



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE  
SANTANA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS  
GENÉTICOS VEGETAIS**



**ANA CAROLINA DA CUNHA RODRIGUES**

**PROPAGAÇÃO *in vitro* E ACLIMATIZAÇÃO DE ESPÉCIES  
MEDICINAIS: *Alpinia zerumbet* (Pers.) B. L. Burtt. & R. M. Sm.  
(ZINGIBERACEAE) E *Solidago chilensis* Meyen  
(ASTERACEAE)**

Feira de Santana – BA  
2016

**ANA CAROLINA DA CUNHA RODRIGUES**

**PROPAGAÇÃO *in vitro* E ACLIMATIZAÇÃO DE ESPÉCIES  
MEDICINAIS: *Alpinia zerumbet* (Pers.) B. L. Burtt. & R. M. Sm.  
(ZINGIBERACEAE) E *Solidago chilensis* Meyen  
(ASTERACEAE)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador: Prof. Dr. José Raniere Ferreira de Santana

Feira de Santana – BA  
2016

Rodrigues, Ana Carolina da Cunha

R611 Propagação *in vitro* e aclimatização de espécies medicinais: *Alpinia zerumbet* (Pers.) B. L. Burtt. & R. M. Sm. (Zingiberaceae) e *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae) / Ana Carolina da Cunha Rodrigues. – Feira de Santana, 2017.  
95 f. : il.

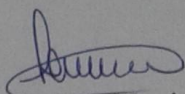
Orientador: José Raniere Ferreira de Santana.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, 2017.

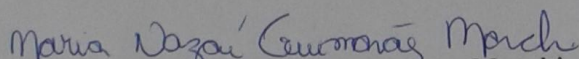
1. Plantas medicinais. 2. *Alpinia zerumbet*. 3. *Solidago chilensis*. 4. Amica. 5. Colônia. 6. Propagação *in vitro*. 7. Organogênese. I. Santana, José Raniere Ferreira de., orient. II. Universidade Estadual de Feira de Santana. III. Título.

CDU 633.8

**BANCA EXAMINADORA**

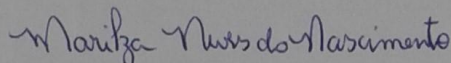


**Prof. Dr. Lenaldo Muniz de Oliveira**  
Universidade Estadual de Feira de Santana

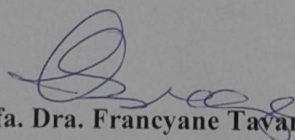


**Profa. Dra. Maria Nazaré Guimarães Marchi**

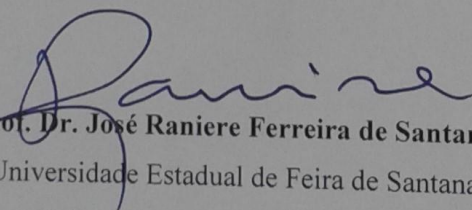
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Baiano



**Profa. Dra. Marilza Neves do Nascimento**  
Universidade Estadual de Feira de Santana



**Profa. Dra. Franciane Tavares Braga**  
Universidade do Estado da Bahia



**Prof. Dr. José Raniere Ferreira de Santana**  
Universidade Estadual de Feira de Santana  
Orientador e Presidente da Banca

**Feira de Santana – BA**

**2016**

**OFEREÇO**  
**Ao meu pai (*in memorian*), mãe, irmãos, cunhados e sobrinhos,**  
**por terem me incentivado em busca de cada vez mais conhecimento.**

*À minha família e amigos pelo apoio durante a realização deste trabalho.*

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

A Deus em primeiro lugar, que me deu a oportunidade da vida e proporcionou ter experiências que contribuem para o meu crescimento intelectual, moral e espiritual.

À minha família, por ser meu porto seguro. Minha mãe Maria Carolina, meu irmão Alessandro e irmã Andréa que nunca deixaram de estar ao meu lado, meus cunhados, Ramon e Jaqueline com quem sempre pude contar, meus sobrinhos Milena, Gustavo e Ana Paula pelas lembranças de que a vida é maravilhosa nas pequenas coisas. Aos meus filhos e afilhados de quatro patas, pelos momentos de alegria, conforto e esperança de um mundo melhor.

Ao meu pai (*in memoriam*), quem torceu e contribuiu para o meu trajeto profissional e com certeza ainda vibra pelas minhas conquistas no caminho da vida.

Aos meus amigos, pelo apoio, conselhos e momentos de reflexão.

A Rodrigo, que chegou perto do fim e ainda assim foi ímpar.

Às minhas estagiárias, sem elas o término do trabalho seria bem diferente.

Aos colegas de trabalho, pelo apoio e oportunidade.

Ao meu orientador pela sinceridade e incentivo ao longo desses anos de convivência.

Aos meus colegas do curso, pelos momentos de apoio, trabalho em grupo, incentivo, troca de experiências, em especial Tecla Santos Silva e Flávia Pereira de Sousa.

À Sara Galvão e Sandra Queiroz, por serem Espíritos de Luz na minha vida.

À Universidade Estadual de Feira de Santana e ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais pela realização do curso. À Unidade experimental Horto Florestal, Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais pela infraestrutura e suporte com reagentes.

À UFBA, pela infraestrutura e suporte para a realização dos experimentos, em especial aos laboratórios 14 e 13, Dra Patrícia Lopes Leal, Dr Leandro Martins de Freitas, Dra Patrícia Bellini e Dr Orlando Caires Neves.

E a todas as pessoas que contribuíram, diretamente ou indiretamente, para a conquista.

**Meus sinceros agradecimentos!!**

Cada dia que amanhece se assemelha a uma página em branco, na qual gravamos os nossos pensamentos, ações e atitudes. Na essência, cada dia é a preparação de nosso próprio amanhã.

Chico Xavier

## RESUMO

*Alpinia zerumbet* e *Solidago chilensis* são conhecidas pelos valores ornamental e medicinal. Existem poucos relatos na literatura sobre micropropagação de *Alpinia zerumbet* e nenhum sobre *Solidago chilensis*, o que demonstra necessidade de estudos. Este trabalho objetivou estudar a propagação *in vitro* das espécies, envolvendo micropropagação e desenvolvendo protocolos para organogênese. Para o estabelecimento *in vitro* foram testados diferentes tipos de explantes, métodos de desinfestação e antioxidantes. Para multiplicação, esses explantes foram testados com reguladores vegetais: ácido naftalenoacético e benzilaminopurina isolados e combinados, além de ácido 2,4-diclorofenoxiacético e cinetina, isolados e combinados. Foi feita caracterização anatômica da calogênese. Para aclimatização, após a pré-aclimatização, as mudas foram transferidas para copos plásticos contendo substrato esterilizado, tampados com garrafas pet e levados para casa de vegetação com sombrite 50%, onde as tampas das garrafas foram desenroscadas aos poucos. Os resultados mostraram sucesso no estabelecimento *in vitro* de *A. zerumbet*, etapa crucial para iniciar cultivo em larga escala. Contra contaminação, o tratamento mais efetivo foi 4mL de PPM/L (Plant Preservative Mixture), controlando 100% dos patógenos. Como antioxidante, o ácido ascórbico (2%) foi o mais eficiente. Houve brotação de *A. zerumbet* em explantes derivados de gemas. Não foi observado declínio na taxa de propagação no decorrer dos subcultivos *in vitro*, contudo o crescimento é muito lento. Para *S. chilensis*, explantes de segmentos nodais apresentaram maior taxa de multiplicação. Não foi observado declínio na taxa de propagação no decorrer de quatro subcultivos *in vitro* e as mudas apresentaram alto índice de sobrevivência na fase de aclimatização.

**Palavras-chave:** Arnica. Colônia. Embriogênese. Estabelecimento *in vitro*. Organogênese. Oxidação.



## ABSTRACT

(*In vitro* propagation and acclimatization of medicinal species: *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L.Burtt&R.M.Sm. (Zingiberaceae) and *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae). *Alpinia zerumbet* and *Solidago chilensis* are known for their ornamental and medicinal values. There are few reports in the literature on micropropagation of *Alpinia zerumbet* and none about *Solidago chilensis*, which demonstrates the need for studies. This work aimed to study *in vitro* propagation of the species, involving micropropagation and developing protocols for organogenesis. For *in vitro* establishment were tested different types of explants, disinfection methods and antioxidants. For multiplication, these explants were tested with plant growth regulators naftalen acetic acid and benzilaminopurin isolated and combined, and dichlorophenoxyacetic acid and kinetin, isolated and combined. It was made anatomical characterization of callus formation. For acclimatization, after pre-acclimatization, the seedlings were transferred to plastic cups containing sterilized substrate, capped with plastic bottles and taken to a greenhouse with 50% shading, where the bottle caps were unscrewed slowly. The results showed success in establishing *in vitro* of *A. zerumbet* crucial step to start large-scale cultivation. Against contamination, the most effective treatment was 4ml PPM/L (Plant Preservative Mixture), controlling 100% of pathogens. As an antioxidant, ascorbic acid (2%) was the most efficient. There was budding *A. zerumbet* derivatives bud explants. There was no decline in the propagation rate during *in vitro* subcultures, however growth is very slow. *S. chilensis*, explants nodal segments showed a higher rate of multiplication. There was no decline in the spread rate over four subcultures *in vitro* and the seedlings had a high survival rate in the acclimatization phase.

**Keywords:** Arnica. Colônia. Embryogenesis. *In vitro* establishment. Organogenesis. Oxidation.

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

PNPIC – Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares

SUS – Sistema Único de Saúde

PNPMF – Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos

PPPM – Programa de Pesquisas de Plantas Medicinais

RENISUS – Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS

MS – Murashige e Skoog

SH – Schenk e Hildebrandt

ANA – Ácido Naftalenoacético

AIB – Ácido Indolbutírico

BAP – Benzilaminopurina

2,4D – Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

KIN – Cinetina

CCDB – Chromosome Counts Database

DIC – Delineamento Inteiramente Casualizado

DCA – Departamento de Ciências Atmosféricas

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO GERAL</b>	11
1.	<b>INTRODUÇÃO</b>	11
2.	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b>	16
2.1	<i>Alpinia zerumbet</i>	16
2.2	<i>Solidago chilensis</i>	20
3.	<b>REFERÊNCIAS</b>	25
	<b>CAPÍTULO 1 - Calogênese <i>in vitro</i> de segmentos foliares e caulinares de <i>Solidago chilensis</i> Meyen</b>	37
1.	<b>Introdução</b>	38
2.	<b>Material e Método</b>	40
3.	<b>Resultados e Discussão</b>	42
4.	<b>Conclusão</b>	55
5.	<b>REFERÊNCIAS</b>	55
	<b>CAPÍTULO 2 - Regeneração <i>in vitro</i> de <i>Solidago chilensis</i> Meyen via organogênese direta</b>	60
1.	<b>Introdução</b>	62
2.	<b>Material e Método</b>	63
3.	<b>Resultados e Discussão</b>	65
4.	<b>Conclusão</b>	72
5.	<b>REFERÊNCIAS</b>	72
	<b>CAPÍTULO 3 – Micropropagação de <i>Alpinia zerumbet</i> (Pers.) B.L. Burtt &amp; R.M. Sm. (Zingiberaceae)</b>	77
1.	<b>Introdução</b>	79
2.	<b>Material e Método</b>	81
3.	<b>Resultados e Discussão</b>	84
4.	<b>Conclusão</b>	89
5.	<b>REFERÊNCIAS</b>	90
	<b>CONCLUSÃO GERAL</b>	95

## **INTRODUÇÃO GERAL**

### **1. INTRODUÇÃO**

Desde a antiguidade as plantas podem ser usadas para alívio de sintomas e cura de diversas doenças, sendo uma forma de tratamento relacionada aos primórdios da medicina e fundamentada no acúmulo de informações através de sucessivas gerações (BRASIL, 2006a). As plantas são de fundamental importância, pois, por apresentarem propriedades terapêuticas ou tóxicas, podem ser utilizadas na recuperação da saúde, tendo grande relevância a realização de estudos que identifiquem espécies com potencial de uso tanto em preparações tradicionais (chá, sucos, xaropes, entre outros) como também na forma de princípios ativos isolados (MARTINS et al., 2000).

Os componentes da biodiversidade podem fornecer uma ampla gama de produtos de importância econômica, dentre eles destacam-se os fitoterápicos (medicamentos preparados exclusivamente à base de plantas medicinais) e os fitofármacos (substâncias extraídas de plantas, que apresentam atividades farmacológicas, podendo ter aplicações terapêuticas), ambos recursos genéticos vegetais (SIMÕES et al., 2010). A etnobotânica estuda as sociedades humanas, passadas e presentes, e suas interações ecológicas, genéticas, evolutivas, simbólicas e culturais com as plantas (ALEXIADES e SHELDON, 1996). Interligado ao estudo de plantas medicinais, a etnobotânica trabalha em conjunto com outras disciplinas correlatas como, por exemplo, a etnofarmacologia, que consiste em combinar informações adquiridas junto a usuários da flora medicinal com estudos químicos e farmacológicos (ELISABETSKY, 2003).

Conforme Prudêncio (2012), a pesquisa em etnobotânica baseia-se em dois pontos: a coleta de plantas e a coleta de informações sobre o uso da mesma, ou seja, quanto mais detalhadas forem as informações, maiores serão as chances de subsidiar o interesse para se avaliar a eficácia e a segurança do uso de plantas para fins terapêuticos. Desde o ano de 2006, o governo federal tem implementado ações para incentivar a pesquisa e o desenvolvimento do setor de plantas medicinais e fitoterápicos. Entre eles, a Portaria Ministerial MS/GM nº 971, de 03 de maio de 2006, que aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS) e o Decreto no 5.813, de 22 de junho de 2006, que aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) e dá outras providências. Essas políticas preconizam o incentivo à pesquisa e o desenvolvimento com relação ao uso de plantas medicinais e fitoterápicos, priorizando a biodiversidade do país (CARVALHO et al., 2008). Até o momento, 71 espécies pertencem ao

elenco definitivo de espécies vegetais nomeadas para estudos pelo PPPM (Programa de Pesquisas de Plantas Medicinais) e para alicerçar ainda mais as ações de fitoterapia nas políticas públicas de saúde, foi criada a RENISUS – Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS, onde estão *Alpinia zerumbet* (Pers.) B. L. Burtt. & R. M. Sm. e *Solidago microglossa* D.C., que é uma sinonímia científica de *S. chilensis* Meyen, a fim de que o uso dessas plantas bioativas seja realizado de maneira mais racional e padronizado (Brasil 2006b; 2009).

No Brasil algumas espécies exóticas utilizadas na medicina popular ainda têm sido pouco estudadas e pesquisas que envolvam propagação dessas espécies devem ser desenvolvidas, preservando a diversidade e a integridade do patrimônio genético. Assim, uma das possibilidades de preservar e multiplicar essas espécies seriam as técnicas de cultura de tecidos, a partir de explantes de plantas que não possuem condições de produzir sementes devido à ausência de formação de frutos ou impossibilidade de germinação devido à mudança do seu local de origem. Para Medeiros (2003), o uso da tecnologia é frequentemente o único recurso na preservação da biodiversidade e promoção da variabilidade.

As técnicas de cultura de tecidos estão baseadas na totipotencialidade da célula vegetal, que possibilita a regeneração de plantas a partir de células, tecidos e órgãos. Nessa técnica segmentos de tecido ou órgão vegetal, aqueles identificados como mais adequados por possuir maior potencialidade morfogênética, são utilizados para iniciar a cultura *in vitro*, em condições assépticas, em meio nutritivo (PINTO e LAMEIRA, 2001). A cultura de tecidos, dentre suas técnicas a micropropagação, é grandemente influenciada pelo tipo de meio de cultura, apresentando diversas concentrações e constituintes entre macro e micronutrientes, vitaminas, fontes de ferro, carboidratos e suplementos orgânicos (PINTO e LAMEIRA, 2001; PEREIRA et al., 2005). Os autores ainda afirmam que a interação e o balanço entre os reguladores vegetais supridos no meio e os hormônios produzidos endogenamente pelas células, vão regular o crescimento e a morfogênese *in vitro*, exceto alguns tecidos que não sintetizam hormônios e por isso são completamente dependentes de reguladores exógenos adicionados ao meio de cultura.

Reguladores vegetais são substâncias naturais ou sintéticas aplicadas nas plantas para alterar os processos vitais e estruturais para incrementar produção e melhorar a qualidade de culturas de interesse econômico (LACA-BUENDIA, 1989). Até recentemente eram conhecidos apenas cinco tipos (auxinas, giberelinas, citocininas, ácido abscísico e etileno) e hoje outras moléculas com efeitos similares tem sido descobertas, tais como, brassinosteróides, ácido jasmônico, ácido salicílico e poliaminas (CATO, 2006). Vários

grupos de reguladores de plantas são conhecidos e estão envolvidos em uma grande variedade de respostas fisiológicas, são os principais compostos orgânicos no meio de cultura que causam respostas morfogênicas *in vitro*.

Diferenças nas concentrações de auxinas e citocininas são responsáveis pela promoção de diferentes respostas, redução do balanço auxina/citocinina induz formação de gemas, concentrações iguais produzem calos e o incremento de auxina tende a iniciar o crescimento de raízes (MOURA et al., 2000; PINTO e LAMEIRA, 2001). Contudo, conforme Nunes et al. (1999), as auxinas estão associadas à diferenciação celular que pode originar os primórdios radiculares, mas provocam a proliferação desordenada de células, formando os calos. Para a rizogênese, as auxinas são os principais reguladores utilizados, sendo ANA (Ácido Naftalenoacético) e AIB (Ácido Indolbutírico) as mais empregadas (MOURA et al., 2000). Entretanto, Grattapaglia e Machado (1990) verificaram que diversas espécies enraízam na presença de níveis muito baixos ou nulos de auxina, principalmente no caso de herbáceas.

Yue e Reed (1993) ressaltam que as plantas propagadas *in vitro* têm potencialidade para desenvolver aparato fotossintético funcional, todavia novas estruturas devem ser formadas durante a fase de enraizamento e para tanto fatores como concentração de sacarose e aeração de recipientes podem ser manipulados. Assim, verifica-se que o cultivo *in vitro* de plantas é um complexo processo dependente de fatores endógenos e exógenos tais como genótipo, substrato (com os diferentes meios e seus reguladores), condições físicas do ambiente onde o cultivo é desenvolvido e ainda fatores dependentes do tecido utilizado como explante.

A oxidação, é um dos fatores que interferem no cultivo *in vitro*, se caracteriza pelo escurecimento das partes excisadas dos explantes e do meio de cultivo, influenciando na absorção dos constituintes do meio pelo explante em virtude da obstrução do tecido oxidado, o que limita em parte o processo de micropropagação de algumas espécies e interfere na taxa de multiplicação (OLIVEIRA et al., 2001; COSTA et al., 2006). Tal oxidação é resultante da liberação de compostos fenólicos *in vitro*, como melanina, suberina, lignina, cutina e calose pelo tecido injuriado, que modifica a composição do meio de cultivo e, conseqüentemente, a absorção de metabólitos (ANDRADE et al., 2000; VAN WINKLE et al., 2003). Os compostos fenólicos sofrem oxidação pelas enzimas polifenoloxidasas, produzindo quinonas na presença do oxigênio molecular, substâncias altamente tóxicas, o que lhes permite reduzir a ação de microrganismos invasores, contudo normalmente inibem o crescimento dos explantes, ocasionando, não raramente, até a morte dos mesmos (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998; ALVARENGA et al., 2011). Para a diminuição da oxidação, Grattapaglia e Machado

(1998) ainda recomendam a adição de antioxidantes ao meio de cultivo ou o pré-tratamento dos explantes em solução contendo antioxidantes.

É difícil avaliar a dimensão econômica intrínseca existente entre o cultivo de plantas medicinais e a saúde da população favorecida, mesmo porque a maior parte das plantas é colhida sem cultivo regular, contudo é indiscutível a tendência de desenvolvimento nesta área. No processo produtivo de plantas medicinais em quantidade e com qualidade adequadas é imperativo o processo de produção de mudas, que constitui o primeiro passo para atingir o objetivo esperado (SILVA et al., 2011). A germinação das sementes pode ser definida como a emergência e o desenvolvimento das estruturas essenciais do embrião, em que se manifesta a sua capacidade para dar origem a uma plântula normal, em condições ambientais favoráveis (BORGUETTI e FERREIRA, 2004). Para essas condições ambientais favoráveis, devem-se levar em conta alguns fatores extrínsecos (ambientais), contemplados principalmente pela temperatura e luz, e intrínsecos, ligados à própria semente (dureza, impermeabilidade do tegumento à água e gases, embrião imaturo e presença de inibidores) que podem promover a dormência das sementes e conseqüentemente inibir o processo germinativo (BEWLEY e BLACK, 1994).

Por outro lado, a propagação vegetativa tem como característica, a obtenção de lotes de plantas bastante uniformes e produtivos quando as condições de clima e solo são favoráveis e é muito importante para indivíduos que geram nenhuma ou pouca semente, e para manter um programa de melhoramento ou plantios comerciais, tanto de espécies lenhosas quanto herbáceas, consistindo em multiplicar assexuadamente células, tecidos, órgãos ou propágulos de maneira a produzir clones, visando melhorar e manter variedades de importância econômica e medicinal (PETRY, 1999; EHLERT et al., 2004; FERRARI et al., 2004). O interesse é relativamente recente e tem-se concentrado na verificação dos melhores tipos e comprimentos de estaca, no efeito do uso de reguladores vegetais e nos substratos mais adequados para o enraizamento, sobretudo *in vitro*. Estudos revelam que a utilização de macro ou microestacas do tipo herbácea, semilenhosa e lenhosa, com folhas presentes ou ausentes, assim como, a época de coleta influenciam consideravelmente no enraizamento das mesmas (BEZERRA e LEDERMAN, 1995). As principais vantagens são: rapidez na produção da muda, reprodução fiel da planta-matriz, possibilidade da multiplicação de plantas que não florescem ou não frutificam por motivos de adaptação e cujas sementes são estéreis, além de maior precocidade, uniformidade e alta qualidade das mudas produzidas (PETRY, 1999; BORGUETTI e FERREIRA, 2004).

Além do tipo de estaca, outro fator muito importante para o enraizamento é o

substrato. É de fundamental importância a mistura de diferentes componentes para a composição de um substrato estável, denso e firme para sustentar a estaca, com boa capacidade de retenção de água para que a frequência de irrigação seja baixa, poroso o suficiente para permitir a drenagem do excesso de água, promover aeração adequada, isento de patógenos, com suficiente provimento de nutrientes, e adaptado à obtenção de mudas de boa qualidade em curto período de tempo (CORREIA, 1998; MENEZES JÚNIOR et al., 2000; HARTMANN et al., 2011).

Quando é tratada a propagação vegetativa, além do tipo de substrato, os conhecimentos de anatomia são necessários, pois a identificação dos aspectos estruturais é importante para o sucesso da propagação, a qual depende da regeneração de tecidos vegetais que se encontram na amostra utilizada e das potencialidades desses tecidos, que determinam a capacidade de adaptação ao ambiente, utilizando-se reguladores vegetais ou não (SILVA et al., 2005; GIL et al., 2012; WENDLING e GATTO, 2012).

A germinação *in vitro* é um procedimento recomendado para trabalhos com espécies selvagens, pois visa identificar a existência de mecanismos de dormência de sementes e há possibilidade de identificar técnicas para acelerar e uniformizar a germinação, principalmente com o uso de giberelinas (PINTO e LAMEIRA, 2001) que atuam como indutores da transcrição de diversas hidrolases permitindo a mobilização de reservas que serão utilizadas pelo embrião (TAIZ e ZEIGER, 2013). Porém, quando a espécie não consegue reproduzir sexuadamente para manter sua descendência e promover a variabilidade natural, a cultura de tecidos acaba se tornando uma alternativa única, até que novos estudos citogenéticos sejam direcionados a fim de estudar até que ponto o nível de ploidia e a biologia reprodutiva desta espécie fora do centro de origem interferem nos seus mecanismos reprodutivos (KRIECK et al., 2008).

A micropropagação de espécies medicinais tem apresentado alternativas promissoras para programas de melhoramento, seja na multiplicação de um genótipo desejado, geração de nova variabilidade, seleção e produção de metabólitos secundários (PINTO e LAMEIRA, 2001). Diversos protocolos têm sido estabelecidos para multiplicação *in vitro*, Borthakur et al. (1999) para *Alpinia galanga* Will; Andrade et al. (2000) para *Myracrodruon urundeuva* Fr. All; Asmar et al. (2001) para *Mentha x Piperita* L.; Ahmad e Anis, (2005) para *Cucumis sativus* L.; Vicente et al. (2009) para *Vernonia condensata* Baker; Hamirah et al. (2010) para *Zingiber montanum* Koenig; Mohanty et al. (2011) para *Zingiber rubens* Roxb.; Rakkimuthu et al. (2011) e Victório et al. (2011) para *Alpinia zerumbet*; Campos et al. (2013) para *Amburana cearensis* (Allem.) A.C. Smith; Ozarowski e Thiem (2013) para *Passiflora* spp.;



Attia et al. (2014) para *Morus alba* L.; Stein et al. (2009) mostrando o efeito do genótipo para *Plantago* sp.; Pereira et al. (2006) com germinação de sementes de *Uncaria guianensis* (Aublet) Gmelin; entre outros. Contudo alguns trabalhos ainda são escassos e permanecem muitos questionamentos.

Existem poucos relatos na literatura sobre micropropagação de *Alpinia zerumbet* e *Solidago chilensis*, o que demonstra a necessidade de estudos com as espécies, visto suas importâncias econômicas e fontes de substâncias bioativas validadas cientificamente e que podem ser úteis na produção de fitoterápicos. Este trabalho teve como objetivo estudar a propagação *in vitro* das duas espécies, aprimorando protocolos existentes de micropropagação e desenvolvendo protocolos para organogênese, embriogênese e aclimatização, o que possibilita o desenvolvimento de estratégias para produção em larga escala, conservação e exploração sustentável.

## **2. REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 *Alpinia zerumbet***

#### **2.1.1 Aspectos taxonômicos**

Zingiberaceae é a maior família dentre as Zingiberales com 53 gêneros e mais de 1.200 espécies com distribuição geográfica Pantropical, consistindo de um gênero encontrado na região Neotropical (*Renealmia*), quatro gêneros encontrados na África (*Aframomum*, *Aulotandra*, *Siphonochilus* e *Renealmia*), e o restante dos gêneros distribuídos desde o leste da Ásia até as Ilhas do Pacífico (KRESS et al., 2002). Conforme Smith (1990), o gênero *Alpinia* é o maior, com mais 200 espécies. É cultivado em áreas antrópicas de quase todos os Estados brasileiros (MAAS e MAAS, 2014) e diversos trabalhos mostram que suas espécies são cultivadas como ornamentais e até para fins medicinais (RODRIGUES e GUEDES, 2006; OLIVEIRA JÚNIOR e LEITE, 2007; SOUZA e LORENZI, 2012). Muitas espécies são utilizadas para alimentação, perfumaria, na produção de condimentos de propriedades aromáticas, corantes, fibras e papel (TOMLINSON, 1956). Dentre essas, destaca-se *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burt & R.M. Sm. (Figura 1).

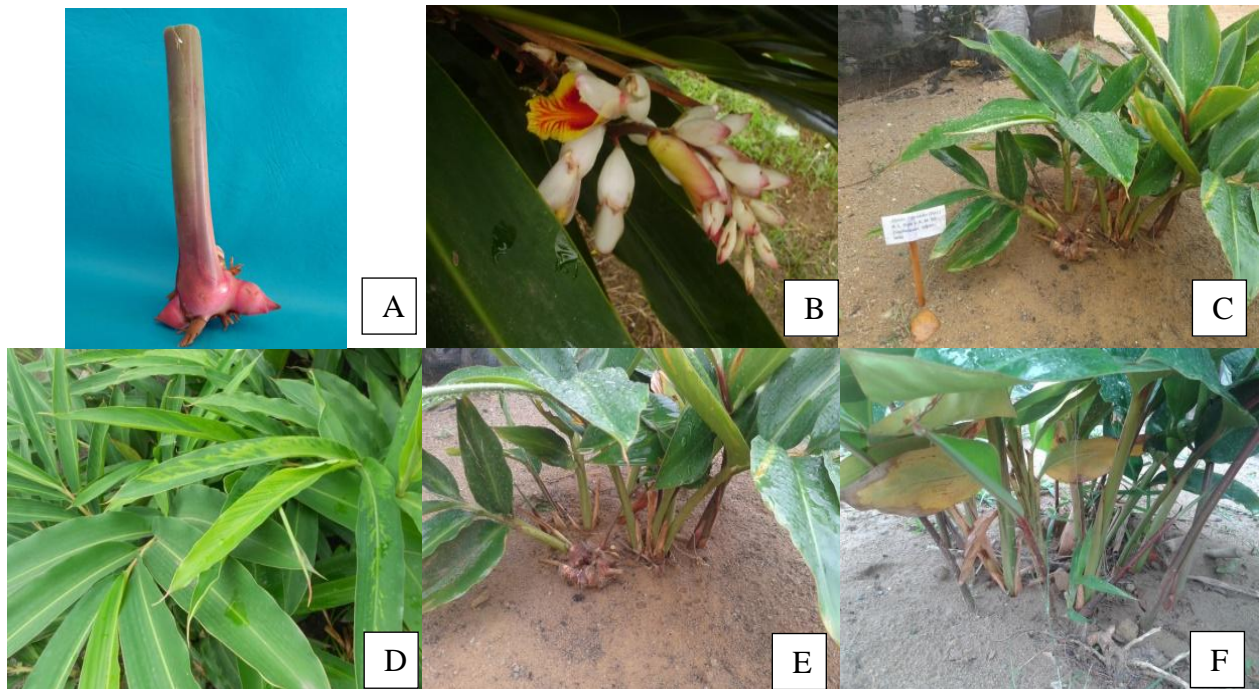


Figura 1 – A- Rizoma de *Alpinia zerumbet*; B- Detalhe da inflorescência; C- Muda cultivada no ambiente externo; D- Detalhe das folhas; E e F- Detalhes das touceiras e brotações laterais. Fotos: Premiumseeds (A), Ana Carolina.

É conhecida em várias regiões do Brasil por água-de-elefante, paco-seroca, cuité-açu, pacová, gengibre-concha, jardineiro, cardamomo-do-mato, cardamomo-falso, cana-do-brejo, cana-do-mato, paco-seroso, louro-de-baiano, alpinia, falsa-noz-moscada e vindivá (ALMEIDA, 1993; SOUZA e LORENZI, 2012; LORENZI e MATOS, 2008; RODRIGUES e GUEDES, 2006). Em outros países é conhecida popularmente como *flor del paraíso*, *paraíso*, *ilusion* (Venezuela); *boca de dragón* (República Dominicana), *shell ginger*, *shell flower*, *ginger lily* (em países de língua inglesa) (VICTÓRIO, 2008).

### 2.1.2 Aspectos morfo-anatômicos

É uma planta herbácea, rizomatosa, aromática capaz de atingir 2 a 3 metros de altura, folhas simples, coriáceas e lanceoladas em disposição dística, lígula desenvolvida e presença de longa bainha que, sobrepostas umas às outras, formam um pseudocaulé. Sua inflorescência é do tipo cacho, branca com amarelo-rósea (SIRIRUGSA, 1997; ALBUQUERQUE e NEVES, 2004). O fruto é uma cápsula, em forma de fuso, com três lóculos contendo mais de dez sementes cada um, dispostas livremente. O pericarpo é branco amarelado a castanho amarelado, com nervuras aladas longitudinais, ápice com cálice tubular persistente sendo bastante aromático e gosto ligeiramente pungente (WU et al., 2014).

Ainda conforme os autores, as sementes são poliédricas, cobertas com arilo

membranáceo branco, que possui de quatro a sete camadas de células, arredondadas ou longitudinalmente alongadas, com paredes espessadas. A epiderme da testa possui uma única camada de células, longitudinalmente alongadas e com parede relativamente espessada; hipoderme com três ou quatro camadas de células, tangencialmente alongadas; camada pigmentosa formada por várias camadas de células castanhas, distribuídas com uma ou duas camadas de células oleíferas subarredondadas; endotesta constituída por uma camada de células paliçádicas esclerenquimatosas, marrom-avermelhadas, de paredes internas e laterais muito espessas (WU et al., 2014).

Gevú et al. (2014) estudaram os rizomas em 10 espécies da família Zingiberaceae e apesar da grande maioria dos elementos de vaso de metaxilema de Zingiberaceae serem longos e estreitos, com placas de perfuração escalariformes, encontraram no gênero *Alpinia* elementos de vaso de metaxilema predominantemente curtos com espessamentos de parede parcialmente perfuradas. As perfurações das placas possuem geralmente poucas barras ( $\leq 10$ ). Verificaram que os rizomas de todas as 10 espécies acumulam grãos de amido, são classificados como suculentos e observaram idioblastos oleíferos na maioria das espécies. Ainda mostraram a presença de mais elementos internos de metafloema próximos aos elementos de metaxilema apenas nas espécies de *Alpinia*, o que ajuda na elucidação de parentesco entre os taxa.

Jezler et al. (2013) observaram nas folhas a maior quantidade de células oleíferas distribuídas tanto no parênquima paliçádico quanto esponjoso. Nas pétalas em menor quantidade distribuídas na epiderme e parênquima. O rizoma foi o órgão que apresentou menos células oleíferas, encontradas no tecido cortical e medular, contudo nas raízes não foi possível quantificação e verificaram a presença de células oleíferas na região cortical.

Santos et al. (2012) mostraram que o horário de colheita é importante sobre o teor do óleo essencial com o maior valor encontrado às 14:33h, contudo sem alteração na composição química, sendo o composto majoritário terpinen-4-eol, em plantas com seis e nove meses de idade. Para pós-colheita, Araújo (2013) verificou que a embalagem plástica conservou o óleo essencial por até nove meses nas estruturas vegetais, sem perdas excessivas. Murakami et al (2009) verificaram 17 compostos presentes no óleo essencial e desses, *p*-Cymene o mais abundante, contudo houve variação significativa na composição do óleo essencial ao longo de cinco anos de pesquisa nas diferentes estações do ano.

### 2.1.3 Aspectos fitoquímicos

Apesar dos avanços na tecnologia e na eficácia das drogas sintéticas, os produtos

naturais estão sendo cada vez mais utilizados para fins médicos, talvez porque eles têm menos efeitos colaterais ou por serem mais acessíveis (DEVIENNE et al., 2004). As plantas medicinais desempenham um papel importante na medicina moderna: elas podem produzir drogas que dificilmente são obtidas por síntese química, e que proporcionam alguns compostos que podem ser facilmente modificados, tornando-os mais eficazes e menos tóxicos (TUROLLA e NASCIMENTO, 2006).

O que diferencia uma planta tóxica de uma planta medicinal é a dose e o uso que é feito dela, contudo poucas espécies têm sido estudadas cientificamente para avaliar a qualidade, eficácia e segurança na administração (CALIXTO, 2005; SILVEIRA et al., 2008). Calixto (2000) ressalta que é falsa a ideia de que drogas à base de plantas são seguras e sem efeitos colaterais. A importância da inclusão dos fitoterápicos nos programas de farmacovigilância vem sendo reconhecida nos últimos anos por vários países da Europa, como Reino Unido e Alemanha, onde muitas delas foram retiradas do mercado devido a importantes efeitos tóxicos e risco para uso humano (SILVEIRA et al., 2008).

Toda planta de *A. zerumbet* pode ser utilizada, porém o rizoma serve tanto como produto alimentar como uma fonte natural de antioxidantes (ALMEIDA, 1993; ELZAAWELY et al., 2007; WONG et al., 2009). Também se destacam as propriedades hipotensoras, diuréticas, antifúngicas, anti-*Helicobacter pylori*, antiobesidade, como relaxante muscular, antiespasmódica, antipsicótica, anti-helmíntica e antinociceptiva (LARANJA et al., 1992; LIMA et al., 1993; BEZERRA et al., 2000; ARAÚJO PINHO et al., 2005; WANG e HUANG, 2005; ARAÚJO et al., 2011; MACEDO et al., 2012; CUNHA et al., 2013; TU e TAWATA, 2014). O óleo essencial está presente por toda planta, a atividade antimicrobiana do óleo essencial das flores foi patenteada e também relatada a produção de inseticidas por Morita (1992). O óleo essencial das folhas também tem atividade relatada por Satou et al. (2013). Eles verificaram que o tempo de inalação, não apenas a quantidade tem efeito ansiolítico eficaz entre 90 e 120min, contudo esse efeito retorna ao normal após 150min de exposição. Já com os frutos, o óleo essencial tem efeito protetor contra oxidação que visa melhorar a função endotelial aórtica humana (XIAO et al., 2014). Oliveira (2008) encontrou DL<sub>50</sub> para o extrato aquoso >5g/Kg, demonstrando que os princípios ativos do extrato apresentam baixa toxicidade.

Rodrigues e Guedes (2006) encontraram relatos de uso desta planta para problemas de pressão e coração, como calmante, para pós-parto adicionando-se aguardente e mel, problemas menstruais, dor de cabeça e dores em geral. De acordo com Matos (1999), suas atividades sedativa e hipotensora estão comprovadas. Almeida (2000) relata a presença de

alcalóides, esteróides, triterpenóides, derivados hidroxiantracênicos, flavonóides e saponinas. Barcelos et al. (2010) identificaram 14 constituintes no óleo essencial das folhas, sendo terpinen-4-ol (37,45%) o majoritário, seguido pelo óxido de cariofileno (7,56%), *trans*-hidrato de sabineno (6,61%) e 1,8-cineol (4,02%), sendo provavelmente o primeiro e o último responsáveis pela redução da hipertrofia cardíaca.

#### 2.1.4 Propagação

A propagação vegetativa é considerada uma importante ferramenta na manutenção de espécies, principalmente aquelas de importância medicinal, pois na maioria dos casos, as plantas propagadas mantêm as características genéticas da planta mãe (HARTMANN et al., 2011). Destaca-se a propagação assexuada ou clonal, tendo essa a vantagem de manter todas as características da planta matriz, a uniformidade nas mudas, a produção de materiais de alta qualidade e menor custo, sendo viável para pequenos agricultores. Além disso, é importante para espécies que não se reproduzem muito bem por meio de sementes. Para estaquia, alguns trabalhos demonstram facilidade na produção de mudas.

As sementes de *Alpinia zerumbet* são raramente formadas devido à baixa viabilidade do grão de pólen (apenas 7%) e é propagada vegetativamente através de rizomas (RAKKIMUTHU et al., 2011). Fatores como polinização insuficiente e estresse ambiental podem influenciar negativamente na viabilidade das sementes, interferindo na reprodução sexuada das espécies (VELTEN e GARCIA, 2005). Com relação à ausência de frutificação efetiva, discussão semelhante foi feita por Li et al., (2002) com *Alpinia kwangsiensis* T. L. Wu & S. J. Chen, que habita áreas de florestas tropicais e beiras de estradas de Yunnan, uma província montanhosa a Sudoeste da China. A exploração comercial para a produção e propagação convencional é dificultada devido à baixa viabilidade das sementes, com baixa taxa de germinação e baixa taxa de enraizamento de estacas (ILLG e FARIA, 1995).

## 2.2 *Solidago chilensis*

### 2.2.1 Aspectos taxonômicos

Asteraceae é uma das famílias mais importantes como fonte de espécies de valor medicinal, ornamental, alimentício e conseqüentemente econômico, com 1600 a 1700 gêneros e cerca 24000 espécies, em nove famílias botânicas, cosmopolita, exceto pela Antártica (DI STASI et al., 2002; FUNK et al., 2005; APG III, 2009). É bem representada no Brasil, com aproximadamente 278 gêneros e 2066 espécies, parte é nativa enquanto várias outras foram aqui aclimatadas, distribuídas em diferentes regiões (DI STASI et al., 2002; FUNK et al.,

2009; SOUZA e LORENZI, 2012).

O gênero *Solidago* é um dos maiores da família Asteraceae com cerca de 130 espécies, que preponderantemente apresentam sementes com heteromorfismo, onde ocorrem diferenças entre frutos localizados na periferia e no centro do capítulo, em relação ao tamanho, massa e estrutura de dispersão, sendo assim, modelo biológico adequado para testar a evolução das taxas de dispersão ou estratégias de germinação (IMBERT, 2002; WEBER e JAKOBS, 2005). No Brasil, é vista a ocorrência somente da espécie *S. chilensis* Meyen, que também pode ser encontrada no Chile e Argentina (JOAQUIM et al., 2012).

É popularmente conhecida como arnica, arnica-brasileira, erva-lanceta, arnica-silvestre, espiga-de-ouro, lanceta, macela-miúda, marcela-miúda, rabo-de-rojão, sapé-macho. Possui como sinonímia científica *Solidago marginella* DC, *S. nitidula* Martius; *S. odora* Hook ET Arn, *S. polyglossa* DC, *S. vulneraria* Martius, *S. linearifolia* DC, *S. microglossa* DC (OLIVEIRA et al., 1998; LORENZI e MATOS, 2008 e BORGES e TELES, 2014).

#### 2.2.2. Aspectos morfo-anatômicos

É um subarbusto ereto, perene, não ramificado, entouceirado, rizomatoso, levemente aromático, de 80 até 120 cm de altura por cerca de 1,5 cm de diâmetro na base do caule, de coloração verde clara na parte superior e verde acinzentada na parte inferior. Suas folhas são simples, membranosas, elípticas e obovadas, alternas, serradas, quase sésseis, ásperas ao tato, medindo até 10 cm de comprimento por até 1,5 cm de largura; capítulos florais pequenos, com flores amarelas, constituídos de oito a dez floretas tubulosas e dezoito a vinte floretas liguladas, reunidas em grandes inflorescências escorpióides dispostas na extremidade dos ramos, conferindo ao conjunto o aspecto de uma grande panícula muito ornamental, com cerca de 20 cm de comprimento (OLIVEIRA et al., 1998; LORENZI, 2000) (Figura 2).



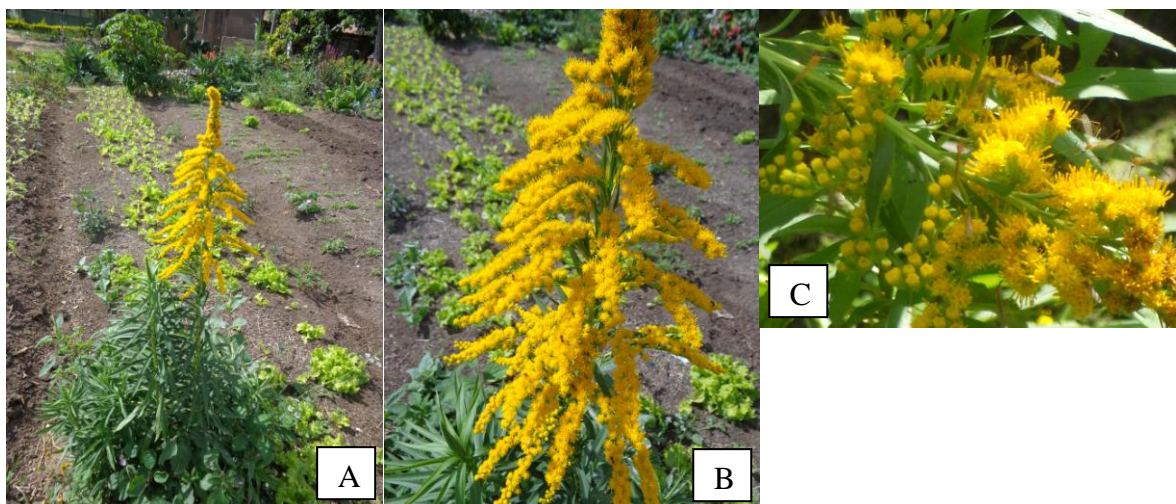


Figura 2 – *Solidago chilensis* em horta. A- Vista geral; B- Detalhe da inflorescência; C- Detalhe das flores. Fotos: Dévisson Luan.

Quando analisaram a anatomia de *S. chilensis* var. *chilensis*, Hernández et al. (2013) encontraram na raiz um cilindro vascular com periciclo rodeando a estrutura vascular secundária, que inicialmente apresenta estrutura tetraarca, quatro arcos de xilema intercalados por grupos de floema com fibras. A periderme radicular é formada por um felogênio superficial, seguida do córtex composta de 10 a 12 camadas de parênquima, com reservatórios opostos a cada grupo de floema, e a endoderme com estrias de Caspary.

As diferenças mais importantes do caule aéreo com o rizoma são: a presença de colênquima e um córtex estreito, com menos camadas de aerênquima do que o rizoma (HERNÁNDEZ et al., 2013). A folha apresenta mesofilo de estrutura heterogênea e assimétrica, sua região mediana é constituída por uma ou duas fileiras de células parenquimáticas grandes e de paredes finas. O parênquima paliçádico é formado por duas fileiras de células tanto do lado da epiderme superior como do lado da epiderme inferior. As epidermes são providas de tricomas tectores unisseriados, geralmente formados por duas a quatro células, sendo frequentemente a célula terminal alongada e delgada. Os estômatos anomocíticos ocorrem em ambas as epidermes. (CHICOUREL et al., 1998; OLIVEIRA et al., 1998; HERNÁNDEZ et al., 2013). Hernández et al. (2013) também encontraram estômatos anisocíticos em ambas superfícies foliares, junto a anomocíticos, cutícula espessa, três tipos de tricomas e mesofilo isobilateral tendo 2-3 camadas de células curtas de parênquima paliçádico.

Gil et al. (2012) analisaram folhas de indivíduos da espécie *S. chilensis* em uma região de Córdoba, Argentina, adaptados a ambientes secos e solos pobres, e encontraram uma epiderme foliar uniestratificada de cutícula espessa, com células pequenas, de paredes retas ou suavemente onduladas e contorno sinuoso, com estômatos anomocíticos e anisocíticos no

mesmo nível das células epidérmicas e em maior frequência na face abaxial.

Cancelli et al. (2006) e Palazzezi et al. (2007) analisaram os grãos de pólen e descreveram como de tamanhos médios, oblato-esferoidais, âmbito subtriangular, tricolporados, endoabertura lalongada, equinados, abertura margeada por 4 pares de espinhos, colpos longos e largos no equador, de pontas afiladas e margem difusa perto da região polar, colporos pouco visíveis, exina cavada, ectosexina perfurada, e com columelas maiores nas bases dos espinhos. Espinhos médios, cônicos, columelados, ápices afilados e sólidos, e com 12 a 15 espinhos em vista polar.

### 2.2.3 Aspectos fitoquímicos

As espécies da família Asteraceae são ricas em estruturas secretoras, compostas por células glandulares especializadas que ocorrem isoladas ou agrupadas e variam quanto à morfologia, função, posição e tipo de compostos que biossintetizam e acumulam, e estão envolvidos na defesa química das plantas (SIMON et al., 2002; MILAN et al., 2006; ANDREUCCI et al., 2008). Além disso, apresentam uma ampla variedade de atividades biológicas e farmacológicas que lhes conferem um status importante no que se refere à procura de compostos bioativos, sendo utilizadas para delimitar alguns gêneros (CASTRO et al., 1997; SMILJANIC, 2005). Estudos sobre o gênero *Solidago* revelam que esta planta tem atividades biológicas importantes, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (LIZ, 2007).

Rodrigues et al. (2014) encontraram floração durante todos os meses do ano para *S. microglossa* cultivada em Belém – PA, enquanto a frutificação ocorreu apenas entre os meses de agosto e outubro, além de fevereiro e março. Isso fez com que estes autores indicassem o mês de agosto para coleta de sementes e folhas para análise fitoquímica, na região, em virtude do deslocamento de substâncias ativas para os órgãos reprodutivos durante a fenofase (LAMEIRA e AMORIM, 2008). Baggio et al. (2012) ressaltam que alguns aspectos tais como estágio de desenvolvimento da planta e fatores ambientais como solo e modo de plantio podem influenciar a produção de princípio ativo no vegetal e assim a composição fitoquímica.

*S. chilensis* possui folhas e flores aromáticas com propriedades medicinais, cuja ação farmacológica predominante ocorre no sistema circulatório. Popularmente é usada como antiinflamatória, analgésica, estomáquica, adstringente, cicatrizante, vulnerária, para traumatismos, contusões e picadas de insetos (LORENZI, 2000; RODRIGUES e CARVALHO, 2001; LORENZI e MATOS, 2008; BAGGIO et al., 2012). Na forma de emplastro, cataplasma, tintura ou infusão, suas folhas e caules são muito utilizadas para o tratamento de contusões e machucados (POSSE, 2007), micoses de pele (AVANCINI e



WIEST, 2008), inflamação, infecção e contusão (MASSAROTTO, 2009), dor e inflamação (OLIVEIRA et al., 2010), problemas renais, anti-helmíntico, relaxante muscular, contra dores, estomáquico, antihipertensivo, pneumonia, constipação (BIESKI et al., 2012), contusão, traumatismo, furúnculos (JORGE, 2012), contusões, inchaços (OLIVEIRA e MENINI NETO, 2012), contra dores em geral (TULER e SILVA, 2014). Na região da Mata Atlântica, o macerado da planta toda em aguardente é usado externamente contra dores musculares, pancadas, picadas de insetos e infecções, enquanto a decocção da planta toda é usada internamente como sedativa e contra distúrbios digestivos (DI STASI et al., 2002).

Sua propriedade antiinflamatória estaria reforçada pela presença de antocianinas, carotenoides e flavonóides (LORENZI e MATOS, 2008), validada por Goulart et al. (2007), Liz et al. (2008), Tamura et al. (2009) e Gastaldo et al. (2012). A atividade antioxidante parece estar relacionada com os flavonóides presentes, entre eles a quercetina (GUNTNER et al., 1999). Também possui saponinas, taninos, e alcalóides (ROCHA, 2006; BAGGIO et al., 2012). Entretanto, Pedroso et al. (2009) não encontraram a presença de saponinas e alcalóides, também em *S. microglossa*, isso mostra como a influência de fatores intrínsecos e ambientais podem influenciar na produção vegetal. Rodríguez et al. (2002) atribuíram efeito gastroprotetor devido à solidagenona, um diterpeno labdânico, isolada do extrato do rizoma e das raízes. Conforme Bucciarelli et al. (2010) previne a formação de lesões gástricas, sem toxicidade aguda.

Silva et al. (2010) atribuíram efeito analgésico e anti-inflamatório atuando significativamente na redução de lombalgias e Rocha (2006) também comprovou atividades analgésica e anti-inflamatória em ratos. O extrato de folhas de *S. microglossa* inibiu espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico, induzidas por diferentes pré-oxidantes e o extrato etanólico mostrou significativa atividade hepatoprotetora devido aos compostos polifenólicos tais como ácido gálico e flavonóides, entre eles quercetrina, rutina e quercetina (SABIR et al., 2012). Vila et al. (2002) encontraram constituintes voláteis no óleo essencial das folhas, somando 36 diferentes compostos encontrados, atribuindo a esse óleo essencial atividade antifúngica contra 5 tipos de fungos filamentosos e uma levedura.

#### 2.2.4 Propagação

A propagação sexuada é essencial na permanência da variabilidade genética existente para a espécie. *S. chilensis* se reproduz por sementes e/ou através de seus rizomas, a semeadura pode ser feita diretamente a campo, em sulcos (PRUDÊNCIO, 2012). Zuliani et al. (2012) conseguiram resultados positivos para formação de brotos, folhas e raízes de estacas

medianas e basais de *S. chilensis* mantidas em água, sem solução nutritiva, sendo necessário apenas fitorregulador para o total enraizamento das mesmas. Correia et al. (1999) e Prudêncio (2012) sugerem a utilização de grande quantidade de sementes na propagação sexuada para essa espécie, pois a mesma apresenta uma baixa percentagem de germinação (20% a 20°C e 12% a 20-30°C, aos 14 dias).

Conforme Correia et al. (1999) e Löbler (2013), *S. chilensis* possui resultados distintos quando analisado o fotoblastismo e a temperatura para germinação demonstrando a necessidade de maiores estudos e compreensão dos fatores que influenciam na germinação. Para que o cultivo e o manejo das espécies vegetais sejam conduzidos de forma adequada, é essencial o entendimento da dinâmica dos ecossistemas onde essas espécies se desenvolvem, para indicar as respostas das plantas às condições climáticas e edáficas locais, diferenciando períodos de floração e frutificação inerentes a determinada área (D'EÇA-NEVES e MORELLATO, 2004).

### 3. REFERENCIAS:

- AHMAD, N.; ANIS, M. *In vitro* mass propagation os *Cucumis sativus* L. from nodal segments. **Turkish Journal of Botany**, v. 29, n. 3, p. 237-240, 2005.
- ALBUQUERQUE, E. S. B; NEVES, L. J. Anatomia foliar de *Alpinia zerumbet* (Pers.) Burt & Smith (Zingiberaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 18, n. 1, p. 109-121, 2004.
- ALEXIADES, M.; SHELDON, J. W. **Selected guidelines for ethnobotanical research: a field manual**. New York: New York Botanical Garden. 1996. 306p.
- ALMEIDA, E. R. **Plantas medicinais brasileiras – conhecimentos populares e científicos**. São Paulo, Hemus Editora, 1993. 341 p.
- ALMEIDA, M. Z. de. **Plantas medicinais e ritualísticas**. Salvador: EDUFBA. 2000. 192p.
- ALVARENGA, T. C. et al. Polifenoloxidase: uma enzima intrigante. **Ciência & Tecnologia: FATEC-JB**, v. 3, n. 1, p. 83-93, 2011.
- ANDRADE, M. W.; LUZ, J. M. Q.; LACERDA, A. S. Micropropagação da aroeira (*Myracrodunon urundeuva* Fr. All.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 24, n. 1, p. 174-180, 2000.
- ANDREUCCI, A. C. et al. Glandular hairs and secretory ducts of *Matricaria chamomilla* (Asteraceae): morphology and histochemistry. **Annales Botanici Fennici**, v. 45, p. 11-18, 2008.
- APG, The Angiosperm Phylogeny Group. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 161, p. 105–121, 2009.

ARAÚJO PINHO, F. V. S. et al. Antinociceptive effects of the essential oil of *Alpinia zerumbet* on mice. **Phytomedicine**, v. 12, n. 6-7, p. 482-486, 2005.

ARAÚJO, F. Y. R. de et al. Inhibition of ketamine-induced hyperlocomotion in mice by the essential oil of *Alpinia zerumbet*: possible involvement of an antioxidant effect. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 63, n.8, p.1103–1110, 2011.

ARAÚJO, K. C. **Conservação pós-colheita de *Lippia sidoides* Cham e *Alpinia zerumbet* para a agricultura familiar**. 2013. 70f.il. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Fitotecnia, Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia.

ASMAR, S. A. et al. Citocininas na multiplicação in vitro de hortelã-pimenta (*Mentha x piperita* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. especial, p. 533-538, 2011.

ATTIA, O. A. et al. Micropropagation of mulberry (*Morus alba* L.) cv. Al-Taify. **International Journal of Bio-Technology and Research**, v. 4, n.2, p. 15-22, 2014.

AVANCINI, C. A. M.; WIEST, J. M. Etnomedicina veterinária, etnonosotaxia e etnoterapêutica de doenças de pele como referência para seleção e avaliação preliminar da atividade antibacteriana de plantas nativas no sul do Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.10, n.1, p.21-28, 2008.

BAGGIO, A. L. et al. Pesquisa fitoquímica dos princípios ativos presentes na droga vegetal *Solidago microglossa*, D.C. (arnica brasileira). **Revista Thêma et Scientia**, v. 2, n. 1, p. 149-153, 2012.

BARCELOS, F. F. et al. Estudo químico e da atividade biológica cardiovascular do óleo essencial de folhas de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L.Burt & R.M.Sm. em ratos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n.1, p. 48-56, 2010.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and Germination**. 2. Ed. New York: Plenum, 1994. 445 p.

BEZERRA, J. E. F; LEDERMAN, I. E. Propagação vegetativa por estaquia da aceroleira. In: SÃO JOSÉ, A. R.; ALVES, R. E. **Acerola no Brasil, produção e mercado**. Vitória da Conquista: Diz/UESB, 1995. p. 32-40.

BEZERRA, M. A. C. et al. Myorelaxant and antispasmodic effects of the essential oil of *Alpinia speciosa* on rat ileum. **Phytotherapy Research**, v. 14, n. 7, p. 549–551, 2000.

BIESKI, I. G. C. et al. Ethnopharmacology of Medicinal Plants of the Pantanal Region (Mato Grosso, Brazil). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 1-36, 2012.

BORGES, R. A. X.; TELES, A. M. ***Solidago* in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www.floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB5503>>. Acesso em: 22 Dez. 2014.

BORGHETTI, F.; FERREIRA, A. G. Interpretação de resultados de germinação. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (Org.). **Germinação do básico ao aplicado**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 209-222.

BORTHAKUR, M. et al. A protocol for micropropagation of *Alpinia galanga*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 55, n. 3, p. 231-33, 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS – PNPIC-SUS**. Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. - Brasília :Ministério da Saúde, 2006a. 92 p. - (Série B. Textos Básicos de Saúde). Disponível em: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/fitoterapia\\_no\\_sus.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/fitoterapia_no_sus.pdf) Acesso em: 05 de março de 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **A Fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisas de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos**. Brasília: Ministério da Saúde. 2006b. Disponível em: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/fitoterapia\\_no\\_sus.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/fitoterapia_no_sus.pdf) Acesso em: 05 de março de 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. **RENISUS – Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS**. 2009. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/maio/07/renisus.pdf> Acesso em: 22/10/2014.

BUCCIARELLI, A. et al. Evaluation of gastroprotective activity and acute toxicity of *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae). **Pharmaceutical Biology**, v. 48, n. 9, p. 1025-1030, 2010.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 179-189, 2000.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America A personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 131–134, 2005.

CAMPOS, V. C. A. et al. Micropropagação de umburana de cheiro. **Ciência Rural**, v. 43, n. 4, p. 639-644, 2013.

CANCELLI, R. R.; GUERREIRO, C. T.; BAUERMAN, S. G. Diversidade polínica em Asteraceae Martinov da fazenda São Maximiano, Guaíba, RS. Parte II. **Pesquisas, Botânica. São Leopoldo, Instituto Anchieta de Pesquisas**. v. 57, p. 137-152, 2006.

CARVALHO, A. C. B. et al. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Brazilian Journal of Pharmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 314-319, 2008.

CASTRO, M. de M.; LEITÃO-FILHO, H. de F.; MONTEIRO, W. R. The use of secretory structures for identification of genera of Asteraceae from cerrado vegetation. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 20, p. 163-174, 1997.

CATO, S.C. **Ação de bioestimulante nas culturas do amendoineiro, sorgo e trigo e interações hormonais entre auxinas, citocininas e giberelinas.** 2006. 74p. (Tese) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba.

CHICOUREL, E. L. et al. Contribuição ao conhecimento analítico de três compostas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 7-8, n.1, p. 59-66, 1998.

CORREIA, E. **Aspectos de propagação sexuada e vegetativa da arnica brasileira (*Solidago chilensis* Meyen Asteraceae).** In: MING, L.C. (Coord.) Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares: avanços na pesquisa agrônômica. Botucatu: UNESP, 1998. v.2, p.193-208.

CORREIA, E.; MING, L. C; CÂMARA, F. L. A. **Aspects of the sexual reproduction of the Brazilian arnica (*Solidago chilensis* Meyen var. *megapotamica* (DC.) Cabrera-Asteraceae).** In: WOLD CONGRESS ON MEDICINAL AND AROMATIC PLANTS FOR HUMAN WELFARE, 2, 1999, Mendoza. Proceedings... Mendoza: ISHS, 1999. P. 89-91.

COSTA, F. H. da S. et al. Efeito da interação entre carvão ativado e N<sup>6</sup>-benzilaminopurina na propagação *in vitro* de bananeira, cv. Grand Naine (AAA). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 2, p. 280-283, 2006.

CUNHA, G. H. da et al. Vasorelaxant and antihypertensive effects of methanolic fraction of the essential oil of *Alpinia zerumbet*. **Vascular Pharmacology**, v. 58, n. 5-6, p. 337-345, 2013.

D'EÇA-NEVES, F. F.; MORELLATO, L. P. C. Métodos de amostragem e avaliação utilizados em estudos fenológicos de florestas tropicais. **Acta Botanica Brasílica**, v. 18, n. 1, p. 99-108, 2004.

DEVIENNE, K. F.; RADDI, M. S.; POZETTI, G. L. Das plantas medicinais aos fitofármacos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 6, p. 11-14, 2004.

DI STASI, L. C. et al. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica.** 2ª edição revista e ampliada. São Paulo: UNESP, 2002. 604 p.

EHLERT, P.A.D; LUIZ, J.M.Q; INNECCO, R. Propagação vegetativa da alfavaca – cravo utilizando diferentes tipos de estacas e substratos. **Horticultura Brasileira**, v. 22, n. 1, p. 10-13, 2004.

ELISABETSKY, E. Etnofarmacologia. **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 3, p. 35-36, 2003.

ELZAAWELY, A.A.; XUAN, T.D.; TAWATA, S. Essential oils, kava pyrones and phenolic compounds from leaves and rhizomes of *Alpinia zerumbet* and their antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 103, n. 2, p. 486-494, 2007.

FERRARI, M.P.; GROSSI, F.; WENDLING, I. **Propagação vegetativa de espécies florestais.** Colombo – PR; Embrapa Florestas, Documentos, 94, 2004. 22 p.

FUNK, V. A. et al. Classification of Compositae. In: FUNK, V. A.; Susana, A.; Stuessy, T.F.; Bayer, R.J. (eds.). **Systematics, evolution, and biogeography of Compositae.** International

Association for Plant Taxonomy (IAPT). Viena, Austria, 2009. p. 171-189.

FUNK, V. A. et al. Everywhere but Antarctica: Using a supertree to understand the diversity and distribution of the Compositae. **Biologiske Skrifter. K. Danske videnskabernes Selskab**, v. 55, p. 343-374, 2005.

GASTALDO, B. et al. Action of constituents of *Solidago chilensis* DC (Brazilian arnica) in the mechanisms of wound healing. **Planta Medica**, v. 78, n. 11, p. PI319, 2012.

GEVÚ, K. V. et al. Structural analysis of subterranean organs in Zingiberaceae. **Plant Systematics and Evolution**, v. 300, n. 5, p. 1089-1098, 2014.

GIL, S. P. et al. Epidermis foliar de tres especies de asteráceas nativas de Argentina con potencial ornamental. **Phyton**, v. 81, p. 205-210, 2012.

GOULART, S. et al. Anti-inflammatory evaluation of *Solidago chilensis* Meyen in a murine model of pleurisy. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, p. 346–353. 2007.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In; TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (eds). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: Embrapa/CNPM, 1990. p. 99-169.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPH, 1998. p. 183-260.

GUNTNER, C. et al. Antioxidant properties of *Solidago chilensis* L. flavonoids. **Acta Horticulturae**, v. 501, p. 159 -163, 1999.

HAMIRAH, M. N. et al. Micropropagation of red ginger (*Zingiber montanum* Koenig), a medicinal plant. **Asia-Pacific Journal os Molecular Biology and Biotechnology**, v. 18, n. 1, p. 127-130, 2010.

HARTMANN, H. T. et al. **Plant propagation: principles and practices**. 8. ed. New Jersey: Prentice Hall, 2011. 915 p.

HERNÁNDEZ, M. P. et al. Anatomical and Chemical Analysis in *Solidago chilensis* var. *chilensis* (Asteraceae). **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 32, n. 8, p. 1236-1240, 2013.

ILLG, R. D.; FARIA, R. T. Micropropagation of *Alpinia purpurata* from inflorescence buds. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 40, p. 183-185, 1995.

IMBERT, E. Ecological consequences and ontogeny of seed heteromorphism. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, v. 5, n. 1, p. 13-36, 2002.

JEZLER, C. N. et al. Histoquímica, teor e composição química do óleo essencial nos diferentes órgãos de *Alpinia zerumbet*. **Ciência Rural**, v. 43, n. 10, p. 1811-1816, 2013.

JOAQUIM, A. R. et al. **Análise química comparativa entre inflorescências de espécies do gênero *Solidago***. Anais do XXII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil. 18 a 21 de

setembro de 2012, Bento Gonçalves-RS. Disponível em:  
[http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/64260/Resumo\\_25229.pdf?sequence=1](http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/64260/Resumo_25229.pdf?sequence=1)  
Acessado em 16 de dezembro de 2014.

JORGE, S. S. A. **Plantas Mediciniais: Coletânea de Saberes**. 2012. Disponível em:  
[http://www.agronomiaufs.com.br/index.php/download-e-videos/category/75-downloads#\(47825636 Plantas Mediciniais.pdf\)](http://www.agronomiaufs.com.br/index.php/download-e-videos/category/75-downloads#(47825636%20Plantas%20Mediciniais.pdf)) Acessado em:02/12/2014.

KRESS, W. J.; PRINCE, L. M.; WILLIAMS, K. J. The phylogeny and a new classification of the gingers (Zingiberaceae): evidence from molecular data. **American Journal of Botany**, v. 89, n. 10, p. 1682-1696, 2002.

KRIECK, C. et al. Biologia reprodutiva de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L.Burtt & R.M.Sm. (Zingiberaceae) em Florianópolis, Santa Catarina. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 10, n. 2, p. 103-110, 2008.

LACA-BUENDIA, J.P. Efeito de reguladores de crescimento no algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.). **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.1, n.1, p.109-113, 1989.

LAMEIRA, O. A.; AMORIM, A. C. L. Substâncias ativas de plantas medicinais. In: LAMEIRA, O. A.; PINTO, J. E. B. P. (Ed.). **Plantas medicinais: do cultivo, uso e manipulação à recomendação popular**. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2008. p. 73-82.

LARANJA, S. M. R.; BERGAMASCHI, C. M.; SCHOR, N. Evaluation of three plants with potential diuretic effect. **Revista Associação Médica Brasileira**, v. 38, n. 1, p. 13-16, 1992.

LI, Q.-J. et al. Mating system and stigmatic behaviour during flowering of *Alpinia kwangsiensis* (Zingiberaceae). **Plant System and Evolution**, v. 232, n. 1-2, p. 123–132, 2002.

LIMA, E. O. et al. *In vitro* antifungal activity of essential oils obtained from officinal plants against dermatophytes. **Mycoses**, v. 36, n. 9-10, p. 333-336, 1993.

LIZ, R. **Estudo do efeito antiinflamatório da *Solidago chilensis* Meyen em modelo de inflamação pela carrentina, em camundongos**. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Farmácia, 2007. 56 p.

LIZ, R. et al. The antiinflammatory modulatory role of *Solidago chilensis* Meyen in the murine model of the air pouch. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 60, n. 4, p. 515-521, 2008.

LÖBLER, L. 2013. **Propagação, metabolismo secundário e genotoxicidade de *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae)**. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia, RS, 2013. 97 p.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil**. 3. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2000. 339 p.il.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Plantarum, 2008. 576 p.

MAAS, P.; MAAS, H. *Zingiberaceae*. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2014. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB110703>>. Acesso em: 22 Dez. 2015.

MACEDO, I. T. F. et al. *In vitro* activity of *Lantana camara*, *Alpinia zerumbet*, *Mentha villosa* and *Tagetes minuta* decoctions on *Haemonchus contortus* eggs and larvae. **Veterinary Parasitology**, v. 190, n. 3-4, p. 504–509, 2012.

MARTINS, E. R. et al. **Plantas medicinais**. 2ª ed. Viçosa: UFV, 2000. 220 p.

MASSAROTTO, N. P. **Diversidade e uso de plantas medicinais por comunidades quilombolas Kalunga e urbanas, no Nordeste do Estado de Goiás-GO, Brasil**. Dissertação de Mestrado em Ciências Florestais. Universidade de Brasília – UnB, 2009. 130 p.

MATOS, F. J. de A. **Plantas da medicina popular do Nordeste**. Fortaleza: Edições UFC. 1999. 80 p.

MEDEIROS, J. D. A biotecnologia e a extinção de espécies. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 30, p. 109-113, 2003.

MENEZES JÚNIOR, F. O. G. et al. Caracterização de diferentes substratos e seu desempenho na produção de mudas de alface em ambiente protegido. **Horticultura Brasileira**, v. 18, n. 3, p. 164-170, 2000.

MILAN, P., HAYASHI, A. H., APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Comparative leaf morphology and anatomy of three Asteraceae species. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, p. 135-144, 2006.

MOHANTY, S. et al. Micropropagation of *Zingiber Rubens* and assessment of genetic stability through RAPD and ISSR markers. **Biologia Plantarum**, v. 55, n. 1, p. 16-20, 2011.

MORITA, D. **Insecticides and bactericide made of sell flower essential oil**. Jpn. Okinawa-Ken US Patent 5, 110,594, 1992.

MOURA, T. L. et al. Organogênese *in vitro* de citrus em função de concentrações de BAP e seccionamento do explante. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, n. 2, p. 240-245, 2000.

MURAKAMI, S. et al. Composition and seasonal variation of essential oil in *Alpinia zerumbet* from Okinawa Island. **Journal of Natural Medicines**, v. 63, n. 2, p. 204-208, 2009.

NUNES, J. C. de O. et al. Micropropagação do porta-enxerto Marubakaido (*Malus prunifolia*), a partir da cultura de meristema. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 21, n. 2, p. 191-195, 1999.



OLIVEIRA, E. R.; MENINI NETO, L. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais utilizadas pelos moradores do povoado de Manejo, Lima Duarte – MG. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 2, p. 311-320, 2012.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M. K. **Farmacognosia**. São Paulo: Atheneu, 1998. 412 p.

OLIVEIRA, H. B.; KFFURI, C. W.; CASALI, V. W. D. Ethnopharmacological study of medicinal plants used in Rosário da Limeira, Minas Gerais, Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 2, p. 256-260, 2010.

OLIVEIRA, C. C. **Estudo toxicológico pré-clínico do extrato aquoso e do óleo essencial das folhas de *Alpinia zerumbet* (Pers.) Burt & Smith**. 2008. 93 f.il. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará.

OLIVEIRA, R. P. de; SILVEIRA, D. G.; SILVA, S. O. Concentração de BAP e a eficiência de micropropagação de bananeira tetraplóide (Grupo AAAB). **Scientia Agrícola**, v. 58, n. 1, p. 73-78, 2001.

OLIVEIRA JÚNIOR, J. B. de; LEITE, M. S. A Ordem Zingiberales nos Herbários do Estado de Pernambuco. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 2, p. 810-812, 2007.

OZAROWSKI, M.; THIEM, B. Progress in micropropagation of *Passiflora* spp. to produce medicinal plants: a mini-review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 6, p. 937-947, 2013.

PALAZZEZI, L. et al. Pollen Grain Morphology of Selected Allergenic Species Native to Southern South America. **Journal of the Torrey Botanical Society**, v. 134, n. 4, p. 527–533, 2007.

PEDROSO, R.; SILVA, C. de P.; FURLAN, C. M. Comparação dos principais constituintes químicos de duas espécies de arnica: cravorana (*Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass) e varão-de-ouro (*Solidago* sp). **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 7, n 22, p. 1-8, 2009.

PEREIRA, J. E. S. et al. Influência do número de gemas, presença ou ausência de folhas e posição do explante na multiplicação *in vitro* da batata. **Horticultura Brasileira**, v. 23, n. 1, p. 86-89, 2005.

PEREIRA, R. C. A. et al. Germinação, avaliação do ácido giberélico e posição do explante no alongamento *in vitro* de *Uncaria guianensis* (Aublet) Gmelin Rubiaceae (unha-de-gato). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 4, p. 637-642, 2006.

PETRY, C. **Plantas ornamentais: aspectos para a produção**. Passo Fundo: Ediupuf, 1999. 155 p.

PINTO, J. E. B. P.; LAMEIRA, O. A. **Micropropagação e metabólitos secundários *in vitro* de plantas medicinais**. Lavras: UFLA/FAEPE. 2001. 102 p.:il.

POSSE, J. C. **Plantas medicinais utilizadas pelos usuários do SUS nos bairros de Paquetá e Santa Teresa: uma abordagem etnobotânica**. Dissertação de Mestrado. Rio de Janeiro:

UFRJ/Faculdade de Farmácia, 2007. 115 f.: il.

PRUDÊNCIO, R. **Levantamento etnofarmacologia de *Solidago chilensis* Meyen. Arnica-brasileira (Asteraceae)**. 2012. Monografia apresentada ao Setor de Pós-Graduação da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, para a obtenção do título de especialista em Ecologia e Manejo de Recursos Naturais, Criciúma, Santa Catarina, 2012. 45 p.

RAKKIMUTHU, R.; JACOB, J. E.; ARAVINTHAN, K. M. *In vitro* micropropagation of *Alpinia zerumbet* variegata, an important medicinal plant, through rhizome bud explants. **Research in Biotechnology**, v. 2, n. 1, p. 07-10, 2011.

ROCHA, A. A. **Obtenção e avaliação das atividades analgésicas e antiinflamatórias do extrato hidroalcoólico bruto da arnica brasileira (*Solidago microglossa* DC)**. Franca, Dissertação (Mestrado) – Promoção da Saúde – Universidade de Franca, 2006. 69 p.

RODRIGUES, A. C. C.; GUEDES, M. L. S. Utilização de plantas medicinais no Povoado Sapucaia, Cruz das Almas – Bahia. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, n. 2, p. 1-7, 2006.

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do Cerrado na região do Alto Rio Grande – Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 25, n. 1, p. 102-123, 2001.

RODRIGUES, Y. H. T. de M. et al. **Fenologia de *Solidago microglossa* DC. (Asteraceae)** Anais do 18º Seminário de Iniciação Científica e 2º Seminário de Pós-graduação da Embrapa Amazônia Oriental. 12 a 14 de agosto de 2014, Belém-PA. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/108141/1/Pibic74.pdf> Acessado em 16 de dezembro de 2014.

RODRÍGUEZ, J. A. et al. Gastroprotective activity of solidagenone on experimentally induced gastric lesions in rats. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 54, p. 399-404, 2002.

SABIR, S. M. et al. Antioxidant and hepatoprotective activity of ethanolic extract of leaves of *Solidago microglossa* containing polyphenolic compounds. **Food Chemistry**, v. 131, n. 3, p. 741–747, 2012.

SANTOS, M. S. et al. Harvest time and plant age on the content and chemical composition of the essential oil of *Alpinia zerumbet*. **Horticultura Brasileira**, v. 30, n. 3, p. 385-390, 2012.

SATOU, T. et al. Organ accumulation in mice after inhalation of single or mixed essential oil compounds. **Phytotherapy Research**, v. 27, n. 2, p. 306-311, 2013.

SILVA, A. G. da et al. Evaluation of an extract of Brazilian arnica (*Solidago chilensis* Meyen, Asteraceae) in treating lumbago. **Phytotherapy Research**, v. 24, n. 2, p. 283-287, 2010.

SILVA, A.L.B.R. da; CRUZ, M.E. da S.; RODRIGUES, C.; SILVA, L.H.B.R. da. Produção de mudas de espécies de plantas medicinais. **Anais Eletrônico VII EPCC – Encontro Internacional de Produção Científica Cesumar CESUMAR – Centro Universitário de Maringá** Editora CESUMAR Maringá – Paraná - Brasil 25 a 28 de Outubro de 2011.

SILVA, L. M.; ALQUINI, Y.; CAVALLET, V. J. Inter-relações entre a anatomia vegetal e a produção vegetal. **Acta Botanica Brasilica**, v. 19, n. 1, p. 183-194, 2005.

SILVEIRA, P. F.; BANDEIRA, M. A. M.; ARRAIS, P. S. D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n.4, p. 618-626, 2008.

SIMÕES, C. M. O. et al. (Orgs) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Univ. UFRGS/Ed. UFSC, 2010. 1102 p.

SIMON, P. M., KATINAS, L., ARAMBARRI, A. M. Secretory structures in *Tagetes minuta* (Asteraceae, Heleniae). **Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica**, v. 37, p. 181-191, 2002.

SIRIRUGSA, P. **Thai Zingiberaceae: Species Diversity And Their Uses**. Invited lecture present date the International Conference on Biodiversity and Bioresources: Conservation and Utilization, 23–27 November 1997, Phuket, Thailand. Disponível em: <http://www.iupac.org/symposia/proceedings/phuket97/sirirugsa.html>\_Acesso em: 14 Out 2015.

SMILJANIC, K. B. A. **Anatomia foliar de espécies de Asteraceae de um afloramento rochoso no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro (MG)**. Viçosa, Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, MG, 2005. 79 p.

SMITH, R.M. *Alpinia* (Zingiberaceae): A Proposed New Infrageneric Classification. **Edinburgh Journal of Botany**, v. 47, n. 1, p. 1-75, 1990. doi:10.1017/S0960428600003140. Reproduzido com permissão.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG III**. 3ª Ed. Instituto Plantarum de Estudos da Flora: Nova Odessa, SP, 2012. 768 p.

STEIN, V. C. et al. Efeito do genótipo na propagação *in vitro* de *Plantago* sp. **Revista Verde**, v. 4, n. 2, p. 68-75, 2009.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Trad. Armando Molina Divan Junior et al. 5ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918 p.il.

TAMURA, E. K. et al. Inhibitory effects of *Solidago chilensis* Meyen hydroalcoholic extract on acute inflammation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 122, n. 3, p. 478-485, 2009.

TOMLINSON, P. B. Studies in the systematic anatomy of the Zingiberaceae. **Journal of the Linnean Society**, v. 55, p. 547-592, 1956.

TU, P. T. B.; TAWATA, S. Anti-Obesity Effects of Hispidin and *Alpinia zerumbet* Bioactives in 3T3-L1 Adipocytes. **Molecules**, v. 19, n. 10, p. 16656-16671, 2014.

TULER, A. C.; SILVA, N. C. B. Women's ethnomedicinal knowledge in the rural community of São José da Figueira, Durandé, Minas Gerais, Brazil. **Revista Brasileira de**

**Farmacognosia**, v. 24, n. 2, p. 159-170, 2014.

TUROLLA, M. S. R., NASCIMENTO, E. de S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, p. 289-306, 2006.

VAN WINKLE, S.; JOHNSON, S.; PULLMAN, G. S. The impact of gelrite and activated carbon on the elemental composition of plant tissue culture media. **Plant Cell Report**, v. 21, p. 1175-1182, 2003.

VELTEN, S. B.; GARCIA, Q. S. Efeitos da luz e da temperatura na germinação de sementes de *Eremanthus* (Asteraceae), ocorrentes na Serra do Cipó, MG, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 19, n. 4, p. 753-761, 2005.

VICENTE, M. A. A.; ALMEIDA, W. A. B.; CARVALHO, Z. S. Multiplicação *in vitro* e aclimatação de *Vernonia condensata* Baker. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 2, p. 176-183, 2009.

VICTÓRIO, C.P. **Cultura de Tecidos e Metabólitos Especiais em “Colônia” (*Alpinia zerumbet* Pers. Burtt et Smith) e *A. purpurata* (Vieill) K. Schum e Estudos Preliminares da Atividade Biológica**. 2008. Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Biofísica). 188f.

VICTÓRIO, C. P. Therapeutic value of the genus *Alpinia*, Zingiberaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 1, p. 194-201, 2011.

VILA, R. et al. Composition and antifungal activity of the essential oil of *Solidago chilensis*. **Planta Medica**, v. 68, n. 2, p. 164–167, 2002.

WANG, Y.; HUANG, T. Screening of anti-*Helicobacter pylori* herbs deriving from Taiwanese folk medicinal plants. **Immunology and Medical Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 295–300, 2005.

WEBER, E.; JAKOBS, G. Biological flora of Central Europe: *Solidago gigantea* Aiton. **Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 200, n. 2, p. 109-118, 2005.

WENDLING, I.; GATTO, A. **Substratos, adubação e irrigação na produção de mudas**. 2. ed. Viçosa: Aprenda Fácil, (Coleção Jardinagem e Paisagismo; Série Produção de Mudanças Ornamentais, 2), 2012. 148 p.

WONG, L. F.; LIM, Y. Y.; OMAR, M. Antioxidant and antimicrobial activities of some *Alpinia* species. **Journal of Food Biochemistry**, v. 33, n. 6, p. 835–851, 2009.

XIAO, T. et al. The Endothelial Protective Properties of Essential Oil from Fructus *Alpiniae zerumbet* via the Akt/NOS- NO Signaling Pathway *In Vitro*. **Planta Medica**, v. 80, n. 17, p. 1628–1634, 2014.

YUE, X.; REED, B. M. Improved shoot multiplication of mature hazelnut (*Corylus avellana* L.) *in vitro* using glucose as a carbon source. **Plant Cell Reports**, v. 12, n. 5, p. 256-259,

1993.

ZULIANI, A. J. B. et al. **Enraizamento de estacas de *Solidago chilensis* Meyen.** In: XVII Simpósio de Ensino, Pesquisa e Extensão, 2012, SANTA MARIA. Anais do XVII Simpósio de Ensino, Pesquisa e Extensão, 2012.

**CAPÍTULO 1 – Regeneração *in vitro* de *Solidago chilensis* Meyen via organogênese direta**

## Regeneração *in vitro* de *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae) via organogênese direta

**Resumo:** *Solidago chilensis* Meyen é uma espécie medicinal conhecida por arnica-brasileira. O trabalho teve como objetivo estabelecer protocolo para regeneração *in vitro* de *S. chilensis* via organogênese direta. Para o estabelecimento *in vitro* foram testados dois tipos de antioxidantes: carvão ativado (0,3%) adicionado ao meio de cultura e imersão em solução de ácido ascórbico (2%) por 20 minutos, e quatro tipos de explantes: segmentos basais e medianos de lâmina foliar, além de segmentos intermodais e nodais caulinares, apicais e medianos. Também foram testados tipos de fechamento dos tubos (com filme PVC e algodão), e analisada a anatomia das plantas. Para aclimatização, vasos contendo fibra de coco, areia e terra vegetal foram mantidos em casa de vegetação. As plantas foram regadas três vezes por semana com 2 mL de solução de Hoagland (1/4 de força). Depois de quinze dias as tampas das garrafas foram desenroscadas, no trigésimo dia as mudas foram transferidas para sacos de polietileno, avaliada porcentagem de sobrevivência e crescimento durante 60 dias. Segmentos nodais medianos apresentaram maior taxa de multiplicação do que apicais e folhas. Não foi observado declínio na taxa de propagação no decorrer de quatro subcultivos *in vitro* e o pH das culturas se manteve estável. Foi estabelecido com sucesso o protocolo de micropropagação de *S. chilensis* e as mudas apresentaram alto índice de sobrevivência na fase de aclimatização.

**Palavras-Chave:** Clonagem, fechamento do tubo, tampa de algodão, tecidos vegetais.

**Abstract:** *Solidago chilensis* Meyen is a medicinal plant known for Brazilian arnica. The work aimed to establish a protocol for *in vitro* regeneration of *S. chilensis* via direct organogenesis. To establish *in vitro* were tested two types of antioxidants: activated carbon (0.3%) added to culture medium and immersion in solution of ascorbic acid (2%) for 20 minutes; and four types of explants: basal and median of leaf segments, as well as intermodal and nodal stem segments, apical and median. Were also tested the tube closure types (with PVC film and cotton), and analyzed the anatomy of plants. For acclimatization, vessels containing coconut fiber, sand and topsoil were kept in the greenhouse. Plants were watered three times a week with 2 ml of Hoagland solution (1/4 strength). After fifteen days the caps of the bottles were unscrewed, on the thirtieth day, transferred to polyethylene bags, and evaluated the percentage of survival and growth parameters, for 60 days. Median nodal segments showed higher multiplication rate than apical and leaves. There was no decline in the propagation rate over four subcultures *in vitro* and the pH remained stable. It was successfully established the micropropagation protocol of *S. chilensis* and the seedlings had a high survival rate in the acclimatization phase.

**Keywords:** Cloning, tamponade, cotton cap, plant tissues.

### Introdução

*Solidago chilensis* Meyen, comumente conhecida como arnica-brasileira, é uma planta nativa da parte meridional da América do Sul, incluindo o sul e sudeste brasileiro, caracterizada por um subarbusto ereto, perene, rizomatoso, de 80 até 120 cm de altura, folhas

simples, alternas, quase sésseis, capítulos florais pequenos, flores amarelas, reunidas em inflorescências escorpióides dispostas na extremidade dos ramos, conferindo ao conjunto o aspecto de uma grande panícula muito ornamental. (CORREIA et al. 1999; LORENZI e MATOS, 2008; PRUDÊNCIO, 2012; LÖBLER, 2012).

De acordo com levantamentos etnobotânicos (PRUDÊNCIO, 2012), *S. chilensis* é usada popularmente no tratamento de contusões, machucados, tratamento de feridas, traumatismo, furúnculo e dor no corpo, sob as formas de emplastro, alcoolatura, escalda-pés, tintura, cataplasma, infusão e banho. Baseado em diversos levantamentos etnofarmacológicos, pode-se observar que os relatores populares corroboram com a descrição científica e com os principais constituintes químicos dessa espécie, que são flavonóides, taninos, saponinas, resinas, óleo essencial, inulina, rutina, ácido químico, ramnosídeos e ácido caféico, clorogênico, hidrocínâmico, quercitina e glicosídeo, demonstrando que a espécie é promissora para investigação e no desenvolvimento de formulações para o combate a processos inflamatórios e nos estudos de outros sintomas e enfermidades (MARTINS-RAMOS et al., 2010; PRUDÊNCIO, 2012).

*S. chilensis* se multiplica por sementes e também pelos rizomas. A propagação por meio de sementes pode ser influenciada negativamente por determinados fatores tais como polinização insuficiente e estresse ambiental, interferindo na reprodução sexuada (VELTEN e GARCIA, 2005). Além disso, a variabilidade genética produzida não é aconselhada para a manutenção da produtividade no que diz respeito às plantas medicinais. Assim, a propagação clonal via cultura de tecidos é uma importante ferramenta na manutenção de espécies de importância medicinal, pois na maioria dos casos, as plantas propagadas mantêm as características genéticas da planta matriz, a uniformidade nas mudas e a produção de alta qualidade (EHLERT et al., 2004; FERREIRA e BORGUETTI, 2004; HARTMANN et al., 2011).

Contudo, o crescimento *in vitro* e o desenvolvimento de uma planta é determinado por fatores complexos tais como nutrientes (água, açúcares, macro e micronutrientes), fatores de crescimento físico (luz, temperatura, pH, concentrações de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>), reguladores, vitaminas e a composição genética da planta, que é decisivo em todas as fases de desenvolvimento da planta e por sua vez, sua expressão também depende das condições físicas e químicas as quais o material é submetido enquanto mantido *in vitro* (PAN e VAN STANDEN, 1998).

O objetivo deste estudo foi estabelecer um protocolo eficiente para regeneração *in vitro* de *S. chilensis* via organogênese direta.



## **Material e Método**

### **Estabelecimento *in vitro***

O material vegetal foi coletado de plantas matrizes mantidas em viveiro no Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana, oriundas de bairros de Vitória da Conquista. Os caules e folhas foram lavados com detergente neutro a 5% por 5min, imersos em solução de ácido ascórbico a 2% por 20 minutos, desinfestados em câmara de fluxo laminar com álcool 70% por três minutos seguidos de hipoclorito de sódio 2,5% por 15 minutos e lavados por três vezes com água destilada autoclavada.

Foram testados dois tipos de antioxidantes: carvão ativado (0,3%) adicionado ao meio de cultura e imersão dos explantes em solução de ácido ascórbico (2%) durante 20 minutos, antes da desinfestação. Segmentos basais e medianos de lâmina foliar (1cm), além de segmentos internodais e nodais caulinares (1 a 2cm), foram inoculados em meio MS ou MS $\frac{1}{2}$  (MURASHIGE e SKOOG, 1962) acrescidos de 3% de sacarose e 0,7% de ágar, suplementados com diferentes concentrações e combinações dos reguladores vegetais ANA. Os tratamentos foram nomeados em: 1- 0,0  $\mu$ M de ANA e 0,0  $\mu$ M de BAP; 2- 0,0  $\mu$ M de ANA e 4,44  $\mu$ M de BAP; 3- 0,0  $\mu$ M de ANA e 8,88  $\mu$ M de BAP; 4- 2,68  $\mu$ M de ANA e 0,0  $\mu$ M de BAP; 5- 2,68  $\mu$ M de ANA e 4,44  $\mu$ M de BAP; 6- 2,68  $\mu$ M de ANA e 8,88  $\mu$ M de BAP; 7- 5,36  $\mu$ M de ANA e 0,0  $\mu$ M de BAP; 8- 5,36  $\mu$ M de ANA e 4,44  $\mu$ M de BAP; 9- 5,36  $\mu$ M de ANA e 8,88  $\mu$ M de BAP. Os segmentos nodais foram subdivididos em apicais e medianos.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizados com 10 repetições, cada uma composta por cinco tubos. Os tubos foram mantidos em sala de crescimento, sob fotoperíodo de 16h, irradiância de fóton de 36 $\mu$ mol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> e temperatura de 25°C  $\pm$  2. O pH dos meios foi ajustado para 5,7, antes da autoclavagem. Foram dispensados 10mL de meio de cultura em cada tubo de ensaio e esterilizados em autoclave (121°C por 15 minutos). O acompanhamento foi feito por um período de quatro subcultivos. O pH foi medido a cada 15 dias, por meio de fitas indicadoras (Merck).

### **Multiplicação**

Foram feitos quatro subcultivos regulares, em intervalos mensais, em meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), acrescidos de 3% de sacarose e 0,7% de ágar, suplementados com diferentes concentrações e combinações dos reguladores vegetais ANA. Os tratamentos foram nomeados em: 1- 0,0  $\mu$ M de ANA e 0,0  $\mu$ M de BAP; 2- 0,0  $\mu$ M de ANA e 4,44  $\mu$ M de BAP; 3- 0,0  $\mu$ M de ANA e 8,88  $\mu$ M de BAP; 4- 2,68  $\mu$ M de ANA e 0,0

$\mu\text{M}$  de BAP; 5- 2,68  $\mu\text{M}$  de ANA e 4,44  $\mu\text{M}$  de BAP; 6- 2,68  $\mu\text{M}$  de ANA e 8,88  $\mu\text{M}$  de BAP; 7- 5,36  $\mu\text{M}$  de ANA e 0,0  $\mu\text{M}$  de BAP; 8- 5,36  $\mu\text{M}$  de ANA e 4,44  $\mu\text{M}$  de BAP; 9- 5,36  $\mu\text{M}$  de ANA e 8,88  $\mu\text{M}$  de BAP. Após 30 dias a eficiência dos reguladores vegetais na multiplicação dos brotos foi determinada pela frequência de respostas dos explantes, número de brotos por explante e altura média das brotações.

Também foi testado o tipo de fechamento dos tubos, utilizando filme PVC e algodão envolvido em gaze de explantes em meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), acrescidos de 3% de sacarose e 0,7% de ágar, sem reguladores vegetais.

### **Pré-aclimatização**

Após o surgimento das raízes em meio de cultura sem adição de reguladores vegetais, as plantas passaram por um processo de pré-aclimatização ainda nos tubos de ensaio, no qual foram retiradas as tampas de filme de PVC e de algodão, permanecendo na sala de crescimento durante sete dias.

### **Aclimatização**

Para a aclimatização, 30 plantas de cada tratamento de fechamento do tubo foram transferidas para vasos contendo uma mistura de fibra de coco, areia e terra vegetal (1:1:1), mantidos em casa de vegetação (50% de sombreamento). As plantas foram cobertas com garrações plásticas de 5 litros, com tampa, visando manter a umidade relativa alta no microambiente. Dentro da cobertura plástica, além das mudas, foi mantido um copo de água com fungicida Derosal, cuja função foi de manter maior umidade dentro dos frascos e diminuir a contaminação. As plantas foram regadas com 2mL de solução de Hoagland (1/4 de força) (HOAGLAND e ARNON, 1950), compondo os seguintes tratamentos: 1- tampa de algodão sem solução de Hoagland; 2- tampa de algodão com solução de Hoagland uma vez por semana; 3- tampa de algodão com solução de Hoagland três vezes por semana; 4- tampa de PVC sem solução de Hoagland; 5- tampa de PVC com solução de Hoagland uma vez por semana; 6- tampa de PVC com solução de Hoagland três vezes por semana. Depois de quinze dias as tampas das garrafas foram desenroscadas, no trigésimo dia, transferidas para sacos de polietileno, avaliada a porcentagem de sobrevivência e parâmetros de crescimento tais como altura, diâmetro de caule e número de folhas, por 60 dias.

### **Anatomia**

Para caracterização anatômica das plantas cultivadas nos dois tipos de fechamento dos

frascos, as amostras coletadas foram fixadas em FAA 50 (JOHANSEN, 1940) por 24 horas e posteriormente estocadas no álcool a 70% em geladeira até o momento dos cortes anatômicos. Foram feitos cortes transversais e longitudinais à mão livre em lâminas semipermanentes, com glicerina 50%, corados com azul de Astra e safranina básica 1% de acordo com metodologia modificada de Kraus e Arduin (1997) e observados em Microscópio Olympus Optical BX 40 para fotografia.

### **Análise estatística**

Para os tratamentos antioxidantes utilizados, foi feita a contagem do grau de oxidação atribuindo-se valores de zero a quatro, para ausência de oxidação até oxidação intensa, os valores foram transformados em  $\sqrt{x+0,5}$ . Satisfazendo as pressuposições de homogeneidade pelo teste de Bartlett e normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, foi feita análise de variância pelo Sisvar (FERREIRA, 2014) e teste F para todas as variáveis analisadas na seleção do tipo de explante (ZONTA e MACHADO, 1991). Quando as pressuposições de homogeneidade e normalidade não foram satisfeitas, foi realizado o teste de Mann-Whitney ou Kuskall-Wallis quando mais de duas amostras.

Para comparação estatística das médias entre os tratamentos foram medidos e analisados a altura da planta, considerada a medida compreendida entre a base do explante sobre o meio de cultura e a extremidade oposta, o número de folhas intactas e de folhas senescentes, presença ou ausência de raízes. O número de folhas (X) também foi transformado em  $\sqrt{X+0,5}$  antes de serem submetidos ao procedimento da análise da variância. Os resultados expressos em % foram transformados em  $\arcsen \sqrt{x/100}$  antes da análise de variância.

### **Resultados e Discussão**

Tendo em consideração os resultados de oxidação dos explantes, houve diferença significativa na tripla interação entre meio de cultivo, tratamento antioxidante e tipo de explante (Tabela 1).

Tabela 1 – Médias de oxidação de explantes de *Solidago chilensis* (Meyen), submetidos a diferentes tratamentos antioxidantes em meios MS e MS½.

Tipo de explante	MS			MS½		
	Testemunha	Ácido ascórbico	Carvão ativado	Testemunha	Ácido ascórbico	Carvão ativado
Segmento nodal	1,83bCc	0,71aAa	1,44aBb	1,51aBc	0,71aAa	1,83bCc
Segmento entrenodal	1,45bBb	0,71aAa	1,45aBb	1,11aBab	0,71aAa	1,45aCb
Base foliar	1,07aBa	0,71aAa	1,09aBa	1,06aBa	0,71aAa	1,07aBa
Segmento mediano da lâmina foliar	1,35aBb	0,71aAa	1,26aBab	1,34aBbc	0,71aAa	1,34aBb
Média geral por meio de cultura		1,13*			1,11*	
CV (%)	15,62					

\*Média geral por meio de cultura sem diferença significativa; Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna, não diferem significativamente ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey; Médias seguidas de mesmas letras maiúsculas na mesma linha, para tratamento antioxidante no desdobramento meio de cultura e tipo de explante, não diferem significativamente ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey; Médias seguidas de letras minúsculas com apóstrofo iguais na mesma coluna não diferem significativamente ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey para tipo de explante no desdobramento de meio de cultura e tratamento antioxidante.

Analisando o desdobramento do tipo de meio de cultura, verificou-se que não houve diferença estatística significativa para oxidação entre os meios MS e MS½. Também não houve diferença significativa para a interação entre meio de cultura e tipo de explante. Contudo, para os tratamentos antioxidantes utilizados, houve diferença significativa para o tratamento com ácido ascórbico, que apresentou média de 0,71, mostrando-se muito eficiente quando comparado com os outros tratamentos, com médias da ordem de 1,24 para testemunha inoculada no meio MS½ e de 1,44 para testemunha inoculada no meio MS. Com relação aos tipos de explantes, houve diferença estatística para segmento nodal, com maior oxidação (1,35) em meio MS½. A base foliar é a que menos oxida entre os tratamentos utilizados, apresentando média de 0,95 em meio MS½, seguida do segmento mediano da lâmina foliar com 1,07 e dos segmentos intermodal e nodal com 1,09 e 1,35, respectivamente.

O pH se manteve estável em 5,7 durante todo o processo de micropropagação, mostrando que o crescimento dos explantes mantiveram essa taxa ótima de pH do meio ao longo do período de cultivo.

Culturas de segmentos nodais apresentaram melhor resultado por possuírem um meristema pré-existente facilmente desenvolvido nos brotos e o meio MS completo atendeu as necessidades para todos os tratamentos posteriores. A subdivisão dos segmentos nodais em apicais e medianos dentro dos tratamentos de reguladores vegetais mostrou diferença entre esses segmentos nas brotações aos 30 dias de cultivo (Figura 1).

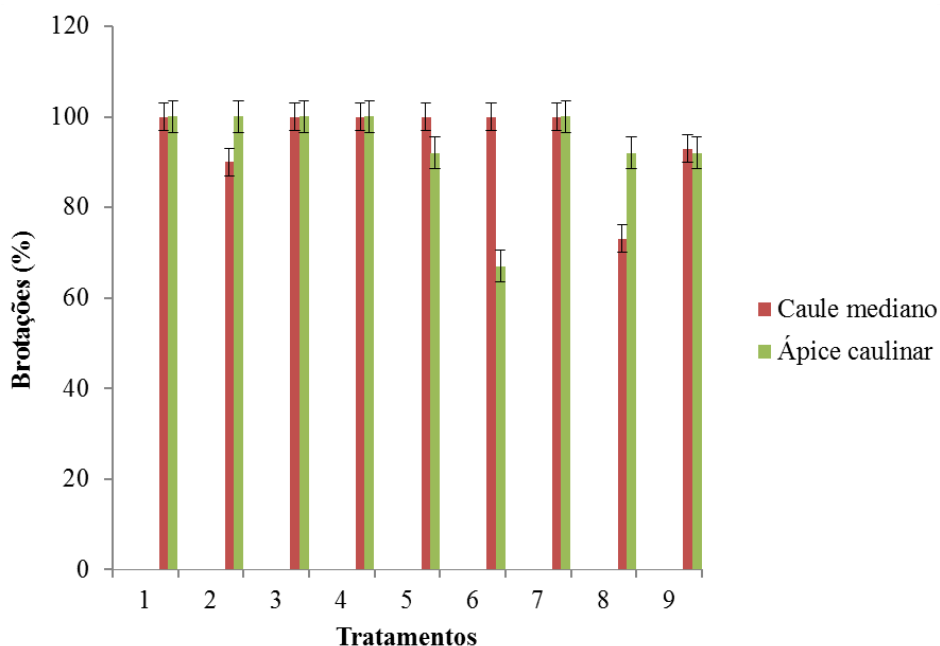


Figura 1 – Porcentagem de brotações de segmentos nodais apicais e medianos submetidos a tratamentos com ANA e BAP em meio MS aos 30 dias de cultivo. Letras minúsculas diferentes na variável caule mediano, médias significativamente diferentes entre si por Tukey a 0,05; Letras maiúsculas diferentes na variável ápice caulinar, médias significativamente diferentes entre si por Tukey a 0,05. Tratamentos: 1- 0,0  $\mu\text{M}$  de ANA e 0,0  $\mu\text{M}$  de BAP (testemunha); 2- 0,0  $\mu\text{M}$  de ANA e 4,44  $\mu\text{M}$  de BAP; 3- 0,0  $\mu\text{M}$  de ANA e 8,88  $\mu\text{M}$  de BAP; 4- 2,68  $\mu\text{M}$  de ANA e 0,0  $\mu\text{M}$  de BAP; 5- 2,68  $\mu\text{M}$  de ANA e 4,44  $\mu\text{M}$  de BAP; 6- 2,68  $\mu\text{M}$  de ANA e 8,88  $\mu\text{M}$  de BAP; 7- 5,36  $\mu\text{M}$  de ANA e 0,0  $\mu\text{M}$  de BAP; 8- 5,36  $\mu\text{M}$  de ANA e 4,44  $\mu\text{M}$  de BAP; 9- 5,36  $\mu\text{M}$  de ANA e 8,88  $\mu\text{M}$  de BAP.

Os explantes formados pelo ápice caulinar são mais frágeis, brotaram menos e morreram após 30 dias de cultivo, comparados com os explantes formados por partes medianas do caule, que possuem maior resistência e brotaram em maior porcentagem na maior parte dos tratamentos com ANA e BAP, podendo estar relacionado à produção de auxinas pelo ápice o que inibe o crescimento das gemas laterais, quando essa dominância apical é suprimida, as brotações laterais se desenvolvem.

Quando foi analisado o efeito dos reguladores vegetais, a análise de comparação de médias por Kruskal-Wallis mostrou efetividade apenas para os tratamentos 1 e 7 (testemunha e 5,36  $\mu\text{M}$  de ANA, respectivamente), como evidenciado na Figura 2, no entanto sem diferença entre estes e os tratamentos 4, 5, 6, 8 e 9. Não houve surgimento de calos em nenhum dos tratamentos.

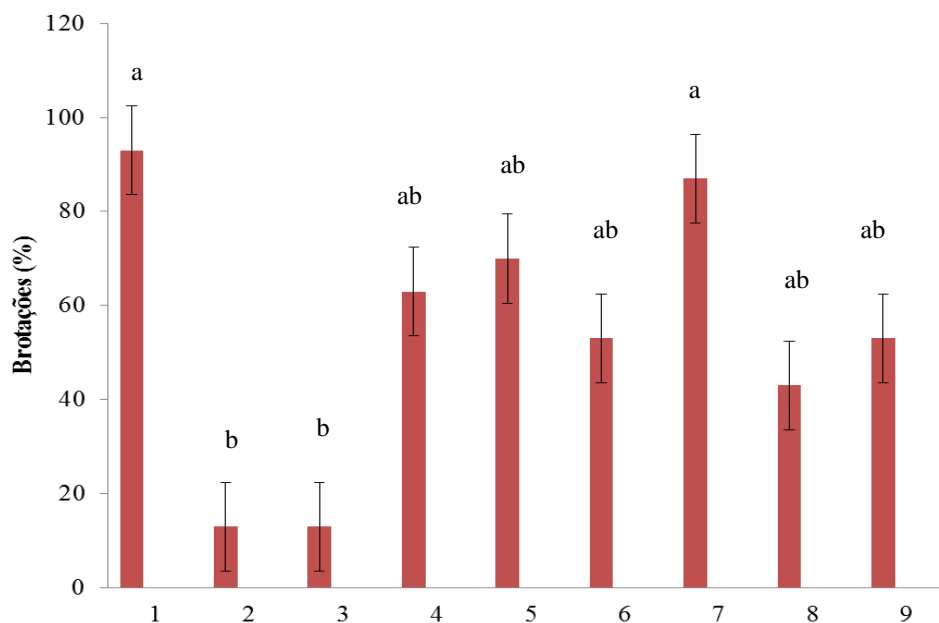


Figura 2 - Porcentagem de brotações de segmentos nodais submetidos a tratamentos com ANA e BAP em meio MS aos 30 dias de cultivo. Letras minúsculas diferentes, médias significativamente diferentes entre si por Kruskal-Wallis a 1% de probabilidade. Tratamentos: 1- 0,0 µM de ANA e 0,0 µM de BAP (testemunha); 2- 0,0 µM de ANA e 4,44 µM de BAP; 3- 0,0 µM de ANA e 8,88 µM de BAP; 4- 2,68 µM de ANA e 0,0 µM de BAP; 5- 2,68 µM de ANA e 4,44 µM de BAP; 6- 2,68 µM de ANA e 8,88 µM de BAP; 7- 5,36 µM de ANA e 0,0 µM de BAP; 8- 5,36 µM de ANA e 4,44 µM de BAP; 9- 5,36 µM de ANA e 8,88 µM de BAP.

Analisando o desdobramento da interação significativa a 1% pelo teste de comparação de médias, obteve-se o resultado visualizado na Tabela 2, na qual mostra que a presença dos reguladores interferiu negativamente na brotação e a maior média de brotação se deu sem adição de regulares vegetais.

Tabela 2 – Brotações (%) dos explantes caulinares em meio de cultura MS, adicionados dos reguladores ANA e BAP em diferentes concentrações.

ANA (µM)	BAP (µM)		
	0,0	4,44	8,88
0,0	81.1450 aA	12.8889 bB	15.3936 bB
2,68	53.2561 aA	59.6064 aA	49.4275 aA
5,36	76.9229 aA	38.4614 abB	49.4275 aAB

Médias seguidas de letras minúsculas iguais nas colunas, não diferem significativamente entre si por Tukey a 5% de probabilidade; Médias seguidas de letras maiúsculas iguais nas linhas, não diferem significativamente entre si por Tukey a 5% de probabilidade.

Ao longo dos subcultivos, em um total de quatro, as médias de altura das plantas principais brotadas dos explantes nos primeiros 30 dias, se encontram na Tabela 3, que mostra maior crescimento sem adição de reguladores, remetendo ao trabalho de Costa et al. (2008) em que esclarece que as diferentes respostas exercidas pelas auxinas se devem a diferenças no

metabolismo e estabilidade das mesmas e de Costa (2006) em que houve efeito negativo da adição dos reguladores AIA e BAP, produzindo anormais de tamareira.

Tabela 3 – Médias de altura (cm) das brotações principais dos explantes caulinares nos primeiros 30 dias de cada subcultivo em meio MS acrescidos dos reguladores vegetais ANA e BAP em diferentes concentrações.

ANA ( $\mu\text{M}$ )	BAP ( $\mu\text{M}$ )		
	0,0	4,44	8,88
0,0	1.4042 aA	0.0556 aB	0.0750 aB
2,68	0.8778 bA	0.1728 aB	0.1306 aB
5,36	0.4578 cA	0.1528 aB	0.0667 aB

Médias seguidas de letras minúsculas iguais nas colunas, não diferem significativamente entre si por Tukey a 5% de probabilidade; Médias seguidas de letras maiúsculas iguais nas linhas, não diferem significativamente entre si por Tukey a 5% de probabilidade.

As folhas produziram apenas raízes, isso mostra a possibilidade da presença de auxinas endógenas e a necessidade de reguladores vegetais adicionados ao meio para estimular brotação, contudo as dosagens utilizadas não mostraram efetividade. Aos 30 dias de cultivo *in vitro*, as folhas mais velhas das brotações caulinares iniciaram o processo de senescência, provavelmente justificado pela produção de etileno, que interfere de maneira negativa no desenvolvimento, podendo provocar a morte da plântula. Para sanar esse problema foi testado com sucesso o uso de tampas de algodão envolvido em gaze, devidamente autoclavadas, para permitir trocas gasosas com o meio.

Para diferença de fechamento dos tubos, os resultados mostram que a presença da tampa de algodão aparentemente diminui a concentração do etileno *in vitro*, contudo, não impede perda maior de água, já que facilita as trocas gasosas e faz com que o meio de cultivo evapore mais rapidamente, fazendo os subcultivos em menor intervalo de tempo. Além disso, favoreceu a entrada de bactérias, que não afetaram o crescimento, porém deixaram as plantas aparentemente desidratadas. As médias se encontram na Tabela 4.

Tabela 4 – Médias de altura (cm), número de folhas verdes e número de folhas secas (senescência) das brotações principais dos explantes caulinares em meio MS nos tratamentos de tampa de algodão e filme PVC.

	Altura	Nº folhas verdes	Nº folhas secas
Tampa de PVC	7,18 b	10,52 b	13,81 a
Tampa de algodão	8,53 a	12,87 a	6,91 b

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem significativamente entre si por Tukey a 1% de probabilidade.

Para o enraizamento não foi necessário regulador e a aclimatização foi feita sem grandes dificuldades, se mantida a umidade e controle da aeração. Na pré-aclimatização, apenas com as tampas dos tubos retiradas, houve 100% de sobrevivência. Na aclimatização houve 85% de sobrevivência (Figura 3).

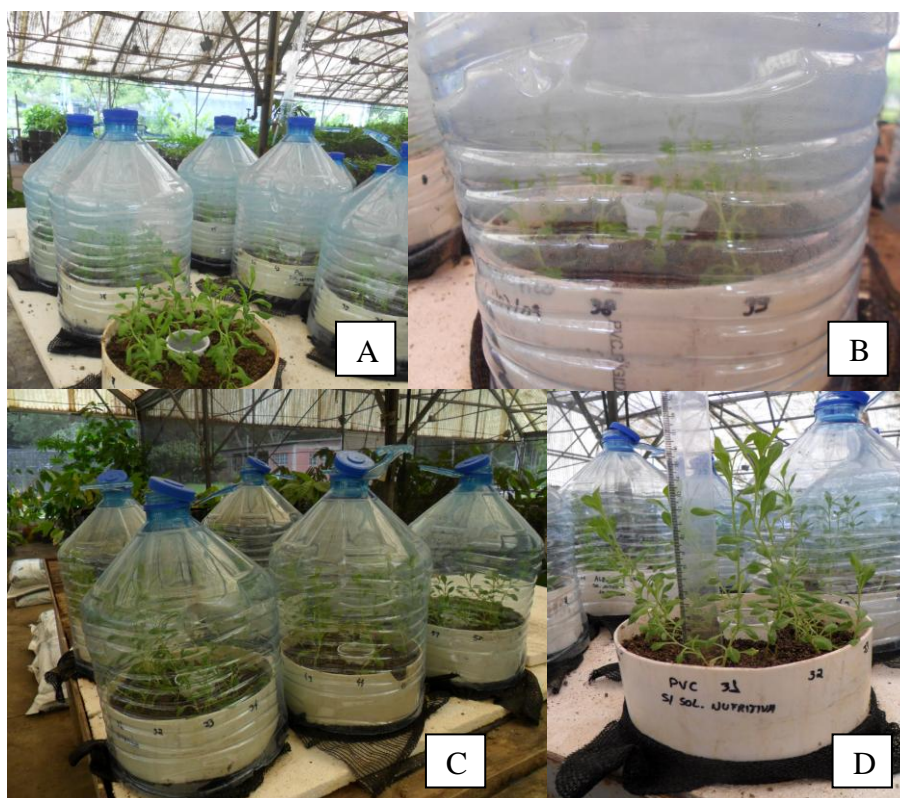


Figura 3 – Aclimatização de plantas (*Solidago chilensis* Meyen) cultivadas em meio MS, com tampa de PVC e tampa de algodão. A- montagem; B- detalhe da umidade interna; C- abertura das tampas após 15 dias; D- Retirada dos frascos após 30 dias.

Para aclimatização, foi feita biometria inicial das plantas para avaliar a diferença entre os tratamentos de fechamento com algodão e filme PVC, mostrando redução no número de folhas secas (senescência) e aumento em altura, e consequentemente de folhas verdes, resultando no teste de média da Tabela 5 abaixo:

Tabela 5 – Médias de altura (cm), número de folhas verdes e número de folhas secas (senescência) das plantas direcionadas para aclimatização, cultivadas em meio MS nos tratamentos de tampa de algodão e filme PVC.

	Altura	Nº folhas verdes	Nº folhas secas
Tampa de PVC	7,55 b	13,03 a	9,80 a
Tampa de algodão	9,26 a	16,10 a	3,13 b

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem significativamente entre si por Tukey a 5% de probabilidade.



Durante a aclimatização, as análises de crescimento indicaram mais uma vez a efetividade do fechamento com algodão para melhor adaptação das plantas, contudo os nutrientes da solução de Hoagland interferiram negativamente no desenvolvimento das mudas durante os 60 dias de verificação (Tabela 6).

Tabela 6 – Análise de variância para médias de altura (cm), número de folhas e diâmetro do caule (cm) de mudas de arnica durante 60 dias de aclimatização, cultivadas em meio MS nos tratamentos de tampa de algodão e filme PVC, submetidas a tratamentos de irrigação com solução de Hoagland (1/4 de força).

Variáveis	Tratamentos						CV(%)
	1	2	3	4	5	6	
Altura 30 dias	19,61 a	17,31 ab	12,13 c	17,90 ab	15,30 bc	16,20 ab	14,97
Altura 60 dias	43,22 a	40,81 a	28,88 b	38,05 ab	35,82 ab	37,35 ab	16,31
Nº folhas 30 dias	27,33 a	21,00 ab	16,75 b	27,50 a	19,30 ab	25,90 ab	26,12
Nº folhas 60 dias	53,22 a	41,75 ab	30,75 b	41,40 ab	34,90 b	42,60 ab	27,95
Diâmetro 30 dias	1,39 a	1,29 a	1,10 a	1,30 a	1,34 a	1,34 a	16,15
Diâmetro 60 dias	1,59 a	1,59 a	1,38 a	1,30 a	1,45 a	1,38 a	14,42

Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Tratamentos: 1- tampa de algodão sem solução de Hoagland; 2- tampa de algodão com solução de Hoagland uma vez por semana; 3- tampa de algodão com solução de Hoagland três vezes por semana; 4- tampa de PVC sem solução de Hoagland; 5- tampa de PVC com solução de Hoagland uma vez por semana; 6- tampa de PVC com solução de Hoagland três vezes por semana.

A anatomia das plantas cultivadas nos diferentes fechamentos mostra diferença entre os dois tratamentos. A Figura 4A mostra as plantas dos tubos de ensaio vedados com PVC. Em caule (Figura 4B), há uma única camada epidérmica revestida de uma tênue cutícula, logo abaixo, duas ou três camadas de colênquima anelar seguido de parênquima cortical com numerosos espaços intercelulares. Na sequência, próximos ao floema existem calotas esclerenquimáticas que dão sustentação ao órgão (Figura 4C). Em folhas, há presença de tricomas tectores unisseriados formados por três a cinco células ao longo de toda margem (Figura 4E e F). É notória a presença de estômatos adjacentes às células epidérmicas vizinhas. O mesofilo é composto por três camadas de parênquima clorofiliano (Figura 4G e H).

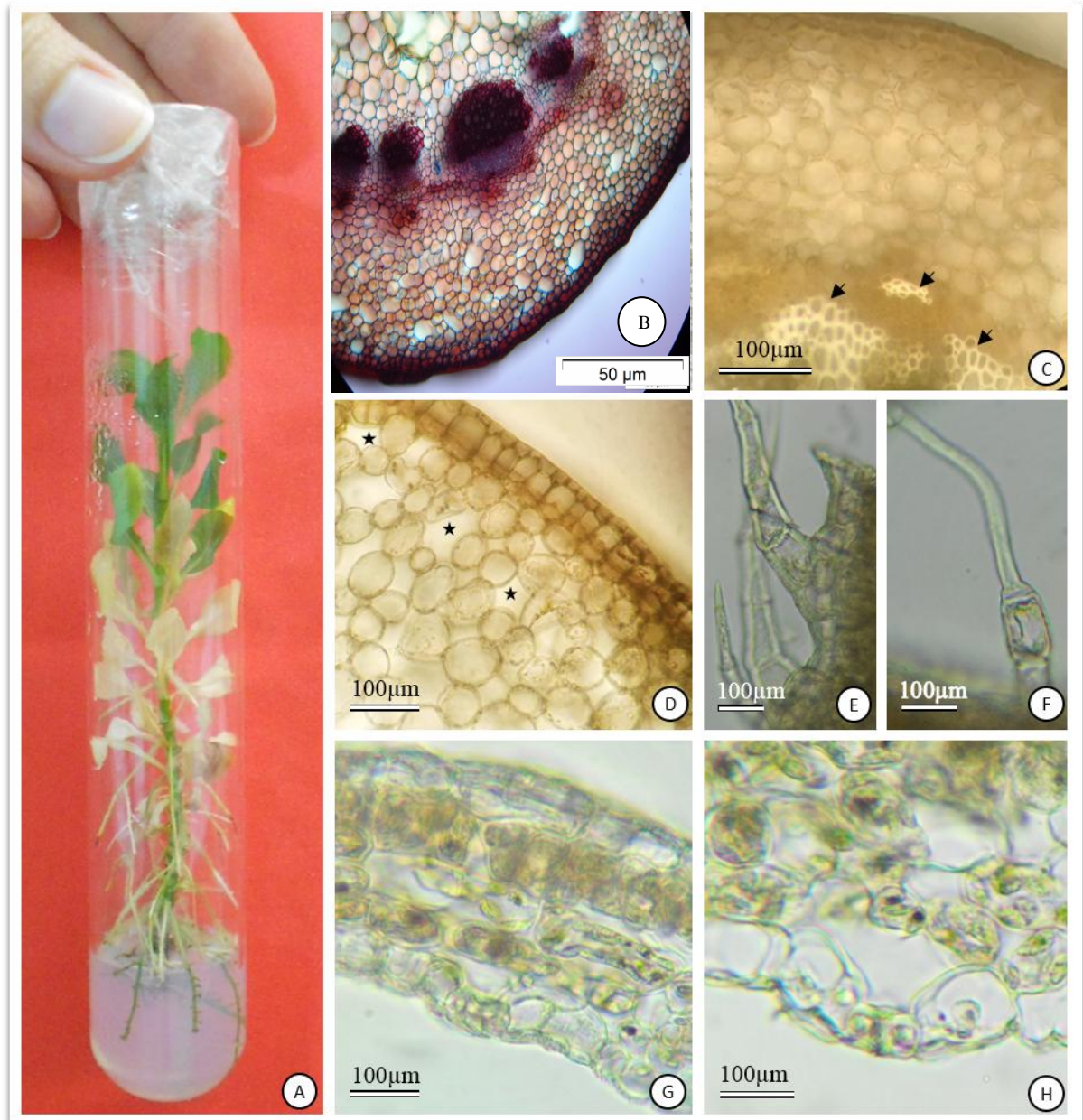


Figura 4 – Anatomia de plantas cultivadas em meio MS, em tubos de ensaio vedados com película de PVC. A- plântula *in vitro* evidenciando o tipo de fechamento do tubo de ensaio; B- corte transversal de caule, coloração safranina 1%; C- vista parcial do caule, destacando as camadas de tecidos até porção do cilindro central, setas indicam faixas de esclerênquima; D- corte transversal de caule evidenciando espaços intercelulares (estrelas); E- tricomas tectores unisseriados nas margens das folhas; F- tricoma tector multicelular unisseriado; G- corte transversal de folha evidenciando estômato; H- detalhe do estômato e câmara subestomática.

A Figura 5A mostra as plantas dos tubos de ensaio vedados com tampa de algodão. Circundando o feixe vascular central, ficam evidentes duas camadas de tecidos, a endoderme e o periciclo, o xilema no centro bastante lignificado rodeado por fina camada de floema (Figura 5B). Em caule, há uma única camada epidérmica revestida de cutícula mais evidente, logo abaixo, uma camada de células representando a exoderme seguida de parênquima

cortical com poucos espaços intercelulares, feixes vasculares isolados dispostos em anel (Figura 5C). Em folhas, o mesófilo é composto por cerca de quatro camadas de parênquima clorofiliano, com plastídios nas margens das células (Figura 5D). Estômatos alinhados com as células epidérmicas (Figura 5E). Os mesmos tipos de tricomas tectores também estão presentes nas margens das folhas e tricomas ao longo das células epidérmicas em ambas as faces (Figura 5F e G).



Figura 5 – Anatomia de plantas cultivadas em meio MS, em tubos de ensaio vedados com tampa de algodão. A- plântula *in vitro*; B- corte transversal da raiz, corado com Safranblau; C- corte transversal de caule; D- corte transversal de folha; E- detalhe de estômatos em corte transversal de folha; F- tricomas tectores unisseriados na margem da folha; G- detalhe de tricoma.

A adição de antioxidantes como o ácido cítrico, ácido ascórbico, peróxido de hidrogênio, polivinilpirrolidona (PVP) e carvão ativado ao meio de cultura após a autoclavagem, é relatada na literatura tanto para bananeira como para outras culturas, como alternativa para a diminuição do processo de oxidação (OLIVEIRA et al., 2011). O carvão ativado é um componente que tem sido frequentemente adicionado aos meios de cultura de tecidos vegetais com sucesso, pois possui a propriedade de adsorver os compostos fenólicos liberados pela oxidação dos tecidos lesionados durante o cultivo *in vitro*, porém seus efeitos ainda não são bem esclarecidos, existem considerações de que o carvão ativado promove a adsorção de reguladores vegetais, exudatos de plantas e metabólicos tóxicos, além de vitaminas, íons e outros componentes do meio de cultura (EBERT et al., 1993; PAN e VAN STANDEN, 1998; VAN WINKLE et al., 2003; COSTA et al., 2006). Andrade et al. (2000) ainda relatam maior taxa de oxidação encontrada no segmento nodal de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All e alertam necessidade de observação devido ao dano causado, fazendo com que a planta não absorva os nutrientes do meio, sobretudo os reguladores de crescimento.

Fatores físicos influenciam alterações do pH do meio de cultivo *in vitro*, contudo é conhecido o fato de que a presença de tecidos vegetais também pode alterar o mesmo (NICOLOSO et al., 2008). Algumas espécies, por exemplo, podem induzir alteração no pH do meio de cultivo para obter ótimas taxas de crescimento e enraizamento, o que mostra que as interações entre o desempenho do crescimento e as variações do pH do meio de cultivo parecem ser dependentes do genótipo vegetal (LEIFERT et al., 1992; NICOLOSO et al., 2008). Leifert et al. (1992) ainda mostram que o pH do meio de cultura tende a baixar sem explantes, seguindo uma taxa constante durante incubação na sala de crescimento, contudo não se tem o completo entendimento das causas desse acontecimento mas devem ser levadas em consideração quando se avalia as mudanças do pH do meio induzidas pelo material vegetal.

Conforme Schwalbert et al. (2014) e Dezan et al. (2012), as exigências nutricionais das plantas são bastante específicas, o suprimento inadequado de um nutriente pode resultar em prejuízos para o desenvolvimento vegetal, seja por excesso, que pode provocar danos por salinidade, ou seja, ocorre um desequilíbrio osmótico que afeta negativamente a absorção de água pelas raízes, ou pela sua deficiência. Para Schwalbert et al. (2014), o tipo de formulação mineral mais adequado para o cultivo de diversas espécies vegetais tem variado bastante, mesmo entre espécies com hábitos semelhantes, contudo o meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) e suas variações destacam-se como sendo os mais



utilizados em cultura de tecidos vegetais para a maioria das espécies herbáceas (BERTOZZO e MACHADO, 2010).

Thorpe et al. (2008) afirmam que a adição de componentes ao meio de cultura, especialmente macronutrientes e fontes de carbono, representa decréscimo considerável no potencial osmótico do meio e isso faz com que ocorram atrasos no processo de germinação de sementes e redução no crescimento inicial das plântulas (ANDRÉO-SOUZA et al., 2010). As interações entre nutrientes modulam o crescimento de plantas, sendo que, a disponibilidade de água e o suprimento adequado de nitrogênio exercem importância particular (HARTMANN et al., 2011). Para algumas espécies, baixas concentrações de sais minerais são essenciais na medida em que proporcionam, em geral, maior crescimento, sendo corroborado por diversos dados da literatura que comprovam a baixa demanda por nutrientes minerais *in vitro*, a exemplo de orquídeas epífitas, uma vez que vivem em ambientes com baixa disponibilidade de nutrientes (KNUDSON, 1946; ARDITTI e ERNEST, 1992; STANCATO et al., 2008; PEDROSO DE MORAES et al., 2009a; PEDROSO DE MORAES et al., 2009b; CORDEIRO et al., 2011; CUNHA et al., 2011). Os resultados encontrados confirmam que o meio de cultura ideal deve ser determinado utilizando fórmulas nutritivas mais adequadas para aperfeiçoar a qualidade das plantas produzidas *in vitro* (REGO-OLIVEIRA e FARIA, 2005).

Além disso, plantas que sofrem alterações anuais ou mesmo diárias de fatores climáticos, parecem exibir ritmos fisiológicos endógenos que podem se tornar críticos para o estabelecimento da cultura (ARDITTI e ERNST, 1992). Por isso, não há meio de cultura específico adequado às exigências de gêneros, espécies e clones (DEZAN et al., 2012). Em geral, é difícil compreender o motivo pelo qual certas combinações de meio e condições de cultivo obtêm sucesso e outras fracassam (VENTURA et al., 2002). Estudos *in vitro* com orquídeas demonstram que a diminuição de custos é possível pela simplificação dos meios de cultura atuais, principalmente pelo emprego de fertilizantes como base de meios de cultura, visando à produção em larga escala de representantes de Orchidaceae que requerem condições de cultivo específicas (STANCATO et al., 2001; PEDROSO DE MORAES et al., 2009a; 2009b) e isso pode ser extrapolado para outros grupos de plantas.

Na micropopagação, os reguladores de crescimento, especialmente as auxinas e citocininas, desempenham um papel muito importante, pois auxinas são geralmente utilizadas quando o propósito é alongamento e divisão celular, com posterior expansão dos tecidos (formação de calo), formação de raízes e citocininas servem para estimular o crescimento e desenvolvimento de brotações múltiplas (PIERIK, 1990; EINSERT, 1991; GEORGE, 1993). Neste aspecto, diversos autores relatam a necessidade de suplementação do meio de cultura

com combinações de auxinas e citocininas para garantir a eficiência na micropropagação de diferentes plantas medicinais (OLIVEIRA, et al., 2008; ABDELLATEF et al., 2010; ALVES, 2010; FONSECA, 2012; ALMEIDA et al., 2015). Por outro lado, a presença de auxinas e citocininas endógenas podem interferir na adição desses reguladores vegetais e provocar um efeito inesperado, que depende de um balanço hormonal intermediário e as diferentes respostas exercidas pelas auxinas se devem a diferenças no metabolismo e estabilidade das mesmas, sugerindo a possibilidade de outros tipos de auxinas poderem promover resultados similares àquelas rotineiramente utilizadas (COSTA et al., 2008).

Em micropropagação convencional, as plantas crescem em condições heterotróficas devido à presença de sacarose no meio e pelo desenvolvimento em recipientes fechados, o que resulta em uma adaptação morfofisiológica que causa pouca funcionalidade estomática e uma deficiente formação de cera cuticular, além do reduzido desenvolvimento do mesofilo foliar, especialmente os parênquimas clorofilianos e feixes vasculares (ZIV e CHEN, 2008). Contudo, alguns autores também verificaram a eficiência da tampa de algodão no cultivo *in vitro*, principalmente no que diz respeito à redução da abscisão foliar, a exemplo de Nepomuceno et al. (2009) e Gutiérrez (2010).

A vedação com PVC restringe a passagem dos gases e da água, fazendo com que se acumulem gotas de água nas plantas. Esse acúmulo de umidade e hormônios no interior do tubo vedado com PVC produz pouca transpiração devido ao elevado potencial de água na atmosfera do tubo e conseqüentemente o de massa de água e a pressão de turgor. Com menos pressão de turgor as células crescem menos. Por ter a maturação antecipada e menor pressão de turgor, as células do mesofilo foliar tendem a crescer e se dividir menos, os entrenós também ficam curtos. Ocorre acúmulo de etileno e assim há maturação acelerada das células, deposição precoce da parede secundária e sua lignificação, o que provoca senescência prematura dos órgãos (SUTTER, 1984). Com a tampa de algodão, há formação de gradiente de água no interior da plântula e uma continuidade nesse gradiente devido à comunicação com o meio externo, o potencial de água diminui no sentido meio de cultivo>raiz>caule>folha>lúmen do tubo>algodão>atmosfera. Mesmo devagar o sistema perde água para a atmosfera e isso facilita formação de cera epicuticular, contribuindo para melhorar a retenção de água. Caso isto ocorra, a saída de água pelas folhas promove um fluxo de massa e aumenta a pressão de turgor no interior das células, forçando as paredes celulósicas e aumentando as células em tamanho, número ou ambos (SUTTER, 1984).

Santana et al. (2008b) verificaram que as plantas de *Annona glabra* L. em cultivo fotoautotrófico formaram epiderme mais espessa visando à produção de cutina e

possibilitando a redução na perda de água. Com a adição em área de parede, diminui-se o incremento de camadas celulósicas. O turgor seria responsável por manter as folhas eretas e assim a plântula não necessita de muitos tecidos de sustentação. Outro motivo para não formar tecido de sustentação seria a idade do tecido, por ser muito jovem pode não haver deposição de parede secundária com a tampa de algodão. Santana et al. (2008a) testaram a presença do PVC e do algodão no fechamento dos tubos no cultivo de *Annona glabra* L. e verificaram que, com a remoção da película de PVC da tampa, o acúmulo de matéria seca da parte aérea subiu, representando ganhos de até 149,3% e de até 250% para raiz. Isso mostra que a tampa de algodão não limita as trocas gasosas e favorece a fotossíntese, tornando o meio fotoautotrófico.

Alguns trabalhos também mostram alta taxa de enraizamento sem necessidade de reguladores vegetais. Com base nos estudos de Cline e Neely (1983), quando se produz uma estaca, as células vivas na superfície da lesão tecidual são expostas e ocorre uma resposta de cicatrização do ferimento, logo se forma uma camada necrosada como resultado das células externas mortas, fechando o ferimento com um material muito parecido com a cortiça (suberina), bloqueando o xilema com resina. Esta camada auxilia na proteção da superfície do corte contra dessecação e patógenos, além de dar origem às primeiras raízes. Também foi relatado por Hartmann et al. (2011), que o ferimento permite maior absorção de água e de reguladores de crescimento, caso fossem colocados no meio de cultura.

Na micropropagação, deve-se avaliar a anatomia das espécies cultivadas *in vitro* e *ex vitro*, que permite a identificação dos caracteres que contribuem para a sobrevivência das plantas no campo, assim como suas possíveis adaptações ao meio (COSTA, 2006). Assim, a fase de aclimatização pode significar a limitação de todo processo de multiplicação *in vitro* de plantas e deve ser precedida de mudanças gradativas e contínuas, para que a planta se adapte ao novo ambiente. Os órgãos fotossintetizantes não operam normalmente e as plantas não desenvolvem capacidade fotoautotrófica, o que facilita a rápida desidratação da planta quando transferida para o ambiente normal, causando a morte de mudas durante a fase de aclimatização (NGUYEN e KOZAI, 2001; SOUZA et al., 2006). Na adaptação gradativa que constitui a pré-aclimatização, é possível estimular a planta propagada *in vitro* à nutrição autotrófica, através da redução de sacarose no meio de cultura e/ou do aumento da aeração dos recipientes, utilizando-se fechamentos alternativos, originando plantas anátomo-fisiológicas mais adaptadas ao processo de aclimatização (THORPE et al., 2008).

## Conclusão

É possível micropropagar a espécie. Caule mediano resultou no melhor tipo de explante. As folhas produziram apenas raízes, isso mostra que são necessários reguladores vegetais adicionados ao meio para estimular brotação nesse tipo de explante. Para o enraizamento não é necessário regulador, porém etileno interfere no desenvolvimento. O uso de tampa de algodão permite trocas gasosas com o meio, facilita o processo de aclimatização e melhor adaptação anatômica. Na pré-aclimatização, houve 100% de sobrevivência e na aclimatização 85% de sobrevivência.

## Referências

- ABDELLATEF, E. et al. *In Vitro* callogenesis and proliferation from diferente explants of Garden Cress (*Lepidium sativum* Linn). **International Journal of Current Research**, v. 4, p. 091-093, 2010.
- ALMEIDA, C. S. et al. Respostas morfogênicas de jenipapeiro em diferentes condições de cultura *in vitro*. **Revista Caatinga**, v. 28, n. 1, p. 58–64, 2015.
- ALVES, M. N. Cultura de tecidos de *Cecropia glaziovii* Sneth (Urticaceae): micropropagação vegetativa e regeneração de plantas via calos. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, n. 5, p. 1245-1252, 2010.
- ANDRADE, M. W.; LUZ, J. M. Q.; LACERDA, A. S. Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 24, n. 1, p. 174-180, 2000.
- ANDRÉO-SOUZA, Y. et al. Efeito da salinidade na germinação de sementes e no crescimento inicial de mudas de pinhão-manso. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n. 2, p. 83-92, 2010.
- ARDITTI, J.; ERNEST, R. **Micropropagation of orchids**. New York: John Wiley & Sons, 1992. 682p.
- BERTOZZO, F.; MACHADO, I. S. Meios de cultura no desenvolvimento de ápices caulinares de mamoneira (*Ricinus communis* L.) *in vitro*. **Ciência e agrotecnologia**, v. 34, n. 6, p. 1477-1482, 2010.
- CLINE, M. N.; NEELY, D. The histology and histochemistry of the wound healing process in geranium cuttings. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 108, p. 452-496, 1983.
- CORDEIRO, G. M. et al. Desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya amethystoglossa* Lindley X (*Cattleya dupreana* X *Laelia purpurata* Lindley) em diferentes meio de cultura. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, v. 18, n. 1, p. 22-28, 2011.
- CORREIA, E.; MING, L. C; CÂMARA, F. L. A. Aspects of the sexual reproduction of the Brazilian arnica (*Solidago chilensis* Meyen var. *megapotamica* (DC.) Cabrera- Asteraceae).



**Acta Horticulturae**, v. 502, p. 89-91, 1999.

COSTA, N. M. S. **Cultivo *in vitro* e estudo anatômico da Tamareira (*Phoenix dactylifera* L.)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Programa de Pós-Graduação do Centro de Biociências, 2006. 89 f.il.

COSTA, F. H. da S. et al. Efeito da interação entre carvão ativado e N<sup>6</sup>-benzilaminopurina na propagação *in vitro* de bananeira, cv. Grand Naine (AAA). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 2, p. 280-283, 2006.

COSTA, F. H. S.; LOUREIRO, T. S.; PEREIRA, J. E. S. Influência de auxinas e tipos de explantes na indução de calos friáveis em *Piper hispidinervum* C. DC. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 39, n. 2, p. 269-274, 2008.

CUNHA, T. et al. Desenvolvimento *in vitro* de *Laeliocattleya schilleriana* Rolfe em meios de cultivo simplificados. **Scientia Plena**, v. 7, n.8, p. 1-5, 2011.

DEZAN, L. F. et al. *In vitro* growth of *Schomburgkia gloriosa* Lindl. using simplified culture media. **Idesia**, v. 30, n. 2, p. 53-58, 2012.

EBERT, A.; TAYLOR, F.; BLAKE, J. Changes of 6-benzylaminopurine and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid concentrations in plant tissue culture media in the presence of activated charcoal. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 33, p. 157–162, 1993.

EHLERT, P. A. D.; LUIZ, J. M. Q.; INNECCO, R. Propagação vegetativa da alfavaca- cravo utilizando diferentes tipos de estacas e substratos. **Horticultura Brasileira**, v. 22, n. 1, p. 10-13, 2004.

EINSERT, J. W. Woody plant micropropagation with cytokinins. In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.) **Biotechnology in agriculture and forestry: high-tech and micropropagation I**. Berlin: Springer, 1991. v.17, p.190-201.

FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (Orgs). **Germinação: do básico ao aplicativo**. Porto Alegre: Artmed, 2004. 324 p.

FERREIRA, D.F. Sisvar: a guide for its bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 38, n. 2, p. 109-112, 2014.

FONSECA, P. T. **Cultura de embrião zigótico, calogênese e conservação *in vitro* de *Erythrina velutina* Willd. (Leguminosae)**. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Departamento de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, 2012. 92 f.: il.

GEORGE, F. **Plant propagation by tissue culture: the technology**. Dordrecht: Springer, 1993. 574 p.

GUTIÉRREZ, I. E. M. **Micropropagação de *Bauhinia cheilantha* (Bong.) Steud. (Fabaceae)**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Estadual de Feira de Santana, 2010. 85 p.

HARTMANN, H. T. et al. **Plant propagation: principles and practices** 8<sup>th</sup> ed. Jersey: Prentice-Hall, 2011. 915 p.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. **California Agricultural Experimental Station**. Circ. n.347, 1950.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: Mcgraw-Hill Book, 1940. 523 p.

KNUDSON, L. A new nutrient solution for germination of orchid seed. **American Orchid Society Bulletin**, v. 15, p. 214-217, 1946.

KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. Manual básico de métodos em morfologia vegetal. Rio de Janeiro: EDUR, 1997. 198 p.

LEIFERT, C. et al. Effect of medium acidity on growth and rooting of different plant species growing *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 30, p. 171-179, 1992.

LÖBLER, L. et al. Embebição, temperatura e regime de luz no processo germinativo de sementes de *Solidago chilensis* Meyen. 2012. In: **XVI Simpósio de Ensino, Pesquisa e Extensão**. Anais... Unifra, Santa Maria, RS. Disponível em: <http://www.unifra.br/eventos/sepe2012/Trabalhos/6481.pdf> Acesso em: 18 Dez 2014.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2. ed. São Paulo: Instituto Plantarum, 2008. 544 p.

MARTINS-RAMOS, D.; BORTOLUZZI, R. L. C.; MANTOVANI, A. Plantas medicinais de um remanescente de Floresta Ombrófila Mista Altomontana, Urupema, Santa Catarina, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 3, p. 380-397, 2010.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

NEPOMUCENO, C. F. et al. Respostas morfofisiológicas *in vitro* de plântulas de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. *cebil* (Griseb) Altschul1. **Revista Árvore**, v. 33, n. 3, p. 481-490, 2009.

NGUYEN, Q. T.; KOZAI, T. Photoautotrophic micropropagation of tropical and subtropical woody plants. In: MOROHOSHI, N.; KOMAMINE, A. (Ed.). **Molecular Breeding of Woody Plants**. Elsevier Science, 2001. p. 335-344.

NICOLOSO, F. T.; FERRÃO, G. da E.; CASTRO, G. Y. Culture medium pH and growth of brazilian ginseng *in vitro* cultured plantlets. **Ciência Rural**, v. 38, n. 7, p. 2059-2062, 2008.

OLIVEIRA, H. S. de. et al. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de brotos no processo de micropropagação de cultivares de bananeira (*Musa spp.*). **Acta Amazonica**, v. 41, n. 3, p. 369-376, 2011.

OLIVEIRA, L. M. et al. Efeitos de citocininas sobre a anatomia foliar e o crescimento de *Annona glabra* L. durante o cultivo *in vitro* e *ex vitro*. **Ciência Rural**, v. 38, n. 5, p. 1447-1451, 2008.

PAN, J. J.; VAN STADEN, J. The use of charcoal in *in vitro* culture – a review. **Plant Growth Regulators**, v. 26, p. 155-163, 1998.

PEDROSO DE MORAES, C. et al. Desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya loddigesii* Lindley (Orchidaceae) utilizando fertilizantes comerciais. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 7, n. 1, p. 67-69, 2009a.

PEDROSO DE MORAES, C. et al. Desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya tigrina* A. Richard. (Orchidaceae) utilizando fertilizantes comerciais. **Ensaios e Ciência**, v. 13, n. 2, p. 57-65, 2009b.

PIERIK, R. L. M. **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores**. Madrid: Mundi-Prensa, 1990. 326 p.

PRUDÊNCIO, R. **Levantamento etnofarmacologia de *Solidago chilensis* Meyen. Arnica-brasileira (Asteraceae)**. 2012. Monografia apresentada ao Setor de Pós- graduação da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, para a obtenção do título de especialista em Ecologia e Manejo de Recursos Naturais, Criciúmas, Santa Catarina, 2012. 45 p.

REGO-OLIVEIRA, L. V.; FARIA, R. T. *In vitro* propagation of Brazilian orchids using traditional culture media and commercial fertilizers formulations. **Acta Scientiarum**, v. 27, n. 1, p. 1-5, 2005.

SANTANA, J. R. F. et al. Estímulo do comportamento fotoautotrófico durante o enraizamento *in vitro* de *Annona glabra* L., I. Desenvolvimento do sistema radicular e da parte aérea. **Ciência e agrotecnologia**, v. 32, n.1, p. 80-86, 2008a.

SANTANA, J. R. F. et al. Estímulo do comportamento fotoautotrófico durante o enraizamento *in vitro* de *Annona glabra* L., II. Aspectos da anatomia da folha antes da aclimatização. **Ciência e agrotecnologia**, v. 32, n. 2, p. 640-644, 2008b.

SCHWALBERT, R. et al. Concentrações de sais do meio MS no cultivo *in vitro* de *Desmodium incanum*. **Enciclopédia Biosfera**, v. 10, n. 18, p. 1009-1015, 2014.

SOUZA, F. V. D.; COSTA, M. A. P.; SILVA-NETO, H. P. Aclimatização. In: SOUZA, A.S.; JUNGHANS, T.G. **Introdução à micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, Tropical, 2006. p. 131-140.

STANCATO, G. C.; ABREU, M. F.; FURLANI, A. M. C. Crescimento de orquídeas epífitas *in vitro*: Adição de polpa de frutos. **Bragantia**, v. 67, n. 1, p. 51-57, 2008.

STANCATO, G. C.; BEMELMANS, P. F.; VEGRO, C. L. R. Produção de mudas de orquídeas a partir de sementes *in vitro* e sua viabilidade econômica: estudo de caso. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 7, n. 1, p. 25-33, 2001.

SUTTER, E. Chemical composition of epicuticular wax in cabbage plant grown *in vitro*. **Canadian Journal of Botany**, v. 62, n. 1, p. 74-77, 1984.

THORPE, T. A. et al. The Components of Plant Tissue Culture Media II : Organic Additions, Osmotic and pH Effects, and Support Systems. In: GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; KLERK, G.D. (Eds.), **Plant Propagation by Tissue Culture**, v. 1, 3.ed. Springer, 2008. p. 115-173.

VAN WINKLE, S.; JOHNSON, S.; PULLMAN, G. S. The impact of gelrite and activated carbon on the elemental composition of plant tissue culture media. **Plant Cell Report**, v. 21, p. 1175-1182, 2003.

VELTEN, S. B.; GARCIA, Q. S. Efeitos da luz e da temperatura na germinação de sementes de *Eremanthus* (Asteraceae), ocorrentes na Serra do Cipó, MG, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 19, n. 4, p. 753-761, 2005.

VENTURA, G. M. et al. Organogênese *in vitro* a partir de gemas apicais e axilares de plantas adultas de orquídeas do grupo *Cattleya*. **Revista Ceres**, v. 49, n. 286, p. 613-628, 2002.

ZIV, M.; CHEN, J. The Anatomy and Morphology of Tissue Cultured Plants. In: In: GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; KLERK, G.D. (Eds.), **Plant Propagation by Tissue Culture**, v. 1, 3.ed. Dordrecht: Springer, 2008. p. 465- 478.

ZONTA, E. P.; MACHADO, A. A. **Manual do SANEST**: sistema de análise estatística para microcomputadores. Pelotas: UFPel, 1991. 102 p.

**CAPÍTULO 2 – Morfogênese *in vitro* de segmentos foliares e caulinares de *Solidago chilensis* Meyen**

## Morfogênese *in vitro* de segmentos foliares e caulinares de *Solidago chilensis* Meyen

**Resumo:** O presente trabalho objetivou avaliar a calogênese em folhas e caules de plantas de *Solidago chilensis* Meyen em meio de cultura contendo diferentes concentrações de fitorreguladores e descrever o processo de diferenciação de células envolvidas na formação dos calos. As culturas calogênicas foram obtidas a partir de explantes foliares e caulinares, inoculados em meio MS, suplementado com diferentes concentrações de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e cinetina (KIN). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cinco repetições de três tubos, cada tubo contendo um único explante, totalizando 15 tubos por tratamento. Os tubos foram fechados com filme PVC e mantidos em sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas de irradiação e temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . Para caracterização anatômica do processo de calogênese, os explantes foram coletados a cada dois dias a partir da data de inoculação. As amostras coletadas foram fixadas em FAA50 por 24 horas e posteriormente estocadas no álcool a 70% em geladeira até o momento dos cortes anatômicos. O material foi cortado transversal e longitudinalmente à mão livre, montados em lâminas semipermanentes feitas com glicerina 50%, observados em Microscópio Olympus Optical BX 40 e fotografados. A folha demonstrou ser a melhor fonte de explante para calogênese, em diversas concentrações testadas dos reguladores vegetais, e o caule, sem reguladores, para formação de brotos via organogênese direta. As análises histológicas mostraram que a regeneração de brotos em *S. chilensis* ocorreu por via direta em caule, sem regulador, pela retomada da atividade meristemática das gemas preexistentes, e a formação de calos, em folhas, promoveu o desenvolvimento de embriões somáticos, pela dediferenciação dos tecidos.

**Palavras-chave:** Calos embriogênicos, embriogênese somática, organogênese direta, micropropagação de plantas, reguladores vegetais.

**Abstract:** This study aimed to evaluate the callus formation in leaves and stems of *Solidago chilensis* Meyen plants, under different concentrations of growth regulators and describe the process of differentiation of cells involved the formation of callus. The calus cultures were obtained from leaf explants and shoot, inoculated on MS medium supplemented with different concentrations of 2,4-D and kinetin (KIN). The Experimental design was a randomized with five repetitions of three tubes (single explant for test tube), totaling 15 tubes per treatment. The tubes were sealed with plastic wrap and kept in a growth chamber under 16 hour photoperiod and temperature of  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . For anatomic characterization of callus formation process, explants were collected every two days from the date of inoculation. The samples were fixed in FAA50 for 24 hours and then stored in 70% alcohol in the refrigerator until the time of the anatomical cuts. The material was cut longitudinally and crosswise freehand, mounted on semi-permanent slides made with glycerin 50% seen in Olympus Optical Microscope BX 40 and photographed. The sheet has proven to be the best source of explant for callus formation in various tested concentrations of plant growth regulators, and the stem, not regulators, to form buds via direct organogenesis. Histological analysis showed that the regeneration of shoots in *S. chilensis* occurred by direct pathway in stem without regulator, the resumption of meristematic activity of preexisting buds and callus formation in leaves, promoted the development of somatic embryos, by the dedifferentiation of the tissues.

**Key-words:** Embryogenesis callus, somatic embryogenesis, direct organogenesis, plant micropropagation, plant growth regulators.

## Introdução

As plantas medicinais têm sido utilizadas com frequência, visto seu amplo efeito referente às suas funções terapêuticas para cura e prevenção de doenças, principalmente as chamadas doenças negligenciadas, que não são de interesse das grandes companhias farmacêuticas por não corresponderem a uma grande porcentagem em vendas (FUNARI e FERRO, 2005). Além disso, muitas dessas espécies agregam valor econômico na sua comercialização, principalmente quando se trata de um país tropical como o Brasil, que oferece riqueza na sua biodiversidade florística e tem a oportunidade de entrar nesse mercado, com pesquisas promissoras baseadas em levantamentos etnobotânicos (MACIEL et al., 2002; ATAS, 2003; FUNARI e FERRO, 2005; SIMÕES et al., 2010).

*Solidago chilensis* Meyen é uma planta da família Asteraceae, nativa, que ocorre com frequência nas regiões sul Brasil, sendo conhecida popularmente como arnica-brasileira e muito valorizada por causa do seu potencial medicinal encontrado nas folhas, gerando benefício à saúde. São atribuídas a esta espécie propriedades contra problemas gastrointestinais, anti-inflamatória, analgésica, estomáquica, adstringente, cicatrizante e vulnerária, topicamente é utilizada para o tratamento de ferimentos, escoriações, traumatismos e contusões (LORENZI e MATOS, 2002). A atividade antioxidante da espécie parece estar relacionada com os flavonóides presentes, entre eles a quercetina (GUNTNER et al., 1999).

Muitas espécies medicinais apresentam problemas com as sementes ou essa via de propagação é desvantajosa devido à variabilidade genética que induz mudanças na produção do princípio ativo. É para essas espécies, tais como *S. chilensis*, que as técnicas de cultivo *in vitro* são indicadas. A grande maioria das plantas medicinais é coletada em habitat natural e por maior que seja o número de indivíduos numa localidade não há como atender uma demanda constante e ininterrupta, principalmente quando a espécie tem vários usos, apenas o cultivo sistematizado pode garantir produção regular, com qualidade e em larga escala (PEREIRA, 2009).

Diante disso, reconhece-se a importância do tipo de propagação voltado para as plantas medicinais, visando a rápida multiplicação, auxiliando na conservação de germoplasma, na manutenção da produtividade e aumento da qualidade fitossanitária (ERIG e SCHUCH, 2005; FLORES et al., 2006). Assim, é importante estabelecer protocolos para atender a necessidade de uma rápida e alta taxa de multiplicação visando tanto à comercialização de mudas quanto à proteção a espécies que atualmente correm risco de extinção (SOUZA e PEREIRA, 2007; QUISEN e ANGELO, 2008; MELO et al., 2014).

A propagação vegetativa é considerada uma importante ferramenta na manutenção de

espécies, principalmente aquelas de importância medicinal, pois na maioria dos casos, as plantas propagadas mantêm as características genéticas da planta mãe (HARTMANN et al., 2011). As técnicas de cultura de tecidos estão baseadas na totipotencialidade da célula vegetal, que possibilita a regeneração de plantas a partir de células, tecidos e órgãos, os quais são identificados como mais adequados por possuir maior potencialidade morfogênética, são utilizados para iniciar a cultura *in vitro*, em condições assépticas, em meio nutritivo e têm apresentado alternativas promissoras seja para multiplicação de um genótipo desejado, geração de nova variabilidade, seleção e produção de metabólitos secundários de relevância e por algum motivo não podem ser produzidos por síntese, o que representa uma alternativa para a propagação comercial de espécies de interesse econômico, entre as quais as medicinais com valor farmacológico reconhecido (PINTO e LAMEIRA, 2001; PEREIRA, 2009; MORAIS et al., 2012).

De acordo com Rodrigues e Almeida (2010), a calogênese se destaca na cultura de tecidos vegetais para estudos fisiológicos relacionando com o crescimento celular. A indução de calos em diferentes tecidos vegetais pode ocorrer inoculando-se explantes de qualquer parte da planta em meio de cultura com o estímulo de reguladores de crescimento, que modifica o metabolismo celular, provoca uma desdiferenciação e os explantes iniciam o crescimento de um novo tecido composto por células meristemáticas não especializadas (NOGUEIRA et al., 2007; FREITAS, 2009; ASMAR et al., 2011; DEGENHARDT-GOLDBACH et al., 2011). Embora o calo continue desorganizado durante a multiplicação celular, alguns tipos de células especializadas podem ser formados ao acaso por meio de centros de morfogênese. Essas células especializadas são capazes de iniciar a formação de órgãos como raízes, brotos e embriões somáticos (GEORGE et al., 2008).

Shmeda-Hirschmann et al. (2005) produziram calos e regeneraram plantas a partir de segmentos de folhas, secções nodais e extremidades de brotos apenas com o intuito de analisar o teor de metabólitos secundários, principalmente solidagenona, rutina e ácido clorogênico. O presente trabalho teve como objetivos avaliar a indução de calos em explantes de folhas e caules de plantas de arnica (*S. chilensis*), em diferentes concentrações de fitorreguladores e descrever o processo de diferenciação de células ou grupo de células envolvidas na formação dos calos.

## **Material e Método**

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Botânica da Universidade Federal da Bahia. Foram utilizadas plantas matrizes cultivadas em casa de vegetação, a partir



de estacas de plantas cultivadas em hortas comunitárias da cidade de Vitória da Conquista, Bahia.

### **Indução de calos**

As culturas calogênicas foram obtidas a partir de explantes foliares (1cm<sup>2</sup>) e caulinares (1cm, apresentando nós e entrenós) lavados em água corrente com detergente neutro a 5% por 5min, imersos em solução de ácido ascórbico a 2% por 20 minutos e desinfestados com álcool 70% por 3 minutos seguidos de hipoclorito de sódio 2,5% por 15 minutos em câmara de fluxo laminar. Os explantes foram inoculados em meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), acrescidos de 30g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 7g.L<sup>-1</sup> de ágar, reajustando o pH para 5,7, suplementado com diferentes concentrações de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético - 0,0, 2,26, 4,52 e 9,05 µM) e cinetina (KIN - 0,0, 2,32, 4,65 e 6,97 µM), combinados e isolados.

Foi colocado um único explante por tubo de ensaio, em 10 repetições de 3, vedados com papel filme e mantidos em sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas, irradiância de fótons de 36 µmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> e temperatura de 25 ± 2°C.

Foram avaliados porcentagem de contaminação por fungos e bactérias, porcentagem de oxidação, formação de calos e brotação.

### **Preparação das amostras para as análises microscópicas dos calos**

Para caracterização anatômica do processo de calogênese, explantes foram coletados a cada dois dias a partir da data de inoculação, de acordo com a metodologia de Rocha (2011). As amostras coletadas foram fixadas em FAA 50% (JOHANSEN, 1940) por 24 horas e posteriormente estocadas em álcool a 70% em geladeira até o momento dos cortes anatômicos.

Foram feitos cortes transversais e longitudinais à mão livre, colocados em lâminas semipermanentes com glicerina 50%, corados com azul de astra e safranina básica 1% de acordo com metodologia de Kraus e Arduin (1997), com azul de evans e sem coloração, observados em Microscópio Olympus Optical BX 40 e fotografados.

### **Análise estatística**

O delineamento experimental em arranjo fatorial foi inteiramente casualizado para as variáveis brotações e formação de calos. Para que o modelo de análise de variância da regressão tivesse validade, satisfazendo as pressuposições de homogeneidade pelo teste de Bartlett e normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, independência de erros (resíduo) e

erros (resíduos) com distribuição normal, foi feita a análise exploratória dos dados, análise de variância da regressão e teste F utilizando-se o programa estatístico Assistat 7.7 pt (SILVA e AZEVEDO, 2016). Também foram analisadas porcentagem de contaminação e oxidação.

## Resultados e Discussão

Foi verificado que caules utilizados como explantes apresentaram maior porcentagem de contaminação fúngica e bacteriana, em contrapartida, folhas apresentaram maior oxidação (Tabela 1). Com relação à contaminação bacteriana, observou-se que o caule foi infestado mais mais que as folhas (Tabela 1).

Tabela 1 – Distribuição da presença de fungos, bactérias e oxidação em explantes de caules e folhas de *Solidago chilensis*, distribuídos nos tratamentos com reguladores vegetais KIN e 2,4-D. Dados expressos em porcentagens.

Reguladores vegetais(μM)		Presença de fungos (%)		Presença de bactérias (%)		de Explantes oxidados (%)	
2,4-D	KIN	Folha	Caule	Folha	Caule	Folha	Caule
0	0	26,7	26,7	0	0	20	20
	2,32	6,7	60	13,3	13,3	86,7	6,7
	4,65	40	20	0	0	20	20
	6,97	26,7	0	0	0	13,3	0
2,26	0	13,3	6,7	0	13,3	33,3	13,3
	2,32	20	53,3	0	46,7	6,7	6,7
	4,65	13,3	66,7	0	26,7	0	6,7
	6,97	33,3	46,7	0	20	0	0
4,52	0	6,7	40	0	20	0	13,3
	2,32	0	66,7	6,7	33,3	13,3	6,7
	4,65	46,7	53,3	53,3	46,7	0	6,7
	6,97	20	60	0	6,7	0	6,7
9,05	0,0	53,3	26,7	13,3	13	33,3	33,3
	2,32	26,7	33,3	6,7	66,7	0	13,3
	4,65	93,3	20	0	6,7	0	13,3
	6,97	26,7	20	0	6,7	0	40

O 2,4-D se mostrou um pouco mais efetivo e indispensável para indução de calos, contudo houve mais formação de calos, nos explantes de folhas, nos tratamentos 2,26 μM de 2,4-D combinado com 4,65 μM de KIN, em 93,3% dos tubos, mostrando diferença estatística altamente significativa (Tabela 2). Para brotações diretas, o caule mostrou efetividade em 80% dos explantes, devido à presença das gemas laterais, sem a presença de reguladores, também com diferença estatística altamente significativa.

Tabela 2 – Efeito dos reguladores vegetais KIN e 2,4-D na quantidade de brotações via organogênese direta e calogênese obtidas de explantes de caules e folhas de *Solidago chilensis*. Dados expressos em porcentagens.

Reguladores vegetais(μM)		Brotações (%)		Calos (%)	
2,4-D	KIN	Folha	Caule	Folha	Caule
0	0	0	80**	0bB	0ns
	2,32	0	0	0bB	0ns
	4,65	0	0	6,7bB	0ns
	6,97	0	0	53,3aA	0ns
2,26	0	0	0	40abB	0ns
	2,32	0	0	66,7aAB	0ns
	4,65	0	0	93,3aA	6,7ns
	6,97	0	0	33,3abB	6,7ns
4,52	0	0	0	0bB	0ns
	2,32	0	0	13,3bB	0ns
	4,65	0	0	13,3bB	0ns
	6,97	0	0	60aA	0ns
9,05	0,0	0	0	53,3aA	0ns
	2,32	0	0	20bAB	0ns
	4,65	0	0	0bB	0ns
	6,97	0	0	0bB	0ns

\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey; Para número de calos, letras minúsculas diferentes na mesma coluna, diferença significativa por Tukey a 1% de probabilidade, e letras maiúsculas diferentes na mesma linha, diferença significativa por Tukey a 1% de probabilidade; ns, diferença não significativa.

De maneira geral, as quantidades de 2,4-D utilizadas promoveram uma relação negativa com a formação de calos, enquanto que KIN foram mais efetivas quanto maior a concentração (Figura 1A e C). A quantidade de calos formados por folhas indica que devem ser preferidas para indução de embriogênese somática ou organogênese indireta, com  $P < 0,01$  e  $R^2 = 1$  aproximadamente (Figura 1B). Em caules a formação de calos foi extremamente baixa em apenas duas combinações de todos os tratamentos utilizados. As concentrações de reguladores utilizadas nos caules promoveram nenhuma brotação e baixa formação de calos, com  $P < 0,01$  e  $R^2 = 0,3$  aproximadamente, como mostraram os resultados da Figura 1D.

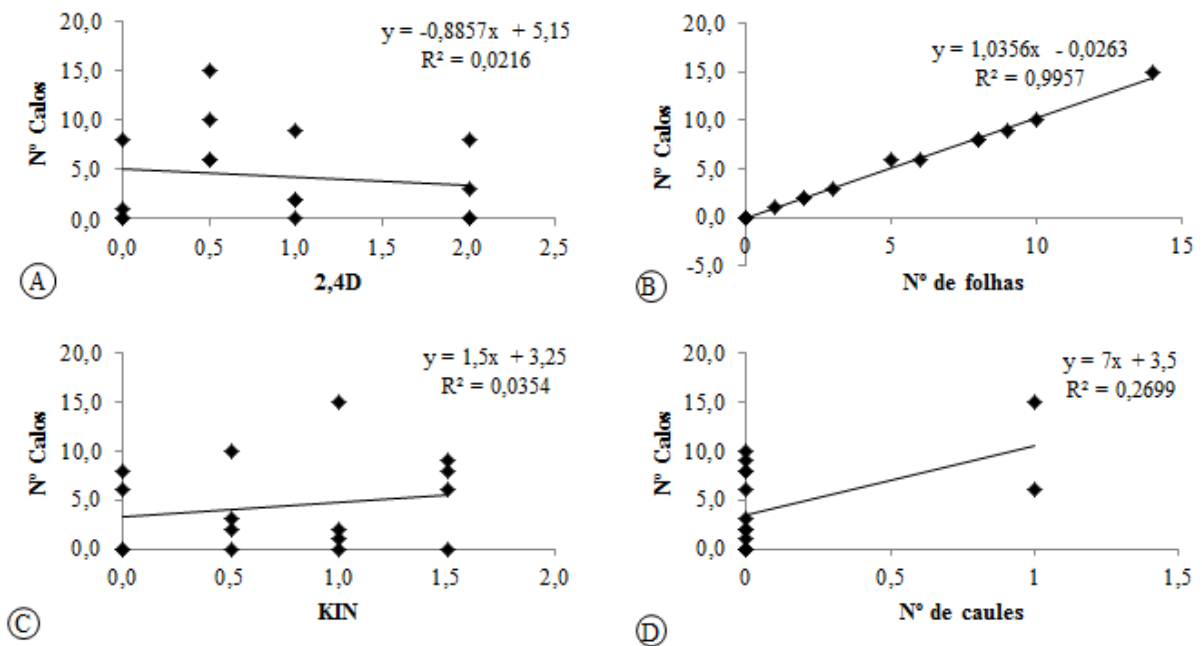


Figura 1 – Resultados de análise de regressão das ocorrências de calos e oxidação nos explantes caulinares e foliares de *Solidago chilensis* em meio de cultura MS, adicionados dos reguladores 2,4-D e KIN em diferentes concentrações. A- número de calos formados em função das concentrações de 2,4-D utilizadas, relação negativa; B- número de calos formados em folhas; C- número de calos formados em função das concentrações de KIN utilizadas, relação positiva; D- número de calos formados em caules.

Ocorreu aumento de oxidação em explantes caulinares, quando houve o aumento na concentração dos reguladores, exceto algumas combinações com aumento na concentração de KIN de acordo com regressão não linear cujo valor de  $P < 0,05$  e  $R^2 = 0,2$ , como mostra a Figura 2B. Quanto à oxidação em explantes foliares há uma relação positiva forte, indicando aumento do número de explantes oxidados quando concentrações dos reguladores são aumentadas,  $P < 0,01$  e  $R^2 = 0,8$  (Figura 2A).

A formação calogênica foi avaliada e demonstrou apenas a presença de calos friáveis, que são mais propensos a formar embriões. Houve calos de coloração branca, verde, amarela ou marrom claro (Figura 3).

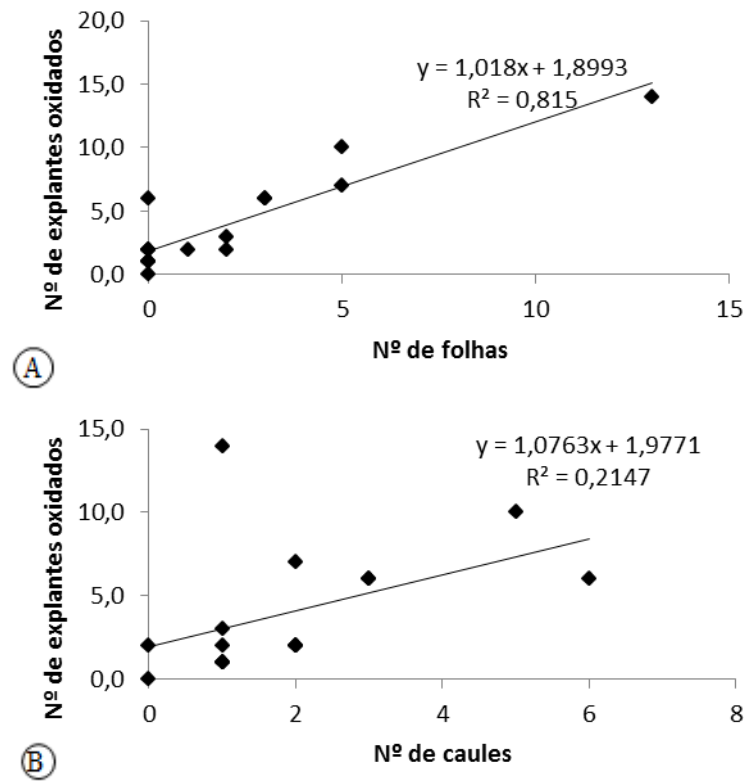


Figura 2 – Resultados de análise de regressão da oxidação nos explantes caulinares e foliares em meio de cultura MS, adicionados dos reguladores 2,4-D e KIN em diferentes concentrações. A- aumento da oxidação de explantes foliares em função do aumento nas concentrações dos reguladores vegetais utilizados; B- aumento da oxidação de explantes caulinares em função do aumento nas concentrações dos reguladores vegetais utilizados.

Figura 3 – Aspectos da formação de calos friáveis em explantes de folhas e caules de *S. chilensis* ao longo do cultivo *in vitro* em meio nutritivo MS, em função de diferentes concentrações de 2,4-D e KIN. (A) coloração branca em meio contendo 2,26 $\mu$ M de 2,4-D combinado com 4,65 $\mu$ M de KIN; (B) coloração verde e branca leitosa em meio contendo 2,26 $\mu$ M de 2,4-D combinado com 4,65 $\mu$ M de KIN; (C e D) coloração branca leitosa e amarelada em meio contendo 2,26 $\mu$ M de 2,4-D combinado com 4,65 $\mu$ M de KIN; (E e F) coloração amarela em meio contendo 4,52 $\mu$ M de 2,4-D combinado com 4,65 e 6,97 $\mu$ M de KIN; (G) coloração marrom clara em meio contendo 9,05 $\mu$ M de 2,4-D.

A sequência de cortes histológicos revelou a formação de calos com potencial embriogênico (Figura 4). Já no primeiro dia de formação e fixação de calos, massas de células com características meristemáticas bem definidas, de células pequenas, compactas e isodiamétricas, apareceram sob células alongadas, pouco diferenciadas, com paredes celulares finas, que se coram fracamente com azul de Evans com pouca aderência e espaços celulares conspícuos (Figura 4 A a C). No segundo dia de fixação, ou seja, quarto dia de formação, foi observada cicatrização próxima às excisões e início da proliferação celular pelas células ao redor do feixe vascular em ambas as faces da folha (Figura 4 D).

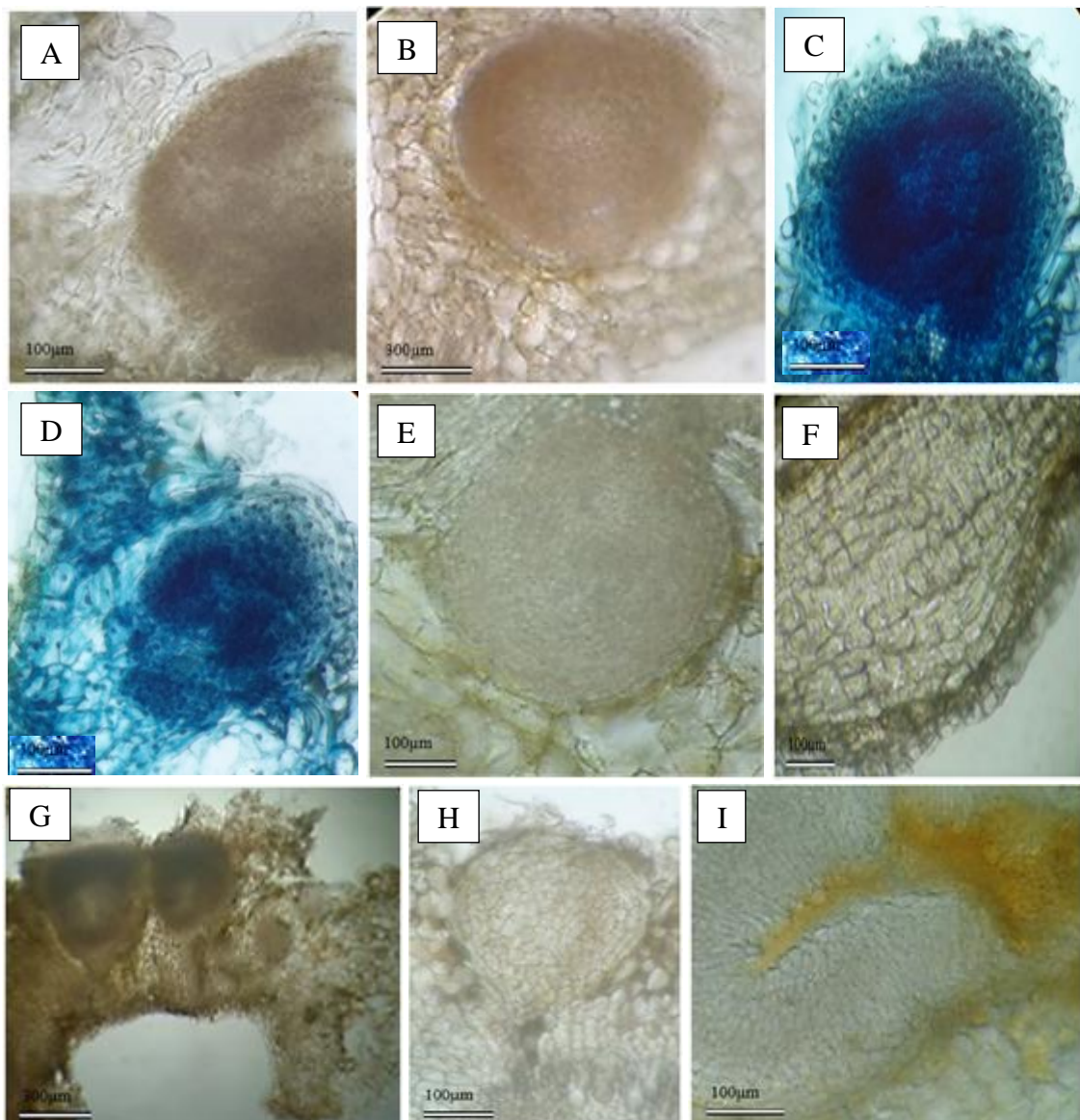


Figura 4 – Sequência de cortes histológicos e visualização de desenvolvimento embrionário ao longo da calogênese *in vitro* de *Solidago chilensis* até 60 dias de desenvolvimento em meio de cultivo MS suplementado com reguladores vegetais 2,4-D e cinetina (KIN). A a C– 1º dia, massa de células com características meristemáticas; D– início de proliferação celular pelas células ao redor do feixe vascular; E- 5º dia, embriões globulares mais proeminentes; F- protuberância subepidérmica evidente; G- embriões de diferentes tamanhos e estágios, apresentam-se disformes; H- 27º dia, embrião em estágio cordiforme; I- seções de primórdios foliares são visíveis e acompanhados de secreção castanha no 30º dia.

No quinto dia de fixação, ou seja, décimo dia de crescimento de calos, os embriões globulares são mais proeminentes (Figura 4 E). As células alongadas se proliferam ao ponto de forçar o rompimento da epiderme próximo à nervura principal. As protuberâncias digitiformes vistas nos calos são formadas por estas células e se assemelham aos tricomas pluricelulares unisseriados. No entanto, estas protuberâncias são de origem subepidérmica (Figura 4 F). Esse tecido recobre embrião e feixes vasculares isolando-os do meio, nesta fase. Uma linha de abscisão se torna conspícua, apresentando células isodiamétricas e justapostas, assemelhando à epiderme, delimitando um espaço que divide o parênquima coeso do tecido frouxo com características de parênquima lacunoso e aerênquima, sem apresentar cloroplastos. A embriogênese é indireta e tem origem por desdiferenciação das células do parênquima clorofiliano.

No oitavo dia, protuberâncias digitiformes presentes na superfície dos calos apresentam mais séries de células, portanto são mais largas e diferem do que foi observado no quinto dia. Embriões de diferentes tamanhos e estágios, apresentam-se disformes (Figura 4 G). No 12º dia, em corte longitudinal, torna-se visível a proliferação celular cuja origem não é pericíclica, a qual produz células isodiamétricas a tabulares e coesas, promovem o incremento nas camadas subjacentes à epiderme da nervura principal. No 27º dia embriões em estágio cordiforme são visíveis, ocorre proliferação celular a partir do pericilo em feixes vasculares de menor porte (Figura 4 H). No 30º dia secções de primórdios foliares são visíveis e acompanhados de secreção castanha (Figura 4 I). A nervura principal apresenta rompimento da epiderme em ambas as faces com aumento no número de células alongadas afastando os tecidos mais antigos para as laterais.

Embriões de diferentes tamanhos e estágios concorrem por espaço, apresentando-se disformes, o que não se assemelham aos formatos descritos para os estágios embriogênicos, com distinção de camadas celulares organizadas como o ápice caulinar. Tais formas também podem estar relacionadas aos planos de corte dos calos, visto que os mesmos surgem e desenvolvem para regiões distintas não sendo possível orientá-los com precisão. Além disso, a secreção apresentada junto ao embrião no 30º dia não teve sua natureza química investigada e poderia estar relacionada com os ductos da nervura principal, ou ainda, ser secretada por células adjacentes ao embrião assim como ocorre com embriões somáticos de *Passiflora edulis*, os quais são circundados por mucilagem (APEZZATTO-DA-GLÓRIA et al., 2005).

O estabelecimento é a primeira fase da micropropagação e necessita do desenvolvimento de um protocolo eficiente. Algumas espécies apresentam dificuldades nessa primeira fase em virtude de problemas com oxidação e presença de microrganismos e para

isso são utilizadas várias substâncias com ação germicida, antibiótica e antioxidante (SATO et al., 2001; MORAIS et al., 2012). Essa elevada contaminação sugere a presença de bactérias endofíticas no caule e/ou encontradas na rizosfera e solo nas condições de cultivo do viveiro que crescem sob condições do estresse do cultivo *in vitro* (FORCHETTI et al., 2007).

As técnicas de cultura de tecidos são bastante aplicadas em pesquisas envolvendo plantas medicinais, com ênfase na micropropagação, cujos protocolos permitem estabelecer padrões para a multiplicação massal de várias espécies. Normalmente, tecidos mais jovens tendem a responder melhor aos tratamentos, mas é possível obter calogênese a partir de fragmentos já diferenciados de diversos órgãos (LOYOLA-VARGAS e VAZQUEZ-FLOTA, 2006; GEORGE et al., 2008). Contudo, há espécies lenhosas em que ocorre alta frequência de regeneração de brotos a partir de tecidos não meristemáticos, devido à variabilidade genética da espécie, que possibilita maior capacidade morfogenética de alguns tecidos (MOREIRA-DIAS et al. 2001; COSTA et al., 2004; GEORGE e DEBERGH, 2008; ZENG et al., 2009). Entretanto, o sucesso da micropropagação, independentemente do explante utilizado, está sujeito ao efeito do genótipo da planta-matriz na resposta aos estímulos *in vitro* (STEIN et al., 2009).

Na micropropagação, reguladores de crescimento tais como auxinas e citocininas, desempenham papéis de extrema importância visto que promovem diversas reações, desde alongamento e divisão celular, formação de raízes e calos pelas auxinas, e crescimento e desenvolvimento de brotações múltiplas pelas citocininas (PIERIK, 1990; EINSERT, 1991; GEORGE, 1996). Neste aspecto, diversos autores relatam a necessidade de suplementação do meio de cultura com combinações de auxinas e citocininas para garantir a eficiência na micropropagação de diferentes plantas medicinais (RUBIN et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2010; ASMAR et al., 2011; MORAIS et al., 2012; ATTIA et al., 2014).

Na indução de calogênese o uso de auxinas é frequente. George (1996) comenta que o 2,4-D tem efeito no metabolismo do RNA, induzindo a transcrição de RNAs mensageiros capazes de decodificar proteínas para o crescimento e que podem induzir a proliferação celular desordenada, ou seja, formação do calo. Como isso depende de um balanço hormonal intermediário de auxinas e citocininas, inclusive da produção endógena do órgão utilizado como explante, as diferentes respostas exercidas pelas auxinas se devem a diferenças no metabolismo e estabilidade das mesmas, sugerindo a possibilidade de outros tipos de auxinas poderem promover resultados similares àquelas rotineiramente utilizadas (COSTA et al., 2008).

São consideradas dois tipos de embriogênese somática, aquela dita direta, para aqueles



explantes que sofreram poucas divisões celulares antes da indução embriogenética, e a indireta, que seria aquela na qual os explantes passaram por um período de proliferação desorganizada, na forma de calos, antes da indução embriogenética propriamente dita (GUERRA et al., 1999). Ainda conforme Guerra et al. (1999), no desenvolvimento dos calos, a epiderme na porção das nervuras pode se romper de acordo com o aumento no tamanho ou número de células, formação de zonas de abscisão e pode ser facilitado com a ausência de tecidos de sustentação, como ocorre na face adaxial. Já na face abaxial a presença do colênquima pode resistir a este evento.

O uso de auxinas é recomendado em vários estudos para a produção de calos friáveis, principalmente para embriogênese somática e possui grandes vantagens devido às altas taxas de multiplicação e formação de embriões individualizados que se desenvolvem diretamente em plantas (NUNES et al., 1999). Além disto, é utilizada para estudos em fisiologia, genética e bioquímica do desenvolvimento embrionário, em que muitos protocolos utilizam altos níveis de auxinas, principalmente 2,4-D (EBERT et al., 1993; SAGARE et al., 2000; BHARGAVA et al., 2003; FLORES et al., 2007; REIS et al., 2007).

Conforme Gamborg (1982) e George (1996), a textura e morfologia do calo variam de acordo com as concentrações de auxinas e citocininas, onde se produz calos friáveis em meio de alta concentração de auxina e baixa de citocinina e se a relação é inversa, ocorre produção calos de tecido compacto e com células pequenas. Contudo, no presente trabalho, não foram encontrados calos compactos.

## **Conclusão**

A folha demonstrou ser a melhor fonte de explante para calogênese, em diversas concentrações testadas dos reguladores vegetais, e o caule, sem reguladores, para formação de brotos via organogênese direta, sem regulador, pela retomada da atividade meristemática das gemas preexistentes, e embriogênese somática, em folhas, pela desdiferenciação dos tecidos.

As folhas apresentaram as maiores taxas de oxidação e os caules de contaminação. O 2,4-D foi mais eficiente para formação de calos.

## **Referências**

APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. et al. **Estudos morfológicos, anatômicos, histoquímicos e ultra-estruturais da organogênese in vitro do maracujazeiro**. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. (Eds.) *Maracujá: germoplasma e melhoramento genético*. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. p. 387-407.

- ASMAR, S. A. et al. Citocininas na multiplicação in vitro de hortelã-pimenta (*Mentha x piperita* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. especial, p. 533-538, 2011.
- ATAS, L. Atenção à pobreza. **Revista Pesquisa Fapesp**, v. 91, p. 20-23, 2003.
- ATTIA, O. A. et al. Micropropagation of mulberry (*Morus alba* L.) cv. Al-Taify. **International Journal of Bio-Technology and Research**, v. 4, n.2, p. 15-22, 2014.
- BHARGAVA, S. C.; SAXENA, S. N.; SHARMA, R. *In vitro* multiplication of *Phoenix dactylifera* L. **Journal Plant Biochemistry & Biotechnology**, v. 12, n. 1, p. 43-47, 2003.
- COSTA, F. H. S.; LOUREIRO, T. S.; PEREIRA, J. E. S. Influência de auxinas e tipos de explantes na indução de calos friáveis em *Piper hispidinervum* C. DC. **Revista Ciência Agronômica**, v. 39, n. 2, p. 269-274, 2008.
- COSTA, M. G. C. et al. Morphogenic gradients of adventitious bud and shoot regeneration in epicotyl explants of Citrus. **Scientia Horticulturae**, v. 100, n. 1-4, p. 63-74, 2004.
- DEGENHARDT-GOLDBACH, J. I. et al. Calogênese in vitro a partir de folhas de erva mate (*Ilex paraguariensis* St.Hil.) mantidas em casa de vegetação. In: CONGRESSO SUDAMERICANO DE LA YERBA MATE, 5., 2011, Posadas. Actas. Posadas: Instituto Nacional de la Yerba Mate, 2011. p. 61-66. Disponível em: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/895830>. Acessado 23 Out 2015
- EBERT, A.; TAYLOR, F.; BLAKE, J. Changes of 6-benzylaminopurine and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid concentrations in plant tissue culture media in the presence of activated charcoal. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 33, p. 157-162, 1993.
- EINSERT, J. W. Woody plant micropropagation with cytokinins. In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.) **Biotechnology in agriculture and forestry: high-tech and micropropagation I**. Berlin: Springer, 1991. v.17, p.190-201.
- ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural. **Ciência Rural**, v. 35, n. 4, p. 961-965, 2005.
- FLORES, R.; MALDANER, J.; NICOLOSO, F. T. Otimização da micropropagação de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hickenffia tuberosa (Spreng.) Hicken. **Ciência Rural**, v. 36, n. 3, p. 845-851, 2006.
- FLORES, R. et al. Embriogênese Somática e Organogênese Indireta em *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. supl. 2, p. 993-995, 2007.
- FORCHETTI, G.; MASCIARELLI, O.; ALEMANO, S.; ALVAREZ, D.; ABDALA, G. Endophytic bacteria in sunflower (*Helianthus annuus* L.): isolation, characterization, and production of jasmonates and abscisic acid in culture médium. **Applied Microbial and Cell Physiology**, v. 76, n. 5, p. 1145-1152, 2007.
- FREITAS, H. B. **Desenvolvimento e hormônios vegetais**. Editora da Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2009. 68 p.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 2, p. 178-182, 2005.

GAMBORG, O. L. Callus and cell culture. In: WETTER, L.R.; CONSTABEL, F. **Culture methods**. Ottawa, Saskatoon, 1982. p. 1-9.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: in practice**. Reino Unido: Exegetics Limited, Parte 2, 1996. 1361p.

GEORGE, E. E.; HALL, M. A.; KLERK, G. D. **Plant propagation by tissue culture**. Vol I. The Background. 3. ed. Springer, Dordrecht, 2008. 508p.

GEORGE, E. F.; DEBERGH, P. C. Micropropagation: Uses and Methods. In: GEORGE, E. F. Hall, M.A.; Klerk, G.D. (Eds.), **Plant Propagation by Tissue Culture**, Vol.1, The Background. 3.ed. Dordrecht: Springer, 2008. p. 29-64.

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese Somática e Sementes Sintéticas. In: Torres, A.C.; Caldas, L.S.; Buso, J.A. (eds.). **Culturas de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília, Embrapa-CBAB, v. 2, 1999. p. 533-568.

GUNTNER, C. et al. Antioxidant properties of *Solidago chilensis* L. flavonoids. **Acta Horticulturae**, v. 501, p. 159-163, 1999.

HARTMANN, H. T. et al. **Plant propagation: principles and practices** 8<sup>th</sup> ed. Jersey: Prentice-Hall, 2011. 915 p.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: Mcgraw-Hill Book, 1940. 523 p.

KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. Manual básico de métodos em morfologia vegetal. Rio de Janeiro: EDUR, 1997. 198 p.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Instituto Plantarum: Editora Nova Odessa – SP, 2002. 512 p.

LOYOLA-VARGAS, V. M.; VÁZQUEZ-FLOTA, F. **Methods in Molecular Biology**, vol. 318: Plant Cell Culture Protocols, Second Edition. Edited by: © Humana Press Inc., Totowa, NJ. 2006. 393 p.

MACIEL, M. A. M. et al. Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MELO, P. R. B. et al. Germinação de aquênios de *Lychnophora pinaster* em função de estádios de maturação, temperatura e luz. **Científica**, v. 42, n.4, p. 404-410, 2014.

MORAIS, T. P. et al. Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 14, n. 1, p. 110-121, 2012.

MOREIRA-DIAS, J. M. et al. Day length and photon flux density influence the growth regulator effects on morphogenesis in epicotyl segments of Troyer citrange. **Scientia Horticulturae**, v. 87, n. 4, p. 275-290, 2001.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

NOGUEIRA, R. C. et al. Indução de calos em explantes foliares de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Ciência e agrotecnologia**, v. 31, n. 2, p. 366-370, 2007.

NUNES, R. F. M. et al. Embriogênese somática em tamareira. In: QUEIROZ, M. A. de; GOEDERT, C. O.; RAMOS, S. R. R. (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste brasileiro**. Petrolina: Embrapa Semi-Árido; Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999.

OLIVEIRA, L. M. et al. Effects of cytokinins on *in vitro* mineral accumulation and bud development in *Annona glabra* L. **Ciência e agrotecnologia**, v. 34, n. 6, p. 1439-1445, 2010.

PEREIRA, A. M. S. **Cultura de Tecidos de plantas medicinais**. 2009. Disponível em: <http://www.ufmt.br/.../Cultura%20de%20tecidos%20de%20plantas%20medicinais.pdf> Acesso em: 14 dez. 2015.

PIERIK, R. L. M. **Cultivo in vitro de las plantas superiores**. Martins: Nijoff, 1990. 370 p.

PINTO, J. E. B. P.; LAMEIRA, O. A. **Micropropagação e metabólitos secundários in vitro de plantas medicinais**. Lavras: UFLA/FAEPE. 2001. 102 p.:il.

QUISEN, C. R.; ÂNGELO, P. C. S. **Manual de procedimentos do laboratório de cultura de tecidos da Embrapa Amazônia Ocidental**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental – Documentos 61, 2008. 44 p.

REIS, I. N. R. S.; LAMEIRA, O. A.; CORDEIRO, I.M. C. C. Efeito do 2,4-D na Indução de Calos *in vitro* de Paricá (*Schizolobium parahyba* var. *amazonicum* (Huber ex Ducke) Barneby). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. supl. 2, p. 498-500, 2007.

ROCHA, D. I. **Estudos anatômicos e ultraestruturais de sistemas de regeneração in vitro de *Passiflora cincinnata* Masters e *Passiflora edulis* Sims (Passifloraceae)**. 2011. 58 f. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Viçosa.

RODRIGUES, F. R.; ALMEIDA, W. A. B. Calogênese em *Cissus sicyoides* L. a partir de segmentos foliares visando à produção de metabólitos *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 12, n. 3, p. 333-340, 2010.

RUBIN, S. et al. Reguladores de crescimento na multiplicação *in vitro* de *Thymus vulgaris* L. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. supl.2, p. 480-482, 2007.

SAGARE, A. P. et al. Cytokinin-induced somatic embryogenesis and plant regeneration in *Corydalis yanhusuo* (Fumariaceae) - a medicinal plant. **Plant Science**, v. 160, n. 1, p. 139-47, 2000.

SATO, A.Y. et al. Micropropagação de *Celtis* sp: controle da contaminação e oxidação. **Cerne**, v. 7, n. 2, p. 117-123, 2001.

SHMEDA-HIRSCHMANN, G.; JORDAN, M.; GERTH, A.; WILKEN, D. Secondary metabolite content in rhizomes, callus cultures and *in vitro* regenerated plantlets of *Solidago chilensis*. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 60, n. 1-2, p. 5-10, 2005.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. **African Journal os Agricultural Research**, v. 11, n. 39, p. 3733-3740, 2016.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: – da planta ao medicamento**. 6ª edição rev. ampl. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2010. 1104 p.

SOUZA, A. V.; PEREIRA, A. M. S. Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9, n. 4, p. 103-117, 2007.

STEIN, V. C. et al. Efeito do genótipo na propagação *in vitro* de *Plantago* sp. **Revista Verde**, v. 4, n. 2, p. 68-75, 2009.

TREVIZAM, R. et al. Caracterização morfológica de calos de *Eucalyptus urophylla* s. T. Blake 215 sob concentrações de boro e cálcio. **Cerne**, v. 17, n. 2, p. 215-222, 2011.

ZENG, L. et al. High efficiency *in vitro* plant regeneration from epicotyls explants of Ponkan Mandarin (*Citrus reticulata* Blanco). **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 45, p. 559–564, 2009.

**CAPÍTULO 3 – Micropropagação de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt & R.M. Sm. (Zingiberaceae)**

**Micropropagação de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt & R.M. Sm.  
(Zingiberaceae)**

**Resumo:** Para avaliar técnicas de desinfestação e de controle de oxidação em diferentes tipos de explantes, foi feito o estabelecimento *in vitro* de *Alpinia zerumbet* a partir de gemas axilares e segmentos foliares, sob a ação dos reguladores vegetais: ácido naftalenoacético (ANA), benzilaminopurina (BAP), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e cinetina (KIN), isolados e/ou combinados. Para o controle dos microrganismos foi usado o Plant Preservative Mixture (PPM - 2 e 4mL.L<sup>-1</sup>), além de outros métodos de desinfestação e o controle da oxidação foi testado mantendo-se as culturas no escuro, adicionando ácido ascórbico (2%) ou carvão ativado (0,3%) no meio de cultura. Para a multiplicação (subculturas) foram utilizados reguladores vegetais ANA, BAP, 2,4-D e KIN, isolados e/ou combinados. Foi feita pré-aclimatização das mudas, na qual os tubos foram destampados e permaneceram na sala de crescimento por sete dias. Para a aclimatização, as mudas foram transferidas para copos plásticos contendo substrato esterilizado, tampados com garrafas pet e levados para casa de vegetação com sombrite 50%, onde as tampas das garrafas foram desenroscadas aos poucos. Foi analisado o índice de sobrevivência das mudas. Os resultados mostraram que 4mL.L<sup>-1</sup> PPM acrescentado ao meio de cultura MS foi tratamento mais efetivo, controlando 100% dos endofíticos e epifíticos. A oxidação *in vitro* foi reduzida drasticamente quando se utilizou o ácido ascórbico a 2%. Observou-se brotação apenas para explantes derivados de gemas axilares. Não foi observado declínio na taxa de propagação no decorrer dos subcultivos *in vitro*, contudo o crescimento é lento. Houve formação de calos friáveis em pseudocaulis e gemas em maiores quantidades, seguidos de lâminas foliares e rizomas. Após o estabelecimento da cultura *in vitro* não existiram grandes dificuldades para a multiplicação e aclimatização da espécie, porém são necessários mais estudos para acelerar e incrementar o número de mudas produzidas.

**Palavras-chave:** Biofábrica, brotação, fungos endógenos, medicamento fitoterápico, organogênese, planta medicinal.

**Abstract:** To evaluate disinfection and oxidation control techniques in different types of explants, the establish *in vitro* of *Alpinia zerumbet* was carried out from axillary buds and leaf segments, under the action of plant growth regulators: naphthaleneacetic acid (NAA), benzylaminopurine (BAP), 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and kinetin (KIN), isolated and/or combined. For control of the presence of microorganisms were used Plant Preservative Mixture (PPM - 2 and 4mL.L<sup>-1</sup>), and were analyzed the effect of different techniques of disinfection and the control of oxidation were tested with the dark, adding ascorbic acid (2%) and activated carbon (0,3%) in the culture medium. For multiplication (subcultures) were used plant growth regulators NAA, BAP, 2,4-D and KIN, isolated and/or combined. It was made a pre-acclimatization, in which the tubes were uncapped and remained in a growth chamber for seven days. For acclimatization, they were transferred to plastic cups containing substrate sterilized, capped with plastic bottles and taken to a greenhouse with 50% shading, where bottle caps were unscrewed slowly. The survival rates of the seedlings were analyzed. The results showed that 4mL.L<sup>-1</sup> PPM added to the MS medium was the most effective treatment, controlling 100% of endophytic and epiphytic. *In vitro* oxidation was drastically reduced when using ascorbic acid at 2%. There was only sprouting explants derived from axillary buds. There was no decline in the propagation rate during *in vitro* subcultures, however growth is slow. There was formation of friable callus in pseudostems and gems in greater quantities, followed by leaf segments and rhizomes. After the

establishment of *in vitro* culture there were no major difficulties for multiplication and acclimatization of the species, but more studies are needed to accelerate and increase the number of seedlings produced.

**Key words:** Biofactory, sprouting, endogenous fungi, herbal medicine organogenesis, medicinal plant.

## Introdução

*Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt & R.M. Sm. é uma planta herbácea, rizomatosa capaz de atingir 2 a 3 metros de altura, com inflorescência do tipo cacho, branca com amarelo-rósea e fruto na forma de uma cápsula globosa com várias sementes, todavia suas sementes são raramente formadas devido à baixa viabilidade do grão de pólen (apenas 7%) e por isso é propagada vegetativamente através dos rizomas (ALBUQUERQUE e NEVES, 2004; KRIECK et al., 2008; RAKKIMUTHU et al., 2011). Com relação à ausência de frutificação efetiva e por ser uma planta medicinal, em que há necessidade de manter as características genéticas da planta mãe, a propagação assexuada ou clonal é importante, pois além de manter as características da planta matriz e a uniformidade nas mudas, mantém a produção de materiais de alta qualidade (PETRY, 1999; EHLERT et al., 2004; FERRARI et al., 2004; HARTMANN et al., 2011).

Foi com esse propósito que Rakkimuthu et al. (2011) fizeram seu trabalho objetivando estabelecer um protocolo para micropropagação *in vitro* de *Alpinia zerumbet* variegada. Eles utilizaram brotos dos rizomas e inocularam em meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) suplementado com 3% de sacarose e diferentes concentrações de BAP combinados com 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de cinetina, obtendo melhores respostas com 1,5 mg.L<sup>-1</sup> de BAP e 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de cinetina, com regeneração de quase 95%, transferidas com sucesso para campo com solo:vermiculita (1:1). Contudo, foi utilizado cloreto de mercúrio na descontaminação, substância altamente tóxica.

As técnicas de cultura de tecidos, baseadas na totipotencialidade da célula vegetal, podem regenerar plantas a partir de explantes, isolados de qualquer órgão de uma planta, em condições assépticas e meio de cultivo que deve proporcionar à planta os nutrientes necessários ao metabolismo das células e os fatores de crescimento, responsáveis pela diferenciação de brotações e raízes (GEORGE et al., 2008; SCHUCH e PETERS, 1993). Contudo, a presença de microorganismos e a oxidação fenólica podem ser consideradas como os principais problemas para a micropropagação de várias plantas. Procedimentos de desinfestação do explante e assepsia de todos os materiais são essenciais para o desenvolvimento de um bom trabalho, seja a partir de fungicidas sistêmicos ou outros



produtos tais como hipoclorito, solúveis em água e, portanto, de fácil remoção evitando efeitos residuais tóxicos (BARRUETO CID e ZIMMERMANN, 2006).

Existem diversas marcas comerciais de compostos à base de cloro e sanificantes alternativos tais como peróxido de hidrogênio, que é de fácil remoção, pode ser diretamente tóxico ao patógeno e está envolvido com o fortalecimento da parede celular, uma vez que é necessário para a biossíntese de lignina (RESENDE et al., 2003; REIS et al., 2008). Também são utilizados fungicidas adicionados ao meio de cultura. Um deles, o PPM (*Plant Preservative Mixture*), é um composto químico considerado eficaz para reduzir a presença de microrganismos na cultura de explantes de diferentes espécies vegetais (COMPTON e KOCH, 2001; BERUTO et al., 2004; DIGONZELLI et al., 2005; HAMIRAH et al., 2010; MORAIS et al., 2012; PAREDES et al., 2014) contudo, sua ação pode ser inibitória ou não sobre a morfogênese. Foi verificado que apenas uma alta concentração ( $10 \text{ mL.L}^{-1}$ ) inibiu a organogênese em melão (*Cucumis melo* L.) e petunia (*Petunia hybrida* H.), porém, a androgênese não foi afetada em tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), sugerindo que a influência do PPM sobre morfogênese depende da espécie (COMPTON e KOCH, 2001).

A oxidação fenólica ocorre pela liberação de compostos *in vitro*, precursores da síntese de lignina, pelo tecido injuriado por meio das enzimas polifenases, produzindo substâncias tóxicas, escurecendo e inibindo o crescimento dos explantes (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998; ANDRADE et al., 2000; SATO et al., 2001; ERIG e SCHUCH, 2003). Isso pode ser minimizado com o uso de carvão ativo adicionado ao meio de cultura, para adsorção de substâncias, manter o ambiente escuro por um período ou com o uso de substâncias antioxidantes.

Outras substâncias também importantes no meio de cultura são os reguladores vegetais, compostos orgânicos que causam respostas morfogenéticas *in vitro*. Diferenças nas concentrações de auxinas e citocininas são responsáveis pela promoção de diferentes respostas: redução do balanço auxina/citocinina induz formação de gemas, concentrações iguais produzem calos e o incremento de auxina tende a iniciar o crescimento de raízes, contudo provocam a proliferação desordenada de células, formando os calos. (NUNES et al., 1999; MOURA et al., 2001; PINTO e LAMEIRA, 2001). O calo é um aglomerado de células e tecidos formado por várias divisões, possuindo características morfológica, bioquímica e ultraestrutural que podem evidenciar as mudanças que ocorrem nas diferentes fases do crescimento, fornecendo dados importantes relacionados ao processo morfogenético *in vitro* de tecidos vegetais (BARRUETO CID, 1992).

Diversas espécies enraízam na presença de níveis muito baixos ou nulos de auxina,

principalmente no caso de herbáceas, mostrando que o cultivo *in vitro* de plantas é um complexo processo dependente de fatores endógenos e exógenos como genótipo, substrato (com os diferentes meios e seus reguladores), as condições físicas do ambiente onde o cultivo é desenvolvido e ainda os fatores dependentes do tecido utilizado como explante (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1990).

Assim, considerando a necessidade de produção de mudas de *A. zerumbet* para o fornecimento de matéria-prima de qualidade para a produção de fitoterápicos e visto que até o momento há poucos relatos com a espécie na área de propagação *in vitro*, o objetivo do trabalho foi avaliar técnicas de desinfestação e de controle de oxidação em diferentes tipos de explantes para posterior multiplicação, enraizamento e aclimatização.

## **Material e método**

### **Material vegetal**

As plantas foram coletadas em diversos pontos das cidades de Vitória da Conquista e Cruz das Almas – BA e cultivadas nos viveiros de produção de mudas da Universidade Federal da Bahia em Vitória da Conquista e no Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana. O material foi encaminhado para o Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Universidade Estadual de Feira de Santana, localizado na Unidade Experimental Horto Florestal e para o Laboratório de Botânica localizado na Universidade Federal da Bahia, campus de Vitória da Conquista, onde foram realizados os experimentos *in vitro*.

A exsicata foi identificada por Flávia Pereira de Sousa, depositada no acervo do Herbário Mongoyós da Universidade Federal da Bahia, Campus Anísio Teixeira, Instituto Multidisciplinar em Saúde, sob o número de tombo 914.

### **Estabelecimento *in vitro***

Inicialmente foi testada a diferença entre bainha ou pseudocaule e folhas jovens, em fase inicial de expansão ou folhas adultas, completamente expandidas, para avaliar o grau de oxidação. Foi feita lavagem com detergente, desinfestação de álcool 70% por 3 minutos, seguido de hipoclorito de sódio 2,5% por 15 minutos. Foi analisada porcentagem de microrganismos e grau de oxidação.

Também foram selecionados diversos tipos de explantes para analisar as respostas de totipotencialidade, tais como segmento de lâmina foliar, bainha, gema axilar e rizoma. Foram testados diferentes métodos para desinfestação prévia utilizando-se:

Tratamentos	Metodologia utilizada
1	imersão em álcool 70% por 3 minutos, seguido de hipoclorito de sódio (2,5% de cloro ativo) por 15 minutos
2	imersão em peróxido de hidrogênio 3% por 30 minutos
3	imersão em álcool 70% por 3 minutos, seguido de peróxido de hidrogênio 3% por 30 minutos.
4	tratamento 1 com adição de PPM (Plant Preservative Mixture) 2mL.L <sup>-1</sup> ao meio de cultura
5	tratamento 1 com adição de PPM 4mL.L <sup>-1</sup> ao meio de cultura

Após a aplicação dos tratamentos nos explantes, foram feitas três lavagens em água destilada autoclavada, em câmara de fluxo laminar e, em seguida, foram inoculados em tubos de ensaio fechados com película de PVC, contendo 10 ml do meio, previamente esterilizados em autoclave por 15 minutos.

Os diferentes tipos de explantes (com cerca de 1cm<sup>2</sup>) foram colocados em meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), suplementado com 30g.L<sup>-1</sup> de sacarose, acrescido de 7g.L<sup>-1</sup> de ágar (Merck), sem adição de reguladores de crescimento, observado crescimento de brotações. Os frascos foram mantidos em sala de crescimento, sob fotoperíodo de 16 h, irradiância de fóton de 36μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> e temperatura de 25°C ± 2 de temperatura, durante 120 dias.

Para o controle de oxidação foram testadas metodologias:

Tratamentos	Metodologia utilizada
1	Testemunha (sem tratamento antioxidante)
2	Tratamentos mantidos no escuro por 15 dias (SANTOS-SEREJO et al., 2009)
3	Solução de ácido ascórbico 2% por 20 minutos, antes da assepsia
4	Meio de cultura com carvão ativado 0,3%

Foram avaliados: melhor método para desinfestação dos explantes e melhor tipo de explante para o estabelecimento *in vitro* de *Alpinia zerumbet*, por meio da porcentagem de sobrevivência, grau de oxidação e porcentagem de microrganismos.

### **Multiplificação**

Foram utilizados como explantes: lâmina foliar, pseudocaule, gema axilar e rizoma, com cerca de 1cm<sup>2</sup> ou 1cm de comprimento. Estes foram lavados com detergente e desinfestados com álcool 70% por 3 minutos seguido de hipoclorito de sódio 2,5% por 15 minutos, em câmara de fluxo laminar, enxaguados por três vezes em água destilada autoclavada e inoculados em tubos de ensaio fechados com película de PVC, contendo 10ml de meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), suplementado com 30g.L<sup>-1</sup> de sacarose e 7g.L<sup>-1</sup>

<sup>1</sup> de ágar e  $4\text{mL.L}^{-1}$  de PPM. Foram adicionados os reguladores vegetais em diferentes concentrações: ácido naftaleno acético – ANA, nas concentrações de 0,0; 1,34; 2,68 e 5,36  $\mu\text{M}$ , combinados com 6benzilaminopurina (BAP), nas concentrações de 0,0; 4,44; 8,88; 13,32 e 17,76  $\mu\text{M}$ , e 2,4-D, nas concentrações 0,0; 2,26; 4,52 e 9,05  $\mu\text{M}$ , combinadas com cinetina (KIN) nas concentrações de 0,0; 2,32; 4,65; 6,97  $\mu\text{M}$ , previamente esterilizados em autoclave por 15 minutos. O material foi mantido em sala de crescimento, sob fotoperíodo de 16 h, irradiância de fóton de  $36\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  e temperatura de  $25\pm 2^\circ\text{C}$  de temperatura e avaliados a porcentagem de sobrevivência, presença de calos, porcentagem de brotação e formação de raízes, sem necessidade de adição de regulador para enraizamento.

### **Pré-aclimatização**

Após o surgimento das raízes, sem adição de reguladores vegetais, as plantas dos tubos de ensaio passaram por um processo de pré-aclimatização no qual os frascos de cultura foram destampados permanecendo na sala de crescimento durante sete dias, quando as plantas foram removidas.

### **Aclimatização**

Para a aclimatização, 70 plantas foram transferidas para copos plásticos contendo substrato composto por fibra de coco, areia e terra vegetal, esterilizado e devidamente umedecido, tampados com garrafas pet e levados para casa de vegetação com sombrite 50%, onde as tampas das garrafas foram desenroscadas aos poucos durante sete dias para haver trocas gasosas com o ambiente e foram totalmente destampadas após mais sete dias. Foi analisado o índice de sobrevivência das mudas.

### **Delineamento experimental e análises estatísticas**

O delineamento experimental foi Inteiramente Casualizado, em esquema fatorial com 10 repetições, em que cada parcela consistiu de cinco tubos de ensaio, para todas as variáveis consideradas. Para que o modelo de análise de variância tivesse validade, satisfazendo as pressuposições de homogeneidade, independência de erros (resíduo) e erros (resíduos) com distribuição normal, foi feita a análise exploratória dos dados, análise de variância e teste F utilizando-se o programa estatístico Assistat 7.7 beta (SILVA e AZEVEDO, 2009) e as médias comparadas pelo teste de Tukey. Os dados em porcentagens foram transformados em arcsen.

Para os tratamentos antioxidantes utilizados, foi feita a contagem do grau de oxidação atribuindo-se valores de zero a quatro, para ausência de oxidação até oxidação intensa, os

valores foram transformados em  $\sqrt{x+0,5}$  para a análise de variância.

## Resultados e Discussão

### Estabelecimento

Para os tratamentos de desinfestação utilizados (Tabela 1), encontrou-se média de propagação da microbiota para T1 (álcool 70% por 3 min+ hipoclorito de sódio a 2,5% por 15min) que correspondeu a 29,07%, T2 (álcool 70% por 3 min+ peróxido de hidrogênio a 3% por 30min) a 55,38%, T3 (peróxido de hidrogênio a 3% por 30min) a 78,04%, T4 (PPM 2mL.L<sup>-1</sup>) a 49,14% e T5 (PPM 4mL.L<sup>-1</sup>) a 0%, todos estatisticamente diferentes entre si, exceto T4 comparado T2, pelo teste de Tukey a 0,05. Para a análise de proliferação microbiana por tipo de explante, foram obtidos 35,91% para lâmina foliar, 27,38% para bainha, 42,60% para gema e 44,56% para rizoma, sendo lâmina foliar, gema e rizomas estatisticamente semelhantes entre si e diferindo de bainha e lâmina foliar que também se assemelharam estatisticamente, com médias comparadas pelo teste de Tukey a 0,05 (Tabela 1).

Tabela 1 – Percentagem da presença de microrganismos em diferentes tipos de explantes de *Alpinia zerumbet*.

Tipo de explante	Tratamentos de desinfestação (médias % de presença de microrganismos)					
	T1	T2	T3	T4	T5	Médias por explante
Lâmina foliar	25,00ab AB	40,97b A	90,00c B	21,13ab A	0,00a A	35,91 AB
Bainha	17,32a A	49,43b A	72,68b AB	21,13a A	0,00a A	27,38A
Gema	38,66b B	50,00bc A	62,11c A	90,00d C	0,00a A	42,60B
Rizoma	33,69b AB	81,15c B	90,00c B	54,94b B	0,00a A	44,56B
Médias por tratamento	29,07b	55,38c	78,04d	49,14c	0,00a	37,82
CV (%)	42,22					

Letras minúsculas diferentes na mesma linha e letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem significativamente entre si por Tukey a 0,05. Tratamentos T1- imersão em álcool 70% por 3 minutos, seguido de hipoclorito de sódio (2,5% de cloro ativo) por 15 minutos; T2- imersão em peróxido de hidrogênio 3% por 30 minutos; T3- imersão em álcool 70% por 3 minutos, seguido de peróxido de hidrogênio 3% por 30 minutos; T4- tratamento 1 com adição de PPM (Plant Preservative Mixture) 2mL.L<sup>-1</sup> ao meio de cultura; T5- tratamento 1 com adição de PPM 4mL.L<sup>-1</sup> ao meio de cultura.

Para os tratamentos antioxidantes utilizados, foram encontradas médias da ordem de 1,70 para meio sem antioxidante e para explantes colocados no escuro por 15 dias, sem diferença estatística significativa entre si e para carvão ativado 0,3% adicionado ao meio, com 1,69, diferindo significativamente do tratamento com ácido ascórbico a 2%, que apresentou 0,71 e se destacou como melhor tratamento antioxidante para todos os tipos de explantes testados (Tabela 2). Com relação aos explantes, a lâmina foliar é a que menos oxida, apresentando média de 1,12, diferindo estatisticamente dos outros tratamentos. A bainha

apresentou média de 1,39, também diferindo estatisticamente de todos os tratamentos e gema e rizoma apresentando médias iguais a 1,64 (Tabela 2).

Tabela 2 – Valores médios para oxidação em diferentes tipos de explantes de *Alpinia zerumbet*.

Tipo de explante	Tratamentos antioxidantes (médias)				Médias por explante
	Testemunha	Escuro	Ácido ascórbico	Carvão ativado	
Lâmina foliar	1,23b A	1,23b A	0,71a A	1,34b A	1,12A
Bainha	1,55b B	1,55b B	0,71a A	1,75c B	1,39B
Gema	2,04c C	2,04c C	0,71a A	1,77b B	1,64C
Rizoma	1,99b C	1,99b C	0,71a A	1,88b B	1,64C
Médias por tratamento	1,70b	1,70b	0,71a	1,69b	1,45
CV (%)	8,78				

Letras minúsculas diferentes na mesma linha e letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem significativamente entre si por Tukey a 0,05.

Na comparação entre folhas maduras e folhas novas, não houve diferença estatística para crescimento de microrganismos com ambos os tratamentos apresentando 25% de tubos com presença de microbiontes (dados não mostrados). Para oxidação, a folha madura apresentou menor média (1,00) e 1,68 para folhas novas, com diferença significativa por Tukey a 0,05 (dados não mostrados). Barbosa (2010) afirmou que folhas imaturas apresentaram elevado potencial de regeneração de plantas quando utilizou 2,4-D em concentrações de 5 e 8 mg/L nos períodos de 5 e 8 dias no escuro. Contudo, folhas imaturas em plantas com alta produção de compostos fenólicos para produção de lignina, favorecem a oxidação, como visualizado nos resultados deste trabalho, necessitando de métodos antioxidantes eficientes. Explantes juvenis geralmente possuem tecidos mais tenros e poucos lignificados, embora tecidos maduros de folhas e flores sejam igualmente utilizados para o estabelecimento *in vitro* (GUEDES, 2008). Além disso, conforme Pierik (1990), quando a planta envelhece, sua capacidade regenerativa costuma diminuir, por isso tende-se a utilizar material procedente de plantas jovens. Mas de modo geral, quanto maior a determinação de um explante para a formação de um órgão específico, menor é sua competência para originar outro órgão, por via alternativa do desenvolvimento (AMARAL, 2005).

Não foi observada diferença significativa, nem interação, na contaminação ou oxidação mesmo quando se avaliou separadamente a bainha do pseudocaule. Por ser uma monocotiledônea, as bainhas das folhas enrolam entre si formando um pseudocaule de crescimento fototrópico positivo. Para a oxidação também não foi verificada diferença significativa entre os explantes testados, contudo, esperava-se que na utilização do pseudocaule, com as bainhas enroladas entre si, houvesse quantidade superior de tecidos injuriados expostos e isso facilitaria uma secreção de maior quantidade de compostos

fenólicos que necrosariam os explantes e inviabilizariam a micropropagação (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998) e conseqüentemente, exposição de tecidos com microrganismos endossimbiontes. Essa exposição, em um meio de cultivo e o estresse produzido no explante, leva à proliferação desses microrganismos, criando uma relação desarmônica que pode acarretar perda de material.

Microrganismos epifíticos são contaminantes em potencial que podem ser removidos com a desinfestação e surgem logo nos primeiros dias no cultivo *in vitro*, já os microrganismos endofíticos não são eliminados durante a desinfestação e podem eventualmente crescer após longos períodos de cultivo e em resposta a estresses mecânicos ou nutricionais. Quando o fungo de sobrepõe ao crescimento da planta e interfere no cultivo *in vitro*, deve ser feito o controle, pois pode ocasionar prejuízos, reduzir a produção e a qualidade dos materiais micropropagados (PANICKER et al., 2007; ESPOSITO-POLESI, 2010; ESPOSITO-POLESI, 2011).

Os microrganismos endofíticos vêm sendo considerados há muito tempo como fontes de contaminação dentro dos trabalhos de micropropagação, principalmente quando crescem descontroladamente devido ao estresse provocado pelo cultivo, porém, alguns autores consideram sua presença como um fator positivo capaz de auxiliar a planta, uma vez que vive no interior de seus tecidos sem causar sintomas de sua presença, o que vem sendo atestado por análises microscópicas e estudos moleculares (PIRTTILÄ et al., 2008, ALMEIDA et al., 2009, ABREU-TARAZI et al., 2010; ARDANOV et al., 2011; PORRAS-ALFARO e BAYMAN, 2011).

O termo axênico é aquele usado para descrever algo não contaminado ou que está livre de qualquer organismo vivo, onde as condições laboratoriais são completamente assépticas e tem sido difundido como um ideal a ser atingido pela cultura de tecidos vegetais, por isso se buscam métodos que eliminem todo e qualquer microrganismo que possa crescer ao longo do tempo de cultivo no meio utilizado (ESPOSITO-POLESI, 2010). Contudo, muitos trabalhos mostram que mesmo em plantas que são consideradas livres de microrganismos, sejam potenciais patógenos ou não, e que não é visualizado nenhum tipo de sintoma, existe uma comunidade endofítica presente. Ainda alegam que esses microrganismos, na sua grande maioria, desempenha papel fundamental no estabelecimento, desenvolvimento e aclimatização das culturas, sendo, portanto, microrganismos benéficos que devem ser conservados no cultivo *in vitro*, pois favorecem o ajuste osmótico, a produção de fitormônios e absorção de nutrientes (BANDARA et al., 2006, FIGUEIREDO et al., 2008; PIRTTILÄ et al., 2008, ALMEIDA et al., 2009, DIAS et al., 2009; ABREU-TARAZI et al., 2010;

ESPOSITO-POLESI, 2011; PORRAS-ALFARO e BAYMAN, 2011; KHAN et al., 2013; KUSARI et al., 2013; HUBBARD et al., 2014). Esses microrganismos podem não se manifestar de forma visível e nem crescem no meio de cultura, sendo observados somente em análises microscópicas das plantas micropropagadas, contradizendo, portanto, a suposição de que estas plantas são axênicas (BARROW et al., 2004; ABREU-TARAZI et al., 2010).

### **Multiplicação**

Para os tratamentos com ANA e BAP, não houve formação de calos ou brotação em explantes derivados de lâmina foliar, pseudocaule e rizoma (dados não apresentados). Apenas as gemas deram resultado positivo para brotação, com 80% no tratamento 1 (testemunha) e 60% no tratamento 14 (2,68 $\mu$ M de ANA combinado com 13,32 $\mu$ M de BAP) e apenas um único calo foi formado no tratamento 10 (1,34 $\mu$ M de ANA combinado com 17,76 $\mu$ M de BAP) não havendo portanto, diferença significativa com estes reguladores.

Para analisar a resposta de lâmina foliar, pseudocaule, rizoma e gemas como explantes para indução de calos ou brotos, foram utilizadas diferentes concentrações de 2,4D e cinetina (KIN). Verificou-se que 94% das gemas brotaram quando não havia reguladores no meio, e nenhuma brotação utilizando reguladores vegetais, com diferença significativa de 0,05 pelo teste de Tukey. Houve maior quantidade de calos formados por pseudocaule e gema, com diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 3). Apesar disso, há necessidade de maiores estudos entre tipos de reguladores vegetais e concentrações utilizadas para melhorar a efetividade da cultura de tecidos vegetais para a espécie em questão.



Tabela 3 – Porcentagem de brotos e calos em explantes provenientes de lâmina foliar, pseudocaule, rizoma e gema de *Alpinia zerumbet*, em função de diferentes concentrações de KIN e 2,4D.

Reguladores vegetais		Calos (%)			
KIN( $\mu$ M)	2,4D( $\mu$ M)	Lâmina foliar	Pseudocaule	Rizoma	Gema
0,0	0,0	0	0	0	0
	2,26	0	0	0	0
	4,52	0	0	0	0
	9,05	0	12ns	26ns	0
2,32	0,0	26ns	0	0	0
	2,26	0	12ns	26ns	0
	4,52	0	0	0	0
	9,05	0	0	0	0
4,65	0,0	26ns	0	0	0
	2,26	0	0	26ns	0
	4,52	0	80*	0	60*
	9,05	26ns	60*	0	0
6,97	0,0	0	0	0	0
	2,26	0	0	0	0
	4,52	26ns	26ns	0	80*
	9,05	0	12ns	0	0

\* Diferença significativa para todos os resultados ao nível de 0,05 pelo teste de Tukey; ns- diferença não significativa.

### Enraizamento

Houve produção de raízes em 100% das plântulas, sem a necessidade de indução hormonal. Conforme Cline e Neely (1983) as células vivas na superfície da lesão tecidual são expostas e ocorre uma resposta de cicatrização do ferimento. Esta camada auxilia na proteção da superfície do corte contra perda de água e entrada de patógenos, além disso, auxiliar a originar as primeiras raízes.

Esses resultados diferem daqueles reportados para outras espécies da família Zingiberaceae entre elas a *A. purpurata*, que necessita de indução hormonal para formação de raízes, como citado nos trabalhos de Balachandra et al. (1990) com *Curcuma longa* e *Zingiber officinale*; de Agretious et al. (1996) com *Alpinia calcarata*; de Borthakur et al. (1999) com *Alpinia galanga* e Prathanturarug et al. (2003, 2005) com *Curcuma longa* L. Para Souza e Pereira (2007) o desenvolvimento do sistema radicular a partir da formação de raízes adventícias em plantas micropropagadas é um processo de grande complexidade envolvendo fatores endógenos e exógenos que ainda não estão completamente elucidados. Para eles, os principais fatores relacionados ao enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*, encontram-se os níveis de auxina endógena, as condições inerentes à planta matriz como juvenilidade e genótipo, dentre outros, o meio de cultura, a presença de reguladores de crescimento e

carboidratos, a nutrição mineral, a presença de poliaminas e substâncias como carvão ativado e compostos fenólicos, as condições ambientais de crescimento das plântulas, dentre outros.

### **Aclimatização**

Das brotações, 70 plantas foram pré-aclimatizadas com sucesso e todas foram transferidas para o processo de aclimatização, sendo as raízes lavadas e plantadas em copos plásticos contendo substrato composto por fibra de coco, areia e terra vegetal, esterilizado e devidamente umedecido, tampados com garrafas pet. Foram mantidas em casa de vegetação com sombrite 50%, onde as tampas das garrafas foram desenroscadas aos poucos durante sete dias para haver trocas gasosas com o ambiente e foram totalmente destampadas após mais sete dias. Houve rega à medida que o substrato desidratava e foi analisado o índice de sobrevivência das mudas, resultando em 74,3% de sobrevivência ao processo de aclimatização, produzindo 52 mudas saudáveis e vigorosas.

Segundo Yue e Reed (1993), as plantas propagadas *in vitro* também têm potencialidade para desenvolver aparato fotossintético funcional, todavia novas estruturas devem ser formadas durante a fase de enraizamento e para tanto fatores como concentração de sacarose e aeração de recipientes devem ser manipulados. Para algumas espécies a alta frequência de regeneração de brotos a partir de tecidos não meristemáticos é facilmente obtida em meio suplementado com uma única citocinina, a exemplo de *Citrus* spp. (MOURA et al., 2001; MOREIRA-DIAS et al. 2001; COSTA et al., 2004; ZENG et al., 2009). Essa maior capacidade morfogenética de alguns tecidos pode ser causada pela variabilidade genética de cada cultura (GEORGE e DEBERGH, 2008).

### **Conclusão**

Com base no que foi exposto é possível verificar que *Alpinia zerumbet* possui microrganismos endógenos de difícil controle e desinfestação, contudo foi possível eliminar 100% com o uso de PMM 4mL.L<sup>-1</sup> adicionados ao meio de cultura, sendo portanto, a metodologia mais eficiente até o momento para o estabelecimento da espécie. Com relação à oxidação, o uso de ácido ascórbico a 2% foi o mais eficiente para o controle da liberação de compostos fenólicos.

Para brotação de explantes, apenas as gemas foram viáveis e as concentrações dos reguladores vegetais não foram efetivas para incrementar altas taxas de brotações. Para formação de calos, os melhores explantes foram pseudocaule e gema, nas concentrações de 4,52 e 9,05µM de 2,4D combinados com 4,65 e 6,97µM de cinetina. Houve produção de

raízes em 100% das plântulas sem necessidade de regulador e 74,3% sobreviveu ao processo de aclimatização, produzindo mudas saudáveis e vigorosas, contudo há necessidade de mais estudos para elucidar os acontecimentos.

### Referências bibliográficas

- ABREU-TARAZI, M. F. et al. Endophytic bacteria in long-term *in vitro* cultivated “axenic” pineapple microplants revealed by PCR–DGGE. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 555-560, 2010.
- AGRETIOS, T. K. et al. *In vitro* clonal multiplication of *Alpinia calcarata* Roscoe. **Phytomorphology**, v. 46, p. 133-38, 1996.
- ALBUQUERQUE, E. S. B; NEVES, L. J. Anatomia foliar de *Alpinia zerumbet* (Pers.) Burt & Smith (Zingiberaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 18, n. 1, p. 109-121, 2004.
- ALMEIDA, C. V. et al. Bacteriosomes in axenic plants: endophytes as stable endosymbionts. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 25, n. 10, p. 1757-1764, 2009.
- AMARAL, L. **Conservação e propagação *in vitro* de três cultivares híbridas de amarílis**. 2005. 119 p. Dissertação (Mestrado Melhoramento Genético Vegetal) - Instituto Agronômico de Campinas, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Campinas.
- ANDRADE, M. W. et al. Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 24, n. 1, p. 174-180, 2000.
- ARDANOV, P. et al. Endophytic bacteria enhancing growth and disease resistance of potato (*Solanum tuberosum* L.). **Biological Control**, v. 56, n. 1, p. 43-49, 2011.
- BALACHANDRA, S. M. et al. *In vitro* clonal multiplication of Turmeric (*Curcuma* spp.) and Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). **Plant Cell Reports**, v. 8, n. 9, p. 521-24, 1990.
- BANDARA, W. M. M. S. et al. Interactions among endophytic bacteria and fungi: effects and potentials. **Journal of Biosciences**, v. 31, n. 5, p. 645–650, 2006.
- BARBOSA, A. L. **Cultura de tecidos e regeneração de plantas transgênicas a partir de calos embriogênicos e de folhas imaturas de cana-de-açúcar**. 2010. 64 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- BARROW, J. R. et al. Fungal Endophytes Intrinsically Associated with Micropropagated Plants Regenerated from Native *Bouteloua eriopoda* Torr. and *Atriplex canescens* (Pursh) Nutt.. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 40, n. 6, p. 608–612, 2004.
- BARRUETO CID, L. P. B. A cultura de células vegetais em meio líquido. **ABCTP Notícias**, v. 18, p. 2-7, 1992.
- BARRUETO CID, L. P.; ZIMMERMANN, M. J. **A contaminação *in vitro* de plantas**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006. 20 p.

BERUTO, M. et al. Micropropagation of tree peony (*Paeonia suffruticosa*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 79, n. 2, p. 249-255, 2004.

BORTHAKUR, M. et al. A protocol for micropropagation of *Alpinia galanga*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 55, n. 3, p. 231-33, 1999.

CLINE, M. N.; NEELY, D. The histology and histochemistry of the wound healing process in geranium cuttings. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 108, p. 452-496, 1983.

COMPTON, M. E.; KOCH, J. M. Influence of plant preservative mixture (PPM) on adventitious organogenesis in melon, petunia, and tobacco. **In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant**, v. 37, n. 2, p. 259-261, 2001.

COSTA, M. G. C. et al. Morphogenic gradients of adventitious bud and shoot regeneration in epicotyl explants of *Citrus*. **Scientia Horticulturae**, v. 100, n. 1-4, p. 63-74, 2004.

DIAS, A. C. F. et al. Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 2, p. 189-195, 2009.

DIGONZELLI, P. et al. Uso de PPM (Plant Preservative Mixture) para controlar contaminantes bacterianos en la multiplicación *in vitro* de caña de azúcar. **Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia**, v. 22, n. 1, p. 22-32, 2005.

EHLERT, P.A.D; LUIZ, J.M.Q; INNECCO, R. Propagação vegetativa da alfavaca – cravo utilizando diferentes tipos de estacas e substratos. **Horticultura Brasileira**, v. 22, n. 1, p. 10-13, 2004.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Tipo de explante e controle da contaminação e oxidação no estabelecimento *in vitro* de plantas de macieira (*Malus domestica* Borkh.) cvs. Galaxy, Maxigala e Mastergala. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 9, n. 3, p. 221-227, 2003.

ESPOSITO-POLESI, N. P. **Investigação da microbiota endofítica onipresente em microplantas “axênicas”**. 2010. 120 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

ESPOSITO-POLESI, N. P. Microorganismos endofíticos e a cultura de tecidos vegetais: quebrando paradigmas. **Revista Brasileira de Biociências**. v. 9, n. 4, p. 533-541, 2011.

FERRARI, M.P.; GROSSI, F.; WENDLING, I. **Propagação vegetativa de espécies florestais**. Colombo – PR; Embrapa Florestas, Documentos, 94, 2004. 22 p.

FIGUEIREDO, M. V. B. et al. Plant growth-promoting rhizobacteria for improving nodulation and nitrogen fixation in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 7, p. 1187-1193, 2008.

GEORGE, E. E. et al. **Plant propagation by tissue culture**. Vol I. The Background. 3. ed.

Springer, Dordrecht, 2008. 508 p.

GEORGE, E. F.; DEBERGH, P. C. Micropropagation: Uses and Methods. In: GEORGE, E. F. HALL, M. A.; KLERK, G. D. (Eds.), **Plant Propagation by Tissue Culture**, Vol.1, The Background. 3.ed. Dordrecht: Springer, 2008. p. 29-64.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPB, 1998. p. 183-260.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (eds). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: Embrapa/CNPB, 1990. p. 99-169.

GUEDES, R. da S. **Embriogênese somática e regeneração de plantas de dendezeiro**. 2008. 126 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Federal do Acre, Rio Branco.

HAMIRAH, M. N. et al. Micropropagation of red ginger (*Zingiber montanum* Koenig), a medicinal plant. **Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology**, v. 18, n. 1, p. 127-130, 2010.

HARTMANN, H. T. et al. **Plant propagation: principles and practices**. 8. ed. New Jersey: Prentice Hall, 2011. 915 p.

HUBBARD, M. et al. Fungal endophytes enhance wheat heat and drought tolerance in terms of grain yield and second-generation seed viability. **Journal of Applied Microbiology**, v. 116, n. 1, p. 109–122, 2014.

KHAN, A. L. et al. Endophytic fungi: resource for gibberellins and crop abiotic stress resistance. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 35, n. 1, p. 62-74, 2013.

KRIECK, C. et al. Biologia reprodutiva de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L.Burtt & R.M.Sm. (Zingiberaceae) em Florianópolis, Santa Catarina. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 10, n. 2, p. 103-110, 2008.

KUSARI, P. et al. Endophytic fungi harbored in *Cannabis sativa* L.: diversity and potential as biocontrol agents against host plant-specific phytopathogens. **Fungal Diversity**, v. 60, n. 1, p. 137–151, 2013.

MORAIS, T. P. et al. Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 14, n. 1, p. 110-121, 2012.

MOREIRA-DIAS, J. M. et al. Day length and photon flux density influence the growth regulator effects on morphogenesis in epicotyl segments of Troyer citrange. **Scientia Horticulturae**, v. 87, n. 4, p. 275-290, 2001.

MOURA, T. L. et al. Organogênese *in vitro* de citrus em função de concentrações de BAP e seccionamento do explante. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, n. 2, p. 240-245, 2001.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NUNES, J. C. O. et al. Micropropagação de porta-enxerto “Marubakaida” (*Malusprunifolia*) a partir da cultura de meristemas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 21, n. 2, p. 191-195, 1999.

PANICKER, B. et al. Influence of cytokinin levels on *in vitro* propagation of shy suckering chrysanthemum “Arka Swarna” and activation of endophytic bacteria. **In Vitro Cellular & Developmental Biology — Plant**, v. 43, n. 6, p. 614–622, 2007.

PAREDES, K. et al. *In vitro* bulbing for the propagation of *Traubia modesta* (Amaryllidaceae), a threatened plant endemic to Chile. **Ciencia e Investigación Agraria**, v. 41, n. 2, p. 207-214, 2014.

PEREIRA, J. E. S. et al. Influência do número de gemas, presença ou ausência de folhas e posição do explante na multiplicação *in vitro* da batata. **Horticultura Brasileira**, v. 23, n. 1, p. 86-89, 2005.

PETRY, C. **Plantas ornamentais: aspectos para a produção**. Passo Fundo: Ediupuf, 1999. 155 p.

PIERIK, R. L. M. **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores**. Martins: Nijoff publishers, 1990. 326 p.

PINTO, J. E. B. P.; LAMEIRA, O. A. **Micropropagação e metabólitos secundários *in vitro* de plantas medicinais**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 102 p.

PIRTTILÄ, A. M. et al. Role of origin and endophyte infection in browning of bud-derived tissue cultures of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 95, n. 1, p. 47-55, 2008.

PORRAS-ALFARO, A.; BAYMAN, P. Hidden fungi, emergent properties: endophytes and microbiomes. **Annual Review of Phytopathology**, v. 49, n. 1, p. 291–315, 2011.

PRATHANTURARUG, S. et al. Rapid micropropagation of *Curcuma longa* L., using bud explants pre-cultured in Thidiazuron supplemented liquid medium. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 80, n. 3, p. 347-351, 2005.

PRATHANTURARUG, S. et al. High - frequency shoot multiplication in *Curcuma longa* L. using thidiazuron. **Plant Cell Reports**, v. 21, p. 1054-1059, 2003.

RAKKIMUTHU, R. et al. *In vitro* micropropagation of *Alpinia zerumbet* Variegata, an important medicinal plant, through rhizome bud explants. **Research in Biotechnology**, v. 2, n. 1, p. 07-10, 2011.

REIS, K. C. et al. Efeito de diferentes sanificantes sobre a qualidade de Morango cv. Oso Grande. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 1, p. 196-202, 2008.

RESENDE, M. L. V. et al. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 2, p. 123-130, 2003.

SANTOS-SEREJO, J. A. et al. Micropropagação da bananeira. In: JUGHANS, T. G.; SOUZA, A. S. (Ed.). **Aspectos práticos da micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2009, p. 237-255.

SATO, A. Y. et al. Micropropagação de *Celtis* sp.: controle da contaminação e oxidação. **Cerne**, v. 7, n. 2, p. 117-123, 2001.

SCHUCH, M. W.; PETERS, J. A. Multiplicação *in vitro* de brotações de macieira cultivares Marubakaido (*Malus prunifolia* Willd Borkh) e Megumi (*Malus domestica* Borkh). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 28, n. 4, p. 433-437, 1993.

SILVA, F. de A. S. E.; AZEVEDO, C. A. V. de. Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7, **Anais...**Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.

SOUZA, A. V.; PEREIRA, A. M. S. Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9, n. 4, p. 103-117, 2007.

YUE, X.; REED, B. M. Improved shoot multiplication of mature hazelnut (*Corylus avellana* L.) *in vitro* using glucose as a carbon source. **Plant Cell Reports**, v. 12, n. 5, p. 256-259, 1993.

ZENG, L. et al. High efficiency *in vitro* plant regeneration from epicotyls explants of Ponkan Mandarin (*Citrus reticulata* Blanco). **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 45, p. 559-564, 2009.

## CONCLUSÃO GERAL

### *Solidago chilensis*

Todas as etapas de estabelecimento *in vitro*, subcultivos e aclimatização da espécie foram feitos com sucesso.

As folhas de arnica apresentaram as maiores taxas de oxidação e os caules de contaminação.

O caule mediano foi a melhor fonte de explante para formação de brotos via organogênese direta, sem uso de reguladores.

Para o enraizamento não é necessário regulador.

O uso de tampa de algodão permite trocas gasosas com o meio e facilita o processo de aclimatização.

O 2,4-D foi mais eficiente para formação de calos.

A folha demonstrou ser a melhor fonte de explante para formação de calos, em diversas concentrações testadas dos reguladores vegetais.

As análises histológicas mostraram embriogênese somática em folhas, pela dediferenciação dos tecidos, em tratamentos contendo diferentes concentrações de 2,4-D de KIN.

### *Alpinia zerumbet*

O estabelecimento *in vitro* foi possível com o uso de PMM 4mL.L<sup>-1</sup> adicionados ao meio de cultura, para eliminar 100% dos patógenos.

O uso de ácido ascórbico a 2% foi o mais eficiente para o controle da oxidação.

Apenas gemas foram viáveis para brotação direta e as concentrações dos reguladores vegetais não foram efetivas para incrementar as taxas.

Para formação de calos, os melhores explantes foram pseudocaulé e gema, nas concentrações de 4,52 e 9,05µM de 2,4D combinados com 4,65 e 6,97µM de cinetina.

Houve produção de raízes em 100% das plantas sem necessidade de regulador.

74,3% das plantas sobreviveram ao processo de aclimatização.