*, 10:69-89, 1952.

VENTRELLA, M.C. *Produção de folhas, óleo essencial e anatomia foliar quantitativa de **Lippia alba** (Mill.) N.E.Br. (Verbenaceae) em diferentes níveis de sombreamento e épocas de colheita*. Botucatu: Tese de Doutorado em Agronomia, Universidade Estadual Paulista. 86 p., 2000.

VIÑA, G. de la; PLIEGO-ALFARO, F.; DRISCOLL, S.P.; MITCHELL, V.J.; PARRY, M.A.; LAWLOR, W. Effects of CO<sub>2</sub> and sugars on photosynthesis and composition of avocado leaves grown *in vitro*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 37(7/8):587–595, 1999.

WETZSTEIN, H.Y.; SOMER, H.E.; BROWN, C.L. VINES, H.M. Anatomical changes in tissue cultured sweet gum leaves during hardening off period. *HortScience*, 16:290, 1981.

## CAPÍTULO I

EFEITO DE IRRADIÂNCIAS E DE FITORREGULADORES NO  
DESENVOLVIMENTO *in vitro* DE *Lippia filifolia* MART. & SCHAU.

## RESUMO

Segmentos apicais do caule de *Lippia filifolia* Mart. & Schau. foram cultivados em diferentes meios [MSO, MS + ANA (0,1 mg L<sup>-1</sup>), MS + BAP (0,5 mg L<sup>-1</sup>), MS + ANA (0,1 mg L<sup>-1</sup>) + BAP (0,5 mg L<sup>-1</sup>)] e submetidos a três níveis de irradiância (40, 104 e 172  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Após 30 dias de cultivo, foram avaliadas as influências dos níveis de irradiância e dos meios de cultivo no desenvolvimento da planta. As características concentração de carotenóides, crescimento em altura, número de brotações e área foliar apresentaram interação significativa entre os fatores níveis de irradiância e meios de cultivo. Os pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*, clorofila *b* e clorofilas totais) foram influenciados somente pelo fator irradiância, diminuindo a concentração de acordo com o aumento da irradiância. O fator meio de cultivo influenciou o número e tamanho das raízes, peso de matéria fresca da parte aérea e a concentração de antocianinas. Não houve interação para as características peso de matéria fresca e seca do sistema radicular e peso de matéria seca da parte aérea, no entanto, os fatores irradiância e meio de cultivo, quando analisados isoladamente, foram significativos para tais características. As condições a que foram submetidas, no determinado período de tempo, induziram diferenças na fisiologia e no desenvolvimento da planta. Considerando as variações específicas para cada meio de cultivo, os explantes apresentaram maior uniformidade na irradiância 104  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . As folhas de *L. filifolia* apresentaram alteração na cor sob irradiância 172  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . A pequena variação na concentração de antocianinas indica que os níveis de irradiância utilizados para o cultivo de *L. filifolia* não induziram condição de estresse para a espécie.

## INTRODUÇÃO

O gênero *Lippia* (Verbenaceae) compreende cerca de 200 espécies (Terblanché & Kornelius, 1996) e está amplamente distribuído nos neotrópicos (Salimena-Pires & Giuliatti, 1998). Possui grande importância econômica devido aos diferentes usos dos óleos essenciais (Salimena, 2002). No Brasil ocorre, especialmente, nos campos rupestres e cerrados (Salimena, 2000). O principal centro de diversidade no Brasil é a Cadeia do Espinhaço, em Minas Gerais, e a Chapada Diamantina, na Bahia, com algumas espécies ocorrendo também em Goiás (Salimena-Pires, 1991). *Lippia filifolia* Mart. & Schau. é uma espécie endêmica na Cadeia do Espinhaço, local onde muitas espécies estão ameaçadas ou em vias de extinção (Salimena-Pires, 1991; Mendonça & Lins, 2000).

As técnicas de cultura de tecidos *in vitro* se constituem num instrumento importante em várias áreas da biologia, criando oportunidades para compreender, utilizar e conservar recursos genéticos de plantas (Withers & Williams, 1998). Essa importante ferramenta vem sendo utilizada com sucesso na propagação em larga escala de duas espécies do gênero: *L. junelliana* (Juliani et al., 1999) e *L. alba* (Gupta et al., 2000). O recente estabelecimento de protocolos para propagação de *L. filifolia*, com elevadas taxas de multiplicação, representa importante contribuição para a preservação, manutenção e multiplicação em larga escala de plantas endêmicas e ameaçadas de extinção da Cadeia do Espinhaço (Peixoto et al., submetido). O desenvolvimento *in vitro* possibilita investigar alguns aspectos fisiológicos da espécie quando submetidas a diferentes condições ambientais, sem comprometer sua ocorrência natural.

A autonomia de resposta de uma célula ou um tecido em expressar o seu potencial e formar um organismo completo, torna-se possível pela associação de fatores *in vitro*, como os meios nutritivos (Cozza et al., 1997) e fatores ambientais (Noé et al., 1997; Marks & Simpson, 1999; Svensson, 2000). A concentração e os tipos de reguladores de crescimento acrescidos no meio de cultura determinam o amplo sucesso da pesquisa na cultura de tecidos (Rout, 2000). Níveis de irradiância também influenciam o desenvolvimento das plantas *in vitro*, assim como a qualidade espectral e o fotoperíodo, sendo decisivos para o sucesso na obtenção de respostas morfogênicas desejadas (Hughes, 1981; Noé et al., 1997; Marks & Simpson, 1999; Svensson, 2000).

As células, os tecidos e as plântulas cultivadas *in vitro* não encontram condições lumínicas e concentração de CO<sub>2</sub> adequadas e, às vezes, não apresentam teores de clorofila suficientes para realizar fotossíntese que sustente o crescimento (Hughes, 1981; Lee et al., 1985; Caldas et al., 1998; Viña et al., 1999; Viña, 2001). Usualmente, crescem sob elevadas concentrações de fontes de carbono no meio de cultura, baixas irradiâncias, com limitada concentração de CO<sub>2</sub> na fase gasosa (Viña et al., 1999) e com alta umidade relativa (Galzy & Compan, 1992). A ação em conjunto desses fatores resulta em baixo desempenho fotossintético, que pode influenciar o crescimento e a morfogênese *in vitro* (Hughes, 1981). Nesse sentido, informações sobre fotossíntese na cultura de tecidos e os efeitos de alterações das condições ambientais *in vitro* podem ser utilizadas para o desenvolvimento de plantas melhor adaptadas para a sobrevivência à aclimação (Lee et al., 1985).

Em investigações fotomorfogênicas na cultura de tecidos, precauções devem ser tomadas para assegurar que a composição do meio sofra menores alterações, advindas de possíveis danos fotoquímicos aos componentes do meio pelas condições lumínicas (Hangarter & Stasinopoulos, 1991). No cultivo *in vitro* das espécies do gênero *Lippia*, valores distintos de irradiâncias foram utilizados na sala de cultura. *L. junelliana* foi mantida sob irradiância 50  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Juliani et al., 1999), *L. alba* mantida sob 60  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Gupta et al., 2000), ambas apresentando taxa superior a 90% de sobrevivência na aclimação, e *L. filifolia* mantida sob irradiância 35  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , sem referência da taxa de sobrevivência (Peixoto et al., submetido). Experimentos preliminares de cultivo *in vitro* de *L. filifolia*, sob irradiância 35  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , demonstraram que a

sensibilidade da espécie a modificações ambientais compromete sua sobrevivência no processo de aclimação. Os resultados obtidos em *L. junelliana* indicaram que a aclimação está relacionada com a aquisição do crescimento autotrófico com 100% de umidade relativa (Juliani et al., 1999). Diante disso, e buscando possíveis contribuições para mitigar o problema de aclimação e sobrevivência de *L. filifolia*, meios de composição semelhantes, incluindo os balanços de reguladores de crescimento, utilizados por Peixoto et al. (submetido), foram testados sob diferentes níveis de irradiância.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito dos níveis de irradiância e dos meios de cultivo, suplementados com diferentes reguladores de crescimento, no desenvolvimento de ápices caulinares de *L. filifolia*, obtendo informações para posteriores estudos de aclimação.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Obtenção do material vegetal

As plantas matrizes de *Lippia filifolia*, mantidas *in vitro*, foram procedentes do Departamento de Botânica, da Universidade Federal de Juiz de Fora – MG, sendo os propágulos provenientes de plantas coletadas na Cadeia do Espinhaço, em Minas Gerais. Essas plantas foram subcultivadas e mantidas no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCT II), no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), da UFV.

Os explantes, obtidos através de segmentos apicais do caule, com aproximadamente 1,5 cm, foram cultivados em um meio de cultura constituído pelos minerais nutrientes de MS (Murashige & Skoog, 1962), 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 10 mL L<sup>-1</sup> de vitamina B<sub>5</sub> (Gamborg et al., 1968). A este meio também se adicionaram diferentes concentrações de reguladores de crescimento: ANA - ácido  $\alpha$ -naftalenoacético - (0,1 mg L<sup>-1</sup>); BAP - 6-benzilaminopurina - (0,5 mg L<sup>-1</sup>); ANA + BAP (0,1 mg L<sup>-1</sup> + 0,5 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente). O pH foi ajustado a 5,7  $\pm$  0,1, antes da adição 4,9 g L<sup>-1</sup> de Agargel<sup>®</sup> (Sigma). Alíquotas de 10 mL foram distribuídas em tubos de ensaio (25 x 150 mm), fechados com tampa transparente de polipropileno e autoclavados a 121 °C e pressão de 1,5 kgf cm<sup>-2</sup>, durante 20 minutos.

Sob condições assépticas, foi inoculado um explante por tubo de ensaio, sendo as culturas mantidas em sala de crescimento com fotoperíodo de 16/8 h, temperatura de 25  $\pm$  2 °C e irradiância 36  $\mu$ mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, por quatro dias. Após esse período, os tubos foram redistribuídos nas grades, ocupando lóculos alternados, a uma distância aproximada de 3 cm uns dos outros, de modo a

evitar sombreamento nos tubos, e transferidos para sala de crescimento, do Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Fitotecnia, com fotoperíodo de 16/8 h, temperatura de  $26 \pm 2$  °C e irradiâncias de 40, 104, 172  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , por um período adicional de 30 dias.

Os tratamentos com níveis de irradiância foram instalados com a utilização de lâmpadas fluorescentes (OSRAM®, luz do dia, 40 W), sendo quantificadas por radiômetro (LI-COR, modelo LI-185B). Em cada prateleira foram estabelecidos os respectivos ambientes lumínicos: a) 40  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (1 lâmpada acesa); b) 104  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (3 lâmpadas acesas); 172  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (5 lâmpadas acesas). Todas as prateleiras foram isoladas nas laterais e na frente com folhas de isopor de 20 mm de espessura; sobre as lâmpadas colocou-se uma folha de papel alumínio, visando uma distribuição mais homogênea dos espectros luminosos. Para a manutenção da temperatura foram instalados *coolers* nas prateleiras, posicionados como aspiradores. Na parte superior e inferior da folha de isopor, posicionada à frente da prateleira, deixou-se uma abertura de 2 cm, buscando homogeneizar as condições de temperatura e umidade do ar, entre a sala de crescimento e o interior da estrutura montada. A avaliação foi realizada após 30 dias. O experimento foi sistematizado com três repetições.

### **Concentração dos pigmentos fotossintéticos**

A quantificação de clorofilas (*a*, *b* e totais) e de carotenóides foi realizada segundo metodologia de Hendry & Price (1993). Foram utilizadas, aproximadamente, três plantas por tratamento, com três repetições, sendo pesadas 300 mg de massa fresca da parte aérea das plantas (caules e folhas), macerados com acetona 80% e  $\text{CaCO}_3$ . O extrato foi filtrado diretamente no balão volumétrico, envolto por papel alumínio, e o resíduo no papel filtro foi lavado com acetona 80% até completar o volume do balão de 25 mL. As absorvâncias foram determinadas em espectrofotômetro (UV-VIS Micronal B582), nos comprimentos de onda 480, 645 e 663 nm, e as concentrações dos pigmentos determinadas segundo Hendry & Price (1993).

Para quantificação do teor de antocianinas, foram utilizadas, aproximadamente, oito plantas por tratamento para cada leitura, sendo processada toda a parte aérea das plantas (caules e folhas). Com três

repetições por tratamento. As antocianinas foram extraídas através da maceração de 1 g de massa fresca, em almofariz com areia lavada, em uma solução de etanol 95% e HCl 0,1 N, na proporção de 85:15 (v/v), respectivamente. O extrato foi filtrado diretamente no balão volumétrico e o resíduo no papel filtro foi lavado com a solução até completar o volume do balão de 25 mL. A absorvância foi determinada em espectrofotômetro (UV-VIS Micronal B582), no comprimento de onda 532 nm, e o teor de antocianina, determinado segundo a equação de Sakamura & Francis (1961):  $A = a \cdot b \cdot c$ , em que: A = absorvância a 532 nm; a = coeficiente de extinção molar (40.800 moles. $1^{-1}$ ); b = diâmetro da cubeta (1 cm); c = teor de antocianinas (moles. $1^{-1}$ ).

### **Crescimento e desenvolvimento das plantas**

Para verificar o desenvolvimento da planta, avaliou-se a altura e número de ramificações, o número e o comprimento de raízes, a presença de calos e as massas fresca e seca da parte aérea e do sistema radicular. Foram realizadas três repetições, sendo cada repetição constituída de cinco plantas, onde se obtiveram as médias das características observadas.

As plantas foram separadas, em parte aérea e sistema radicular, pesadas em balança analítica (Marte), acondicionadas em sacos de papel e levadas a estufa de secagem e esterilização (FANEM<sup>®</sup> mod. 320-SE) a 70 °C, por um período de 72 horas. Posteriormente, o material foi transferido para um dessecador onde permaneceu por 12 horas, para resfriamento, sendo então submetido à avaliação da massa seca.

Após a pesagem das plantas frescas, foram avaliadas as características de desenvolvimento. A altura da planta e o comprimento das raízes foram registrados com régua de precisão. Para pesagem de massa fresca e seca, nos meios acrescidos de reguladores que não induzem o enraizamento, considerou-se o calo como componente radicular para análise.

Para a determinação da área foliar, foram utilizadas três repetições, sendo cada repetição constituída de duas planta. As folhas totalmente expandidas foram retiradas a partir do segundo nó, tanto no sentido base-ápice, quanto ápice-base. Foram amostradas, em média, de 50 a 100 folhas por planta. Procedeu-se à colagem das folhas em folhas de papel A<sub>4</sub> com fita adesiva

transparente, seguida de escaneamento e posterior análise de imagens. A área foliar foi medida por meio do programa de análise de imagens *NIH Image*, versão 1.60, de domínio público, escrito por Wayne Rasband, do *U.S. National Institutes of Health*, acessado via Internet pelo código *Anonymous from zipp.nimh.nih.gov*.

### **Esquema experimental**

O experimento foi montado em blocos no tempo, com três repetições, em esquema fatorial 4 x 3 (níveis de irradiância x meios de cultivo), totalizando 12 tratamentos.

Os dados foram analisados nos programas estatísticos SAEG e GENES, e submetidos a testes de médias. Para avaliar o comportamento dos reguladores de crescimento (variável qualitativa), dentro de cada nível de irradiância, foi utilizado o teste de Dunnett ( $P < 0,05$ ). Na análise do comportamento das irradiâncias (variável quantitativa), dentro de cada meio de cultivo, foi utilizado o teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Concentração de pigmentos

As concentrações de clorofilas *a*, *b* e totais, por grama de massa fresca, não apresentaram interações significativas entre meios de cultivo e irradiâncias (Tabela 1). Quando avaliadas isoladamente, a produção dos referidos pigmentos não demonstrou significância a 5% entre as plantas cultivadas em meio MSO e MS suplementados com ANA (0,1 mg L<sup>-1</sup>), BAP (0,5 mg L<sup>-1</sup>) ou ANA + BAP (0,1 mg L<sup>-1</sup> e 0,5 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente) (Fig. 1). Os níveis de irradiância apresentaram diferenças significativas na concentração destas clorofilas (Tabela 1), se mantendo estável nas irradiâncias 40 e 104  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , e apresentando menores concentrações em 172  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Figs. 1A-D).

Quando *L. filifolia* foi submetida à irradiância de 172  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  a concentração de todas as clorofilas diminuiu, uma tendência esperada em decorrência da elevação da radiação fotossinteticamente ativa (PAR). Todavia, não foi observada necrose apical ou abscisão foliar no período de condução do experimento. Por outro lado, a razão clorofila *b/a* se manteve estável (5:1 em média) de acordo com o aumento nos níveis de irradiância. A aclimação fotossintética, em altas luminosidades, é consistentemente acompanhada pelo decréscimo da razão clorofila *b/a* (Anderson et al., 1995).

A razão fotossintética é inadequada em plantas micropropagadas e ocorre, usualmente, em menor magnitude do que em plantas crescidas em condições normais (Viña et al., 1999). As condições de crescimento *in vitro* parecem ser importantes parâmetros fotossintéticos na aclimação (Pospíšilová et al., 1999). Na cultura *in vitro*, observa-se baixa quantidade de

PAR, alta concentração de CO<sub>2</sub> e adição de fonte de carbono no meio de cultura (Moreira et al., 1999), fatores que reduzem o desempenho fotossintético (Viña et al., 1999), embora isso nem sempre seja observado (Lee et al., 1985). Em *Persea americana* (Lauraceae), os pigmentos fotossintéticos também foram influenciados pela irradiância, decrescendo a concentração de clorofila *a* e carotenóides, de acordo com o aumento da irradiância (Viña et al., 2001). Em maracujazeiro (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.), os maiores níveis de irradiância (100 e 150  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) promoveram considerável inativação do aparelho fotossintético, resultado da degradação dos pigmentos foliares e de danos ao aparato fotossintético (Alexandre, 2002).

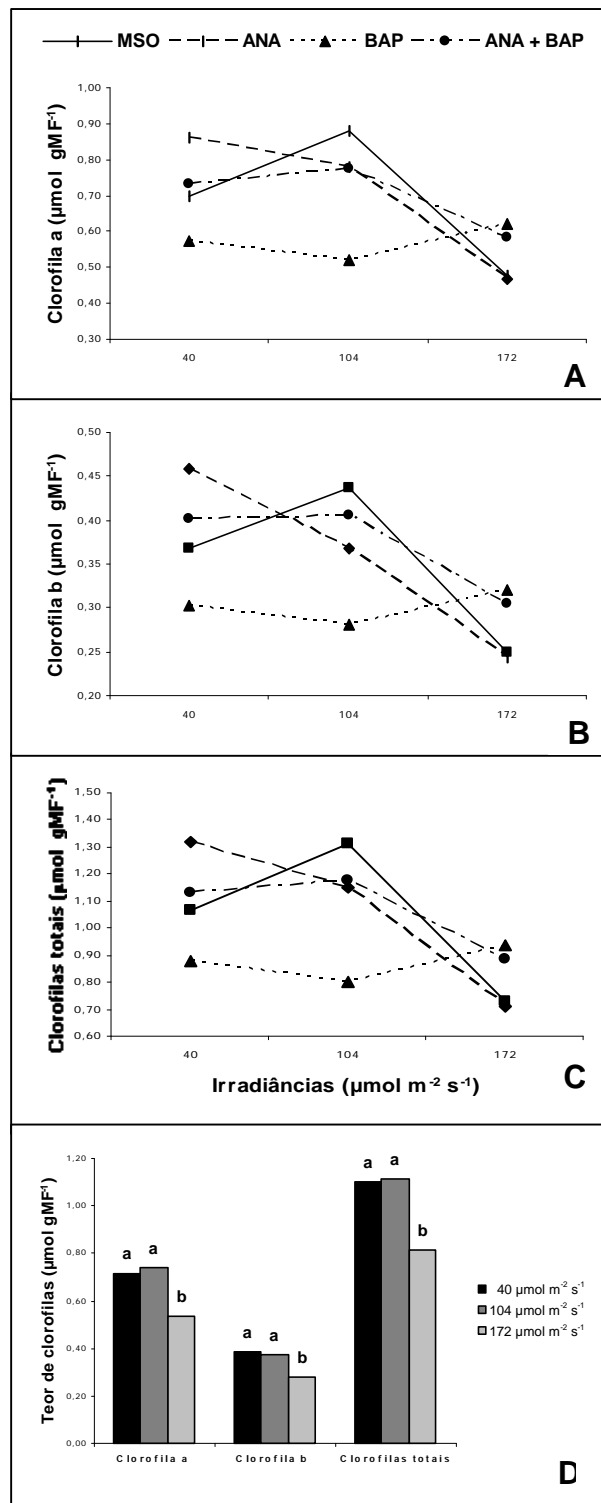
Tabela 1. Análise de variância da produção de clorofila *a* (CLa), clorofila *b* (CLb), clorofilas totais (CLt), carotenóides (CAR) e antocianinas (ANT), por grama de massa fresca, das plantas de *L. filifolia* cultivadas *in vitro* com suplemento de diferentes reguladores de crescimento e submetidas a três níveis de irradiância

Quadrados Médios						
FV	GL	CLa	CLb	CLt	CAR	ANT
Meios de cultivo	3	0,0349 <sup>NS</sup>	0,0081 <sup>NS</sup>	0,0612 <sup>NS</sup>	95,0170 <sup>NS</sup>	60,8656 <sup>**</sup>
Irradiâncias	2	0,1453 <sup>**</sup>	0,0390 <sup>**</sup>	0,2680 <sup>**</sup>	389,8923 <sup>**</sup>	2,8727 <sup>NS</sup>
Meios de cultivo X Irradiâncias	6	0,0476 <sup>NS</sup>	0,0112 <sup>NS</sup>	0,0838 <sup>NS</sup>	148,9234 <sup>*</sup>	2,6002 <sup>NS</sup>
Resíduo	22	0,0225	0,0055	0,0399	47,3743	5,7264
Média		0,66	0,35	0,91	39,32	13,79
C. V. (%)		22,60	21,48	22,07	17,50	17,36

<sup>\*\*</sup> e <sup>\*</sup> Significativo ao nível de 1% e 5 % de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

<sup>NS</sup> Não significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F.

Durante o crescimento *in vitro*, os tecidos fotossintéticos podem aclimatar-se de acordo com o ambiente. Essa aclimação se refere à mudanças bioquímicas, fisiológicas e morfológicas da planta em resposta às condições ambientais (Viña et al., 1999). Em *Liquidambar styraciflua* L. (Hamamelidaceae), o conteúdo de clorofila por área foliar foi significativamente maior em níveis menores de luz que em níveis maiores (Lee et al., 1985).

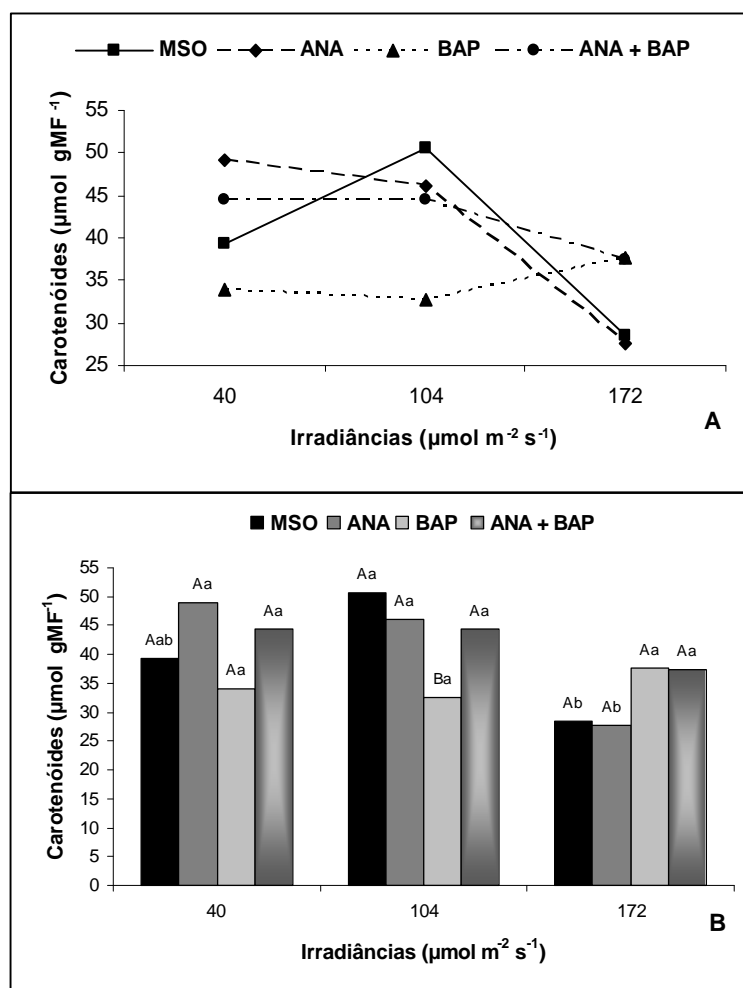


**Figura 1.** Produção de clorofila *a* (A), clorofila *b* (B) e clorofilas totais (C), (CLa, CLb e CLt, respectivamente), por grama de massa fresca, na parte aérea de *Lippia filifolia*, cultivada *in vitro* sob diferentes níveis de irradiância, em meio MSO (na ausência de reguladores de crescimento) e MS suplementado com ANA (0,1 mg L<sup>-1</sup>), BAP (0,5 mg L<sup>-1</sup>) ou ANA (0,1 mg L<sup>-1</sup>) + BAP (0,5 mg L<sup>-1</sup>). As médias seguidas de uma mesma letra, dentro de cada tipo de clorofila, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de significância (D).

Condições de cultivo *in vitro*, como alta umidade relativa, condicionam a planta regenerada a desenvolver uma estrutura morfológica deficiente das folhas, como reduzida formação de cera cuticular e epicuticular (Wetzstein et al., 1981), pobre desenvolvimento de *grana* (Wetzstein & Sommer, 1982) e baixa densidade de estômatos, comparada com plantas em campo (Cozza et al., 1997). Diferentes pré-tratamentos *in vitro* induziram, durante a aclimação de *Nicotiana tabacum* (Solanaceae), efeitos nos parâmetros fotossintéticos e nos pigmentos, demonstrando a importância do pré-tratamento para o crescimento *ex vitro* das plantas micropropagadas (Kaldlecek et al., 2001).

A interação entre irradiâncias e meios de cultivo foi significativa apenas para a concentração de carotenóides. Quanto aos níveis de irradiância, dentro de cada meio de cultivo, a maior concentração de carotenóides ocorreu na irradiância de  $104 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  no meio MSO, sofrendo redução em  $172 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Figs. 2A e B). No meio MS+ANA houve diminuição na concentração de carotenóides na irradiância de  $172 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . O meio MS+BAP diferiu significativamente de MSO, na irradiância de  $104 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , por manter a menor concentração de carotenóides, porém, em  $172 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , apesar das diferenças não significativas, este meio apresentou tendência de aumento na concentração de carotenóides (Figs. 2A e B). Os meios suplementados com BAP apresentaram, no ápice das ramificações, coloração violácea com o aumento da irradiância, no entanto, na região intermediária das ramificações, a porção mediana do limbo foliar variou, de um verde intenso a um verde pálido, representando início de clorose. Nos meios MSO e MS+ANA não se observou a coloração violácea e o início de clorose se deu de forma uniforme em todo o limbo e por toda a planta.

A absorção da radiação depende, em grande parte, da concentração do pigmento fotossinteticamente ativo, o qual, em condições de forte radiação, pode se tornar o fator limitante para o processo fotoquímico (Larcher, 2000). Os carotenóides são pigmentos acessórios que desempenham papel essencial na fotoproteção (Taiz & Zeiger, 2004). Com base na redução na concentração de carotenóides e na mudança de coloração no limbo foliar, pode-se afirmar que houve fotodestruição dos pigmentos foliares. A deficiência de clorofila pode ser reconhecida pela clorose e ocasiona considerável redução na intensidade fotossintética, podendo ser resultado de uma radiação muito forte ou muito



**Figura 2.** Produção de carotenóides (CAR), por grama de massa fresca, na parte aérea de *Lippia filifolia*, cultivada *in vitro* sob diferentes níveis de irradiância, em meio MSO (na ausência de reguladores de crescimento) e MS suplementado com ANA (0,1 mg L<sup>-1</sup>), BAP (0,5 mg L<sup>-1</sup>) ou ANA (0,1 mg L<sup>-1</sup>) + BAP (0,5 mg L<sup>-1</sup>) **(A)**. As médias seguidas da mesma letra maiúscula dentro de uma mesma irradiância não diferem do tratamento controle (MSO), pelo teste de Dunnett a 5% de significância. As médias seguidas de uma mesma letra minúscula entre o mesmo tratamento, em diferentes níveis de irradiância, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de significância **(B)**.

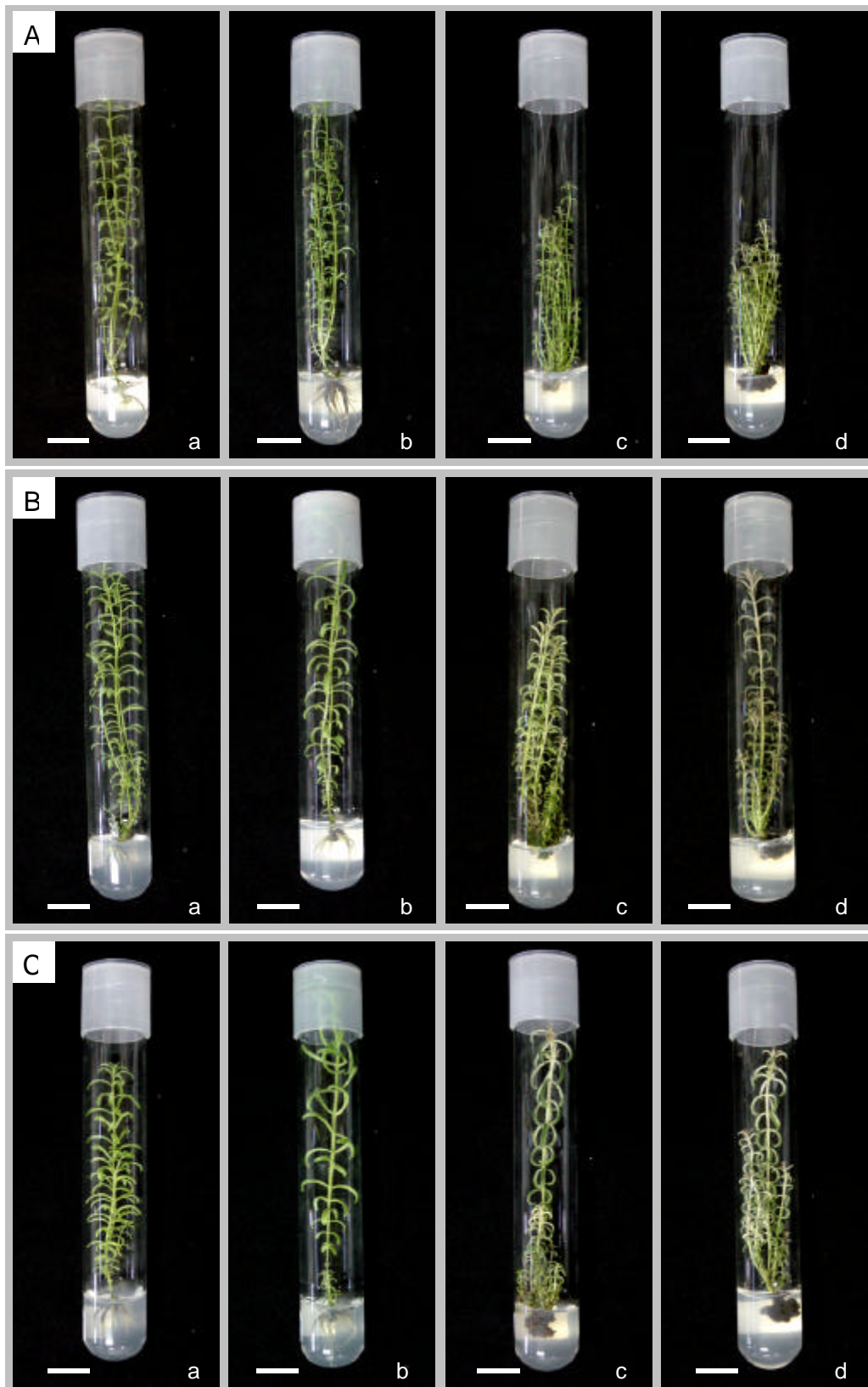
fraca (Larcher, 2000). As citocininas influenciam o movimento de nutrientes para as folhas a partir de outras partes da planta, e são reguladores naturais da senescência foliar. Sugere-se, também, que as citocininas associadas com outros fatores, tais como luz, nutrição e desenvolvimento, regulam a síntese dos pigmentos e proteínas fotossintéticas (Taiz & Zeiger, 2004), o que pode justificar a variação na coloração com aumento da irradiância, apenas na presença de citocinina, nos ápices das ramificações (Figs. 3 e 4).

A concentração de antocianinas não apresentou interação significativa, assim como os níveis de irradiância não apresentaram diferenças, quando avaliados isoladamente (Tabela 1). No fator meio de cultivo, os meios MS+ANA+BAP e MS+BAP diferiram de MSO, apresentando maior concentração de antocianinas (Figs. 5A e B).

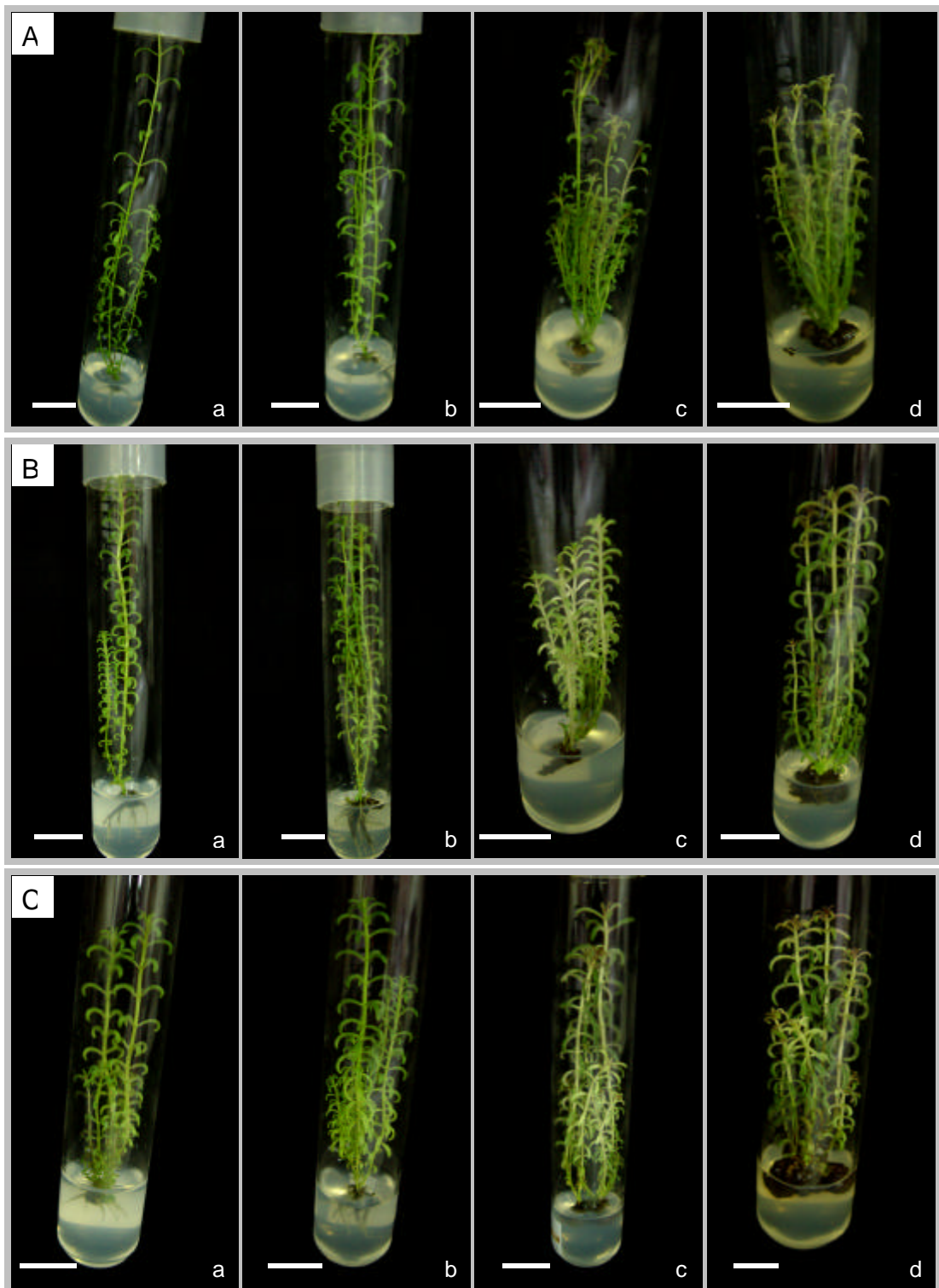
A antocianina, em folhas jovens não expandidas, age como um filtro opaco e protege o mesofilo; sob forte radiação aumenta a concentração de pigmentos de proteção no cloroplasto, como o caroteno e a luteína (Larcher, 2000). A maior quantidade de brotações e, conseqüentemente, de folhas jovens, apresentada pelas plantas cultivadas em meios suplementados com BAP (Fig. 3c-d e 4c-d), pode justificar a maior concentração de antocianinas nessas plantas.

Análise de antocianinas tem indicado que a fotoproteção pode ser um fator comum no requerimento para seu acúmulo (Close & Beadle, 2003). O padrão de desenvolvimento da acumulação de antocianinas pode se diferenciar de acordo com a estratégia de desenvolvimento de diferentes espécies de plantas, e tem como um de seus papéis a fotoproteção das plantas sob estresse ambiental (Steyn et al., 2002). Geralmente, a indução da síntese de antocianinas requer alta intensidade de luz, e os níveis de antocianinas nas plantas e em folhas individuais variam em relação aos níveis de exposição à luz (Mancinelli, 1983; Krol et al., 1995, citados por Steyn et al., 2002).

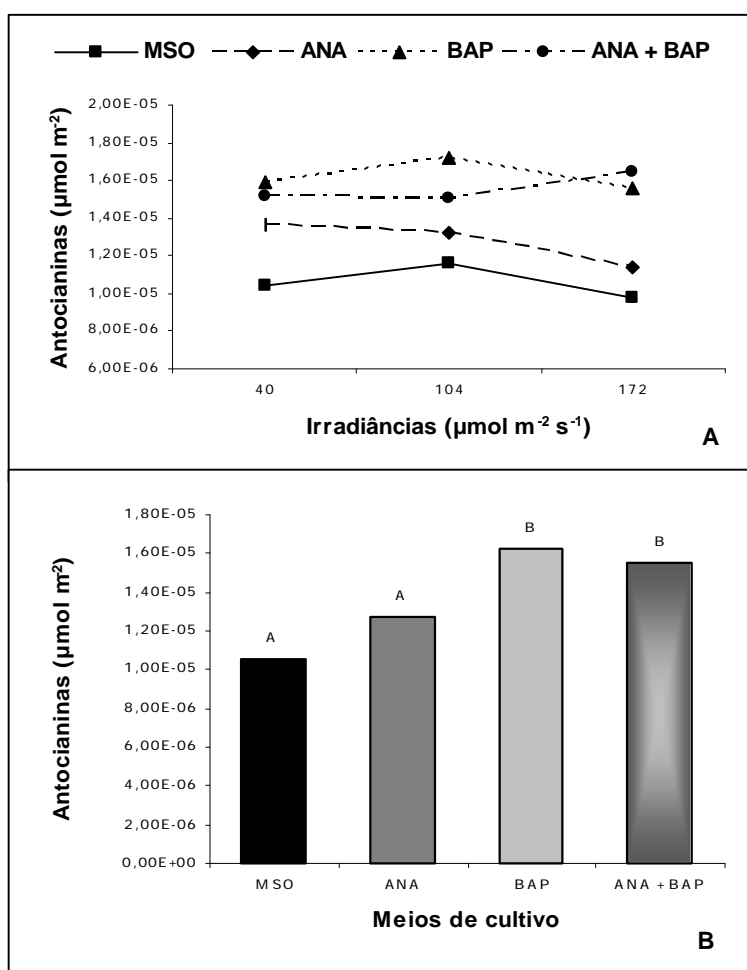
As variações nos níveis de irradiância alteraram a concentração dos pigmentos fotossintéticos, mas não influenciaram a biossíntese de antocianinas, demonstrando que as condições a que foram submetidas, pelo período de tempo do experimento, não induziram níveis de estresse extremo nas plantas. Embora, possivelmente, maiores irradiâncias ou maiores períodos de exposição poderiam afetar o desenvolvimento dos explantes de *L. filifolia*.



**Figura 3.** Ápices caulinares de *Lippia filifolia*, aos 30 dias, cultivados em meio MSO (a); e MS suplementado com ANA (0,1 mg L<sup>-1</sup>) (b), BAP (0,5 mg L<sup>-1</sup>) (c), ou ANA (0,1 mg L<sup>-1</sup>) + BAP (0,5 mg L<sup>-1</sup>) (d), em diferentes níveis de irradiâncias: 40  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (A); 104  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (B); 172  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (C). Barra = 15 mm.



**Figura 4.** Ápices caulinares de *Lippia filifolia*, aos 30 dias, cultivados em meio MSO **(a)**; e MS suplementado com ANA (0,1 mg L<sup>-1</sup>) **(b)**, BAP (0,5 mg L<sup>-1</sup>) **(c)**, ou ANA (0,1 mg L<sup>-1</sup>) + BAP (0,5 mg L<sup>-1</sup>) **(d)**, em diferentes níveis de irradiâncias: 40 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> **(A)**; 104 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> **(B)**; 172 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> **(C)**. Barra = 15 mm.



**Figura 5.** Produção de antocianinas (ANT) da parte aérea de *Lippia filifolia*, cultivada *in vitro* sob diferentes níveis de irradiância, em meio MSO (na ausência de reguladores de crescimento) e MS suplementado com ANA ( $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ ), BAP ( $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ ) ou ANA ( $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ ) + BAP ( $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ ) **(A)**. As médias seguidas da mesma letra maiúscula não diferem do tratamento controle (MSO), pelo teste de Dunnett a 5% de significância **(B)**.

## Crescimento e desenvolvimento

As análises de variância evidenciaram efeitos significativos a 5% na interação entre meios de cultivo e níveis de irradiância para as características de crescimento em altura, número de brotações e área foliar. Para características como peso de massa fresca e seca da parte aérea das plantas, a interação não foi significativa (Tabela 2).

Tabela 2 - Resultados da análise de variância das características de crescimento em altura (CRE), do número de brotações (NBR), da área foliar (ARF), do peso de massa fresca da parte aérea (MFA) e do peso de massa seca da parte aérea (MSA), das plantas de *Lippia filifolia* cultivadas *in vitro* com suplemento de diferentes reguladores de crescimento e submetidas a três níveis de irradiância

Quadrados Médios						
FV	GL	CRE	NBR	ARF	MFA	MSA
Meios de cultivo	3	24,6410 <sup>**</sup>	159,9198 <sup>**</sup>	66,8830 <sup>**</sup>	0,1384 <sup>**</sup>	0,0022 <sup>**</sup>
Irradiâncias	2	13,0496 <sup>**</sup>	55,1549 <sup>**</sup>	31,6257 <sup>**</sup>	0,0185 <sup>NS</sup>	0,0007 <sup>**</sup>
Meios de cultivo X Irradiâncias	6	5,8824 <sup>*</sup>	14,1727 <sup>*</sup>	6,1358 <sup>*</sup>	0,0040 <sup>NS</sup>	0,0002 <sup>NS</sup>
Resíduo	22	1,9831	4,1527	2,1599	0,0093	0,0001
Média		5,63	6,21	6,90	0,314	0,040
C. V.(%)		25,03	32,81	21,31	30,73	26,11

<sup>\*\*</sup> e <sup>\*</sup> Significativo ao nível de 1% e 5 % de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

<sup>NS</sup> Não significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F.

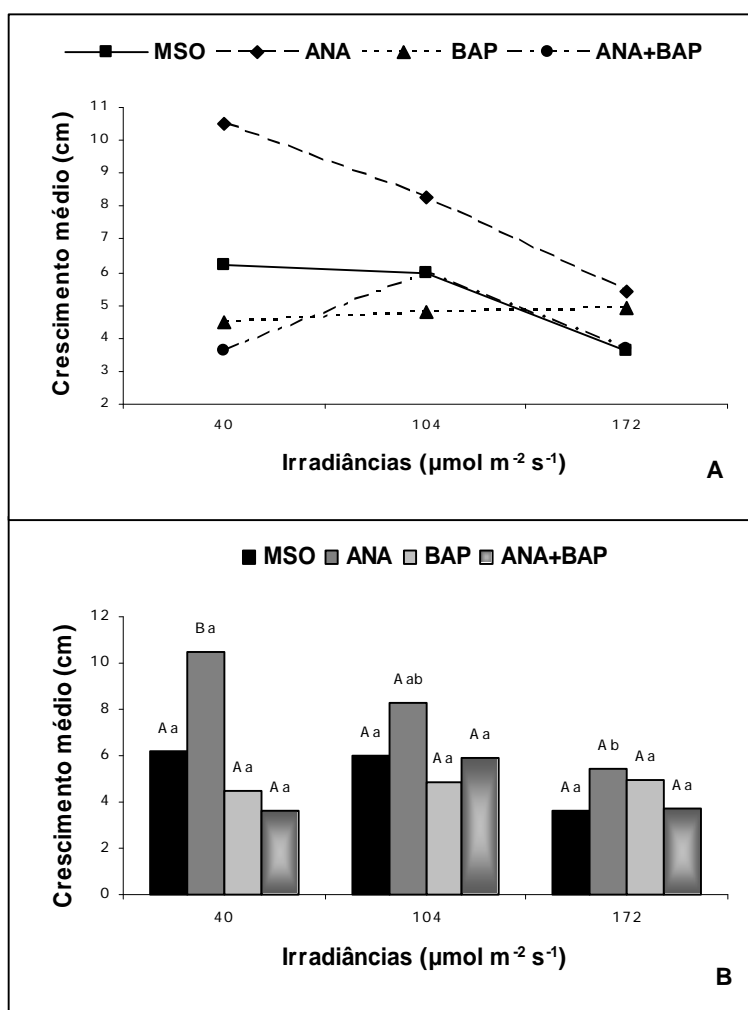
No parâmetro crescimento em altura, os níveis de irradiância dentro de cada meio de cultivo, observou-se que as plantas cultivadas em meio MS+ANA tiveram o crescimento reduzido, em resposta ao aumento da irradiância (Figs. 6A e B), diferindo significativamente entre as irradiâncias 40 e 172  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Nos demais meios de cultivo, as variações entre as irradiâncias não foram significativas. MSO também apresentou redução no crescimento em altura com o aumento da irradiância, sendo mais acentuada na irradiância 172  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Enquanto, MS+BAP apresentou uma discreta tendência em aumentar seu crescimento com o aumento na irradiância. As plantas cultivadas no meio MS+ANA+BAP apresentaram tendência de maior crescimento apenas na irradiância de 104  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , porém, não diferindo estatisticamente das

demais irradiâncias (Fig. 6B).

Os meios de cultivo em relação ao tratamento controle, dentro de cada nível de irradiância, apresentaram diferença significativa apenas com o MS+ANA na irradiância de  $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Fig. 6B), representando maior crescimento. Esse meio de cultivo representou a maior taxa de crescimento, tanto entre os meios quanto entre as irradiâncias. Os meios MS+BAP e MS+ANA+BAP não diferiram do MSO nas diferentes irradiâncias (Fig. 6B). As plantas cultivadas nesses meios apresentaram crescimento menor que o controle nos dois primeiros níveis de irradiância e maior no terceiro nível. Apenas na irradiância de  $104 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  as plantas do meio MS+BAP tiveram crescimento inferior às plantas do meio MS+ANA+BAP (Fig. 6B), no entanto, essas diferenças de crescimento não foram estatisticamente significativas.

O maior crescimento das plantas em MS+ANA pode ser justificado pela concentração de auxina presente no meio. Um dos efeitos fisiológicos da aplicação da auxina é o crescimento em comprimento de caules (Benincasa & Leite, 2002), a inibição no alongamento é, em geral, atribuída à biossíntese de etileno induzida por auxina (Taiz & Zeiger, 2004). A luz provoca uma diminuição do teor de auxina (Benincasa & Leite, 2002), até mesmo com o uso de auxina estável a luz, o crescimento foi fortemente reduzido por outras mudanças induzidas pela luz no meio (Hangarter & Stasinopoulos, 1991).

Em *Persea americana*, cultivado em meio sólido suplementado com BAP, o comprimento da ramificação principal também não apresentou diferenças significativas entre os diferentes níveis de irradiância (Viña et al., 2001). Em *Lippia filifolia* cultivada sob irradiância de  $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Peixoto et al., submetido) e em *L. junelliana* sob irradiância de  $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Juliani et al., 1999), foram observados valores médios mais elevados para altura de brotações, sempre na ausência de BAP, independente das concentrações de auxinas utilizadas. Em *Malus domestica* Borckh. (Rosaceae), dois clones (Smoothie e Reinders) submetidos ao maior nível de irradiância ( $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), obtiveram a maior média e comprimento de brotos totais sobre todos os tratamentos e clones (Noè et al., 1997). Em cultivares de *Rhododendron* (Ericaceae), *Disanthus* (Hamamelidaceae) e *Crataegus* (Rosaceae), o comprimento dos brotos axilares foi inibido, significativamente, de acordo com o aumento nos níveis de irradiância (Marks & Simpson, 1999).



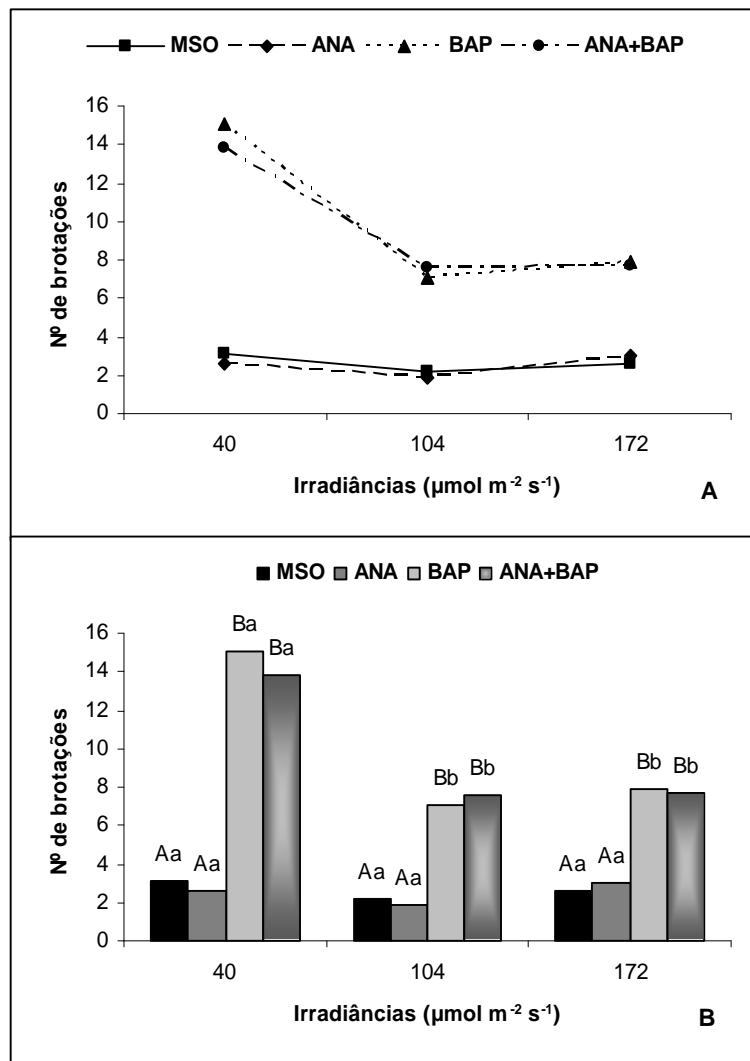
**Figura 6.** Crescimento em altura (CRE) de *Lippia filifolia*, cultivada *in vitro* sob diferentes níveis de irradiância, em meio MSO (na ausência de reguladores de crescimento) e MS suplementado com ANA (0,1 mg L<sup>-1</sup>), BAP (0,5 mg L<sup>-1</sup>) ou ANA (0,1 mg L<sup>-1</sup>) + BAP (0,5 mg L<sup>-1</sup>), **(A)**. As médias seguidas da mesma letra maiúscula dentro de uma mesma irradiância não diferem do tratamento controle (MSO), pelo teste de Dunnett a 5% de significância. As médias seguidas de uma mesma letra minúscula entre o mesmo tratamento em diferentes níveis de irradiância, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de significância **(B)**.

Quanto ao número de brotações (Figs. 7A e B), os níveis de irradiância, dentro de cada meio de cultivo, mostraram que as plantas cultivadas em MSO e MS+ANA apresentam menor número de brotações (Fig. 3a-b e 4a-b), mantendo o mesmo padrão entre as irradiâncias (Fig. 7A). As plantas cultivadas em MS+BAP e MS+ANA+BAP, apresentaram o maior número de brotações (Fig. 3a-b e 4a-b). Os meios contendo apenas BAP, ou associado a este, demonstraram redução no número de brotações de acordo com o aumento dos níveis de irradiância, sendo esta queda mais significativa na irradiância  $104 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , se estabilizando em  $172 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Fig. 7A).

Os meios de cultivo, em relação ao tratamento controle, dentro de cada nível de irradiância, apresentaram diferença significativa com MS+BAP e MS+ANA+BAP, em todos os níveis de irradiância (Fig. 7B), com os maiores números de brotações. O meio MS+ANA não diferiu do MSO (Fig. 7B).

A diferença no número de brotações está relacionada, principalmente, aos reguladores de crescimento nos meios de cultivo. O BAP, isolado ou em associação a outros reguladores, induz a formação de grandes números de brotos e alta taxa de multiplicação, em muitos sistemas de micropropagação (Hu & Wang, 1983, citados por Caldas et al., 1998), enquanto o crescimento das gemas laterais pode ser inibido pelas auxinas (Benincasa & Leite, 2002; Taiz & Zeiger, 2004). O aumento no número de proliferação de brotos por explante, com a presença de BAP no meio, confirma os resultados obtidos em *L. junelliana* (Juliani et al., 1999), *L. alba* (Gupta et al., 2000) e *L. filifolia* (Peixoto et al., submetido), demonstrando a importância da adição dessa citocinina para a multiplicação de brotações em espécies do gênero *Lippia*. Em meio suplementado com BAP e IBA, o número de brotos axilares mostrou um significativo decréscimo com o aumento da irradiância em cultivares de *Rhododendron*, enquanto em *Disanthus* e em *Crataegus*, o número desses brotos não foi afetado por mudanças na irradiância (Marks & Simpson, 1999).

Uma interação entre luz e BAP sugere que a indução do BAP na formação de brotos seja promovida por uma baixa resposta de energia de fitocromo (Baraldi et al., 1988 citados por George, 1993). A alteração na atividade de gemas axilares pode ser, provavelmente, causada pela interação entre composição espectral da luz e citocininas (Noè et al., 1997), o que pode justificar o decréscimo significativo no número de ramificações apenas nos



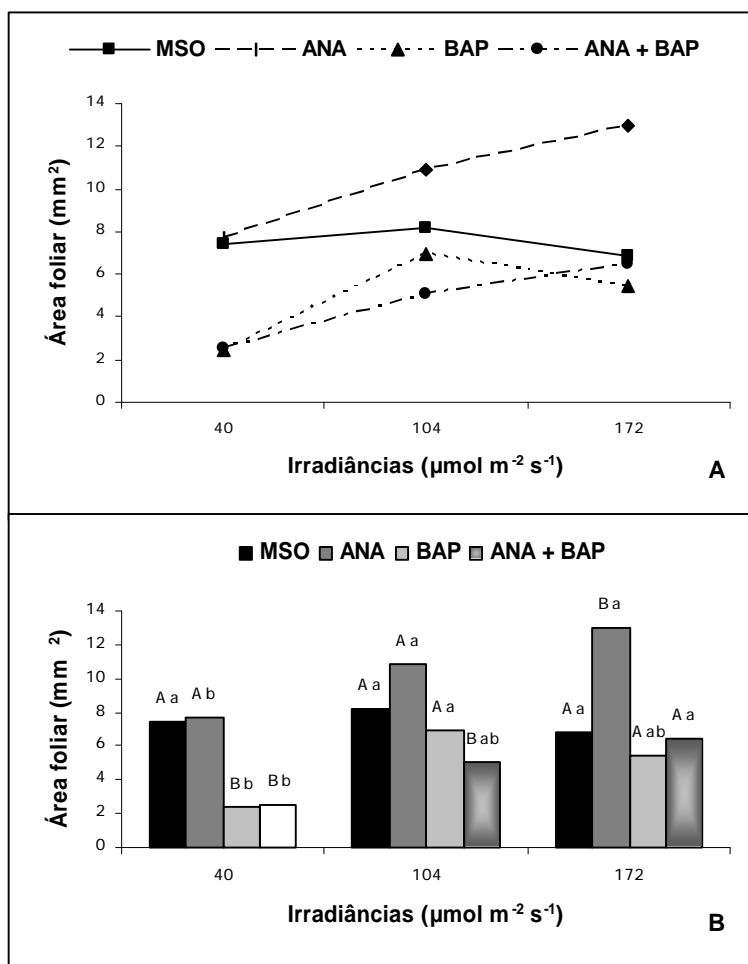
**Figura 7.** Número de brotações (NBR) em *Lippia filifolia*, cultivada *in vitro* sob diferentes níveis de irradiância, em meio MSO (na ausência de reguladores de crescimento) e MS suplementado com ANA ( $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ ), BAP ( $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ ) ou ANA ( $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ ) + BAP ( $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ ), **(A)**. As médias seguidas da mesma letra maiúscula dentro de uma mesma irradiância não diferem do tratamento controle (MSO), pelo teste de Dunnett a 5% de significância. As médias seguidas de uma mesma letra minúscula entre o mesmo tratamento em diferentes níveis de irradiância, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de significância **(B)**.

meios de cultivo suplementados com BAP.

Os níveis de irradiância, dentro de cada meio de cultivo, para o parâmetro área foliar (Figs. 8A e B), demonstraram que as plantas cultivadas em meio MSO não apresentaram diferenças entre os níveis de irradiância. No meio MS+ANA, o efeito foi crescente em resposta ao aumento da irradiância, sendo significativo entre o primeiro e segundo nível e se mantendo estável do segundo para o terceiro nível (Fig. 8A). O efeito crescente também foi observado no meio contendo ANA associado com BAP, porém, esse crescimento ocorreu de forma contínua e gradativa (Fig. 8A). No meio MS+BAP, ocorreu aumento significativo da área foliar entre as irradiâncias 40 e 104  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , sendo que em 172  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  o valor da área foliar não diferiu estatisticamente das demais irradiâncias (Fig. 8B).

Diferenças significativas foram observadas entre os meios de cultivo, nos níveis de irradiância (Fig. 8B). Na irradiância 40  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , apenas as plantas cultivadas em MS+ANA não diferiram do MSO, apresentando área foliar superior às cultivadas em MS+BAP e MS+ANA+BAP (Fig. 8B). Na irradiância 104  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , apenas as plantas cultivadas em MS+ANA+BAP diferiram estatisticamente, apresentando a menor área foliar (Fig. 8B). Na irradiância 172  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , apenas as plantas cultivadas em MS+ANA diferiram, apresentando área foliar superior (Fig. 8B). Enquanto as plantas cultivadas em meio MS e MS+ANA apresentaram maior área foliar (Fig. 3a-b e 4a-b), as plantas cultivadas em meio MS+BAP e MS+ANA+BAP tiveram o maior número de folhas (Fig. 3c-d e 4c-d).

Em plantas submetidas a diferentes níveis de radiação solar, a modificação na área foliar é resultante da influência da luz no processo de expansão celular. Entretanto, em alguns casos, a radiação solar pode alterar, também, o padrão de divisão celular, aumentando ou diminuindo o número final de células da folha (Friend & Pomeroy, 1970; Schoch, 1972). O crescimento pela expansão celular é regulado por substâncias endógenas e pelo efeito dos fatores ambientais, principalmente, a irradiância. Substâncias como auxinas, giberelinas e brassinoesteróides induzem o alongamento de células ao longo do eixo vertical, enquanto citocininas e etileno promovem expansão das células ao longo do eixo horizontal (Shibaoka, 1994; Fukazawa et al., 2000).



**Figura 8.** Área foliar (ARF) de *Lippia filifolia*, cultivada *in vitro* sob diferentes níveis de irradiância, em meio MSO (na ausência de reguladores de crescimento) e MS suplementado com ANA (0,1 mg L<sup>-1</sup>), BAP (0,5 mg L<sup>-1</sup>) ou ANA (0,1 mg L<sup>-1</sup>) + BAP (0,5 mg L<sup>-1</sup>), **(A)**. As médias seguidas da mesma letra maiúscula dentro de uma mesma irradiância não diferem do tratamento controle (MSO), pelo teste de Dunnett a 5% de significância. As médias seguidas de uma mesma letra minúscula entre o mesmo tratamento em diferentes níveis de irradiância, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de significância **(B)**.

Em *L. filifolia* o aumento da área foliar associada ao aumento da irradiância pode indicar que as condições lumínicas tradicionalmente encontradas em salas de cultura ( $\pm 35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), estão sub-otimizadas ao desenvolvimento da espécie, sugerindo que maiores níveis de irradiância podem promover um crescimento mais acentuado.

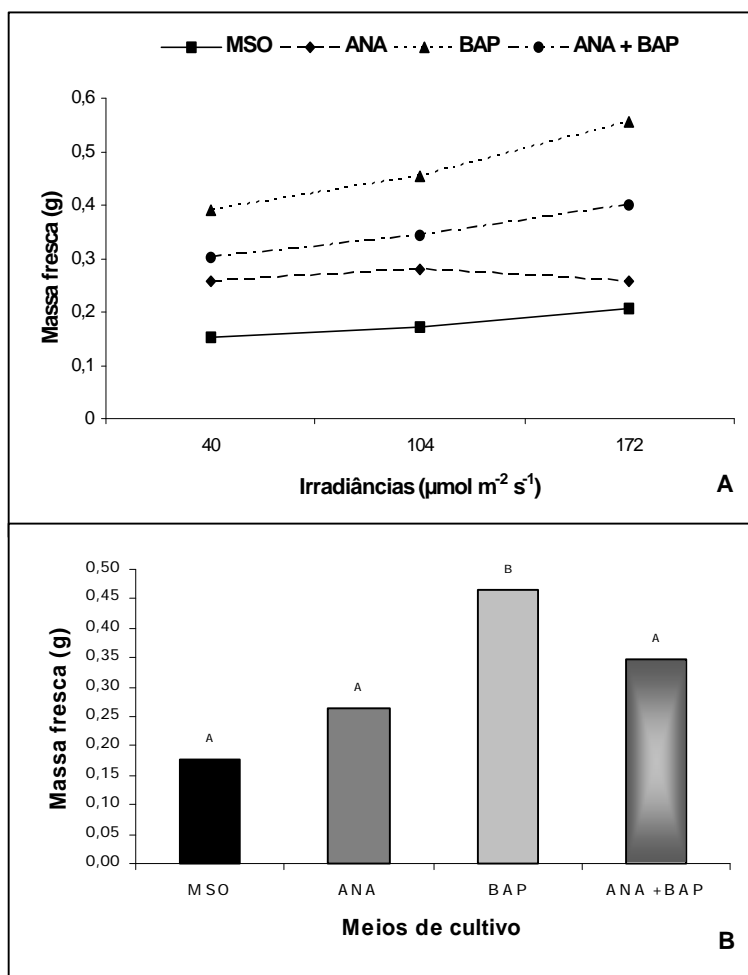
A folha é um órgão que apresenta grande variação na estrutura anatômica e morfológica (Morretes, 1969; Fahn, 1990). O incremento nos níveis de irradiância aumentou a área foliar em *Ceratonia siliqua* L. cultivada *in vitro* (Vinterhalter et al., 2001). Resultados similares também foram obtidos em *Nicotina tabacum*, com níveis mais altos de irradiância combinados com meio contendo 3% de sacarose (Kadlecek et al., 2001). Já em *Persea americana*, as irradiâncias não induziram diferenças na área foliar entre as plantas cultivadas no mesmo tipo de meio (Viña et al., 2001).

Ápices caulinares de maracujazeiros, cultivados em meio MS, contendo 3% de sacarose e incubadas na irradiância  $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , apresentaram menor número de folhas, maior valor de área foliar e folhas menos espessas, quando comparados com ápices cultivados sob menores concentrações de sacarose e níveis de irradiâncias elevados (Alexandre, 2002). Em *Arabidopsis*, maiores níveis de irradiância promoveram maior espessamento do mesofilo, em função, basicamente, da expansão periclinal do parênquima paliçádico (Pyke & Lopes-Juez, 1999). Plantas de *Nicotiana tabacum*, crescidas fotomixotroficamente (3% sacarose), sob alta irradiância ( $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), tiveram discreto espessamento foliar, bom desenvolvimento, camadas mais compactas de parênquima paliçádico e maior espessamento na epiderme da face adaxial que as plantas crescidas sob baixas irradiâncias ( $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ); para as plantas crescidas fotoautotroficamente (sem sacarose), os resultados foram contrários (Radochová et al., 2000). Nem todos os efeitos da luz no crescimento de determinadas espécies como *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae), *Lycopersicon esculentum* (Solanaceae) e *Daucus carota* (Apiaceae), podem ser atribuídos à mudanças fotoquímicas do meio de cultura, alguns desses efeitos são provavelmente efeitos diretos da luz na cultura de tecidos, mas esses efeitos parecem ser específicos de algumas espécies (Hangarter & Stasinopoulos, 1991).

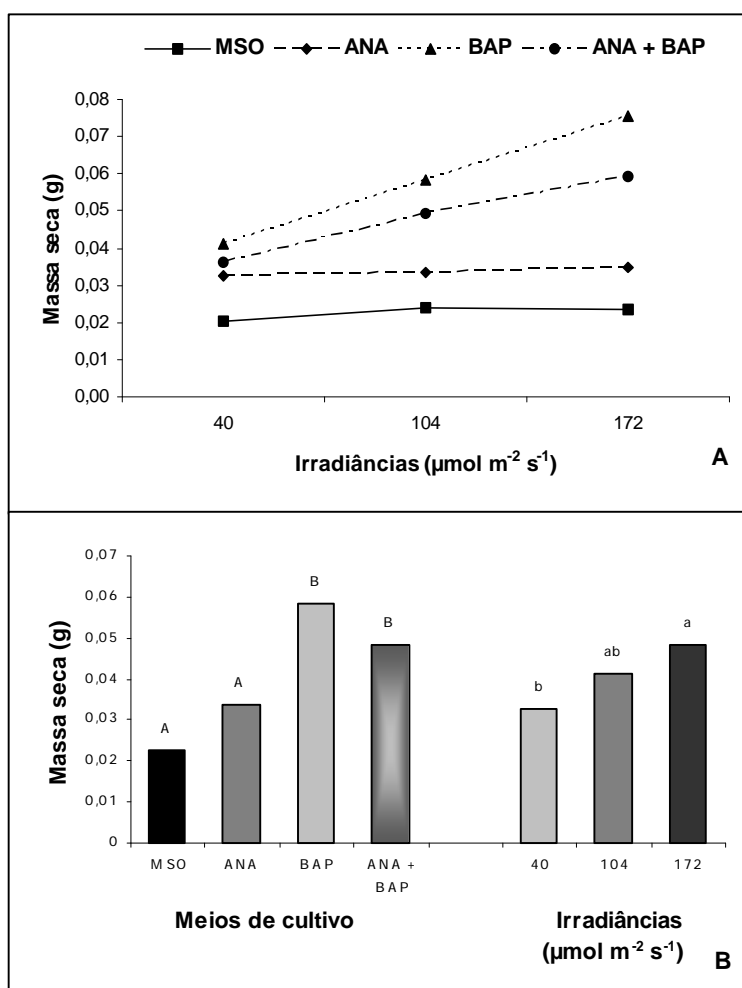
O peso de massa fresca da parte área da planta (MFA) não apresentou diferença significativa entre os níveis de irradiância (Tabela 2). No entanto, os meios de cultivo apresentaram efeito crescente no peso de acordo com o aumento da irradiância, com exceção de MS+ANA, que, na irradiância  $172 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , decresce (Fig. 9A). A estabilidade obtida no MFA, de acordo com o aumento da irradiância, pode ser devido ao balanço entre o aumento da área foliar e a diminuição de crescimento em altura, associada ao efeito da expansão celular e a diminuição de espaços intercelulares, estabelecendo assim a manutenção, entre os tratamentos, no peso da massa fresca em todos os níveis de irradiância.

A diferença entre os meios de cultivo foi significativa para MFA. As plantas cultivadas em MS+BAP foram as únicas que diferiram de MSO, possuindo o maior peso de massa fresca (Fig. 9B). O crescimento em altura e o número de brotações apresentaram resultados semelhantes, sugerindo que o balanço de reguladores na composição do meio, no caso, com a presença de BAP, induziu tais diferenças. Em *Malus domestica*, o aumento da irradiância proporcionou aumento significativo (70% e 95%) na produção de massa fresca em dois clones (Smoothee e Reinders, respectivamente) (Noè et al., 1997). Já em *Persea americana* o peso fresco total das plantas, cultivadas sobre diferentes condições do ambiente *in vitro*, não foi significativamente diferente (Viña et al., 1999), assim como o peso fresco foliar não diferiu entre as irradiâncias dentro de uma mesmo meio (Viña et al., 2001). O peso de massa fresca de *Disanthus* e *Crataegus* também não foi alterado por mudanças na irradiância (Marks & Simpson, 1999).

Avaliados isoladamente, tanto os meios de cultivo quanto os níveis de irradiância foram significativos para o parâmetro peso de massa seca da parte aérea (MSA) (Tabela 2). Dentre os níveis de irradiância, MSA foi crescente de acordo o aumento da irradiância (Fig. 10A), embora a  $104 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  a MFA não tenha diferido estatisticamente dos demais tratamentos (Fig. 10B), o maior crescimento ocorreu nas plantas cultivadas em meio MS+BAP e MS+ANA+BAP (Fig. 10A). Em *Persea americana*, a massa seca foliar não teve diferença significativa entre as irradiâncias ou entre os meios de cultivo (Viña et al., 2001). Em um cultivar de *Begonia X hiemalis*, o aumento na irradiância proporcionou incremento na formação de brotos, não sendo correlacionado



**Figura 9.** Peso de massa fresca da parte aérea (MFA) de *Lippia filifolia*, cultivada *in vitro* sob diferentes níveis de irradiância, em meio MSO (na ausência de reguladores de crescimento) e MS suplementado com ANA ( $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ ), BAP ( $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ ) ou ANA ( $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ ) + BAP ( $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ ), **(A)**. As médias seguidas da mesma letra não diferem do tratamento controle (MSO), pelo teste de Dunnett a 5% de significância **(B)**.



**Figura 10.** Peso de massa seca da parte aérea (MSA) de *Lippia filifolia*, cultivada *in vitro* sob diferentes níveis de irradiância, em meio MSO (na ausência de reguladores de crescimento) e MS suplementado com ANA ( $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ ), BAP ( $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ ) ou ANA ( $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ ) + BAP ( $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ ), **(A)**. As médias seguidas da mesma letra maiúscula, entre os meios de cultivo, não diferem do tratamento controle (MSO), pelo teste de Dunnett a 5% de significância. As médias seguidas de uma mesma letra minúscula, entre os níveis de irradiância, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de significância **(B)**.

com o aumento de massa seca; em duas outras cultivares, não foi verificado incremento na formação de brotos com o aumento da irradiância, porém a produção de biomassa aumentou (Welander, 1978, citado por Hughes, 1981). O total de massa seca em plantas de *Nicotiana tabacum*, transplantadas com sucesso para ambiente *ex vitro*, foi maior que plantas crescidas *in vitro* (Pospíšilová et al., 1999), praticamente dobrando, a razão de massa seca por área foliar, depois de quatro semanas, crescendo em ambiente aberto e sob irradiância natural (Kadlecek et al., 2001).

O meio MS+ANA não diferiu do meio MSO, ambos apresentaram valores estatísticos menores que os meios MS+BAP e MS+ANA+BAP, em relação a MSA (Fig. 10B). Os resultados, entre os meios de cultivos, seguiram a mesma disposição apresentada na análise do peso de massa fresca (Figs. 9B e 10B).

As análises de variância não evidenciaram efeitos significativos a 5% na interação entre meios de cultivo e níveis de irradiância para as características peso de massa fresca e seca da parte aérea e do sistema radicular, número e tamanho de raízes (Tabela 3).

Tabela 3. Resultados da análise de variância das características de número de raízes (NRZ), do tamanho das raízes (TRZ), do peso de massa fresca do sistema radicular (MFR) e do peso de massa seca do sistema radicular (MSR), das plantas de *Lippia filifolia* cultivadas *in vitro* com suplemento de diferentes reguladores de crescimento e submetidas a três níveis de irradiância

Quadrados Médios					
FV	GL	NRZ	TRZ	MFR	MSR
Meios de cultivo	3	93,0287 <sup>**</sup>	5,9043 <sup>**</sup>	0,2150 <sup>**</sup>	0,0024 <sup>**</sup>
Irradiâncias	2	0,5074 <sup>NS</sup>	0,1646 <sup>NS</sup>	0,0190 <sup>*</sup>	0,0002 <sup>*</sup>
Meios de cultivo X Irradiâncias	6	3,2497 <sup>NS</sup>	0,1057 <sup>NS</sup>	0,0113 <sup>NS</sup>	0,0001 <sup>NS</sup>
Resíduo	22	3,2497	0,0620	0,0051	0,0000
Média		2,78	0,67	0,191	0,022
C. V.(%)		52,80	37,01	37,37	30,86

<sup>\*\*</sup> e <sup>\*</sup> Significativo ao nível de 1% e 5 % de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

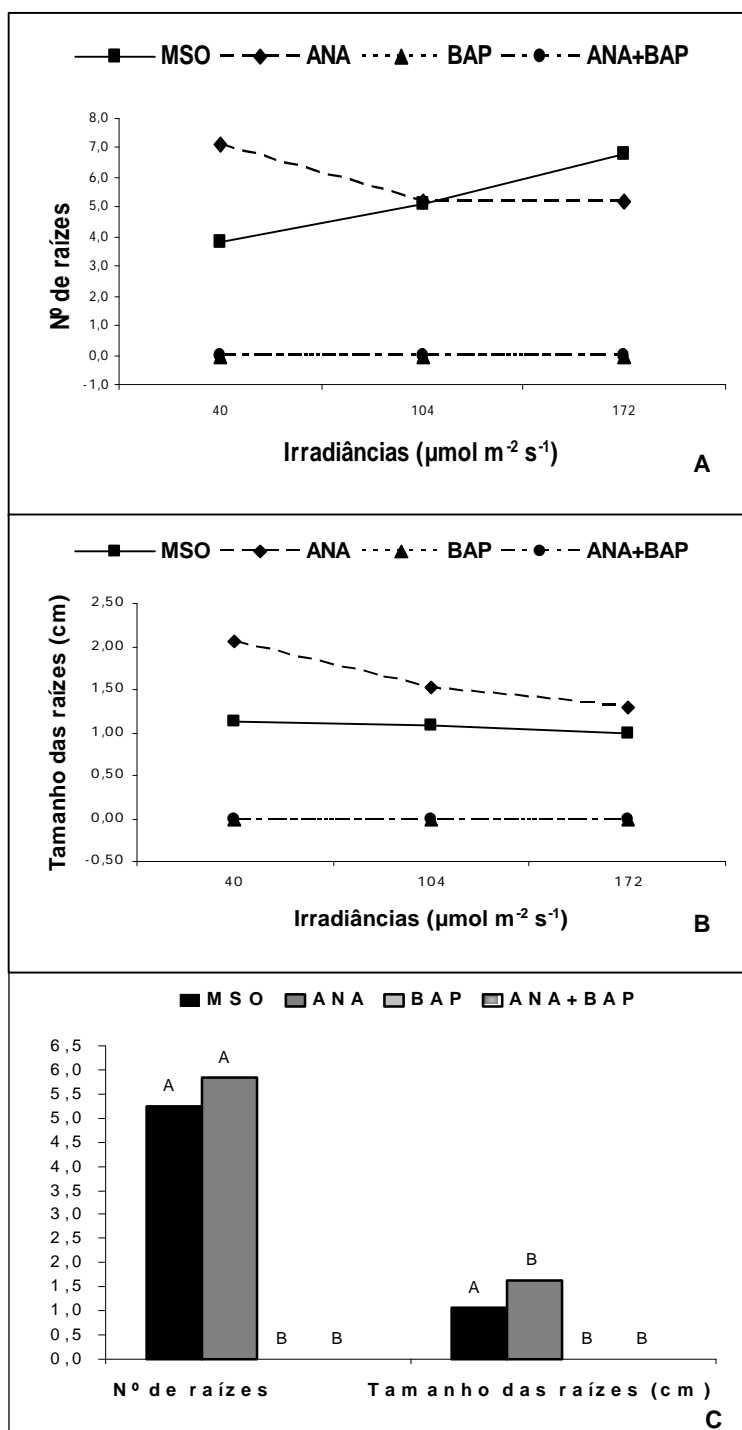
<sup>NS</sup> Não significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F.

O número e o tamanho de raízes não apresentaram diferença estatística entre os níveis de irradiância, apenas entre os meios de cultivo (Tabela 3). O número de raízes foi maior em MSO, de acordo com o aumento da irradiância, enquanto que MS+ANA, reduziu o número de raízes na irradiância  $104 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , mantendo-se estável na irradiância  $172 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Fig. 11A). Quanto ao tamanho das raízes, tanto em MSO como em MS+ANA, houve redução do tamanho das raízes de acordo com o aumento da irradiância, sendo mais significativo esse efeito em MS+ANA (Fig. 11B). Estímulos ambientais como a luz e a gravidade podem afetar a taxa de conjugação e liberação das auxinas; as auxinas ligadas, provavelmente, não estimulam o alongamento celular, podendo ter outras funções como proteção contra degradação oxidativa (Benincasa & Leite, 2002). Níveis de irradiância durante a multiplicação também afetaram o percentual de enraizamento em *Aristolochia manchuriensis* (Aristolochiaceae), sendo que a máxima percentagem de enraizamento foi obtida após dois períodos de subcultivos e posterior transferência das plantas para um nível de irradiância maior ( $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) (Svensson, 2000). Já em *Persea americana*, a irradiância não influenciou o número de raízes (Viña et al., 2001).

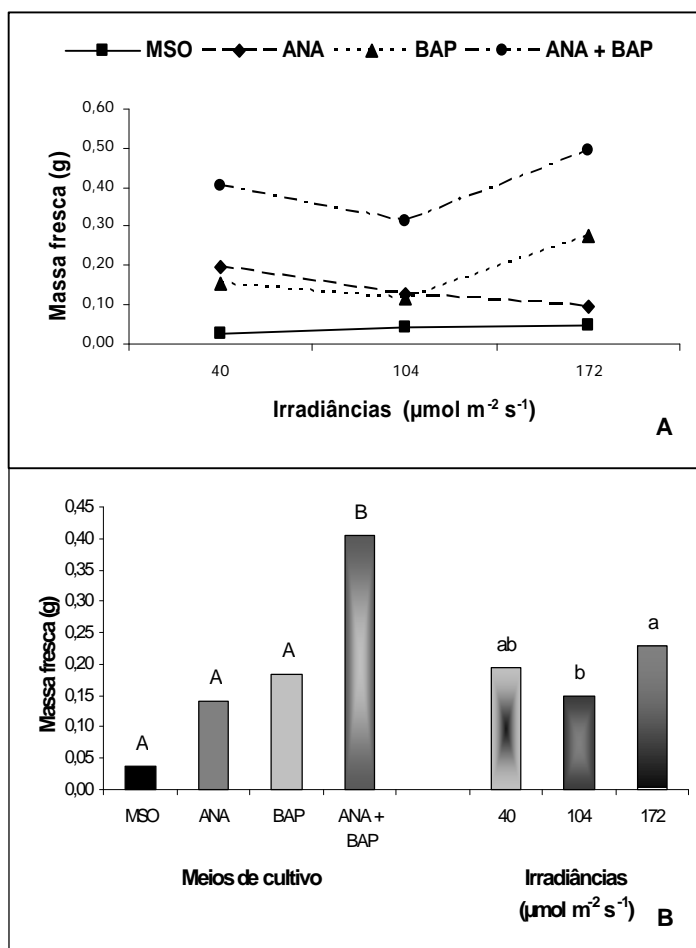
O meio MS+ANA não apresentou diferença quanto ao número de raízes, mas apresentou raízes mais longas que MSO (Fig. 11C). Nas plantas cultivadas com meios contendo BAP, não foi observada a presença de nenhuma raiz, apenas calos (Figs. 3c-d e 4c-d), diferindo assim de MSO quanto ao número e tamanho de raízes (Fig. 11C). Efeitos redutores, altamente significativos, dessa citocinina sobre a quantidade e alongamento de raízes em explantes de *L. filifolia*, também foram observados por Peixoto et al. (submetido).

Tanto o peso de massa fresca (MFR) quanto o peso de massa seca (MSR) do sistema radicular apresentaram diferenças significativas entre os níveis de irradiância e entre os meios de cultivo (Tabela 3). Nas plantas cultivadas em meio contendo BAP, considerou-se como sistema radicular, para avaliação dos parâmetros MFR e MSR, o calo formado na porção basal do explante em contato com o meio de cultivo.

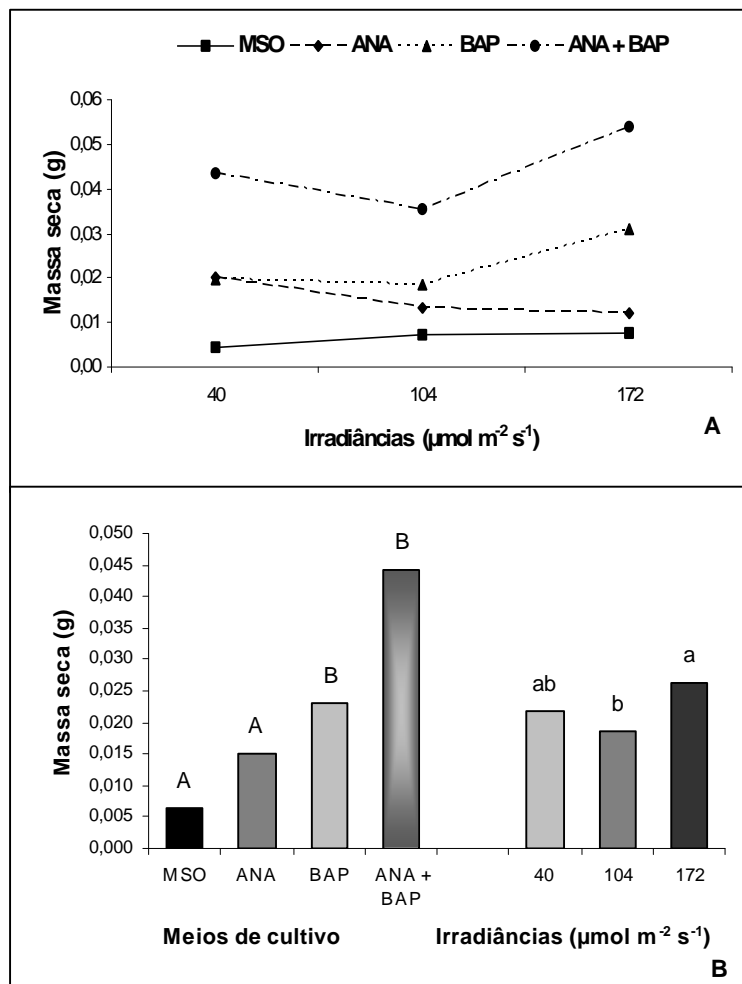
As plantas cultivadas nos diferentes meios apresentaram comportamento semelhante entre os níveis de irradiância para as características MFR e o MSR (Figs. 12 e 13). As plantas do meio MSO apresentaram crescimento moderado



**Figura 11.** Número (A) e tamanho (B) de raízes (NRZ e TRZ, respectivamente), de *Lippia filifolia*, cultivada *in vitro* sob diferentes níveis de irradiância, em meio MSO (na ausência de reguladores de crescimento) e MS suplementado com ANA ( $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ ), BAP ( $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ ) ou ANA ( $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ ) + BAP ( $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ ). As médias seguidas da mesma letra não diferem do tratamento controle (MSO), pelo teste de Dunnett a 5% de significância, dentro da mesma característica (C).



**Figura 12.** Peso de massa fresca do sistema radicular (MFR) de *Lippia filifolia*, cultivada *in vitro* sob diferentes níveis de irradiância, em meio MSO (na ausência de reguladores de crescimento) e MS suplementado com ANA (0,1 mg L<sup>-1</sup>), BAP (0,5 mg L<sup>-1</sup>) ou ANA (0,1 mg L<sup>-1</sup>) + BAP (0,5 mg L<sup>-1</sup>), **(A)**. As médias seguidas da mesma letra maiúscula, entre os meios de cultivo, não diferem do tratamento controle (MSO), pelo teste de Dunnett a 5% de significância. As médias seguidas de uma mesma letra minúscula, entre os níveis de irradiância, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de significância **(B)**.



**Figura 13.** Peso de massa seca do sistema radicular (MSR) de *Lippia filifolia*, cultivada *in vitro* sob diferentes níveis de irradiância, em meio MSO (na ausência de reguladores de crescimento) e MS suplementado com ANA (0,1 mg L<sup>-1</sup>), BAP (0,5 mg L<sup>-1</sup>) ou ANA (0,1 mg L<sup>-1</sup>) + BAP, (0,5 mg L<sup>-1</sup>), **(A)**. As médias seguidas da mesma letra maiúscula, entre os meios de cultivo, não diferem do tratamento controle (MSO), pelo teste de Dunnett a 5% de significância. As médias seguidas de uma mesma letra minúscula, entre os níveis de irradiância, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de significância **(B)**.

para MFR e MSR, de acordo com o aumento da irradiância. Já as do meio MS+ANA, apresentaram redução. Os meios contendo BAP apresentaram redução na irradiância  $104 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , e aumento acentuado em  $172 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Figs. 12A e 13A). Essas oscilações representaram diferença significativa para estas características entre as irradiâncias  $104 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e  $172 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Figs. 12A e 13A).

Para a característica MFR a diferença entre os meios de cultivo foi significativa somente entre os meios MSO e MS+ANA+BAP. Para MSR, os meios contendo BAP (MS+BAP e MS+ANA+BAP) diferiram estatisticamente de MSO; enquanto MSO apresentou o menor peso de massa fresca e seca, MS+ANA+BAP apresentou o maior peso (Figs. 12B e 13B).

Os meios contendo BAP induziram a formação de calos. BAP associado com ANA resultou na formação de calos maiores, quando comparados aos formados apenas em presença da citocinina. Calos na porção proximal de explantes nodais também foram observados em *L. alba*, na presença de BAP, sendo estes menores na adição de auxina (ANA) ao meio (Gupta et al., 2000). Calos também foram observados na presença de altas concentrações de duas auxinas, ANA ( $1 \mu\text{M}$ ) e AIB ( $0,8 \mu\text{M}$ ), em *L. junelliana* (Juliani et al., 1999).

Melhores respostas que as obtidas na propagação de *L. filifolia* em condições fotomixotróficas, talvez possam ser obtidas em propagação sob condições fotoautotróficas. Trabalhos futuros, que visem a determinação da capacidade fotossintética de cultura de *L. filifolia* sob diferentes irradiâncias, seriam importantes para melhor fundamentar a compreensão do comportamento *in vitro* em termos de características de crescimento e desenvolvimento. Esses parâmetros poderiam, ainda, ser associados à aclimação, visando o aumento da sobrevivência das plantas.

Os resultados obtidos demonstram que não houve comprometimento na sobrevivência de *L. filifolia*, durante o período da realização do experimento, demonstrando assim que o maior nível de irradiância ( $172 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), a que foram submetidas, é viável para demarcar o início de futuros experimentos que visem obter plantas com desenvolvimento mais próximo possível das condições encontradas no campo, podendo apresentar assim maior tolerância na etapa de transferência *ex vitro*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDRE, R.S. *Germinação in vitro e organogênese em explantes do maracujazeiro (Passiflora edulis f. flavicarpa Deg.) influenciada pela irradiância e sacarose*. Viçosa: Tese de Mestrado em Fitotecnia – UFV. 103 p., 2002.
- ANDERSON, J.M.; CHOW, W.S.; PARK, Y. I. The grand design of photosynthesis acclimation of the photosynthetic apparatus to environmental cues. *Photosynthesis Research*, 46:129-139, 1995.
- BENINCASA, M.M.P; LEITE, I.C. *Fisiologia Vegetal*. Jaboticabal: Funep, 168 p., 2002.
- CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios Nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa-CNPQ. (1ª ed.) 1:87-132 p., 1998.
- CLOSE, D.C.; BEADLE, C.L. The ecophysiology of foliar anthocyanin. *The Botanical Review*, 69(2):149-161, 2003.
- COZZA, R.; TURCO, D.; BATTI, C.B.; BITONTI, M.B. Influence of growth medium on mineral composition and leaf histology in micropropagated plantlets of *Olea europaea*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 51:215-223, 1997.
- FAHN, A. *Plant anatomy*. London: Butterworth-Heinemann, (4<sup>th</sup> ed.). 588 p., 1990.
- FRIEND, D.J.C.; POMEROY, M.E. Changes in cell size and number associated with the effects of light intensity and temperature on the leaf morphology of wheat. *Canadian Journal of Botany*, 48:85-90, 1970.

- FUKAZAWA, J.; SAKAI, T.; ISHIDA, S.; YAMAGUCHI, I.; KAMIYA, Y.; TAKAHASHI, Y. Repression of shoot growth, a bZIP transcriptional activation, regulates cell elongation by controlling the level of gibberellins. *Plant Cell*, 12:901-915, 2000.
- GALZY, R.; COMPAN, D. Remarks on mixotrophic and autotrophic carbon nutrition of *Vitis* plantlets cultured *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 31:239-244, 1992.
- GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50:151-158, 1968.
- GEORGE, E.F. *Plant propagation by tissue culture*. Part 1: The technology., London: Exegetics Limited, (2<sup>nd</sup> ed.), 574 p., 1993.
- GUPTA, S.K.; KHANUJA, S.P.S.; KUMAR, S. *In vitro* micropropagation of *Lippia alba*. *Current Science*, 81(2):206-210, 2000.
- HANGARTER, R.P.; STASINOPOULOS, T.C. Repression of plant tissue culture growth by light is caused by photochemical change in the culture medium. *Plant Science*, 79:253-257, 1991.
- HENDRY, G.A.F.; PRICE, A.H. Methods of comparative study anatomy: stress indicators – chlorophylls and carotenoids. In: HENDRY, G.A.F.; GRIME, K.P. *Methods in comparative plant ecology*. London: Chapman & Hall, 148-152, 1993.
- HUGHES, K.W. *In vitro* ecology: exogenous factors affecting growth and morphogenesis in plant culture systems. *Environmental and Experimental Botany*, 21(3/4):281-288, 1981.
- JULIANI, H.R.; KOROCH, A.R.; JULIANI, H.R.; TRIPPI, V.S. Micropropagation of *Lippia junelliana* (Mold.) Tronc. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 59:175-179, 1999.
- KADLECEK, P.; TICHÁ, I.; HASEL, D.; CAPKOVÁ, V.; SCHÄFER, C. Importance of *in vitro* pretreatment for *ex vitro* acclimatization and growth. *Plant Science*, 161:695-701, 2001.
- LARCHER, W. *Ecofisiologia Vegetal*. São Carlos: Rima Artes e Textos, 531 p., 2000.
- LEE, N.; WETZSTEIN, Y.; SOMMER, H.E. Effects of quantum flux density on photosynthesis and chloroplast ultrastructure in tissue-cultured plantlets and

- seedlings of *Liquidambar styraciflua* L. towards improved acclimatization and field survival. *Plant Physiology*, 78:637-641, 1985.
- MARKS, T. R.; SIMPSON, S. E. Effect of irradiance on shoot development *in vitro*. *Plant Growth Regulation*, 28:133-142, 1999.
- MENDONÇA, M.P.; LINS, L.V. *Lista vermelha das espécies ameaçadas de extinção da flora de Minas Gerais*. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, Fundação Zoo-Botânica de Belo Horizonte, 160 p., 2000.
- MOREIRA, F.M.; HARISCAIN-LAFITTE, P.; MARASCHIN, M; LIMA-DA-SILVA, A. Teor de clorofila em porta-enxertos de videira *in vitro* e em casa de vegetação. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 11(supl.):30, 1999.
- MORRETES, B.L. Contribuição ao estudo da anatomia das folhas do cerrado III. *Boletim da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras da Universidade de São Paulo 331, Botânica*, 24:7-32, 1969.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum.*, 15:473-497, 1962.
- NOÉ, N.; ECCHER, T.; BONINI, L. Effect of irradiance and spectral composition of radiation on *in vitro* shoot proliferation in *Malus domestica* Borkh. *Biologia Plantarum*, 39:491-497, 1997.
- PEIXOTO, P.H.P.; SALIMENA, F.R.G.; LEITE, M.N.; GARCIA, L.S.; PIERRE, P.M.O.; VICCINI, L.F. Micropropagação de *Lippia filifolia* Mart. & Schau. *Submetido*.
- POSPÍŠILOVÁ, J.; TICHÁ, I.; KADLECEK, P.; HASEL, D.; PLZÁKOVÁ, Š. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. *Biologia Plantarum* 42(4):481-497, 1999.
- PYKE, K.; LÓPEZ-JUEZ, E. Cellular differentiation and leaf morphogenesis in *Arabidopsis*. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 18(4):527-546, 1999.
- RADOCHOVÁ, B.; VICÁNKOVÁ, A.; KUTÍK, J.; TICHÁ, I. Leaf structure of tobacco *in vitro* grown plantlets as affected by saccharose and irradiance. *Biologia Plantarum*, 43(4):633-636, 2000.
- ROUT, G. R.; SAMANTARY, S.; DAS, P. *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants. *Biotechnology Advances*, 18:91-120, 2000.

SALIMENA-PIRES, F.R. *Verbenaceae da Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil*. São Paulo: Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo, 302p.,1991.

SALIMENA, F.R.G. *Revisão taxonômica de Lippia L. sect. Rhodolippia Schauer (Verbenaceae)*. São Paulo: Tese de Doutorado. Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo, 2000.

SALIMENA, F.R.G. Novos sinônimos e tipificações em *Lippia* sect. *Rhodolippia* (Verbenaceae). *Darwiniana*, 40(1-4):121-125, 2002.

SALIMENA-PIRES, F.R.; GIULIETTI, A.M. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: Verbenaceae. *Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo*, 17:155-186, 1998.

SAKAMURA, S.; FRANCIS, F.J. The anthocyanins of the cranberry. *Journal of Food Science*, 26:318-321, 1961.

SCHOCH, P.G. Effects of shading on structural characteristics of the leaf and yield of fruit in *Capsicum annuum* L. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 97(4):461-464, 1972.

SHIBAOKA, H. Plant hormone-induced changes in the orientation of cortical microtubules: alteration in the cross-linking between microtubules and the plasm membrane. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 45:527-544, 1994.

SVENSSON, M. Effect of irradiance level during *in vitro* propagation of *Aristolochia manchuriensis*. *Acta Horticulturae*, 530:403-408, 2000.

STEYN, W.J.; WAND, S.J.E.; HOLCROFT, D.M.; JACOBS, G. Anthocyanins in vegetative tissues: a proposed unified function in photoprotection. *New Phytologist*, 155:349-361, 2002.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*. Trad. SANTARÉM, E.R. et al. Porto Alegre: Artmed, 719 p., 2004.

TERBLANCHÉ, F.C.; KORNELIUS, G. Essential oil constituents of the genus *Lippia* (Verbenaceae) – A literature review. *Journal of Essential Oil Research*, 8:471-85, 1996.

VIÑA, G. de la; PLIEGO-ALFARO, F.; DRISCOLL, S.P.; MITCHELL, V.J.; PARRY, M.A.; LAWLOR, W. Effects of CO<sub>2</sub> and sugars on photosynthesis and

composition of avocado leaves grown *in vitro*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 37(7/8):587–595, 1999.

VIÑA, G. de la; BARCELÓ-MUNOZ, A.; PLIEGO-ALFARO, F. Effects of culture media and irradiance level on growth and morphology of *Persea americana* Mill. microcuttings. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 65:229-237, 2001.

VINTERHALTER, B.; VINTERHALTER, D.; NEŠKOVIC, M. Effect of irradiance, sugars and nitrogen on leaf size of *in vitro* grown *Cerotonia siliqua* L. *Biologia Plantarum*, 44(2):185-188, 2001.

WETZSTEIN, H.Y.; SOMER, H.E.; BROWN, C.L. VINES, H.M. Anatomical changes in tissue cultured sweet gum leaves during hardening off period. *HortScience*, 16:290, 1981.

WETZSTEIN, H.Y.; SOMER, H.E. Leaf anatomy of tissue-cultured *Liquidambar styraciflua* (Hamamelidaceae) during acclimatization. *American Journal of Botany*, 69:1579-1586, 1982.

WITHERS, L.A.; WILLIAMS, J.T. Conservação *in vitro* de recursos genéticos de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa-CNPQ. (1ª ed.) 1:183-260 p., 1998.

## CAPÍTULO II

ANATOMIA E HISTOQUÍMICA FOLIAR DE *Lippia filifolia* MART. & SCHAU.  
(VERBENACEAE) CULTIVADA *in vitro*

## RESUMO

Folhas de *Lippia filifolia* Mart. & Schau. (Verbenaceae), cultivadas *in vitro*, foram fixadas em glutaraldeído. Para análise em microscopia de luz, as amostras, foram incluídas em resina sintética, seccionadas (8  $\mu\text{m}$ ) e coradas com azul de toluidina pH 4,0. Para caracterização da superfície foliar ao microscópio eletrônico de varredura, as amostras foram processadas conforme metodologia usual. Avaliações histoquímicas foram conduzidas em material fresco, submetidos aos reagentes: lugol (amido), sudan IV (lipídios gerais), Nadi (terpenóides), Dragendorff (alcalóides), cloreto férrico (compostos fenólicos) e floroglucinol (lignina); e em amostras fixadas e incluídas em resina sintética, submetidas aos reagentes: xilidine Ponceau (proteínas totais), PAS (polissacarídeos gerais) e vermelho de rutênio (substâncias pécticas). As folhas apresentam epiderme unisseriada, são anfiestomáticas e possuem um grande número de apêndices epidérmicos em ambas as superfícies. Possuem tricomas tectores unicelulares com ornamentações verrucosas, e três tipos de tricomas glandulares: o tipo I, caracterizado por 1-2 células basais, pedículo de 2-3 células e uma cabeça secretora elíptica, constituída por 4-8 células; o tipo II, possui base e pedículo unicelular e cabeça bicelular globular; e o tipo III possui base, pedículo e cabeça esférica, todos unicelulares. O mesofilo é dorsiventral e, na nervura central, um único feixe vascular do tipo colateral, em forma de um arco, está imerso no parênquima fundamental. Os feixes vasculares de menor porte são colaterais e se encontram delimitados por uma bainha parênquimática. Os testes histoquímicos revelaram a presença de substâncias lipofílicas, especificamente óleo essencial e oleoresina, nos tricomas secretores e por todo o mesofilo. Sugere-se a presença de proteínas

na substância secretada pelos tricomas glandulares, e de polissacarídeos nos tricomas glandulares do tipo II. As reações para detectar alcalóides, compostos fenólicos, amido e lignina foram negativas. O óleo essencial, comumente encontrado no gênero *Lippia*, foi o produto de secreção mais abundante encontrado. Características como cutícula delgada, grandes espaços intercelulares e ausência de tecidos de sustentação, provavelmente, estão associadas ao ambiente de cultivo, por se tratar de uma espécie endêmica de campo rupestre. No entanto, estudos complementares são necessários para se avaliar as condições *ex vitro*.

## INTRODUÇÃO

A família Verbenaceae inclui, segundo Cronquist (1988), aproximadamente, 2.600 espécies, reunidas em 100 gêneros com distribuição pantropical; já, segundo Judd et al. (1999), são 1.035 espécies distribuídas em 36 gêneros. As Verbenaceae são comuns em solos arenosos e rochosos que formam grande parte do campo rupestre, destacando-se os gêneros *Lippia* e *Stachytarpheta*, pela ocorrência freqüente em grandes e vistosas populações (Mendonça & Lins, 2000). O gênero *Lippia* tem ampla distribuição, com espécies encontradas, principalmente, nas Américas Central e do Sul, do México até a Argentina (Troncoso, 1952), e na África Tropical (Terblanché & Kornelius, 1996). Compreende cerca de 200 espécies, muitas delas aromáticas, podendo ser herbáceas, subarbustivas ou arbóreas de pequeno porte (Terblanché & Kornelius, 1996; Pascual et al., 2001a). O Brasil se destaca pelo grande número de espécies, cerca de 150, com ocorrência, especialmente, nos campos rupestres e cerrados (Salimena, 2000).

O gênero *Lippia* possui grande importância econômica devido aos diferentes usos do óleo essencial, presentes em suas espécies, sendo muitas medicinais (Salimena, 2002), com propriedades comprovadas (Pascual et al., 2001a).

Diversos estudos em farmacognosia têm sido realizados com espécies de *Lippia*, no entanto, sua utilização não se restringe apenas a esta área. Extratos de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. são empregados além da farmacologia, na indústria cosmética (Zoghbi et al., 1998; Valle et al., 1999). Possui indicações na América do Sul e Central, e na África Tropical, para o tratamento de

distúrbios gastrointestinais, disenteria, resfriados, tosse, asma, como tranquilizante e antifúngico (Pascual *et al.*, 2001b). *L. junelliana* (Mold.) Tronc. possui propriedades medicinais especialmente para tratar dores abdominais (Juliani *et al.*, 2002). *L. turbinata* Griseb., *L. fissicalyx* Troncoso, *L. integrifolia* (Griseb.) Hieron. e *L. grisebachiana* Mold. são empregadas como calmante, digestivo, tônico, diurético, emenagogo e estomáquica (Bassols & Gurni, 2000). *L. dulcis* Trev. é utilizada, principalmente, para combater a tosse e a bronquite (Compadre *et al.*, 1986). *L. sidoides* Cham. é anti-séptica, antiinflamatória e cicatrizante, seus *extratos* são empregados como antimicrobiano, moluscicida e bactericida, e é usada também como tempero (Lorenzi & Matos, 2002). *L. multiflora* Mold. possui propriedades analgésica e antifebril (Abena *et al.*, 2003), aplicada no tratamento contra malária e hipertensão; seu óleo essencial, assim como o óleo de *L. chevalieri*, tem efeito bactericida (Bassole *et al.*, 2003).

Nos estudos farmacológicos realizados com espécies de *Lippia*, os terpenóides são os principais fitoquímicos observados e, nas partes aéreas, apresentam-se na forma de óleos essenciais (Kunle *et al.*, 2003). Ambos, estudos anatômicos e/ou fitoquímicos (Morretes, 1969; Corrêa, 1992; Gomes *et al.*, 1993; Bassols & Gurni, 2000; Juliani *et al.*, 2002; Abena *et al.*, 2003), se limitam à análise da folha, por ser o órgão que melhor reflete as variações estruturais dos vegetais, e o local de maior síntese do princípio ativo, sendo seu principal sítio, o parênquima clorofiliano.

A composição química dos metabólitos é relacionada com os seus diferentes sítios de produção. Os tricomas glandulares podem secretar diversas substâncias (Fahn, 1975), entre estas, os óleos essenciais, que são bastante comuns e ocorrem em gêneros de Verbenaceae, Lamiaceae, Solanaceae, Asteraceae e Geraniaceae (Metcalf & Chalk, 1950).

Tricomas tectores e secretores de óleos aromáticos se dispõem com maior ou menor densidade sobre a superfície das folhas de *L. alba* (Mill.) N.E.Br., de acordo com diversos fatores (Gomes *et al.*, 1993; Ventrella, 2000; Castro, 2001; Tavares, 2003), não havendo qualquer relato para *L. filifolia*.

A produção de óleo essencial pelos tricomas glandulares pode atuar na proteção da parte aérea da planta contra ataque de herbívoros e patógenos (Werker, 1993). Já a atividade biológica dos metabólitos secundários é de interesse para diversas indústrias (Duke, 1994). Portanto, conhecer a estrutura

dos tricomas, e estabelecer uma relação com a produção de princípios ativos, podem contribuir significativamente no auxílio e na manutenção de caracteres de interesse comercial, através de programas de melhoramento genético.

*Lippia filifolia* é endêmica na Cadeia do Espinhaço, em Minas Gerais, região onde muitas espécies estão ameaçadas (Salimena-Pires, 1991) ou em vias de extinção, em razão da pequena área que ocupam e da forte ação antrópica e/ou do fogo (Mendonça & Lins, 2000).

A espécie apresenta potencial no estabelecimento *in vitro*, com elevadas taxas de multiplicação (Peixoto et al., submetido). A cultura de tecidos torna-se, assim, uma importante ferramenta no auxílio de sua conservação e fornece suporte para realização de diversos estudos. As técnicas de cultivo *in vitro* são um instrumento importante na Biologia Vegetal, pelas oportunidades que se criaram para compreender, utilizar e conservar recursos genéticos de plantas (Withers & Williams, 1998). É crescente o número de trabalhos objetivando a propagação *in vitro* de plantas medicinais, e, ou a produção de compostos secundários (Rout et al., 2000). No entanto, as plantas cultivadas *in vitro* crescem em condições diferentes das plantas cultivadas *ex vitro* e, freqüentemente, exibem peculiaridades no seu desenvolvimento anatômico, morfológico e fisiológico (Majada et al., 2000).

O objetivo do presente trabalho foi caracterizar anatomicamente as folhas de *L. filifolia*, cultivadas *in vitro*, e identificar, por técnicas histoquímicas, as principais substâncias produzidas, acumuladas e/ou secretadas pelas folhas.

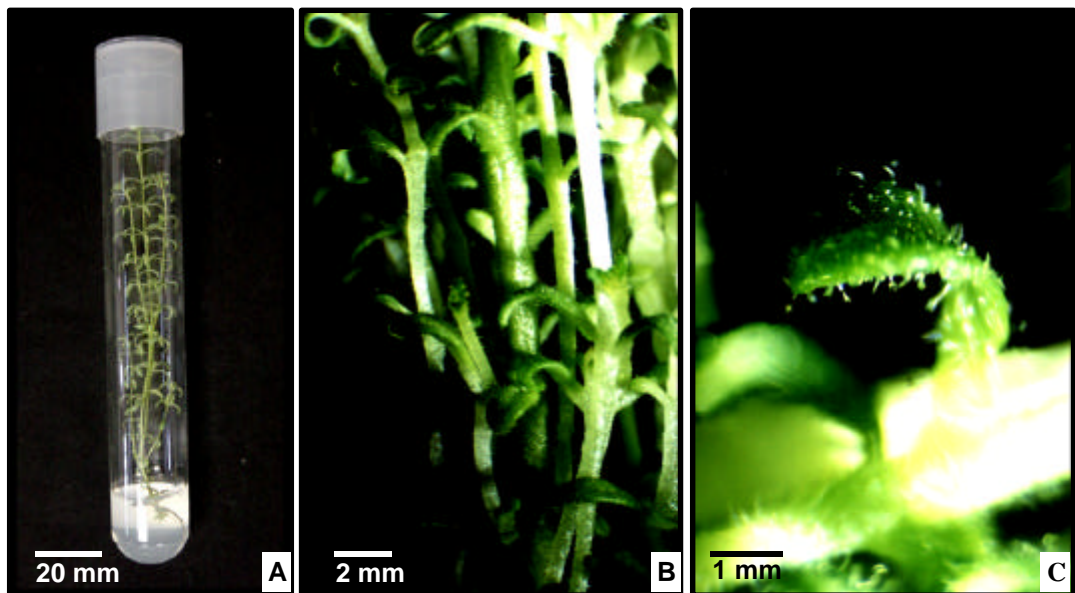
## MATERIAL E MÉTODOS

Plantas matrizes de *Lippia filifolia*, procedentes do Departamento de Botânica, da Universidade Federal de Juiz de Fora/MG, foram subcultivadas *in vitro* e mantidas no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCT II), no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO - UFV), em Viçosa, MG. As culturas *in vitro* foram estabelecidas a partir de propágulos provenientes de plantas coletadas na Cadeia do Espinhaço, Minas Gerais. As exsiccatas desta planta estão depositadas nos Herbário: VIC, registrada sob o número VIC 28679 na Universidade Federal de Viçosa (UFV); e CESJ, registrada sob o número CESJ 34740 na Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF).

### Material vegetal

Os explantes, obtidos através de gemas axilares, foram cultivados em meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), acrescido de vitamina B<sub>5</sub> (Gamborg et al., 1968), 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, não suplementado com reguladores de crescimento. O pH foi ajustado a 5,7 ± 0,1, antes da adição 4,9 g L<sup>-1</sup> de Agargel<sup>®</sup> (Sigma). Alíquotas de 10 mL foram distribuídas em tubos de ensaio (25 x 150 mm), fechados com tampa transparente de polipropileno e autoclavados a 121 °C e pressão de 1,5 kgf cm<sup>-2</sup>, durante 20 minutos.

Os explantes, após inoculação em câmara de fluxo laminar, foram transferidos para sala de crescimento no LCT II, com fotoperíodo de 16/8 h, temperatura de 25 ± 2 °C e irradiância 36 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Após quarenta e cinco dias, as folhas (Figs. 1A-C) foram coletadas para a caracterização anatômica e histoquímica no Laboratório de Anatomia Vegetal (UFV).



**Figura 1.** *Lippia filifolia* cultivada *in vitro*; **A** - planta acondicionada em tubo de ensaio; **B** – detalhe da parte aérea da planta; **C** - detalhe da folha, que apresenta grande número de tricomas.

## **Microscopia de luz**

Folhas totalmente expandidas, na região mediana do caule, foram coletadas para o preparo de lâminas permanentes e semipermanentes. As amostras utilizadas para o preparo das lâminas permanentes foram fixadas em solução de glutaraldeído (Karnovsky, 1965, modificado - 2,5% glutaraldeído, 4% de paraformaldeído, 3% de sacarose,  $\text{CaCl}_2$  5  $\mu\text{M}$  em tampão cacodilato 0,1 M pH 6,8), por 24 horas, tratadas com glicina 0,15 M por 12 horas, desidratadas em série etílica e incluídas em metacrilato (Historesin, Leica). Foram obtidos cortes transversais e longitudinais das amostras com 8  $\mu\text{m}$  de espessura, utilizando micrótomo rotativo de avanço automático (RM 2155 – Leica), equipado com navalha de aço descartável. As lâminas foram montadas em resina sintética (Permount).

Para o preparo de lâminas semipermanentes, folhas frescas foram seccionadas transversalmente, utilizando-se micrótomo de congelamento (Leica CM 1850), do Laboratório de Associações Micorrízicas (BIOAGRO). Inicialmente, as amostras foram criopreservadas em solução de sacarose a 2,3 M, preparada com tampão fosfato de sódio a 0,1 M, sendo mantidas em geladeira por 12 horas e, posteriormente, seccionadas com 50  $\mu\text{m}$  de espessura. As seções foram clarificadas em hipoclorito de sódio comercial a 20%, lavadas em água destilada, submetidas a técnicas histoquímicas e as lâminas montadas em glicerina a 50%.

Para detectar compostos fenólicos, o material vegetal foi fixado em sulfato ferroso 4 % em formalina (Johansen, 1940), por 48 horas, e o controle foi mantido em metanol por 36 horas antes da fixação. As amostras foram desidratadas em série etílico-butílica (Johansen, 1940), incluídas em parafina com 8% de cera, e cortadas com 8  $\mu\text{m}$  de espessura, não submetidas à coloração posterior, e montadas em resina sintética (Permount).

Os cortes foram corados com azul de toluidina a pH 4,0 (O'Brien & McCully, 1981) ou submetidos a técnicas histoquímicas convencionais com material incluído: (1) xilidine Ponceau a pH 2,5 para evidenciar as proteínas totais (O'Brien & McCully, 1981); (2) PAS – “periodic acid schiff”, para detectar os polissacarídeos totais, omitindo o tratamento com ácido periódico nas seções controle (Maia, 1979); e (3) vermelho de rutênio, para evidenciar as

substâncias pécticas (Johansen, 1940).

Foram aplicadas, em material incluído e, também, em material fresco, técnicas para: (1) detectar substâncias lipofílicas utilizando sudan black B (Johansen, 1940) e sudan IV (Gerlach, 1984); (2) verificar a presença de alcalóides através do reagente de Dragendorff (Svendsen & Verpoorte, 1983), sendo as seções-controle previamente tratadas com ácido tartárico a 5% em etanol a 95%, durante 48 horas; e (3) detectar compostos fenólicos por meio do cloreto férrico a 10 % (Johansen, 1940).

Somente para material fresco foram aplicados: (1) reagente de Lugol para detectar amido (Jensen, 1962); (2) reagente de Nadi para detectar terpenóides - óleos essenciais e oleoresinas (David & Carde, 1964); e (3) reagente floroglucinol para identificação de lignina (Johansen, 1940).

A análise e a documentação fotográfica foram realizadas em microscópio de luz (Olympus-AX 70), conectado a um sistema de fotomicrografia (Olympus U-Photo), do Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia Vegetal da UFV.

### **Microscopia eletrônica de varredura**

Para caracterização da superfície foliar, as amostras foram fixadas em Karnovsky (1965, modificado), durante 48 horas, a 4°C, e pós-fixadas com tetróxido de ósmio 1% (Silveira, 1989), por 3 horas. Posteriormente, desidratadas em série etílica até o álcool absoluto, secas em ponto crítico com CO<sub>2</sub> líquido (Bozzolla & Russel, 1992), utilizando o equipamento Balzers (Modelo CPD 020), fixadas em “stubs”, e submetidas à deposição metálica com ouro, pelo processo de pulverização catódica, em equipamento Balzers de congelamento a seco (modelo FDU 010), acoplado ao conjunto de pulverização catódica (modelo SCA 010).

As observações e a documentação fotográfica, para caracterização da superfície foliar e das estruturas secretoras, foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura LEO (modelo 1430VP), no Centro de Microscopia e Microanálise - UFV.

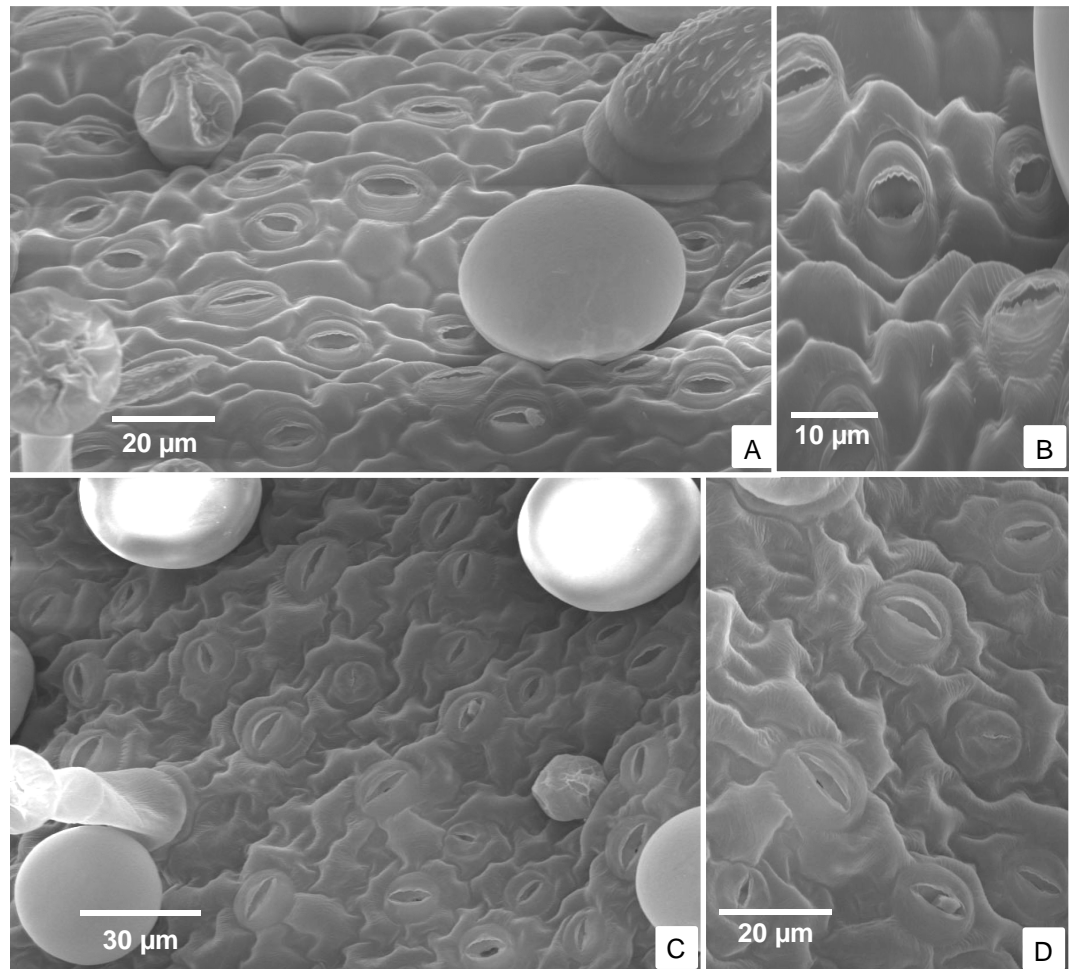
Os tipos de tricomas glandulares subsésseis foram fundamentados na classificação proposta por Cantino (1990).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Caracterização anatômica

As folhas de *Lippia filifolia* possuem epiderme unisseriada. As células epidérmicas, na região internervural, apresentam paredes delgadas, sendo as anticlinais curvas na superfície adaxial (Figs. 2A e B) e sinuosas na abaxial (Figs. 2C e D), também relatada para *L. alba* (Corrêa, 1992; Ventrella, 2000; Castro, 2001; Tavares, 2003). Já *L. lycioides* apresenta células epidérmicas com parede quase sempre reta na superfície adaxial e ondulada na abaxial (Ferreira et al., 2002). As células epidérmicas da nervura central em *L. filifolia*, em vista frontal, são alongadas no sentido longitudinal, principalmente, na superfície abaxial; também apresentam paredes retas, em corte transversal. São células isodiamétricas de paredes periclinais externas pouco espessas, sendo semelhantes à nervura central de *L. alba*, porém, apresenta células de paredes mais espessas (Tavares, 2003). As variações nas paredes das células epidérmicas devem estar relacionadas às condições ambientais, pois a sinuosidade da parede anticlinal está especialmente relacionada com o ambiente em que a folha se desenvolve (Alquini et al., 2003); a ondulação deve-se, provavelmente, a tensões ocorridas na folha durante a diferenciação das células ou ao endurecimento da cutícula (Watson, 1942).

A epiderme apresenta-se revestida por uma cutícula delgada, e a parede periclinal externa das células epidérmicas, na face adaxial da folha, é mais espessa, como ocorre em *L. alba* (Ventrella, 2000). Tavares (2003), estudando três quimiotipos de *L. alba*, verificou variação na espessura da cutícula, nos estratos cuticulares e na espessura da parede periclinal externa, entre os



**Figura 2.** Eletromicrografias de varredura da superfície foliar de *Lippia filifolia* cultivada *in vitro*. Epiderme adaxial na região internervural (**A**); detalhe do estômato na superfície adaxial (**B**); epiderme abaxial na região internervural (**C**); detalhe do estômato na superfície abaxial (**D**);

quimiotipos. Essa variação não foi observada em *L. filifolia*, uma vez que as condições de cultivo *in vitro* são muito específicas quando comparadas às aquelas do cultivo em casa de vegetação ou campo, principalmente, no que se refere à perda de água e ao excesso de luminosidade. Assim, o desenvolvimento da cutícula pode estar relacionado à maior proteção a esses fatores ambientais (Fahn, 1990; Alquini et al., 2003), que no cultivo *in vitro* são controlados. Em plantas de *Dianthus caryophyllus* cultivadas *in vitro*, sob diferentes razões de trocas gasosas, apresentaram cutícula mais espessa nas plantas aclimatadas e cultivadas sob maiores razões de trocas gasosas, quando comparadas com as plantas submetidas às menores razões ou às aquelas hiperhídricas (Majada et al., 2000). No entanto, em *Hedera helix* (Araliaceae), o aumento no espessamento da cutícula, na quantidade de massa e de cera, ocorreu de folhas jovens para folhas adultas, em plantas crescendo tanto *in vitro* como *ex vitro* (Gilly et al., 1997).

A folha de *L. filifolia* é anfiestomática, com maior número de estômatos na face abaxial. Os estômatos são do tipo anomocíticos (Figs. 2A-D), também relatados para *L. citriodora* (Bruneton, 1999) e *L. lycioides* (Ferreira et al., 2002). Em *L. alba* é comum a ocorrência de mais de um tipo de estômato, como diacítico, anomocítico e paracítico (Ventrella, 2000) e anisocíticos (Corrêa, 1992; Tavares, 2003). Estômatos paracíticos e anisocíticos foram relatados em *L. lupulina* (Morretes, 1969), enquanto que os estômatos anomocíticos e diacíticos são os tipos mais frequentemente encontrados em Labiatae e Verbenaceae (Cantino, 1990).

Os estômatos, geralmente, se situam acima do nível das demais células epidérmicas, sendo mais proeminentes na superfície abaxial. Como esta característica é encontrada em plantas hidrófitas (Fahn, 1990), sua presença em *L. filifolia* pode estar relacionada às condições de cultivo *in vitro*, onde a umidade relativa é alta (Carvalho, 2001), ou pode ser comum ao gênero, pois em *Lippia lupulina* (Morretes, 1969), uma espécie de cerrado, os estômatos situam-se no mesmo plano ou um pouco acima das células epidérmicas. Em *L. alba*, a elevação das células subsidiárias não ocorre de maneira uniforme e a cutícula, nesta região, apresenta estriações radiais (Tavares, 2003).

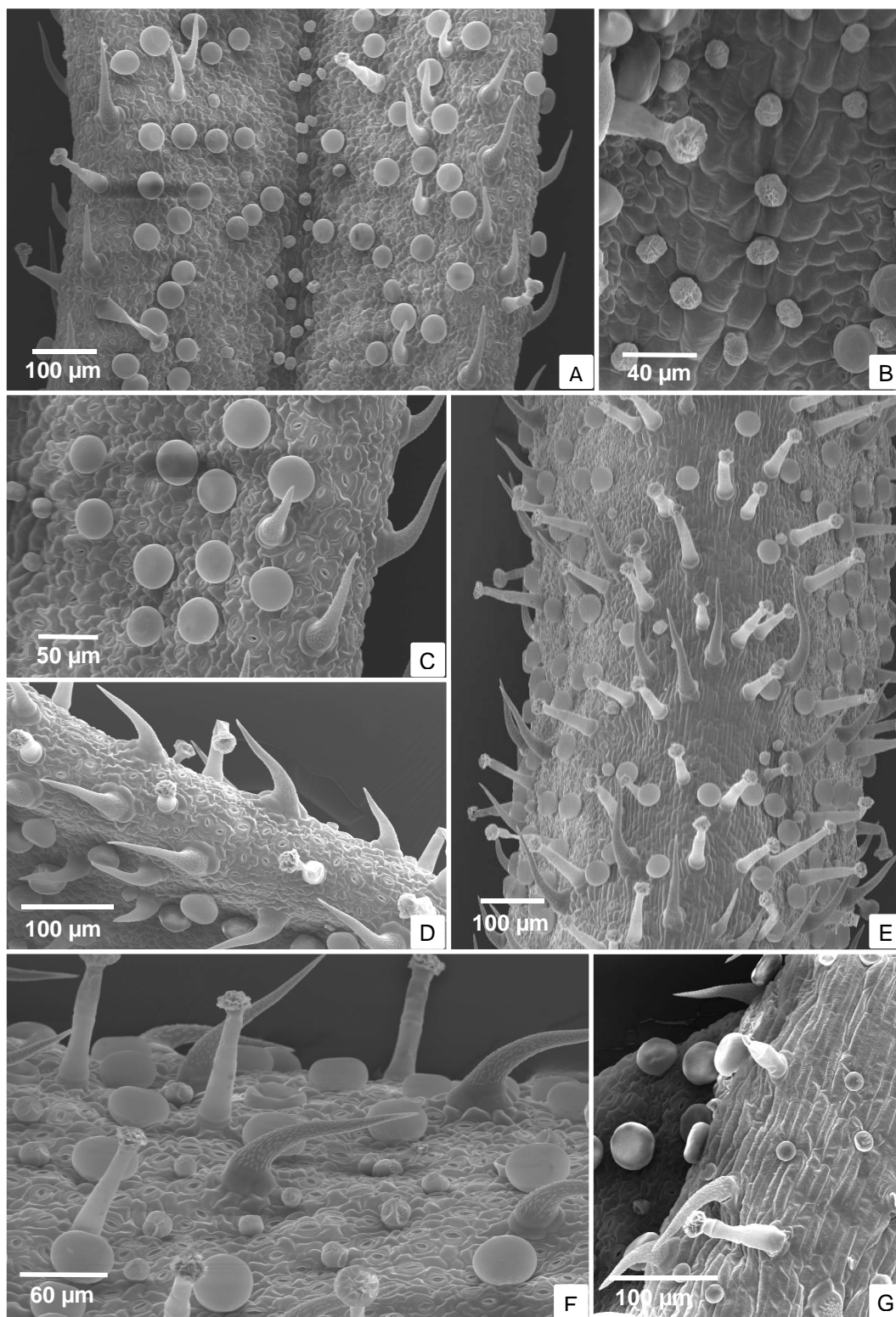
As células-guarda possuem cloroplastos organizados, e as paredes das células estomáticas apresentam espessamento típico, com paredes anticlinais

internas, que se projetam formando pequenas cristas estomáticas. Em *L. lupulina* as paredes interna e externa da célula guarda revelam grande espessamento (Morretes, 1969). As câmaras sub-estomáticas estão presentes em ambas as superfícies, sendo mais amplas na face abaxial, como observado em *L. alba* (Castro, 2001).

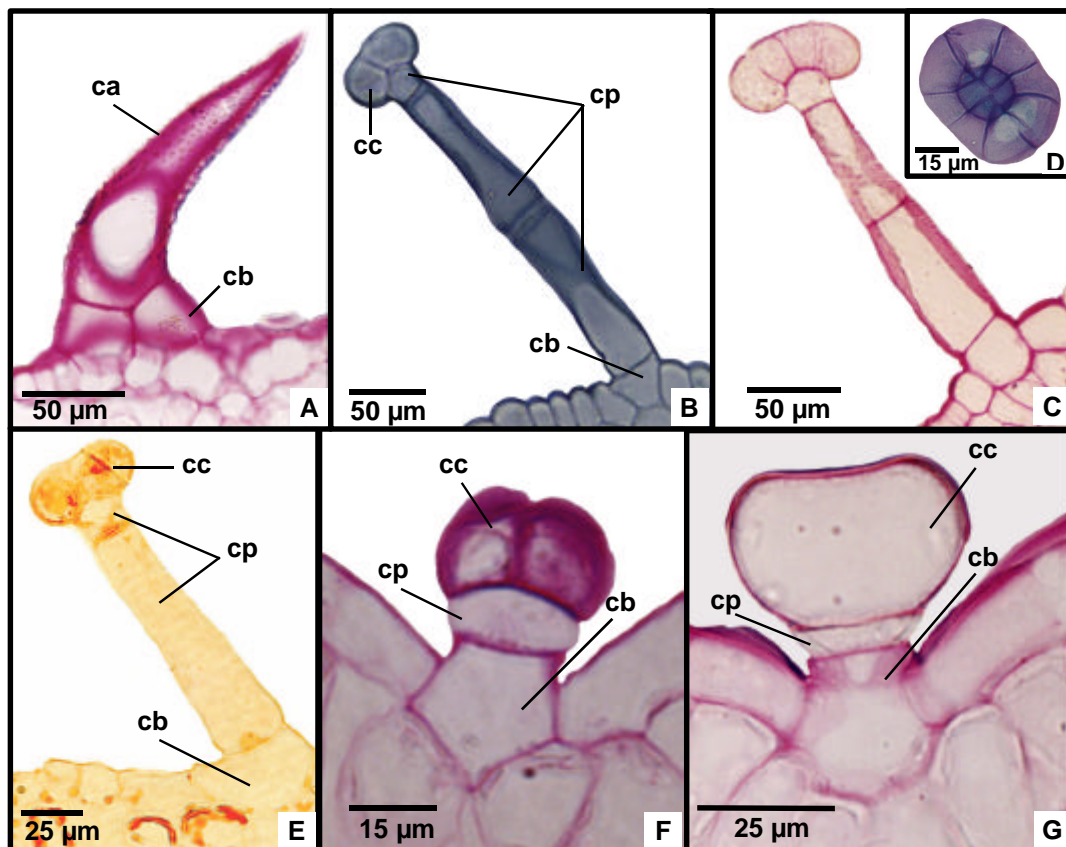
Os apêndices epidérmicos estão presentes em ambas as superfícies foliares (Figs. 3A-G). Os tricomas glandulares e tectores (Figs. 4A-G e 5A-H), presentes em *L. filifolia*, foram evidenciados em outras espécies do gênero, como *L. alba* (Ventrella, 2000; Castro, 2001; Tavares, 2003), *L. turbinata*, *L. fissicalx*, *L. grisebachiana* e *L. integrifolia* (Bassols & Gurni, 2000), diferindo em morfologia e tamanho.

Na família Verbenaceae são freqüentes os tricomas tectores (Solereder, 1908; Metcalfe & Chalk, 1950), os quais estão presentes em ambas as superfícies das folhas de *L. filifolia*, seguindo um padrão de distribuição. Na superfície adaxial, estão localizados apenas na região do bordo ou próximos a este (Figs. 3A e C), enquanto que na superfície abaxial, estão distribuídos por toda a lâmina foliar, inclusive, na nervura central (Figs. 3E-G). Em ambas as superfícies, todos os ápices destes tricomas estão inclinados seguindo uma mesma orientação, no sentido base-ápice foliar. A função dos tricomas tectores depende de sua morfologia, do órgão em que está localizado, e de sua orientação. No entanto, sua função é, freqüentemente, relacionada à especulações que a investigações experimentais (Werker, 2000).

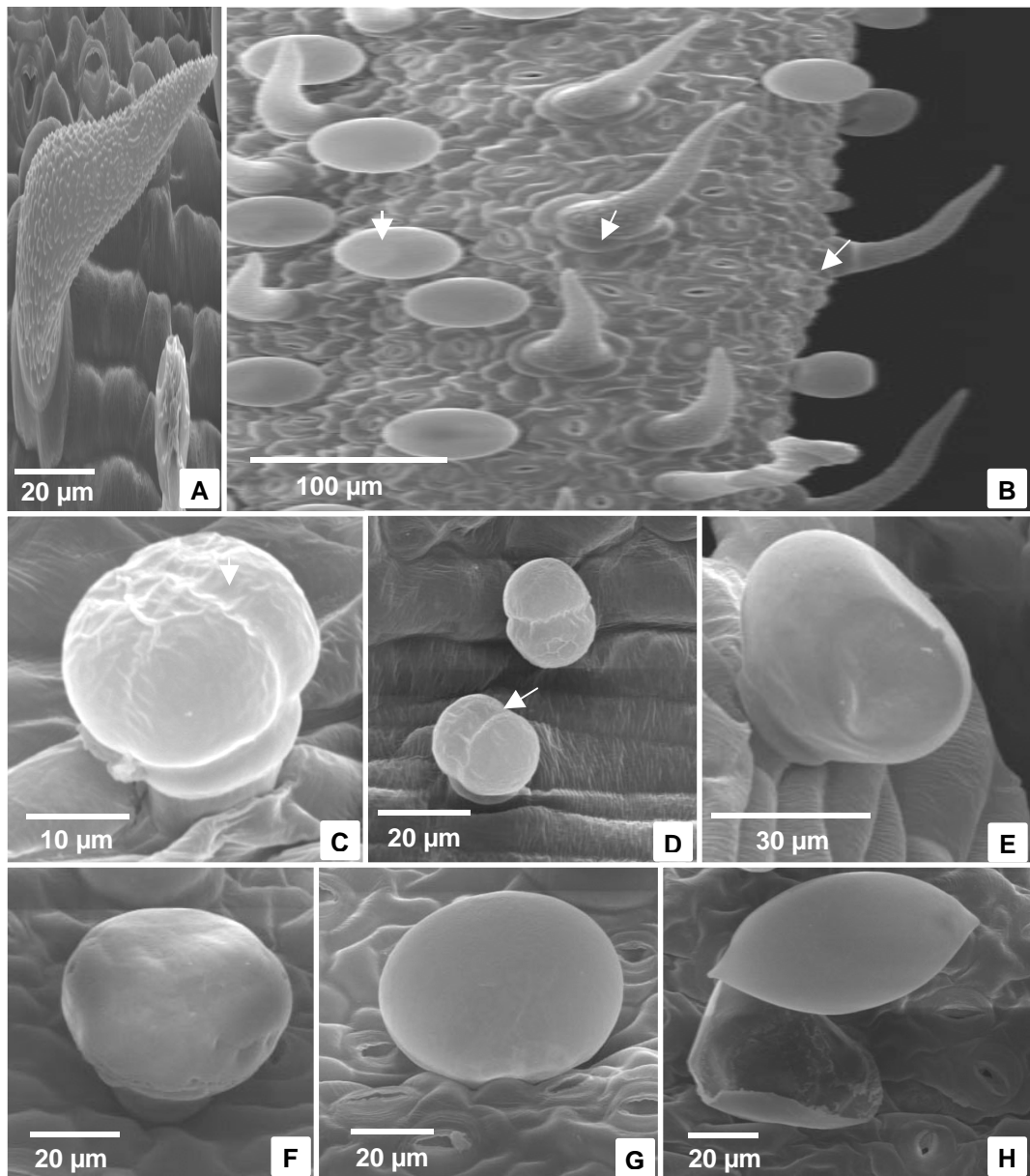
Os tricomas tectores de *L. filifolia* são unicelulares, com base arredondada e ápice agudo, assemelhando-se a um cone, e suas paredes apresentam ornamentações verrucosas (Figs. 4A e 5A). Os tricomas tectores unicelulares foram relatados para o gênero por Metcalfe & Chalk (1950), sendo observados em *L. lupulina* (Morretes, 1969), *L. graveolens* (Cantino, 1990), *L. turbinata*, *L. fissicalx*, *L. grisebachiana*, *L. integrifolia* (Bassols & Gurni, 2000), e *L. alba* (Ventrella, 2000; Castro, 2001; Tavares, 2003). Os tricomas tectores de *L. filifolia* são semelhantes aos de *L. alba* (Corrêa, 1992), possuindo forma e ornamentações, como as encontradas em tricomas do tipo unicelular, observado por Tavares (2003).



**Figura 3.** Eletromicrografias de varredura da superfície foliar de *Lippia filifolia* cultivada *in vitro*. Superfície adaxial (A-C) – região mediana (A); detalhe na nervura central (B); região internervural e bordo (C); bordo foliar (D); superfície abaxial (E-G) – região mediana (E); região internervural (F); nervura central (G).



**Figura 4.** Tricomas observados em seções transversais da folha de *Lippia filifolia* cultivada *in vitro*, mediante microscopia de luz e submetidas a diferentes reagentes/corantes. Tricoma tector – vermelho de rutênio (**A**); tricoma glandular tipo I, com quatro células na cabeça e três células no pedículo – sudan black B (**B**); tricoma glandular tipo I, com oito células na cabeça – vermelho de rutênio (**C**); detalhe da cabeça de um tricoma glandular tipo I – azul de toluidina (**D**); tricoma glandular tipo I, com duas células no pedículo – xilidine Ponceau (**E**); tricoma glandular tipo II – PAS (**F**); tricoma glandular tipo III – vermelho de rutênio (**G**). Célula do ápice (ca); célula(s) da base (cb); célula(s) da cabeça (cc); célula(s) do pedículo (cp).



**Figura 5.** Eletromicrografias de varredura da superfície foliar de *Lippia filifolia* cultivada *in vitro*. Tricoma tector com ornamentações verrucosas (A); bordo da folha, evidenciando os tricomas tectores com duas, quatro e três células basais (setas), respectivamente, (B); tricoma glandular tipo II, mostrando a região do septo (seta) (C-D); tricoma glandular tipo III (E-H), com rompimento na célula da cabeça (H).

As células que compõem a base são mais elevadas que as demais células epidérmicas e variam em tamanho e número, podendo ser duas, três ou quatro (Fig. 5B). Quando em número de duas ou quatro, apresentam tamanho semelhante; no entanto, quando são três células, duas são de tamanhos semelhantes e a terceira é maior, com disposição circular (Fig. 5B). Em *L. alba*, a base dos tricomas tectores se constitui de até oito células, as quais podem conter cristólitos (Tavares, 2003); essas células se dispõem radialmente (Castro, 2001). Tricomas semelhantes, com a base constituída por células epidérmicas com cristólitos e organizadas em forma de roseta, foram verificados em *L. turbinata*, *L. fissicalx*, *L. grisebachiana*, *L. integrifolia* (Bassols & Gurni, 2000). No entanto, cristólitos não foram observados em *L. filifolia*.

Os tricomas glandulares também estão presentes em ambas as superfícies foliares de *L. filifolia* (Figs. 3A–G), e são amplamente distribuídos na ordem Lamiales (Solereder, 1908), onde se insere a família Verbenaceae (Cronquist, 1988; Judd et al., 1999). Como o número de células do pedículo e da cabeça é variável, esses tricomas foram classificados em três tipos: capitado tipo I, capitado tipo II e capitado tipo III.

Capitados do tipo I: são compostos por uma cabeça glandular multicelular (Figs. 4B-E), cujo contorno tende a elíptico, e o número de células que a constitui varia de quatro a oito. Estas estão organizadas em duas fileiras paralelas, posicionadas uma de frente para a outra formando pares; as células que constituem os pares são idênticas na forma e no tamanho (Fig. 4D). A cabeça secretora se liga à base através do pedículo, que é composto por células longas, unisseriadas, normalmente em número de três, podendo, raramente apresentar apenas duas células (Fig. 4E). A célula do pedículo subsequente à cabeça secretora é de menor tamanho (Figs. 4B e C). A base dos tricomas é constituída por células mais altas que as demais células epidérmicas; geralmente se apresentam em número de duas, mas, ocasionalmente, podem apresentar apenas uma célula basal.

Tricomas glandulares com porção intermediária longa ocorrem em Verbenaceae (Cantino, 1990). Tricomas idênticos foram observados em *L. lupulina* (Morretes, 1969). Outra espécie que apresenta tricomas com células longas no pedículo é *L. alba*. No entanto, esta difere no número e no formato das células da cabeça (Ventrella, 2000), podendo ser bicelular de contorno

circular a elíptico (Tavares, 2003) ou, ocasionalmente, com a cabeça unicelular (Corrêa, 1992). A epiderme abaxial de *L. fissicalyx* apresenta tricomas glandulares com quatro células secretoras na cabeça, e uma ou duas células no pedículo; no entanto, não se fez referência quanto ao formato dessas células (Bassols & Gurni, 2000). Tricomas secretores capitados, com número de células basais variável foram relatados em *L. alba* (Ventrella, 2000). A distribuição destes tricomas é idêntica ao padrão de distribuição dos tricomas tectores (Figs. 3A e E).

Capitados do tipo II: são compostos por uma cabeça globular bicelular. As células são paralelas entre si e apresentam forma e tamanho idênticos (Figs. 4F; 5C e D). O pedículo é constituído por uma única célula curta e a base também apresenta uma única célula (Figs. 4F e 5C). Segundo Metcalfe & Chalk (1950), os tricomas glandulares, encontrados em espécies de *Lippia*, são de cabeça muito pequena, consistindo de uma ou somente poucas células suportadas pela porção intermediária de comprimento variável. Tricomas glandulares capitados, com a célula do pedículo mais curta que as células da cabeça, denominados tricomas subsésseis, são comuns nas Verbenaceae (Cantino, 1990).

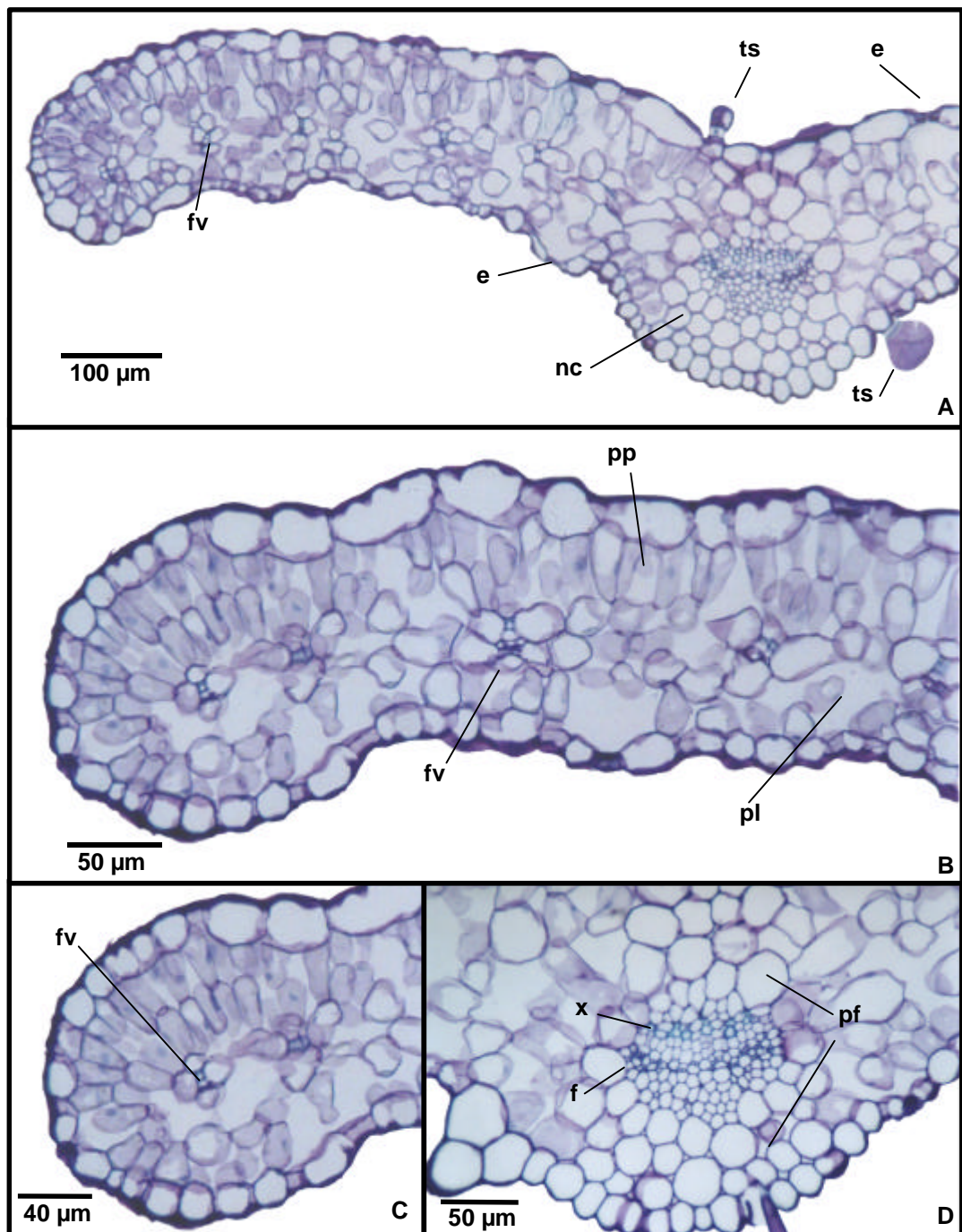
Tricomas glandulares com duas células secretoras na cabeça e, uma ou duas células no pedículo, foram verificados na epiderme abaxial das folhas de *L. turbinata*, *L. fissicalyx*, *L. grisebachiana* e em ambas as faces epidérmicas de *L. integrifolia* (Bassols & Gurni, 2000). Tricomas glandulares subsésseis, com cabeça uni e bicelular, também foram observados em *L. alba* (Ventrella, 2000; Tavares 2003), *L. graveolens* (Cantino, 1990) e *L. lupulina* (Morretes, 1969). Assim como os demais tipos de tricomas, os capitados tipo II estão distribuídos por toda a superfície abaxial da folha, incluindo a nervura central (Figs. 3E-G). No entanto, seu padrão de distribuição na superfície adaxial da folha é específico; são os únicos tricomas cuja distribuição se restringe à nervura central, ou muito próximo a ela (Figs. 3A-C).

Capitados do tipo III: são compostos por uma cabeça esférica unicelular (Figs. 4G; 5E-H). A célula do pedículo é única e muito curta, quando comparada com a célula da cabeça; também são tricomas subsésseis, e a base é formada por uma única célula, que se encontra ao nível das células epidérmicas (Figs. 4G; 5E) ou em pequenas depressões (Figs. 5F e G).

Tricomas glandulares com cabeças unicelulares são encontrados em *Lippia*, podendo ser também bi ou multicelulares (Solleder, 1908). Tricomas glandulares com cabeça esférica e com uma ou duas células do pedículo foram relatados para *L. turbinata*, *L. fissicalx* e *L. grisebachiana*, sendo encontrados em pequenas depressões em *L. turbinata* (Bassols & Gurni, 2000). Estão distribuídos por toda a superfície abaxial da folha, incluindo a nervura central (Figs. 3E-G). Porém, sua maior concentração está na região entre a nervura central e o bordo, onde se encontram em número visivelmente maior que os demais tipos descritos. Ao contrário, no bordo, aparece com menor frequência. Na superfície adaxial, sua distribuição ocorre de modo similar à superfície abaxial, tendo como única exceção a sua ausência na nervura central (Figs. 3A e B).

O mesofilo é dorsiventral. Caracteriza-se pelo parênquima paliçádico em contato com a face adaxial e pelo parênquima lacunoso voltado para a face abaxial (Figs. 6A e B). O parênquima paliçádico é constituído por dois estratos, alternando-se com porções de um único estrato. Suas células são relativamente curtas, assemelhando as de *L. grisebachiana* (Bassols & Gurni, 2000), e possuem espaços intercelulares relativamente grandes; o mesmo ocorre em *L. lupulina* (Morretes, 1969). O parênquima lacunoso apresenta cerca de dois a três estratos, suas células tendem a possuir um formato arredondado, com espaços intercelulares evidentes e de dimensões variáveis. Essa organização pode ser observada em *L. alba*, que apresenta também células de formato lobado (Corrêa, 1992). Tecidos de sustentação não foram observados em *L. filifolia*.

Segundo Metcalfe & Chalk (1950), na família Verbenaceae, as folhas podem ser dorsiventrais ou isobilaterais. Assim como em *L. filifolia*, a organização do mesofilo em *L. alba* é dorsiventral (Corrêa, 1992; Ventrella, 2000; Castro, 2001). Tavares (2003), analisando três quimiotipos de *L. alba*, verificou a presença de uma camada de parênquima paliçádico voltado para a face abaxial no quimiotipo 3, e variações no número de estratos entre os quimiotipos; o quimiotipo 2 apresenta um estrato de parênquima paliçádico, enquanto que no quimiotipo 1 dois estratos são observados em determinadas regiões, e no quimiotipo 3 há dois estratos na superfície adaxial. Folhas de *L. turbinata*, *L. fissicalx* e *L. integrifolia* possuem três ou quatro camadas de parênquima paliçádico, enquanto *L. grisebachiana* apresenta somente duas ou



**Figura 6 .** Seções transversais da folha de *Lippia filifolia* cultivada *in vitro*, coradas com azul de toluidina, mostrando o aspecto geral da folha (A) e detalhe da região internervural (B), do bordo (C) e da nervura central (D). Estômato (e); feixe vascular (fv); floema (f); nervura central (nc); parênquima fundamental (pf); parênquima lacunoso (pl); parênquima paliádico (pp); tricoma secretor (ts); xilema (x).

três camadas; essas espécies possuem organização isobilateral (Bassols & Gurni, 2000).

Folhas dorsiventrais também foram observadas em *L. lycioides* que apresentaram de duas a três camadas de tecidos paliçádico e parênquima lacunoso contendo grãos de amido (Ferreira et al., 2002). Nas espécies *L. alba*, *Lippia* sp<sub>1</sub> e *Lippia* sp<sub>2</sub>, ocorrentes na Mata Atlântica, verificou-se que as duas últimas apresentam parênquima paliçádico unisseriado, enquanto a primeira apresenta bisseriado (Rehem et al., 2002).

Espaços intercelulares relativamente grandes foram observados em plantas cultivadas *in vitro*, como *Nicotiana tabacum*, onde o mesofilo consistiu de uma frouxa camada, pobremente diferenciada em parênquima paliçádico e duas a três camadas de parênquima esponjoso (Tichá & Kutik, 1992); e *Dianthus caryophyllus*, cultivada sob baixa razão de troca gasosa, apresentou células do mesofilo grandes e amplos espaços intercelulares (Majada et al., 2000).

A região do bordo foliar (Fig. 6C), possui um arranjo anatômico semelhante à região internervural, com a presença de estômatos, tricomas e parênquima clorofiliano. Em *L. alba* essa organização pode apresentar estratos colenquimatosos (Corrêa, 1992). Os feixes vasculares de pequeno porte, são do tipo colateral, e estão envolvidos por uma bainha parênquimática sem cloroplastos (Fig. 6B), como em *L. alba* (Corrêa, 1992; Ventrella, 2000; Castro, 2001; Tavares, 2003) e *L. lupulina* (Morretes, 1969).

A nervura central é decumbente na face adaxial (Fig. 3A) e proeminente na face abaxial (Fig. 3E). Na face abaxial, estômatos, tricomas tectores e todos os tipos de tricomas glandulares, estão presentes (Fig. 3G). No entanto, na face adaxial, os estômatos estão ausentes e apenas os tricomas capitados tipo II estão presentes (Fig. 3B). Nesta região, o parênquima clorofiliano é interrompido, sendo substituído por um parênquima fundamental constituído de células grandes e vacuolizadas, ainda sem ocorrência de colênquima (Fig. 6D). Em posição subepidérmica, em ambas as faces, o parênquima fundamental se organiza em três ou quatro estratos. O sistema vascular é formado por um feixe colateral aberto em forma de arco (Fig. 6D).

Em *L. alba*, os tricomas também estão presentes na nervura central, e o feixe vascular, nesta região, é do mesmo tipo apresentado por *L. filifolia*. No entanto, em *L. alba*, os feixes vasculares menores localizam-se próximos da

face adaxial. As células epidérmicas são revestidas por cutícula estriada e ocorre colênquima do tipo angular (Ventrella, 2000; Castro 2001; Tavares, 2003). Em *L. lycioides*, a nervura mediana apresenta epiderme idêntica à do mesofilo, colênquima do tipo angular e um parênquima fundamental desenvolvido. O feixe vascular, nesta espécie, encontra-se em forma de arco aberto, com floema externo contínuo e outro interno, bicolateral (Ferreira et al., 2002). Metcalfe & Chalk (1950) referem-se a presença de feixes vasculares acompanhados por esclerênquima em espécies de *Lippia*, no entanto, a ausência de tecido de sustentação na nervura central de *L. filifolia* pode estar associada às condições de cultivo *in vitro*, uma vez que é comum a ocorrência de colênquima e fibras nessa região, em outras espécies de *Lippia* (Morretes, 1969; Corrêa, 1992; Ventrella, 2000; Castro, 2001; Tavares, 2003).

As plantas cultivadas *in vitro* crescem em diferentes condições das plantas cultivadas *ex vitro* e, freqüentemente, exibem peculiaridades no desenvolvimento. Algumas características apresentadas por *L. filifolia*, como cutícula delgada, ausência de tecidos de sustentação na folha e espaços intercelulares relativamente grandes no parênquima paliçádico, podem ser devido ao artefato do cultivo. Os métodos tradicionais e as exigências para multiplicação *in vitro* – isto é, alta umidade, fatores nutricionais (minerais e carboidratos), altos níveis de reguladores de crescimento, baixa intensidade luminosa e alta disponibilidade de água no substrato - são os principais fatores que levam à hiperhidratação e/ou um desenvolvimento anatômico incipiente nas plantas cultivadas *in vitro* (Majada et al., 2000).

Em plantas transferidas de condições *in vitro* para casa de vegetação ou campo, foram observadas mudanças significativas na morfologia e na anatomia da folha, sobretudo, nas características epidérmicas, no espessamento da folha, na diferenciação no mesofilo, e no número e estrutura dos cloroplastos (Pospíšilová et al., 1999). O que demonstra a necessidade de posteriores estudos com *L. filifolia* em condições de campo e/ou casa de vegetação.

### **Histoquímica**

Em material fresco, o teste para detecção de lipídios gerais foi positivo, evidenciando pela coloração alaranjada (Figs. 7A-F) ou azulada, quando corados com sudan IV ou sudan black B, respectivamente. Substâncias

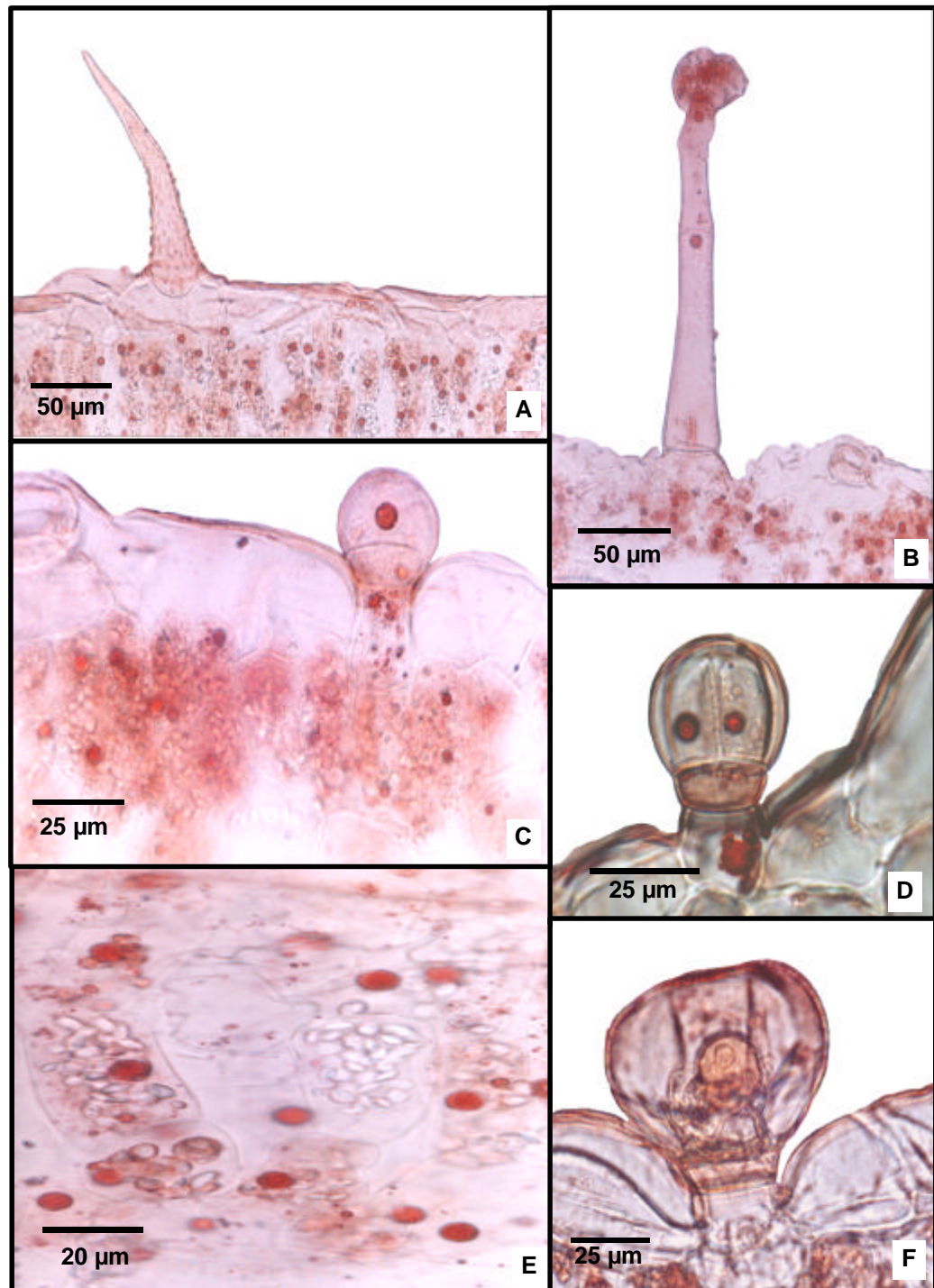
lipofílicas foram encontradas nos três tipos de tricomas glandulares (Figs. 7B-D e F) e nas células do mesofilo, sendo mais evidente no parênquima paliçádico (Figs. 7A,C e E). Em *L. alba* foram observadas substâncias lipídicas nos tricomas secretores e nas células do mesofilo (Ventrella, 2000; Castro, 2001). Da mesma forma que em *L. filifolia*, ocorrem com maior intensidade no parênquima paliçádico.

Em *L. alba*, a presença de gotículas de óleo na célula distal dos tricomas secretores e na parte basal dos tricomas tectores foram evidenciadas (Castro, 2001). Tavares (2003) relatou a presença de óleo essencial no interior dos tricomas glandulares, fazendo referência às células secretoras que ora aparecem distendidas, repletas de secreção, ora mostram-se deformadas, após a liberação do produto.

Em *L. filifolia*, o conteúdo citoplasmático das células do pedículo dos tricomas capitados tipo II e III apresenta-se mais denso, assim como a célula do pedículo subsequente à cabeça secretora do tricoma capitado tipo I. As paredes anticlinais destas células também são mais evidentes (Figs. 7B-D e F), indicando a presença de substância hidrofóbica como suberina ou cutina em suas paredes. Essas características endodérmicas são comuns para os tricomas secretores de óleos, e funcionam como efetiva barreira apoplástica (Fahn, 1988). Essas características também são relatadas em tricomas glandulares de *Salvia blepharophylla* (Bisio et al., 1999), *Salvia aurea* (Serrato-Valenti, 1997), *Origanum dictamnus* (Bosabalidis & Tsakos, 1982), e *Phillyrea latifolia* (Gravano et al., 1998).

No material corado com sudan IV, a presença de cutícula delgada ficou evidenciada (Figs. 7A e C), já que é um composto lipídico. Embora o sudan black B seja indicado para material incluído em resina, os resultados, de forma geral, não demonstraram a mesma eficiência quando comparados com material fresco.

O reagente de Nadi revelou os óleos essenciais corados em azul (Figs. 8 A-D), em forma de gotas ou dispersos no conteúdo citoplasmático (Fig. 8B). Estes estão presentes nas células da cabeça dos tricomas glandulares (Fig. 8D), e no parênquima clorofiliano, principalmente no parênquima paliçádico (Figs. 8A). As reações observadas nas células subsidiárias dos estômatos e



**Figura 7.** Gotas de substâncias lipofílicas observadas em seções transversais da folha de *Lippia filifolia* cultivada *in vitro*, coradas com sudan IV. Tricoma tector na superfície adaxial (A); tricoma glandular tipo I (B); tricoma glandular tipo II na superfície adaxial (C-D); detalhe das células do parênquima clorofiliano (E); tricoma glandular tipo III na superfície adaxial (F).

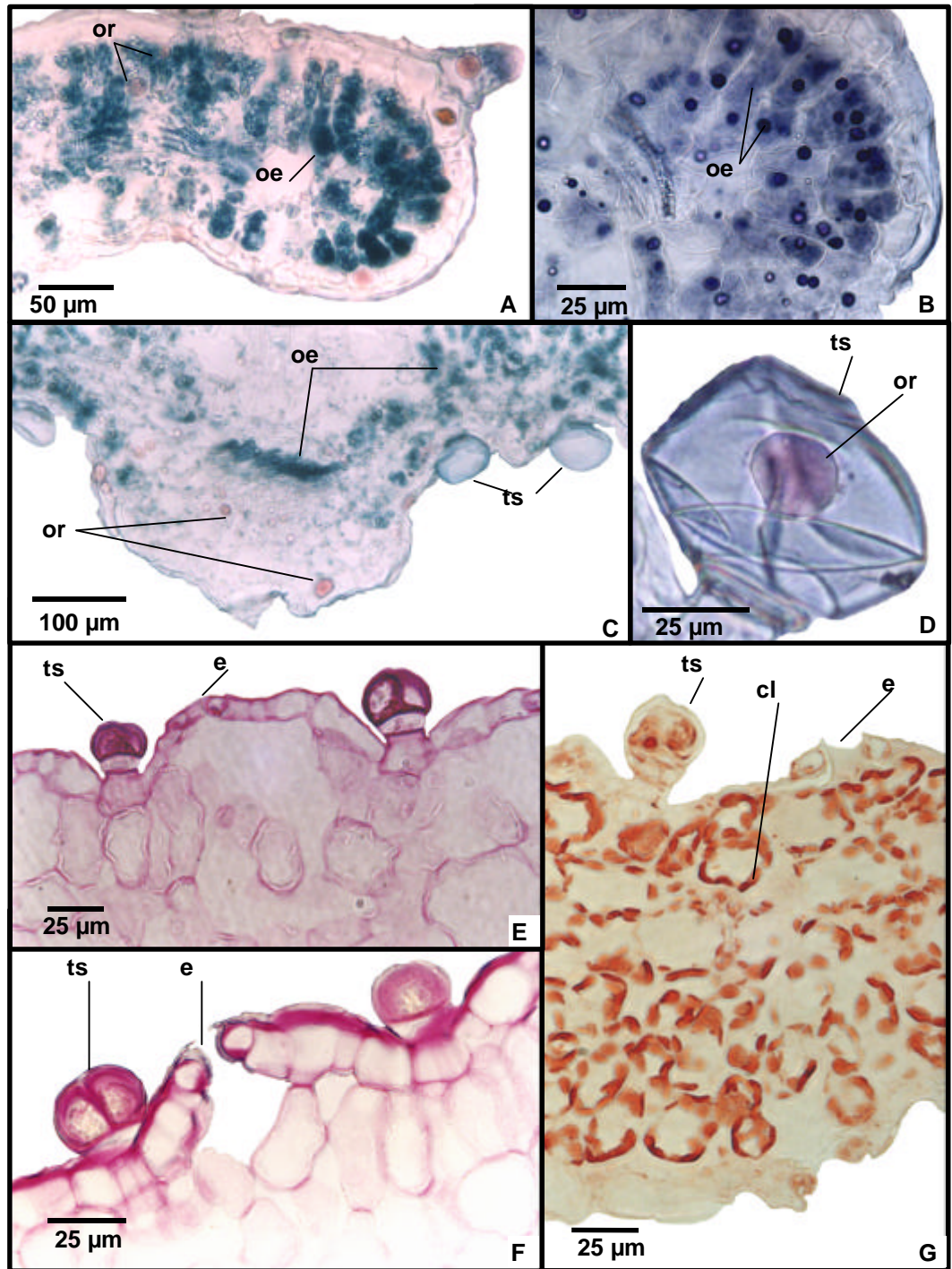
nas células do parênquima fundamental (Fig. 8C), são resultado do artefato da técnica utilizada. Provavelmente, houve extrapolação do secretado do seu local de síntese e migração para os referidos locais. A cutícula ficou evidenciada e as paredes das células dos tricomas tectores e glandulares também, mesmo quando a secreção era ausente nas células da cabeça dos tricomas secretores. A análise histoquímica revelou que o material secretado pelos tricomas e pelo mesofilo são lipofílicos.

A mistura de essências e de ácidos resínicos é evidenciada por uma variação na coloração, indo do violeta a púrpura. As oleoresinas foram detectadas em toda a secção transversal do limbo, sendo mais evidente no parênquima palicádico e nos tricomas secretores (Figs. 8A e D). Sugere-se que a presença de resina seja uma forma alternativa de armazenamento de essência nesta espécie.

É amplamente aceito que as Lamiaceae evoluíram a partir das Verbenaceae (Cantino, 1990), possuindo tricomas semelhantes. Uma das características químicas de muitas espécies de Lamiaceae é a secreção de resina lipofílica, na superfície foliar, por tricomas glandulares (Bisio et al., 1999), onde os terpenóides parecem predominar (Duke, 1994). Em *Salvia aurea* L., a reação com reagente de Nadi foi positiva em ambos os tricomas, capitados e peltados, não fazendo referência, todavia, à coloração apresentada (Serrato-Valenti et al., 1997).

No teste com PAS, que evidencia polissacarídeos gerais, as células da cabeça dos tricomas capitados tipo II reagiram positivamente (Fig. 8E), indicando a presença de substâncias polissacarídicas. As paredes das células epidérmicas, das células subsidiárias dos estômatos e do mesofilo, as células da cabeça e as duas células próximas a base que constituem o pedículo dos tricomas capitados tipo I, a célula dos tricomas tectores, as células da cabeça dos tricomas capitados tipo III e os cloroplastos, foram coradas devido a sua constituição e não a uma reação positiva.

No entanto, fica evidente que as paredes anticlinais externas das células do pedículo dos tricomas capitados tipo II e III, e da célula do pedículo subsequente a cabeça secretora do tricoma capitado tipo I, não se coram com PAS. Isso indica que os polissacarídeos presentes são, provavelmente, carboidratos estruturais de parede, e nos cloroplastos, trata-se de amido primário.



**Figura 8.** Seções transversais da folha de *Lippia filifolia* cultivada *in vitro*, submetidas a diferentes reagentes. Reagente de Nadi (A-D) - limbo (A); detalhe do bordo (B); nervura central (C); tricoma glandular tipo III, (D); PAS - face adaxial (E); vermelho de rutênio – face adaxial (F); xilidine Ponceau - limbo foliar (G). Cloroplastos (cl); estômato (e); óleo essencial (oe); oleoresina (or); tricoma secretor (ts).

Apenas nos tricomas tipo II parece ser parte constituinte da substância secretada, uma vez que na superfície adaxial da folha se localizam na nervura central ou próximo desta (Figs. 3A e B). A relação existente entre a densidade de tricomas capitados e a localização em tecidos de condução, especificamente o floema, com maior densidade de tricomas ao longo das nervuras, talvez possa ser explicada pela relativa abundância de polissacarídeos exsudados (Werker et al., 1985). Estes polissacarídeos podem atuar como lubrificantes para facilitar a expansão foliar (Antunes & Sevinate-Pinto, 1991).

Assim como ocorreu na coloração com PAS, as células do pedículo dos tricomas capitados tipo II e III e a célula do pedículo subsequente a cabeça secretora do tricoma capitado tipo I, também não coram com vermelho de rutênio. Outra semelhança com o PAS trata-se das células da cabeça dos tricomas capitados tipo II, que apresentou coloração mais intensa, indicando a presença de pectinas na substância secretada (Fig. 8 F), sugerindo assim o acúmulo de mucilagens ou outro carboidrato no espaço intercelular ou no espaço subcuticular. As semelhanças nos resultados demonstram que os polissacarídeos são não celulósicos, uma vez que a reação com PAS tem a função de detectar os polissacarídeos gerais. Já a coloração com vermelho de rutênio é específica para substâncias pécticas, que é um grupo específico de polissacarídeos.

Serrato-Valenti et al. (1997), investigando os tricomas glandulares das folhas de *Salvia aurea* L., verificaram, pela coloração com vermelho de rutênio, que o produto secretado por todos os tricomas glandulares também incluiu os polissacarídeos não celulósicos. Isso sugere que apenas os tricomas capitados tipo II de *L. filifolia* acumulam pectinas ou esse acúmulo ocorre em maior proporção no tipo II que nos tipos I e III. Quanto às células do pedículo dos tricomas glandulares, em *S. blepharophylla* (Bisio et al., 1999), a reação com vermelho de rutênio foi positiva, diferindo do resultado obtido em *L. filifolia*.

O teste com xilidine Ponceau revelou uma coloração mais intensa nas células que constituem a cabeça dos tricomas glandulares (Fig. 8G), sugerindo possível presença de proteínas no material secretado. Proteínas estruturais foram evidenciadas no citoplasma, o que era esperado, já que todas as membranas da célula têm a mesma estrutura básica, lipoprotéica, inclusive os

plastídios que apresentam os tilacóides (Raven et al., 2001). Werker et al. (1985), estudando a estrutura dos tricomas glandulares e identificando os principais componentes do material secretado em algumas espécies de Lamiaceae, não obtiveram resultado positivo no teste para proteínas.

A reação para alcalóides e compostos fenólicos gerais, tanto em material incluído quanto em material fresco, foi negativa. No entanto, esses resultados não podem afirmar a ausência desses compostos na espécie. A presença de alcalóides é relatada entre os constituintes químicos da folha de *L. alba* (Martins et al., 2000), mas os mesmos também foram ausentes nos resultados de testes histoquímicos realizados em folhas da espécie (Corrêa, 1992). Em *L. filifolia* tais substâncias podem ser sintetizadas em baixas quantidades, não sendo detectadas nos referidos testes, ou podem realmente estar ausentes na planta. Outros testes, em plantas com maior tempo de desenvolvimento, após a fase de aclimação, devem ser realizados.

Amido de reserva também não foi detectado pela reação com lugol em *L. filifolia*. As condições físicas e químicas do ambiente de cultivo *in vitro* caracterizado por baixas irradiâncias, alta umidade relativa, reduzidas trocas gasosas, suplementação de açúcares, sais e vitaminas (Hughes, 1981; Lee et al., 1985; Viña et al., 1999), ocasiona em baixas taxas fotossintéticas e elevada respiração, o que leva a pouco ou nenhum acúmulo de fotoassimilados.

A utilização de floroglucina, para detectar lignina, demonstrou, na região dos feixes vasculares uma fraca reação nos elementos de vaso do xilema, que ficou melhor evidenciada mediante a utilização do azul de toluidina (Fig. 6D). A lignificação incipiente na parede do xilema e a ausência de tecidos de sustentação na folha de *L. filifolia* devem estar associadas às condições de cultivo, pois às plantas desenvolvidas *in vitro*, geralmente, apresentam-se pouco lignificadas, sistema vascular pouco desenvolvido e reduzida quantidade de tecidos de sustentação (Donnelly et al., 1985).

Portanto, os testes histoquímicos confirmaram a presença de compostos, como o óleo essencial, que é de grande importância para o gênero, e que já foi relatado para outras espécies de *Lippia*.

A estrutura foliar observada em *L. filifolia* Mart. & Schau. segue os padrões relatados para outras espécies do gênero. Características estruturais como cutícula delgada, grandes espaços intercelulares, ausência de tecidos de

sustentação e folhas finas, provavelmente, estão associadas ao ambiente de cultivo, pois trata-se de uma espécie de campo rupestre. Normalmente, plantas de campo rupestre apresentam características anatômicas que as protegem contra a excessiva perda de água, o que não foi observado em *L. filifolia* cultivadas *in vitro*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABENA, A.A.; DIATEWA, M.; GAKOSSO, G.; GBEASSOR, M.; HONDI-ASSAH, Th.; QUAMBA, J.M. Analgesic, antipyretic and anti-inflammatory effects of essential oil of *Lippia multiflora*. *Fitoterapia*, 74:231-236, 2003.
- ALQUINI, Y.; BONA.; BOEGER, M.R.T.; COSTA, C.G.; BARROS, C.F. Epiderme. In: APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.A.; CARMELLO-GUERREIRO, S.M.C. *Anatomia vegetal*. Viçosa: UFV, 438 p., 2003.
- ANTUNES, T.; SEVINATE-PINTO, I. Glandular trichomes of *Teucrium scorodonia* L. morphology and histochemistry. *Flora*, 185:65-70, 1991.
- BASSOLE, I.H.N.; QUATTARA, A.S.; NEBIE, R.; QUATTARA, C.A.T.; KABORE, Z.I.; TRAORE, S.A. Chemical composition and antibacterial activities of the essential oils of *Lippia chevalieri* and *Lippia multiflora* from Burkina Faso. *Phytochemistry*, 62:209-212, 2003.
- BASSOLS, G.B.; GURNI, A.A. Comparative anatomical study on Argentine species of *Lippia* known as "Poleo". *Pharmaceutical Biology*, 38(2):120-128, 2000.
- BISIO, A.; CORALLO, A.; GASTALDO, P.; ROMUSSI, G.; CIARALLO, G.; FONTANA, N.; TOMMASI, N.; PROFUMO, P. Glandular hairs and secreted material in *Salvia blepharophylla* Brandegees ex Epling grown in Italy. *Annals of Botany*, 83:441-452, 1999.
- BOSABALIDIS, A.; TSAKOS, I. Glandular scale development and essential oil secretion in *Origanum dictamnus* L. *Planta*, 156:496-504, 1982.
- BOZZOLA, J. J.; RUSSEL, L. D. *Electron microscopy*. Boston: Jones and Bartlett Publishers, 542 p., 1992.

- BRUNETON, J. *Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants*. 2<sup>th</sup> ed. Translated by Hatton, C.K. New York: Lavoisier Publishing, 1119 p., 1999.
- CANTINO, P.D. The phylogenetic significance of stomata and trichomes in Labiatae and Verbenaceae. *Journal of the Arnold Arboretum*, 71:323-370, 1990.
- CARVALHO, L.C.; OSÓRIO, M.L.; CHAVES, M.M.; AMÂNCIO, S. Chlorophyll fluorescence as an indicator of photosynthetic functioning of *in vitro* grapevine and chestnut plantlets under *ex vitro* acclimatization. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 67:271-280, 2001.
- CASTRO, D.M. *Efeito da variação sazonal, colheita selecionada e temperaturas de secagem sobre a produção de biomassa, rendimento e composição de óleos essenciais de folhas de Lippia alba (Mill.) N.E.Br.ex Britt. & Wilson (Verbenaceae)*. Botucatu: Tese de Doutorado em Agronomia, Universidade Estadual Paulista. 110 p., 2001.
- COMPADRE, C.M.; ROBBINS, E.F.; KINGHORN, A.D. The intensely sweet herb, *Lippia dulcis* Trev.: historical uses, field inquiries, and constituents. *Journal of Ethnopharmacology*, 15:89-106, 1986.
- CORRÊA, C.B.V. Contribuição ao estudo de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. ex Britt. & Wilson – erva cidreira. *Revista Brasileira de Farmácia*, 73(3):57-64, 1992.
- CRONQUIST, A. *The evolution and classification of flowering plants*. 2<sup>nd</sup> ed. New York: The New York Botanical Garden, 555 p., 1988.
- DAVID, R.; CARDE, J.P. Coloration différentielle des inclusions lipidique et terpeniques des pseudophylles du *Pin maritime* au moyen du réactif Nadi. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l' Académie des Sciences Paris*, 258:1338-1340, 1964.
- DONNELLY, D.J.; VIDAVER, W.E.; LEE, K.Y. The anatomy of tissue cultured red raspberry prior to and after transfer to soil. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 4:43-50, 1985.
- DUKE, S.O. Commentary glandular trichomes: A focal point of chemical and structural interactions. *International Journal of Plant Science*, 155:617-620, 1994.
- FAHN, A. *Plant anatomy*. Toronto: Pergamon Press. 611 p., 1975.
- FAHN, A. Secretory tissues in vascular plants. *New Phytologist*, 108: 229-257, 1988.
- FAHN, A. *Plant anatomy*. London: Butterworth-Heinemann. (4<sup>th</sup> ed) 588 p., 1990.

- FERREIRA, J.L.P.; VELASCO, E.; ARAÚJO, R.B.; KUSTER, R.M.; AMARAL, A.C.F. Diferenciação morfo-anatômica entre as folhas de *Lippia lycioides* (Cham.) Steud. e *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown ex Britton & Wilson. In: 53º Congresso Nacional de Botânica, Recife, PE, UFPE, p.159, 2002.
- GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50:151-158, 1968.
- GERLACH, D. *Botanische mikrotechnik*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 311 p. 1984.
- GILLY, C.; ROHR, R.; CHAMEL, A. Ultrastructure and radiolabelling of leaf cuticles from ivy (*Hedera helix* L.) plants *in vitro* and during *ex vitro* acclimatization. *Annals of Botany*, 80:139-145, 1997.
- GOMES, E.C.; MING, L.C.; MOREIRA, E.A.; MIGUEL, O.G.; MIGUEL, M.D.; KERBER, V.A.; CONTE, A.; WEISS FILHO, A. Constituintes do óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. (Verbenaceae). *Revista Brasileira de Farmácia*, 74:29-32, 1993.
- GRAVANO, E.; TANI, C.; BENNICI, A.; GUCCI, R. The ultrastructure of glandular trichomes of *Phillyrea latifolia* L. (Oleaceae) leaves. *Annals of Botany*, 81:327-335, 1998.
- HUGHES, K.W. *In vitro* ecology: exogenous factors affecting growth and morphogenesis in plant culture systems. *Environmental and Experimental Botany*, 21(3/4):281-288, 1981.
- JENSEN, W.A. *Botanical histochemistry, principles and practice*. San Francisco: W.H. Freeman, 408 p., 1962.
- JOHANSEN, D. A. *Plant microtechnique*. New York, Mc Graw-Hill Book Co. Inc., 523 p., 1940.
- JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOGG, E.A.; STEVENS, P.F. *Plant systematics: a phylogenetic approach*. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates Inc., 464 p., 1999.
- JULIANI, H.R.; KOROCH, A.R.; JULIANI, H.R.; TRIPPI, V.S.; ZYGADLO, J.A. Intraespecific variation in leaf oils of *Lippia junelliana* (Mold.) Tronc. *Biochemical Systematics and Ecology*. 30:163-170, 2002.

- KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, 27:137-138, 1965.
- KUNLE, O.; OKOGUN, J.; EGAMANA, E.; EMOJEVWE, E.; SHOK, E. Antimicrobial activity of various extracts and carvacrol from *Lippia multiflora* leaf extract. *Phytomedicine*, 10:59-61, 2003.
- LEE, N.; WETZSTEIN, Y.; SOMMER, H.E. Effects of quantum flux density on photosynthesis and chloroplast ultrastructure in tissue-cultured plantlets and seedlings of *Liquidambar styraciflua* L. towards improved acclimatization and field survival. *Plant Physiology*, 78:637-641, 1985.
- LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas*. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora. 512 p., 2002.
- MAIA, V. *Técnicas histológicas*. São Paulo: Atheneu, 298 p., 1979.
- MAJADA, J.P.; TADEO, F.; FAL, M.A.; SÁNCHEZ-TAMÉS, R. Impact of culture vessel ventilation on the anatomy and morphology of micropropagated carnation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 63: 207-214, 2000.
- MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D. C.; DIAS, J. E. *Plantas medicinais*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 220 p., 2000.
- METCALFE, C.R.; CHALK, L. *Anatomy of the dicotyledons: leaves, stem and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses*. Oxford: Clarendon Press, v. 2, 1041-1053 p., 1950.
- MENDONÇA, M.P.; LINS, L.V. *Lista vermelha das espécies ameaçadas de extinção da flora de Minas Gerais*. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, Fundação Zoo-Botânica de Belo Horizonte, 160 p., 2000.
- MORRETES, B.L. Contribuição ao estudo da anatomia das folhas do cerrado III. *Boletim da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo* 331, *Botânica*, 24:7-32, 1969.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15:473-497, 1962.
- O'BRIEN, T. P.; MCCULLY, M. E. *The study of plant structure principles and selected methods*. Melbourne - Australia: Termarcarphi Pty Ltd., 45 p., 1981.

- PASCUAL, M.E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; SÁNCHEZ MATA, D.; VILLAR, A. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *Journal of Ethnopharmacology*, 76:201-214, 2001a.
- PASCUAL, M.E.; SLOWING, K.; CARRETERO, M. E.; VILLAR, A. Antiulcerogenic activity of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). // *Farmaco*, 56:501-504, 2001b.
- PEIXOTO, P.H.P.; SALIMENA, F.R.G.; LEITE, M.N.; GARCIA, L.S.; PIERRE, P.M.O.; VICCINI, L.F. Micropropagação de *Lippia filifolia* Mart. & Schau. *Submetido*.
- POSPÍŠILOVÁ, J.; TICHÁ, I.; KADLECEK, P.; HASEL, D.; PLZÁKOVÁ, Š. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. *Biologia Plantarum*, 42(4):481-497, 1999.
- RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. *Biologia vegetal*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. (6ª ed) 906 p., 2001.
- REHEM, B.C.; SILVA, D.C.; COSTA, L.C.B.; ROCHA, E.A. Anatomia comparativa de três espécies de *Lippia* (Verbenaceae) da Mata Atlântica utilizadas na medicina popular. In: 53º Congresso Nacional de Botânica, Recife, PE, UFPE, 203 p., 2002.
- ROUT, G. R.; SAMANTARY, S.; DAS, P. *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants. *Biotechnology Advances*, 18:91-120, 2000.
- SALIMENA, F.R.G. *Verbenaceae da Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil*. São Paulo: Tese de Mestrado. Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo, 302 p., 1991.
- SALIMENA-PIRES, F.R. *Revisão taxonômica de **Lippia** L. sect. Rhodolippia Schauer (Verbenaceae)*. São Paulo: Tese de Doutorado. Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo, 2000.
- SALIMENA, F.R.G. Novos sinônimos e tipificações em *Lippia* sect. *Rhodolippia* (Verbenaceae). *Darwiniana*, 40(1-4):121-125, 2002.
- SERRATO-VALENTI, G.; BISIO, A.; CORNARA, L.; CIARALLO, G. Structural and histochemical investigation of the glandular trichomes os *Salvia aurea* L. leaves, and chemical analysis of the essential oil. *Annals of Botany*, 79:329-336, 1997.

- SILVEIRA, M. O preparo de amostras biológicas para microscopia eletrônica de varredura. In: SOUZA, W. (Ed.) *Manual sobre técnicas básicas em microscopia eletrônica de varredura. v.1. Técnicas Básicas*. Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica, 71-82 p., 1989.
- SOLEREDER, H. *Systematic anatomy of the Dicotyledons*. Oxford: Clarendon Press, vol. II: 630-636 p., 1908.
- SVENDSEN, A.B.; VERPOORTE, R. *Chromatography of alkaloids*. New York: Elsevier Scientific Publishing Company, 1983.
- TAVARES, E.S. *Estudos integrados em Lippia alba (Mill.) N.E.Br. – uma planta de interesse econômico e medicinal*. Rio de Janeiro: Tese de Doutorado em Biotecnologia Vegetal, Universidade Federal do Rio de Janeiro. 160 p., 2003.
- TERBLANCHÉ, F.C.; KORNELIUS, G. Essential oil constituents of the genus *Lippia* (Verbenaceae) – A literature review. *Journal of Essential Oil Research*, 8:471-85, 1996.
- TICHÁ, I.; KUTIK, J.; Leaf morphology, anatomy and ultrastructure in transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun) plantlets. *Biologia Plantarum*, 34:567-568, 1992.
- TRONCOSO N. Descripción de algunas especies nuevas o críticas de *Lippia* de la flora argentina. *Darwiniana*, 10:69-89, 1952.
- VALLE, T.G.; MATOS, F.J.A.; LIMA, T.C.M.; VIANA, G.S.B. Behavioral effects of essential oils from *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown chemotypes. *Journal of Ethnopharmacology*, 167:127-133, 1999.
- VENTRELLA, M.C. *Produção de folhas, óleo essencial e anatomia foliar quantitativa de Lippia alba (Mill.) N.E.Br. (Verbenaceae) em diferentes níveis de sombreamento e épocas de colheita*. Botucatu: Tese de Doutorado em Agronomia, Universidade Estadual Paulista. 86 p., 2000.
- VIÑA, G. de la; PLIEGO-ALFARO, F.; DRISCOLL, S.P.; MITCHELL, V.J.; PARRY, M.A.; LAWLOR, W. Effects of CO<sub>2</sub> and sugars on photosynthesis and composition of avocado leaves grown *in vitro*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 37(7/8):587–595, 1999.
- WATSON, R.W. The effect of cuticular hardening on the form of epidermal cells. *New Phytologist*, 41:223-229, 1942.

WERKER, E. Function of essential oil-secreting glandular hairs in aromatic plants of the Lamiaceae. A review. *Flavour and Fragrance Journal*, 8:249-255, 1993.

WERKER, E. Trichome diversity and development. In: HALLAHAN, D.L.; GRAY, J.C.; CALLOW, J.A. *Advances in botanical research, incorporating advances in plant pathology - plant trichomes*, San Diego: Academic Press, vol. 31., 1-35 p., 2000.

WERKER, E.; RAVID, U; PUTIEVSKY, E. Structure of glandular hairs and identification of the main components of their secreted material in some species of the Labiatae. *Israel Journal of Botany*, 34:31-45, 1985.

WITHERS, L.A.; WILLIAMS, J.T. Conservação *in vitro* de recursos genéticos de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. 1ª ed. Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa-CNPQ. 1:297-330 p., 1998.

ZOGHBI, M.G.B.; ANDRADE, E.H.A.; SANTOS, A.S.; SILVA, M.H.L.; MAIA, J.G.S. Essential oils of *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. growing wild in the Brazilian Amazon. *Flavour and Fragrance Journal*, 13: 47-48, 1998.

## CONCLUSÕES GERAIS

As variações nos níveis de irradiância alteraram a concentração dos pigmentos fotossintéticos, mas não influenciaram a biossíntese de antocianinas, demonstrando que as condições a que *L. filifolia* foi submetida, não induziram elevados níveis de estresse para as plantas.

Os níveis de irradiância e os meios de cultivos utilizados influenciaram no desenvolvimento da parte aérea, com variações significativas no crescimento em altura, área foliar e número de brotações, que não comprometeram a sobrevivência da planta no decorrer do experimento. Já o sistema radicular não foi influenciado pelos níveis de irradiância, apenas pelos meios de cultivo.

A estrutura foliar observada em *L. filifolia* Mart. & Schau. segue os padrões relatados para a família, de forma geral e, especificamente, para outras espécies do gênero. Possui características anatômicas, geralmente, apresentadas por plantas cultivadas *in vitro*, como cutícula delgada, grandes espaços intercelulares, ausência de tecidos de sustentação e folhas finas.

Os testes histoquímicos confirmaram a presença de compostos, como óleos essenciais, de grande importância para o gênero, e já relatados para outras espécies de *Lippia*.