

**PROPAGAÇÃO IN VITRO E ASPECTOS  
ANATÔMICOS DE ARNICA (*Lychnophora  
pinaster*) MART.**

**ANA VALÉRIA DE SOUZA**

**2003**

BIBLIOTECA CENTRAL - ITDA

54969  
MFN 046943

DESCARTADO

*mdibein*  
ASSINATURA

Data 30, 08, 17

ANA VALÉRIA DE SOUZA

BIBLIOTECA UNIVERSITÁRIA  
UFLA

PROPAGAÇÃO *IN VITRO* E ASPECTOS  
ANATÔMICOS DE ARNICA (*Lychnophora pinaster*)  
MART.

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Fitotecnia, para obtenção do título de "Mestre".

Orientador

Prof. PhD. José Eduardo Brasil Pereira Pinto

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL



**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA**

Souza, Ana Valéria

Propagação *in vitro* e aspectos anatômicos de arnica (*Lychnophora  
pinaster*) MART. / Ana Valéria Souza. -- Lavras : UFLA, 2003.

126 p. : il.

Orientador: José Eduardo Brasil Pereira Pinto.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Arnica. 2. Planta medicinal. 3. Micropropagação. 4. Antomia. 5.  
Asteraceae. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-633.88355

-583.55

ANA VALÉRIA DE SOUZA

**PROPAGAÇÃO *IN VITRO* E ASPECTOS  
ANATÔMICOS DE ARNICA (*Lychnophora pinaster*)  
MART.**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Lavras,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Agronomia, área de concentração  
Fitotecnia, para a obtenção do título  
de "Mestre".

APROVADA em 07 de fevereiro de 2003.

Prof. Dr. Evaristo Mauro de Castro

UFLA

Prof. Dr. Ricardo Motta Miranda

UFRRJ

  
Prof. PhD. José Eduardo Brasil Pereira Pinto

UFLA

(Orientador)

LAVRAS

MINAS GERAIS - BRASIL

À minha irmã Clédna.

por todo amor e incentivo;

aos meus sobrinhos Alessandra, Alécio e André;

e ao meu cunhado Cláudio que sempre me apoiaram,

**OFEREÇO**

Aos meus pais José Vitor e Silvana,

pelo exemplo de vida, por todo amor e dedicação sempre,

**DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

**À Deus pela minha vida.**

**Aos meus pais pelos valiosos ensinamentos, eterno amor, carinho, apoio e por toda a confiança, obrigada.**

**À minha irmã, cunhado e sobrinhos por sempre terem me incentivado profissionalmente.**

**Ao orientador e amigo José Eduardo Brasil Pereira Pinto pela confiança, amizade, apoio, incentivo e agradável convívio, mas acima de tudo por ter me ensinado a crescer como ser humano. Obrigada por tudo.**

**Ao meu amor Alexandre por toda felicidade, companheirismo e apoio.**

**À prof. e amiga Suzan Kelly Vilela Bertolluci pela amizade e grande ajuda sempre.**

**Ao amigo e laboratorista Evaldo Arantes de Souza pela amizade, constante auxílio e agradável convívio.**

**Aos amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas Mediciniais, Ricardo, Érika, Rita, Regina, Nilmar, Juliana e em especial ao Fabiano, pela amizade e grande auxílio.**

**Aos amigos Luciano Donizete e Sheila Isabel pela amizade e apoio.**

**Ao prof. Evaristo Mauro de Castro, pelo apoio científico, valiosas sugestões e participação na Banca examinadora.**

Ao prof. Ricardo Motta Miranda pelas valiosas sugestões e participação na Banca examinadora.

Aos alunos de Iniciação Científica do Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais Cristina, Diego, Jorge, Renak e Gilvaine.

Aos alunos de Iniciação Científica do Laboratório de Anatomia Vegetal Carlos Vinicius e Nicolau.

Ao Luiz e Sr. Geraldo, funcionários do Horto de Plantas Medicinais.

Ao Manoel, técnico do Laboratório de Microbiologia do Solo, pela atenção e auxílio na realização de parte dos trabalhos.

Aos amigos de pós-graduação, pela amizade e agradável convívio.

Aos professores que contribuíram para meu aprendizado.

À Universidade Federal de Lavras, pela grandiosa oportunidade de qualificar-me.

À CAPES, pela bolsa e auxílios financeiros concedidos durante o mestrado.

Enfim, à todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada.

***“Tudo posso naquele que me fortalece.”***  
(Fil.4:13)

# SUMÁRIO

	Página
<b>LISTA DE SÍMBOLOS</b> .....	i
<b>RESUMO</b> .....	ii
<b>ABSTRACT</b> .....	iii
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	1
1. Introdução Geral .....	1
2. Referencial teórico .....	5
2.1 O cerrado .....	5
2.2 O Campo Rupestre .....	9
2.3 Emprego e importância do gênero <i>Lychnophora</i> .....	10
2.4 Aspectos taxonômicos e descrição botânica da espécie em estudo .....	14
2.5 Cultura de tecidos .....	20
2.6 Micropropagação .....	21
2.7 Enraizamento de plantas lenhosas .....	24
2.8 Meio de cultura e reguladores de crescimento na manipulação <i>in vitro</i> de plantas medicinais .....	27
2.9 Anatomia de plantas medicinais .....	40
3. Referências bibliográficas .....	43
<b>CAPÍTULO 2. Micropropagação de <i>Lychnophora pinaster</i> MART.</b> .....	56
Resumo .....	56
Abstract .....	57
1. Introdução .....	58
2. Material e Métodos .....	61
2.1 Localização do experimento .....	61
2.2 Estabelecimento da cultura <i>in vitro</i> .....	61
2.2.1 Procedência das sementes .....	61
2.2.2 Desinfestação das sementes .....	62
2.2.3 Efeito do meio de cultura na germinação de embriões de <i>Lychnophora pinaster</i> (1) .....	62
2.2.4 Efeito do meio de cultura na germinação dos embriões de <i>Lychnophora pinaster</i> (2) .....	63
2.2.5 Efeito das citocininas BAP e TDZ na indução de múltiplas brotações em segmentos nodais de <i>Lychnophora pinaster</i> .....	63
2.2.6 Efeito do tempo de permanência em GA <sub>3</sub> no alongamento de partes aéreas das brotações de <i>Lychnophora pinaster</i> .....	64
2.2.7 Efeito do tempo de permanência nas auxinas ANA e AIB sobre o enraizamento de brotações de <i>Lychnophora pinaster</i> .....	65

2.2.8 Efeito do tipo de substrato na aclimatização de plântulas de <i>Lychnophora pinaster</i> .....	66
3. Resultados e Discussão .....	67
3.1 Desinfestação das sementes e germinação de embriões de arnica <i>in vitro</i> .....	67
3.2 Efeito do meio de cultura na germinação dos embriões de <i>Lychnophora pinaster</i> .....	73
3.3 Efeito das citocininas BAP e TDZ na indução de múltiplas brotações em segmentos nodais de <i>Lychnophora pinaster</i> .....	80
3.4 Efeito do tempo de permanência em GA <sub>3</sub> no alongamento de partes aéreas das brotações de <i>Lychnophora pinaster</i> .....	87
3.5 Efeito do tempo de permanência nas auxinas ANA e AIB sobre o enraizamento de brotações de <i>Lychnophora pinaster</i> .....	92
3.6 Efeito do tipo de substrato na aclimatização de plântulas de <i>Lychnophora pinaster</i> .....	102
4 Conclusões .....	108
5 Referências Bibliográficas .....	109
<b>CAPÍTULO 3 Aspectos anatômicos comparativos em diferentes ambientes em folhas de <i>Lychnophora pinaster</i> MART.</b> .....	112
Resumo .....	112
Abstract .....	113
1 Introdução .....	114
2 Material e Métodos .....	116
3 Resultados e Discussão .....	118
4 Conclusões .....	125
5 Referências Bibliográficas .....	126

## LISTA DE SÍMBOLOS

AIA = ácido indol acético

AIB = ácido indol butírico

ANA = ácido naftaleno acético

BAP = 6-benzilaminopurina

CIN (KIN) = cinetina

2,4-D = ácido 2,4-diclorofenoxiacético

2iP = N-isopentenilaminopurina

GA3 = ácido giberélico

MS = Murashige & Skoog (1962)

pH = potencial hidrogeniônico

SH = Schenk & Hildebrandt (1972)

TDZ = thidiazuron

WPM = Wood Plant Medium (Lloyd & Mc Cown, 1981)

## RESUMO

SOUZA, Ana Valéria de. Propagação *in vitro* e aspectos anatômicos de (*Lychnophora pinaster*) MART.. LAVRAS: UFLA, 2003. 127p. (Dissertação - Mestre)\*

O emprego de plantas na cura de doenças remonta ao início da civilização. No entanto, o quadro atual não é muito diferente de nossos antepassados, pois o consumo de fitoterápicos pela população é cada vez mais significativo. Inúmeras plantas empregadas para tal fim vêm sendo cada vez mais estudadas, no intuito de assegurar sua sobrevivência no ecossistema, já que muitas delas correm risco de extinção. A espécie *Lychnophora pinaster* é uma planta medicinal do cerrado brasileiro conhecida popularmente como arnica, muito utilizada externamente pela população na forma de extrato alcoólico como anti-inflamatório, anestésico e cicatrizante, em contusões, machucados e hematomas e se encontra na categoria das plantas vulneráveis à extinção devido a sua grande dificuldade de propagação. Como a técnica da micropropagação dentro da cultura de tecidos permite solucionar problemas dessa natureza, o objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo para a propagação *in vitro* da arnica e caracterizar alguns aspectos de anatomia foliar em diferentes ambientes de cultivo. O melhor meio para germinação dos embriões de arnica *in vitro* e crescimento da plântulas foi o MS/4 sólido com 7,5 g de açúcar (padrão). Para a indução de múltiplas brotações, melhores resultados foram obtidos quando o meio padrão foi suplementado com 0,62 mg.L<sup>-1</sup> de BAP, aos 45 dias após inoculação. Melhor alongamento das brotações antes do enraizamento ocorreu quando essas foram deixadas na presença de 3 mg.L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> por 19 dias. O enraizamento foi alcançado com sucesso quando as brotações permaneceram na presença de 2,00 mg.L<sup>-1</sup> de ANA durante 15 dias em sala de crescimento. Quando as plântulas enraizadas foram aclimatizadas em casa de vegetação, houve 100% de sobrevivência no solo do local de ocorrência da espécie e 0%, quando se utilizou o plantmax®. Os estudos anatômicos comprovaram a eficiência da técnica da micropropagação no tocante às características foliares essenciais à sua sobrevivência em condições de campo. Já nas plântulas mantidas *in vitro*, como também nas aclimatizadas, foi possível observar a diferenciação de todos os tecidos internos, além de caracteres xeromorfos comuns a espécies xerófitas, como o tipo de tricomas.

---

\* Comitê Orientador: José Eduardo Brasil Pereira Pinto - UFLA (Orientador), Evaristo Mauro de Castro - UFLA.

## ABSTRACT

Souza, Ana Valéria de. *In vitro* propagation and anatomical aspects of (*Lychnophora pinaster*) MART.. LAVRAS: UFLA, 2003. 127p. (Dissertation - Master)

The use of plants in the cure of diseases come from the beginning of civilization. However, the current frame is not very different from our ancestry, because the use of fitoterapics are more and more significant by the population. Some plants used for this have been studied for its survival in the ecosystems. The species *Lychnophora pinaster*, is a medicinal plant from Brazilian's cerrado, well-known popularly as "arnica", used externally by population in the form of alcoholic extract as antiinflammatory, anesthetic and cicatrizant in contusions and bruises, it is in the category of endangered plants, due difficulty of propagation. As the technique of micropropagation inside the tissue culture permit to solve this problem, the objective of this work was to establish a protocol for the propagation *in vitro* of arnica and to characterize some aspects of the leaves anatomy in different environment. The best medium for germination of the embryos of the arnica *in vitro* and growth of the plantlets was a MS/4 solid with 7,5 g sugar (standart). For induction of the multiple shoots, the best results was obtained when medium standart was supplemented with 0,62 mg.L<sup>-1</sup> of BAP after 45 days inoculation. The best length of the shoots of the arnica before rooting occurred when this standed in 3 mg.L<sup>-1</sup> of GA<sub>3</sub>, for 19 days. The rooting was obtained when the shoots standed in 2,00 mg.L<sup>-1</sup> of NAA for 15 days in growth room. When plantlets rooted were acclimatized in green house, occurred 100% of survival in soil from occurrence local of the species and 0% in plantmax<sup>®</sup>. Anatomical studies proved the efficiency of micropropagation technique for characteristics leaves essential on field survival. In the plantlets *in vitro* and acclimatized were possible to observe the differentiation of the tissue inside and characters xeromorfs commonness in the xerophyts species, as tricomcs typc.

---

\* Guidance committee: José Eduardo Brasil Pereira Pinto (Orientador), Evaristo Mauro de Castro – UFLA.

# CAPÍTULO 1

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

O emprego de plantas na cura de doenças é uma realidade presente desde o início da civilização. O homem primitivo, na busca de vegetais para sua alimentação, já selecionava algumas plantas para o tratamento de suas enfermidades, obtendo com esta prática plantas que apresentavam propriedades terapêuticas, podendo ser usadas como medicamentos e plantas com princípios tóxicos, que inviabilizavam sua utilização.

Esta base de conhecimento foi de grande relevância no desenvolvimento da fitoterapia, visto que, a partir de passado tão remoto, atravessa gerações por entre as mais diversas culturas, baseando-se de modo significativo no conhecimento empírico de curandeiros e de nossos antepassados que há décadas utilizam das plantas para fins terapêuticos.

Detenta de valiosas informações, a humanidade volta a reacreditar no poder das plantas medicinais após um período de estagnação ocorrido entre os anos de 1950 e 1970, devido ao grande avanço dos medicamentos alopáticos; e o que se nota, atualmente, é uma busca insensante por produtos naturais. Merece destaque o consumo de medicamentos fitoterápicos que vem aumentando demasiadamente nos últimos anos, já que não causam algum tipo de reação alérgica ou efeito colateral quando usados adequadamente, e também porque apresentam um custo relativamente baixo. Não deixando de ressaltar o enorme acervo ecológico representado pela exuberante e valiosa flora do Brasil, que oferece elevado número de espécies nativas passíveis da utilização como medicamento e possibilitam o tratamento das mais diversas doenças.

Quando Sandes & Di Blasi (2000), relacionam a rica diversidade genética vegetal do Brasil onde existe cerca de 55.000 espécies catalogadas de

um total estimado entre 350.000 e 550.000 espécies, com as plantas como fonte de substâncias biologicamente ativas que apresentam alguma atividade sobre o metabolismo de um organismo vivo, podendo constituir-se uma atividade *farmacológica*; ressaltam como impressionante, a diversidade em termos de estrutura e de propriedades químicas em que essas substâncias ocorrem na natureza, podendo servir muitas vezes direta ou indiretamente para o desenvolvimento e a síntese de um grande número de fármacos.

Segundo Di Stasi (1996), no Brasil, 20% da população é responsável por 63% do consumo dos medicamentos disponíveis, o restante destes encontra-se nos produtos de origem natural, especialmente plantas medicinais. Farias *et al.*, (1994) ressaltam que os fitoterápicos têm sido, no caso do Brasil e de muitos países, o suporte da indústria farmacêutica, sendo significativo o emprego de matéria-prima vegetal na elaboração desses medicamentos por várias empresas nacionais (Reis & Mariot, 2001).

Esse imensurável valor expressado pela rica biodiversidade brasileira vem sofrendo graves conseqüências. A intensa exploração pelo homem vem acarretando na extinção de várias espécies nativas, como as espécies medicinais nativas de ocorrência dos cerrados brasileiros, já que este é um bioma possuidor de fitofisionomias com características peculiares essenciais à sobrevivência das mesmas, mas que também mostram-se indesejáveis quando busca-se a viabilidade da propagação vegetativa pelo método convencional, levando à uma exploração extrativista predatória.

Corrêa Júnior *et al.*, (1994) afirmam que, com a demanda pela utilização de plantas medicinais na cura ou prevenção de doenças, o cultivo e/ou extrativismo destas plantas torna-se uma alternativa cada vez mais importante na agricultura nacional.

O extrativismo, porém, não é a forma mais adequada; visto que a exploração de plantas de uso medicinal da flora nativa através da extração direta

nos ecossistemas tropicais tem levado a reduções drásticas das populações naturais dessas espécies. Entretanto, Reis & Mariot (2001) afirmam que ainda é relativamente pequeno o conhecimento acumulado sobre o cultivo ou manejo de populações naturais de plantas medicinais da flora nativa; e mesmo das espécies exóticas, a geração de conhecimento e adaptação tecnológica também mostram grandes carências. Como o processo de extrativismo das espécies de interesse ainda perduram, somente o acesso a informações que permitem a estruturação de tecnologias pertinentes aos ambientes e diversidades existentes podem mudar este quadro, tornando a domesticação e cultivo destas espécies questões prioritárias no tocante à preservação genética dos recursos naturais, na tentativa de reduzir o extrativismo e ainda apresentar opções na obtenção de matéria-prima de interesse farmacêutico (Reis & Mariot, 2001).

Tal realidade pode ser notada com a espécie *Lychnophora pinaster* (Asteraceae), conhecida popularmente como arnica. Planta nativa dos cerrados brasileiros, mais precisamente de ocorrência em campos rupestres, muito utilizada pela população como antiinflamatório, anestésico e cicatrizante, na forma de extrato alcóolico, o que lhe confere o atributo de planta medicinal, que vem sendo explorada através de um significativo extrativismo predatório devido à sua dificuldade de propagação e cultivo, colocando-a atualmente na categoria das plantas vulneráveis à extinção.

Atualmente, é considerável o quadro de mudança relativo ao conhecimento empírico no qual se baseou o uso das plantas durante anos. Por acreditar em todo este potencial, a incansável busca pelo conhecimento faz da ciência mestra essencial na descoberta de novas tecnologias e conhecedores do enorme potencial medicinal das plantas, inúmeros profissionais das mais diversas áreas vêm realizando pesquisas no intuito de validar cientificamente as propriedades terapêuticas apresentadas pelas plantas medicinais, como também solucionar questões relativas à propagação das mesmas.

Esta vegetação característica representada pelas formações vegetais do cerrado, de acordo com Ávila (2001), pode ser explicado pelas teorias pedológicas, onde a vegetação seria dependente de aspectos edáficos e geológicos como deficiências minerais, saturação do solo por elementos como o alumínio, diferenças de drenagem e profundidade do solo; pelas teorias climáticas, onde a vegetação seria o resultado do clima, principalmente em função da limitação sazonal de água no período seco e pelas teorias bióticas, nas quais a vegetação seria resultado da ação do homem, principalmente pelo uso freqüente do fogo, ou ainda resultante de outros agentes da biota. Cabendo ressaltar, que não se trata de uma cobertura vegetal uniforme, já que o cerrado, no sentido geral, é um complexo vegetacional.

Além dos fatores já citados, outras características também identificam este rico bioma. Apresenta duas estações climáticas bem definidas, com invernos secos e verões chuvosos (Correia, 1999; Ribeiro & Walter, 1998). As precipitações variam de 750 a 2000 mm, e a precipitação média anual está em torno de 1500 mm, (Adámoli *et al.*, 1987). A temperatura média situa-se em torno de 25°C, podendo chegar até 40°C em alguns locais, sendo que a época mais quente do ano coincide com o período chuvoso e a época mais fria coincide com a seca e a temperatura do mês mais frio está em torno de 18°C (Correia, 1999). Segundo Einten (1994), o cerrado ocorre apenas onde não há geadas ou onde elas não sejam freqüentes.

Nimer (1989) ressalta que, mesmo com a grande diversificação térmica presente no cerrado, há uma certa tendência quanto à uniformidade pluviométrica, pois o mecanismo atmosférico geral determina uma marcha estacional de precipitação semelhante em toda a região.

Uma outra característica dos cerrados diz respeito às diversas formações rochosas, onde se encontram os mais variados tipos de solos, desde os mais

profundos como os latossolos até os litossolos, nos quais é possível encontrar diversos tipos de plantas nativas (Correia, 1999).

De acordo com Reatto *et al.*, (1998), estes são solos rasos, que se originaram de rochas areníticas e quartizíticas, geralmente ácidos e pobres em nutrientes, geralmente associados a muitos afloramentos de rocha, que no cerrado correspondem a 7,3 % da sua área, com apreciável proporção pedras ou cascalhos.

A fitofisionomia típica notada nesse tipo de solo caracteriza as vegetações de Campo limpo e Campo rupestre, sendo que, as plantas de porte arbóreo só se estabelecem aí, quando encontram aberturas ou fendas entre rochas (Reatto *et al.*, 1998).

Segundo Guerra & Nodari, (2001), uma das principais características da biodiversidade é a distribuição relativa desigual de seus componentes no espaço geográfico, significando que a abundância de espécies é variável em determinado ambiente e que existem gradientes geográficos da biodiversidade.

Esta grande diversidade em solo e clima expressando exuberante e diversificada composição florística característica do bioma cerrado, possibilita a exploração do potencial de suas espécies nas mais variadas formas, sendo de tal maneira significativa a exploração das propriedades farmacológicas das suas inúmeras espécies empregadas para fins terapêuticos (Almeida *et al.*, 1998).

Reis & Mariot (2001) afirmam que várias espécies nativas têm sido largamente empregadas pela população; algumas com estudos químicos e/ou farmacológicos que dão suporte à sua utilização, outras, a partir do conhecimento empírico ou tradicional da população.

De acordo com Bezerra, J., *et al.*, (2002), muitas espécies do cerrado brasileiro são usadas na medicina tradicional. As espécies *Stryphnodendron adstringens* (Mart.), *Stryphnodendron polyphyllum* (Mart.) e *Dimorphandra molis* Bth. são usadas para tratamento de diarreia, problemas ginecológicos e

para cicatrização de ferimentos. O extrato de cascas do tronco da espécie *S. adstringens*, possui propriedades cicatrizantes, atividade antiinflamatória e efeitos anti-úlceras gástricas. O óleo essencial das folhas da espécie *Eugenia dysenterica* DC apresenta ainda atividade anti-fúngica. Óleo de frutos de *Caryocar brasiliensis* Camb. é usado em doenças do pulmão; as folhas são utilizadas como infusão em desordens do fígado; sementes de *Annona crassiflora* Mart. são usadas para picadas de cobras e o extrato de suas folhas também apresenta atividade anti-fúngica. Em seus trabalhos, quando testou a atividade moluscicida destas espécies sobre *Biomphalaria glabrata* (Say.) (lesma), só não obteve resultados positivos na concentração de 100 ppm, quando utilizou as folhas de *D. mollis* e *A. crassiflora* e cascas da espécie *E. dysenterica*.

As oportunidades para a identificação de produtos com possível emprego econômico aumentam com a diversidade das espécies, e os pesquisadores da área de produtos naturais mostram-se impressionados pelo fato destes produtos encontrados na natureza revelarem uma gama quase que inacreditável de diversidade em termos de estrutura e de propriedades físico-químicas e biológicas (Reis & Mariot, 2001).

Entre os tipos de vegetação que recobrem o Estado de Minas Gerais, predomina o cerrado, com cerca de 60% da área (Ávila, 2001). Dentre seus principais tipos fitofisionômicos, encontra-se grande número de plantas medicinais empregadas como medicamento na cura de várias doenças, como é notado na região de campo rupestre, que ocorre em regiões altas com muitas pedras, onde pode ser encontrado a arnica, muito usada como antiinflamatório e cicatrizante; a batata milhomem usada contra reumatismo; e o gravatá que tem seu fruto muito empregado em xarope para tratar bronquite (Laureano, 1999).

## 2.2 O Campo Rupestre

O campo rupestre é um tipo fitofisionômico onde as formações vegetais são predominantemente do tipo herbáceo-arbustivo, com a presença eventual de arvoretas pouco desenvolvidas de até dois metros de altura. Abrange um complexo de vegetação que agrupa paisagens em microrrelevos com espécies típicas, onde os arbustos crescem diretamente nas fendas de afloramentos de rochas, como é notado com a espécie *Lychnophora pinaster*, ou em trechos com pouco ou nenhum solo. Ocupa trechos de afloramentos rochosos que geralmente ocorrem no alto das serras em altitudes superiores a 900 metros, em áreas onde há ventos constantes, dias quentes e noites frias (Ávila, 2001; Ribeiro & Walter, 1998).

A sua flora é caracterizada como endêmica (Ribeiro & Walter, 1998), o que também é confirmado pelos autores Giullietti & Forero (1990); Filgueiras (1994) e Harley (1995), ao ressaltarem como forte característica dos campos rupestres a presença de muitos endemismos, graças às suas particularidades vegetais.

Este tipo de vegetação ocorre na Serra da Canastra, Serra do Cipó e Serra do Espinhaço em Minas Gerais, nas Chapada Diamantina (BA) e Chapada dos Veadeiros (GO) e nas serras centrais do Estado de Goiás (Dourada, Pirineus) (Dias, 1992). As espécies que formam aquela vegetação são em sua maioria autóctones, selecionadas pelas condições do clima e especialmente dos solos (Magalhães, 1966).

Segundo Ribeiro & Walter, (1998), esta composição florística típica é dependente das condições edáficas restritivas e do clima peculiar, e pode variar em poucos metros de distância, sendo a densidade das espécies dependente do substrato, como a profundidade do solo, fertilidade e disponibilidade de água.

No caso de afloramentos rochosos, como já citado anteriormente, os indivíduos lenhosos concentram-se nas fendas das rochas, podendo a densidade

ser muito variável, sendo comum, o agrupamento de indivíduos da mesma espécie, cuja presença é condicionada, entre outros fatores, pela umidade disponível (Ribeiro & Walter, 1998).

Entre as espécies comuns de ocorrência nessa região, encontram-se aquelas xeromórficas com folhas pequenas, espessadas e coriáceas, além daquelas com folhas densamente opostas cruzadas (Einten, 1994; Harley, 1995), sendo mais freqüentes àquelas espécies pertencentes à família Asteraceae, (*Baccharis*, *Lychnophora*, *Vernonia*), Bromeliaceae, Cyperaceae, Myrtaceae; dentre outras (Ribeiro & Walter, 1998).

### 2.3 Emprego e importância do gênero *Lychnophora*

O gênero *Lychnophora* pertencente à sub-tribo *Lychnophorineae*, tribo *Vernoniaceae* e à família Asteraceae (Stafflen, 1981) é abundante nos campos rupestres do Brasil (Barreto, 1956; Magalhães, 1966; Ferreira & Magalhães, 1977; Andrade, Gontijo & Grandi, 1986 e Semir, 1991), citados por Silva, (1994); país onde é considerado endêmico.

Apresenta espécies com um microendemismo bastante pronunciado, com distribuição restrita aos complexos rupestres de quartzito da Bahia, Goiás e Minas Gerais (Semir, 1991).

As espécies do gênero ocorrem em solos superficiais retidos em arenito, quartzito ou depósitos ferrosos, ou areia branca profunda, parecendo estar edaficamente restritas à um substrato particular ou a diferentes regimes de umidade (Coile & Jones, 1981).

Segundo Robinson (1999), citado por Sartori *et al.*, (2002), cerca de 50% das 34 espécies descritas que o gênero compreende vêm sendo estudadas quimicamente, para se identificar compostos ou grupos destes, responsáveis pelo seu efeito terapêutico, dado ao intenso uso popular delas há décadas, como

antiinflamatório, anestésico e cicatrizante, com resultados positivos e comprovada eficiência terapêutica empírica.

De acordo com Silva (1994), pesquisas sobre as propriedades medicinais de algumas espécies do gênero tem demonstrado o potencial destas plantas para uso farmacêutico. Foi constatado 100% de atividade tripassonomicida em seis espécies da família Asteraceae, dentre estas encontram-se *L. passeriana* (Mart. ex DC), Gardn. e a espécie *L. pinaster* Mart.

Nestes estudos foi possível identificar alguns dos princípios ativos, compostos ou grupos destes, em que se detectou que o perfil das substâncias do gênero é basicamente caracterizado pela ocorrência de sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, lactonas sesquiterpenos pertencentes aos grupos goiazenolídeos, eremantolídeos, guaianolídeos e classes de audesmanolídeos, além de flavonóides, esteróides e poliacetilenos (Sartori, 2002), podendo-se comprovar cientificamente a eficiência terapêutica das espécies.

Segundo Teske & Trentini (1997), os estudos mostram a importância das lactonas sesquiterpênicas como responsáveis pela atividade alergizante, sendo que em muitas pessoas esta substância pode causar sensibilização na forma de dermatite de contato, já que a atividade citotóxica (ou antitumoral), como também a atividade antibiótica estariam ligadas a esta substância. Os triterpenos são espasmolíticos a nível de musculatura lisa, principalmente na musculatura dos vasos, e permite a distensão dos tecidos sujeitos à inflamação. Os flavonóides potencializam a atividade dos terpenos. As propriedades antiinflamatória e analgésica da arnica se explicam pela diminuição da atividade enzimática no processo inflamatório. O fitocomplexo bloqueia a inflamação causada por traumatismos, diminui a formação de exsudato e incrementa a reabsorção e a ação das células responsáveis pela diminuição dos fragmentos biológicos de origem necróticas.

Bohlmann, *et al.*, (1980), estudando a espécie *Lychnophora salicifolia*, conseguiram isolar o ácido lychnoforínico e derivados de cariofilenos, além de flavonas glicosídeos. E em seus estudos fitoquímicos realizados em 1982, com a parte aérea das espécies *Lychnophora sellowii* Sch. Bip., *Lychnophora bahienis* Mattf. e *Lychnophora crispa* Mattf. demonstraram que furanoeliangolídeos são característicos deste gênero e talvez também, da subtribo, sendo os derivados de humulenos e cariofileno oxidados também de ocorrência freqüente.

Cunha *et al.*,(1995), trabalhando com a parte aérea da espécie classificada por Semir (1991), como *Lychnophora rupestris*, conseguiram isolar alguns dos sesquiterpenos lactonas, como também flavonóides.

No entanto, de acordo com Borsato *et al.*, (2000), entre as espécies do gênero, a espécie *Lychnophora ericoides* (Mart) é a mais popular, cujas folhas e raízes são comercialmente usadas na forma de pó, como analgésico e antiinflamatório. Seus estudos fitoquímicos com extrato de diclorometano de folhas e raízes desta espécie, em cobaias albinas; permitiram concluir significativa atividade analgésica quando usado o extrato das raízes, o que não foi obtido quando se utilizou o extrato das folhas desta mesma espécie.

Os estudos fitoquímicos realizados por Borella *et al.*, (1998) com as espécies *L. ericoides* e *L. pseudovillosissima*, permitiram isolar sesquiterpenos lactonas e triterpenos. Duas dentre as várias substâncias isoladas, o centraterino e goiazenolídeos, mostraram potente ação antiinflamatória *in vitro*.

Duarte (1993), objetivando ampliar o número de drogas com atividade tripanossomicida, em substituição à violeta de genciana, por ter sido detectado sua atividade carcinogênica e mutagenicidade quando usada em camundongos, optou por estudar os aspectos químico-biológico de *L. pinaster*, como atividade tripanossomicida, onde esta em extrato etanólico se mostrou significativamente ativa.

Trabalhos realizados por Pinheiro (2002) com a espécie *Lychnophora pinaster* Mart., testando a influência de diferentes métodos de secagem sobre o rendimento de óleo essencial, permitiu obter como resultado, um maior rendimento dele quando se empregou folhas frescas na extração por refluxo etanólico, não havendo diferença significativa quando se utilizou flores frescas; validando cientificamente o uso empírico das folhas e flores como extrato alcoólico pela população.

Segundo Reis & Mariot (2001) diversos autores têm apontado a importância dos estudos químicos e farmacológicos em espécies tropicais pela intensa produção de metabólitos secundários nas espécies destes ecossistemas. Brito & Brito (1993) citados por Reis & Mariot (2001), apontam diversos estudos químicos e/ou farmacológicos realizados com espécies da flora nativa, ressaltando as potencialidades de utilização de várias delas, bem como a necessidade de maiores estudos da riquíssima flora tropical brasileira.

Como se pode perceber, a maioria dos estudos realizados até agora com as inúmeras espécies do gênero se voltaram para a parte fitoquímica, na busca de identificar os compostos e validar cientificamente sua ação terapêutica, possibilitando a expansão do seu uso de forma mais segura através da comercialização na forma de fitoterápicos.

No entanto, estudos voltados para outras áreas, como cultivo e propagação são indubitavelmente necessários, pois além de serem endêmicas, algumas espécies apresentam expressiva dificuldade de propagação e sua exploração, portanto, é feita através de um extrativismo predatório, como é notado com a espécie *Lychnophora pinaster* Mart. que atualmente se encontra na categoria das plantas vulneráveis, cujas populações encontram-se em declínio em consequência da sua exploração excessiva, destruição dos habitats ou outra alteração ambiental e cuja sobrevivência definitiva ainda não tenha sido assegurada, o que poderá causar a extinção da espécie (Sociedade Botânica do

estado do Mato Grosso, constataram o emprego de espécies medicinais exóticas e nativas do cerrado, dentre elas, *Brickelia brasiliensis* (Spreng.) Robinson, conhecida popularmente como amica da serra muito empregada em casos de dor de dente.

Segundo Semir (1991), a espécie *L. ericoides* Mart. é muito próxima da *Lychnophora pinaster* Mart., e às vezes a separação entre elas é difícil e problemática. Ambas e principalmente *Lychnophora pinaster* são bastante polimórficas no porte, diâmetro dos ramos, forma, comprimento e largura das folhas. A espécie *L. ericoides* Mart. é conhecida popularmente como “amica”, “candeia”, “candieiro”, “pau-candeia” (Almeida, *et al.*, 1998)

A espécie *L. pinaster* é encontrada nos campos rupestres, campos sujos e campos limpos de altitude elevada (altos de serra) na região de cerrado do Alto Rio Grande em Minas Gerais (Rodrigues, 1998). De acordo com Semir (1991), ocorre em ambientes extremamente xéricos, sendo encontrada em campos de canga, como os existentes nas Serras do Rola Moça, Moeda e do Cural, podendo também ser encontrada crescendo entre blocos de rochas ou alto de pequenos morros expostos à intensa insolação e em carrancais nos serrotes como visto nas Serras do Cipó, Caraça e Lavras, onde foi encontrada na Serrinha; em Itumirim, foi encontrada na Serra da Bocaina/Morro Janela; e em Carrancas se encontrou plantas na Cachoeira da Fumaça e Serra de Carrancas. Carvalho (1992), observou arbustos de *L. pinaster* crescendo nos campos rupestres da Serra da Bocaina sobre pequenas depressões rochosas, onde há acúmulo de matéria orgânica.

Segundo Silva (1994), a floração ocorre entre os meses de agosto a outubro; a dispersão dos frutos se dá entre os meses de dezembro, janeiro e fevereiro; época mais provável para a coleta dos aquênios.

A espécie possui folhas e flores aromáticas muito utilizadas externamente pela medicina popular na forma de extrato alcoólico, como

antiinflamatório, anestésico, cicatrizante, em machucados, contusões ou hematomas e também em picadas de insetos, além de pomadas para os mesmos sintomas; também como cosmético, como o sabonete de arnica, para eliminar asperezas, rachaduras e suavizar hematomas e contusões (Almeida, *et al.*, 1998). Internamente pode ser usada em doses homeopáticas na prevenção de hematomas pós-cirúrgico; mas em casos de super dosagem pode se tornar tóxica.

Segundo Semir (1991), as plantas de *L. pinaster* variam de subarbusto ereto com muitos ramos, a pequenos arbustos ericoides e, mais raramente, arbustos mais altos candelabriformes com 0,4 a 2,4 m raramente até 3,6 m. Ramos alternos a subverticilados flexuosos e delicados até mais robustos, densamente tomentosos a velutinos ou curtamente subvilosos, geralmente de coloração cinérea a nigriscente abaixo, e mais ou menos canescente acima, às vezes variadamente ocrácea até atrofusca com cicatrizes triangulares a circulares, ou formando alvéolos subrôbicos, dando aos ramos o aspecto tosselado com 0,5 a 2,0 cm de diâmetro, com o eixo principal basal (tronco) atingindo 2,5 a 5,0 cm de diâmetro nas regiões mais velhas das plantas arbustivas maiores. Folhas muito imbricadas e ascendentes na parte superior dos ramos e mais potentes até pouco reflexas abaixo, geralmente lineares, linear-oblongas, rosmarinióides a ericóides, às vezes longamente lineares em forma de fita, base arredondada a auriculada às vezes ligeiramente acentuada, ápice obtuso a pouco arredondado, raramente pouco agudo, margem revoluta; venação broquidódroma; face adaxial densamente tomentosa canescente com nervura principal subvilosa quando jovem, subglabrescente permanecendo pouco pubérula até totalmente glabra quando velha, geralmente muito rugosa e bulada, às vezes quase lisa, nervura principal alargada afinando da base para o ápice, com indumento subviloso às vezes permanente, nervuras de outras ordens variadamente evidentes e impressas; face abaxial inferior totalmente tomentosa com tricomas subvilosos entremeados aos tomentosos, cobrindo todas as

nervuras, com a principal subquadrática, não alada, sulcada longitudinalmente e bem evidente e saliente com geralmente 0,5 a 6,0 cm de comprimento, mais raramente podendo atingir até 12,0 cm de comprimento e cerca de 0,1 cm de largura. Inflorescência em glomérulos simples folhosos, geralmente muito congestos, hemisféricos com folhas esparsas entre eles com 1,0 a 1,5 cm de comprimento e 2,0 a 3,0 cm de diâmetro em ramos folhosos com até 10,0 cm de comprimento e até 0,3 cm raramente 1,0 cm de diâmetro. Capítulos campanulados a cilíndricos com 3 a 5 flores; com 6,5 a 8,0 mm de comprimento 3,0 a 5,0 mm de diâmetro (Figura 1). Brácteas involucrais em 4 a 5 séries com as exteriores triangulares a subovais, as interiores mais lanceoladas a oval lanceoladas, côncavas de ápice largamente obtuso a arredondado com mancha marrom, margem inteira membranácea, escariosa de coloração mais pálida, superfície tomentosa quando jovem, glabrescente, com 2,0 a 8,0 mm de comprimento e 1,0 a 2,0 mm de largura. Flores lilazes a púrpuras com 8,0 a 10,0 mm de comprimento, lacínios glabros, glandulosos com até 4,0 mm de comprimento (Figura 2). Anteras alvas com até 4,0 mm de comprimento. Aquênio obcônico a oval cilíndrico, glabro, glandulosos oliváceo a castanho, às vezes com manchas atropurpúreas, costado, às vezes com costas pouco evidentes, anguloso, com 1,5 a 3,0 mm de comprimento e 0,8 a 1,5 mm de diâmetro, pappus externo quadrático, pouco coroniforme com ápice truncado a ligeiramente eroso a crenulado com 0,5 a 2,0 mm de comprimento, série interna às vezes pouco espiralada com 10 a 15 páleas com 5,5 a 6,0 mm de comprimento.



FIGURA 1: Plantas de arnica - *Lychnophora pinaster* Mart.



FIGURA 2: Flores da espécie *Lychnophora pinaster* Mart.

## 2.5 Cultura de tecidos

Com o desenvolvimento da ciência moderna, novas tecnologias têm surgido visando melhor qualidade de vida, como também ampliação do conhecimento humano. A possibilidade da reprodução de fenômenos naturais em condições de laboratório, torna-se cada vez mais significativo; e diversas questões problemáticas podem ser resolvidas com grande sucesso.

Atualmente, a manipulação de plantas por meio da biotecnologia vegetal tem merecido destaque, já que é possível regenerar uma planta perfeita simplesmente através de uma célula ou tecido, tornando interessante o desenvolvimento de metodologias que visem uma complementação entre tecnologia e qualidade de vida.

No tocante às plantas medicinais, alternativas eficazes para incrementar a produção de compostos valiosos no desenvolvimento de novos medicamentos, como também otimizar um sistema de cultivo são bem vistas, sendo portanto, as técnicas biotecnológicas necessárias e cada vez mais empregadas.

A manipulação de plantas *in vitro* apresenta-se como técnica altamente segura e viável, neste contexto, já que a cultura de tecido tem como definição básica o cultivo asséptico de qualquer parte viva da planta (explantes) constituídos por frações de tecidos, órgão ou mesmo células em suspensão em meio de cultura sintético (nutrientes, reguladores de crescimento, etc.) sob condições controladas de temperatura, umidade e luminosidade, a fim de gerar uma nova planta (Pinto & Lameira, 2001).

A regeneração de plântulas *in vitro* através da cultura de brotos, freqüentemente utilizada para obtenção de clones que mantêm todas as características da planta-mãe, constitui uma técnica especialmente vantajosa para a preservação de genótipos produtores de compostos medicinais (França, 2001).

## 2.6 Micropropagação

Várias são as técnicas que permitem a manipulação das plantas *in vitro*, sendo a técnica da micropropagação, assim denominada devido o tamanho dos propágulos utilizados aquela de aplicação mais prática e de maior impacto (Grattapaglia & Machado, 1998).

Destaca-se dentro da técnica da cultura de tecidos como ferramenta auxiliar essencial, quando o objetivo é o cultivo de plantas que apresentam fabulosa propriedade terapêutica e certa dificuldade de propagação em campo através do método convencional.

Há décadas estão sendo desenvolvidos trabalhos nesta área, com inúmeras espécies de plantas hortícolas, ornamentais, frutíferas e florestais, onde grandes sucessos juntamente com um progresso significativo têm sido alcançados. Atualmente, nos vários estudos de micropropagação que vêm sendo realizados com as plantas medicinais, tem-se obtido grande êxito, destacando-se as espécies ipeca, espinheira-santa, quebra-pedra, mama-cadela, marmelinho e chapéu-de-couro, dentre outras (Pinto & Lameira, 2001).

Segundo Giles & Friesen (1994), de todas as tecnologias e técnicas que influenciaram a horticultura nos últimos 25 anos, a micropropagação teve o mais significativo impacto no desenvolvimento comercial.

Durante os últimos 10 anos, com o aumento da população, a demanda por plântulas micropropagadas dobrou em número. Aproximadamente, são produzidas de 180 a 200 milhões de plântulas via cultura de célula e tecido (Giles & Friesen, 1994).

Segundo Grattapaglia & Machado (1998), o processo de micropropagação pode ser conduzido de três formas, conforme o explante utilizado e sua subsequente manipulação; multiplicação por meio da proliferação de gemas axilares; multiplicação mediante a indução de gemas adventícias por

multiplicação, possibilidade de multiplicar grandes quantidades de plantas uniformes com genótipos selecionados, em uma área reduzida a baixos custos, maior controle fitossanitário do material propagado, manutenção em bancos de germoplasma de espécies ameaçadas de extinção, incremento acelerado do número de plantas derivadas por genótipo, para a obtenção de metabólitos importantes, rápida multiplicação de plantas provenientes de ambientes particulares que não dão sementes ou não têm boa capacidade de germinação, obtenção de plantas em todas as épocas do ano (Bajaj *et al.*, 1988; Pinto & Lameira, 2001), além de possibilitar a produção de várias plantas medicinais, com a mesma qualidade do princípio ativo, quando cultivadas em condições de campo, como no trabalho desenvolvido pelos pesquisadores Viol *et al.*, (2002), onde procuraram investigar a composição química e atividade antibacteriana de plantas de calêndula cultivadas *in vitro* e no solo.

## **2.7 Enraizamento de plantas lenhosas**

A produção de herbáceas medicinais, com ciclo de vida curto, não oferece maiores dificuldades. Entretanto, a produção de arbóreas, cujas cascas ou raízes contêm substâncias bioativas, freqüentemente se constitui em um desafio com limitações devido à germinação irregular, desenvolvimento lento de propágulos e não enraizamento (França, 2001).

Quando Silva R., *et al.*, (2002), estudaram a propagação vegetativa de malva-santa (*Coleus barbatus* Benth.), uma planta medicinal herbácea que possui o óleo essencial muito utilizado para fins farmacológicos, obtiveram 100% de enraizamento quando utilizaram estacas medianas e basais e 70,83%, quando utilizaram estacas apicais.

Grattapaglia & Machado (1998) também afirmam que o enraizamento de espécies herbáceas é geralmente fácil e que o mesmo não ocorre quando se trata de espécies lenhosas.

De acordo com Assis & Teixeira (1998), a propagação vegetativa constitui um importante método para a multiplicação de plantas lenhosas, sendo comumente utilizada com sucesso e em larga escala, o enraizamento de estacas.

Entretanto, isto não acontece com todas espécies de plantas lenhosas. Insucessos ocorreram nos diversos estudos já realizados quando se buscou enraizar estacas de plantas medicinais lenhosas pelo método convencional, sendo necessário a utilização de reguladores de crescimento; realidade comum em vários estudos com frutíferas e/ou ornamentais (Pivetta *et al.*, 2002), como também medicinais. Citam-se como exemplos, os estudos realizados com estacas de alecrim (Coelho & Messias, 2000; Prado *et al.*, 2000); *Tachia grandiflora*, conhecida popularmente como caferana (Silva *et al.*, 2002); *Punica granatum*, conhecida popularmente como romã (Machado *et al.*, 2002), dentre outros.

Entretanto, mesmo utilizando reguladores de crescimento, muitas plantas medicinais de ocorrência do cerrado brasileiro não respondem ao enraizamento, como foi observado por Cardoso *et al.*, (2002), quando testaram a influência de diferentes substratos e das auxinas Ácido indol-acético (AIA), Ácido indol-butírico (AIB) e Ácido naftaleno-acético (ANA), nas concentrações de 25, 50, 100 e 150 ppm no enraizamento de estacas caulinares da planta medicinal conhecida popularmente como bolsa-de-pastor (*Zeyheria montana* Mart.).

Paron *et al.*, (2002), também não obtiveram grandes sucessos quando estudaram a propagação vegetativa da espécie medicinal lenhosa *Lychnophora ericoides*, por se encontrar na categoria das plantas vulneráveis, segundo a última lista publicada pelo IBAMA, sobre as espécies vegetais ameaçadas de extinção. Estacas apicais e medianas da planta foram imersas em solução contendo ou não os antioxidantes ácido cítrico 0,05% + ácido ascórbico 0,05%, antes da imersão durante 1 hora nos tratamentos: água (T); ácido indol-butírico

(AIB) 0,001%, sacarose 6% + ácido bórico 0,01% e AIB + sacarose. Após 60 dias de condução do experimento das estacas em areia, a avaliação permitiu concluir que não ocorreu enraizamento em nenhuma estaca nas condições avaliadas, mas que houve formação de calos radiculares a nível de 7% nas estacas apicais, quando imersas em solução contendo AIB e AIB + sacarose (Paron *et al.*, 2002).

Situação semelhante também foi encontrada quando se procurou propagar vegetativamente a espécie *Lychnophora pinaster*. Estacas apicais e medianas de arnica imersas durante 24 horas em soluções contendo antioxidantes e auxina em altas concentrações, sendo ácido bórico (100 mg.L<sup>-1</sup>) + 1000 mg.L<sup>-1</sup> de AIB + 6% de sacarose ou ácido bórico (100 mg.L<sup>-1</sup>) + 1000 mg.L<sup>-1</sup> de ANA + 6% de sacarose; não apresentaram nenhuma formação de raiz.

Neste contexto, a técnica da cultura de tecidos tem-se apresentado como uma alternativa viável de clonagem de espécies lenhosas, quer para a formação de pomares, no caso de frutíferas, quer para a produção comercial de mudas e/ou multiplicação de espécies medicinais lenhosas ameaçadas de extinção.

Segundo Einset (1991), duas estratégias têm sido utilizadas para a micropropagação de espécies lenhosas: a regeneração de calos e a multiplicação de brotos. No entanto, como dito anteriormente, a regeneração de plantas a partir da formação de calo pode não constituir um método seguro, no tocante à manutenção da integridade genética desejada da espécie em estudo. Portanto, a multiplicação de brotos é o método mais confiável.

Segundo Assis & Teixeira (1998), algumas limitações desta técnica ocorrem quando o objetivo é o enraizamento de partes aéreas regeneradas *in vitro*, incluindo grande maioria das espécies lenhosas. Os maiores obstáculos ao conhecimento adequado dos fenômenos envolvidos no processo de formação de raízes adventícias residem na dificuldade de isolar e caracterizar os fatores que

controlam estes fenômenos, em virtude da complexidade e da grande interação existente entre eles.

Segundo Rao & Venkateswara, (1996), citados por Bonilla (2002), no caso específico de plantas lenhosas, alguns fatores como contaminação, liberação de substâncias oxidantes no meio, bem como a grande variabilidade genética existente, dificultam estudos de propagação *in vitro*, além da frequência de regeneração *in vitro* diminuir em função da idade da fonte dos explantes.

Entretanto, sucessos têm sido obtido com algumas espécies medicinais lenhosas já estudadas, como nos trabalhos realizados por Bonilla, (2002); Bertolucci, (2000); Coelho, (1999); dentre outros; sendo portanto, a micropropagação de grande valia nesta questão por possibilitar a otimização de protocolos viáveis ao cultivo, mesmo para as espécies medicinais lenhosas.

## **2.8 Meio de cultura e reguladores de crescimento na manipulação *in vitro* de plantas medicinais**

Os meios nutritivos utilizados para a cultura de células, tecidos e órgãos de plantas fornecem as substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos e controlam, em grande parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro*. Eles se baseiam nas exigências das plantas quanto aos nutrientes minerais, com algumas modificações para atender as necessidades específicas das plantas *in vitro* (Caldas *et al.*, 1998).

Durante anos, o meio White foi utilizado como o meio básico para a cultura de uma grande variedade de tecidos de diferentes espécies. Atualmente, o meio identificado como básico refere-se ao meio MS de Murashige e Skoog (1962) (Caldas *et al.*, 1998).

De acordo com França (2001), a presença de reguladores de crescimento no meio de cultura propiciou amplo avanço das técnicas que constituem a biotecnologia atual, tornando-se portanto, indispensáveis ao desenvolvimento

normal das plantas, uma vez que translocam de um órgão para outro e estão envolvidos no comportamento de suas partes quando isoladas.

A partir do momento em que partes da planta (explante) são fragmentadas para que seu desenvolvimento possa ser estudado isoladamente, o fluxo de reguladores, nutrientes orgânicos e inorgânicos, e mesmo água de um órgão, tecido ou célula para outro está inevitavelmente interrompido. Para sustentar o explante, é necessário então, provê-lo com todos nutrientes essenciais, fonte de carbono e nitrogênio e inclusive reguladores de crescimento (França, 2001).

No início do cultivo *in vitro*, quando do estabelecimento do explante inicial, tem-se usado diversas formulações de meio de cultura, na maioria das vezes sólido ou semi-sólido, onde nem sempre é benéfico a adição de reguladores de crescimento. O meio MS com algumas modificações ou diluições tem apresentado bons resultados para diversas espécies, mas com espécies lenhosas, o meio MS em 100% de sua concentração não tem se mostrado satisfatório em alguns casos, e composições mais diluídas em macronutrientes têm sido usadas apresentando ótimos resultados (Grattapaglia & Machado, 1998).

Muitos trabalhos de micropropagação vêm sendo desenvolvidos com plantas medicinais nativas e/ou exóticas, herbáceas e/ou lenhosas, visando o estabelecimento de protocolos simples e diretos para propagação daquelas espécies medicinais com as quais isto não é conseguido pelo método convencional, até processos que abrangem técnicas mais demoradas e cuidadosas, regenerando plantas a partir de diferentes tecidos via embriogênese ou organogênese direta ou indireta.

As variantes estudadas nestes trabalhos ficam por conta do explante inicial que pode ser embrião, meristema apical, gemas axilares, além de outros órgãos e tecidos da planta; concentração e tipos de meio de cultura; como

também concentração e tipos de reguladores de crescimento empregados nas diferentes fases do processo de micropropagação.

A técnica da cultura de embriões zigóticos *in vitro* tem sido usada para superar a dormência de sementes; estudar os aspectos nutricionais e fisiológicos do desenvolvimento do embrião; testar viabilidade de sementes; recuperar híbridos raros de cruzamentos incompatíveis; e como fonte de explantes com tecido de elevada potência, graças a sua natureza juvenil com alto potencial regenerativo; sendo este último, na atualidade, o mais freqüente, (Hu & Ferreira, 1998).

Algumas plantas medicinais apresentam sementes pouco viáveis para sua multiplicação sexuada em condições *in vivo*, como também alta taxa de oxidação quando se inicia o cultivo *in vitro* a partir de gemas axilares, devido à liberação de compostos fenólicos no meio de cultura, como se nota com a espécie medicinal *L. pinaster*, dentre outras.

Logo, para que se inicie um sistema de micropropagação para espécies como tal, torna-se necessário que este se faça a partir de embriões zigóticos germinados *in vitro*, já que a técnica permite selecionar embriões viáveis ao processo em condições altamente assépticas, como também obter plântulas perfeitas para a continuação dos trabalhos.

Vários são os protocolos de micropropagação de plantas medicinais que se iniciam com a cultura de embriões, onde tipo e concentração do meio de cultura e de sacarose mais adequadas à germinação e desenvolvimento das plântulas também são testados, como naqueles trabalhos desenvolvidos por Bonilla, (2002); Azevedo *et al.*, (2002) com sementes de Copaiba (*Copaiba spp*), e por Sousa *et al.*, (2002), quando estudaram a espécie *Catharanthus roseus*, conhecida como vinca, no tocante a germinação e desenvolvimento de seedlings *in vitro* a partir de diferentes concentrações do meio de cultura MS e sacarose para implantação, manutenção e sua multiplicação *in vitro*.

Bertoni *et al.*,(2002), inocularam sementes de *Zeyheria montana* Mart. uma planta medicinal do cerrado submetidas a diferentes protocolos de assepsia, em meio de cultura WPM (Wood Plant Medium) (Lloyd & Mc Cown, 1981), com o objetivo de utilizá-las como fonte de explante para o desenvolvimento do protocolo de micropropagação da espécie.

Quando o objetivo de estudo é somente a germinação de embriões como fonte de explantes; reguladores de crescimento não devem ser adicionados ao meio de cultura, desde que o embrião esteja viável e possibilite a formação de plântulas adequadas para posterior multiplicação; visto que, quando isso é feito, o que ocorrerá é a indução de múltiplas brotações no embrião. Tal fato, foi observado por Pereira *et al.*,(2002), quando obtiveram maior porcentagem de germinação a partir de embriões de unha-de-gato inoculados *in vitro* em meio de cultura MS sem a adição da citocinina BAP (6-benzilaminopurina), e também uma maior comprimento da parte aérea. Quando esta citocinina foi adicionada ao meio de cultura, houve formação de múltiplas brotações.

Entretanto, para a fase de multiplicação, a adição de reguladores de crescimento, mais precisamente as citocininas, na grande maioria das vezes é indispensável.

Dentre as várias citocininas utilizadas durante o processo de multiplicação, como a cinetina (CIN ou KIN), thidiazuron (TDZ), 2-isopenteniladenina (2iP) e 6-benzilaminopurina (BAP), esta última vem sendo usada na maioria dos trabalhos com obtenção de grande êxito, tendo sua concentração variada de acordo com cada espécie estudada, mas geralmente varia entre 0,1 e 5,0 mg.L<sup>-1</sup> (Grattapaglia & Machado, 1998).

Quanto ao meio de cultura, várias formulações são usadas, podendo ser mais diluídas ou não, sendo muito comum a utilização dos meios básicos usados no início do processo, quando do isolamento ou estabelecimento do explante inicial.

A qualidade das partes aéreas provenientes da fase de multiplicação, como também a concentração do meio de cultura é que vai determinar o sucesso do enraizamento. Meios de cultura mais diluídos têm possibilitado melhores resultados. Diluições de 1/2, 1/3 e 1/4 da concentração salina do meio MS são frequentes nessa fase (Lane, 1979; Hasegawa, 1980; Werner & Boe, 1980; Zimmerman & Broome, 1981; Anderson, 1984; Druart, *et al.*, 1982; Valles E Boxus, 1987) citados por (Grattapaglia & Machado, 1998), sendo os meios sólidos utilizados na grande maioria das vezes (Grattapaglia & Machado, 1998).

Como o tipo e concentração de citocinina exercem ação direta durante a fase de multiplicação; nesta fase também, tipos e concentrações de auxina são as variáveis que, em geral, vão atuar diretamente no processo de enraizamento. E mesmo que tenha sido observado em 86% dos meios de enraizamento, algumas plantas medicinais podem enraizar-se na sua ausência. As auxinas podem ser usadas sozinhas ou em combinação, onde as concentrações também variam conforme a espécie e o clone.

As auxinas mais utilizadas são o ácido indol-butírico (AIB), o ácido naftaleno-acético (ANA) e o ácido indol-acético (AIA), pois as demais como o 2,4-D e o picloram, por exemplo, estimulam a produção de calo.

Segundo Grattapaglia & Machado (1998), o ANA pareceu ser a auxina mais eficaz para estimular o enraizamento *in vitro*, aparecendo em 53% dos meios, contra 29% do AIB e 11% para o AIA.

A necessidade de alongamento das partes aéreas daqueles explantes, ou seja, brotações que serão levadas à fase seguinte de enraizamento, cuja espécie possui crescimento lento, é realidade para algumas espécies.

Quando determinadas plantas medicinais apresentam crescimento lento, como por exemplo a espécie *L. pinaster*, o uso de giberelinas, mais comumente o GA<sub>3</sub> durante o processo de micropropagação, antes da fase de enraizamento pode auxiliar nessa questão, já que o efeito mais conhecido desta classe de

reguladores se realiza sobre o alongamento de células, no caso, de partes aéreas. Também uma combinação de citocinina em maior concentração, com auxina em menor concentração, durante a fase de multiplicação, pode favorecer o desenvolvimento da parte aérea, dispensando esta etapa de alongamento, podendo ocorrer às vezes a formação de calos, como nos trabalhos desenvolvidos por Coelho (1999), com a espécie sucupira-branca, quando inoculou segmentos nodais para a indução de múltiplas brotações em meio de cultura suplementado com BAP e ANA, houve um aumento na formação de calos proporcional à concentração da auxina.

Entretanto, para várias espécies de plantas medicinais, após a individualização das brotações, não é necessário a adição de reguladores de crescimento no meio de cultura para este objetivo.

Como a importância das plantas medicinais no contexto científico, tem-se sobressaído, havendo necessidade de mais pesquisas no tocante ao cultivo das mesmas, como dito anteriormente; o uso dos referidos reguladores de crescimento, como também diferentes formulações de meio de cultura e diferentes concentrações na busca de maximizar a produção *in vitro* é significativo.

Coelho (1999), estudando a espécie medicinal conhecida como sucupira branca, também utilizou sementes como fontes de explante para o desenvolvimento dos trabalhos *in vitro*. Quando inoculou embriões e sementes seccionadas e da referida espécie em meio MS líquido diluído para a metade da força dos sais dos macro e micronutrientes, suplementados com vitaminas de MS e 2% de sacarose, observou que em 7 dias os embriões apresentavam alto índice de germinação e maior velocidade, o que também ocorreu, quando sementes escarificadas e embriões foram inoculados *in vitro* em diferentes meios, havendo superioridade no meio líquido. O meio líquido também mostrou-se melhor para ao crescimento dos embriões, quando comparado com diferentes

condições de geleificantes, como fitagel, ágar lavado e ágar. Quando estabeleceu segmentos nodais *in vitro* em meios MS e WPM, observou a superioridade deste último no desenvolvimento destes explantes e quando utilizou o meio MS suplementado com água de coco nas concentrações de 0, 5, 10 e 20%, não se obteve o desempenho esperado. Os segmentos nodais inoculados em MS diluído para a metade da força dos sais dos macro e micronutrientes com vitaminas de MS, 2% de sacarose e 0,7% de ágar suplementados com 0,0; 2,5; 5,0 e 10  $\mu\text{M}$  de BAP e 0,0; 1,0; 3,0 e 5,0  $\mu\text{M}$  de ANA em diferentes combinações, foram usados como explante para a multiplicação da espécie *in vitro*. A concentração de 5,0  $\mu\text{M}$  de BAP proporcionou maior quantidade de multibrotações, em média 3,20 aglomerados por segmento nodal e maior número de brotos, média de 7,65 brotos por segmento nodal.

Bonilla (2002), estudando a propagação *in vitro* da planta medicinal lenhosa do cerrado *Rudgea viburnoides*, testou o efeito do BAP nas concentrações de 0; 2,0; 4,0 e 6,0  $\text{mg.L}^{-1}$  adicionado aos meios MS e WPM sobre a indução e tamanho de brotações múltiplas em segmentos nodais. Melhores resultados foram obtidos em meio WPM, que se mostrou superior em números nos parâmetros avaliados. A citocinina BAP, quando no nível de 4,0  $\text{mg.L}^{-1}$  propiciou melhores resultados quanto ao número de brotações (4,13), porém maior tamanho dos brotos ocorreu quando foi utilizado 6,0  $\text{mg.L}^{-1}$  de BAP (3,95 cm). Os resultados em números obtidos no meio MS foram menores, havendo um aumento tanto no número quanto no tamanho das brotações conforme o aumento na concentração de BAP, e o enraizamento ocorreu aos 60 dias após inoculados dos segmentos nodais com 1,0 cm de comprimento em meio MS/2 suplementado com 0,5  $\text{mg.L}^{-1}$  de AIB.

Entretanto, estudos com a espécie *Echinodorus cf scaber*, conhecida como chapéu-de-couro, propiciaram a indução de brotações (1 a 7), a partir de segmentos nodais inoculados em meio MS suplementado com 6,0  $\text{mg.L}^{-1}$  de

BAP, e maior tamanho dos explantes (3,5 cm) em meio MS isento de regulador (Pereira, 1999).

Em trabalhos desenvolvidos com hortelã, objetivando sua multiplicação em massa *in vitro*, Rosenbecker *et al.*, (2002) não observaram diferenças estatísticas quanto à indução de múltiplas brotações quando avaliaram o meio de cultura MS nas concentrações de 50, 75, 100, 125 e 150% de sais e vitaminas e BAP nas concentrações de 0,0; 0,5 e 1,0  $\mu\text{M}$ .

Estudos de micropropagação de camomila realizados por Thies *et al.*, (2002) possibilitaram a obtenção de melhores resultados quando utilizaram o meio MS com 75% da concentração de sais e vitaminas suplementado com 0,3  $\mu\text{M}$  de BAP, onde as brotações apresentaram porte mais adequado, não havendo formação de brotações na ausência do regulador. Neste meio isento do regulador, ocorreu formação de um maior número de raízes.

Bertolucci, (2000) também encontrou resultados semelhantes quando trabalhou com a espécie *Tournefortia cf paniculata*, conhecida popularmente como marmelinho. Para a realização dos trabalhos de micropropagação, inoculou o segmento nodal em meio MS, MS/2 e WPM advindo do explante primário já estabelecido *in vitro*. Os melhores resultados foram obtidos no meio WPM que, quando suplementado com a citocinina BAP para indução de brotações nas concentrações de 0,0; 0,5 e 1,00  $\text{mg.L}^{-1}$ , permitiu maior crescimento das brotações na ausência do regulador, como também a indução de múltiplas brotações nas outras duas concentrações, sendo a melhor a concentração de 1,00  $\text{mg.L}^{-1}$ . Todas as brotações quando individualizadas e inoculadas no meio WPM sem regulador para alongamento formaram raiz.

Echeverrigaray *et al.*, (2000) obtiveram êxito quando objetivaram estabelecer um protocolo para a micropropagação de camomila romana (*Anthemis nobilis* L.), através da organogênese direta em folhas. Plântulas obtidas à partir de então, foram multiplicadas com sucesso em meio MS

suplementado com 2,25  $\mu\text{M}$  de BAP e 0,6  $\mu\text{M}$  de AIA e enraizadas em meio MS suplementado com 0,5  $\mu\text{M}$  de AIB.

Fracaro & Echeverrigaray (2001), ao estudarem a micropropagação de *Cunila galioides*, uma popular planta medicinal do sul do Brasil, testaram diferentes meios de cultura, entre eles o MS e o efeito das citocininas BAP, CIN e 2iP, sobre altura e número de brotos a partir de gemas axilares coletadas da planta adulta e inoculados *in vitro*. Observaram um aumento no número de brotos proporcional às concentrações de 0; 0,44; 2,2; 4,4 e 8,8  $\mu\text{M}$  de BAP, sendo esta última a melhor, nas duas características avaliadas. Quanto à frequência de enraizamento, número de raízes por explante e comprimento das raízes desta espécie, testaram diferentes concentrações do meio MS e da auxina AIB, respectivamente, MS, MS/2 e MS/4; e 0; 0,5; 2,5 e 5,0  $\mu\text{M}$  de AIB. Os melhores resultados quanto ao número de raízes por explante e comprimento das raízes foram obtidos em meio MS suplementado com 0,5 ou 2,5  $\mu\text{M}$  de AIB e a redução da concentração do meio MS não afetou a indução, porém, o crescimento das raízes.

Tiwari *et al.*, (2000), estudando a micropropagação de *Centella asiatica* (L.), a partir de segmentos nodais, obtiveram melhores resultados quanto à porcentagem de explantes (91%); com brotações axilares, (4 a 5 brotos/explante), quando utilizaram meio de cultura MS suplementado com 22,2  $\mu\text{M}$  de BAP em combinação com 2,68  $\mu\text{M}$  de ANA. Os brotos foram alongados neste mesmo meio suplementado com 6,7  $\mu\text{M}$  de BAP e 2,88  $\mu\text{M}$  de AIA. O meio MS completo quando suplementado com 2.46  $\mu\text{M}$  de AIB enraizaram 90% das plântulas, as quais revelaram maior número de raízes, como também maior comprimento.

*Tridax procumbens* L. foi estudada por Cerqueira,(1999). Segmentos nodais foram estabelecidos *in vitro* em meio MS nas concentrações de sais de 12,5; 25; 50 e 100%, sendo os melhores resultados obtidos quanto à altura da

brotação (11,9 cm) no meio MS com 50% da concentração de sais. Quando se testou o efeito do BAP nas concentrações de 0,0; 0,5 e 1,00 mg.L<sup>-1</sup> em meio MS quanto à altura das brotações em segmentos nodais da espécie, isto foi conseguido em meio MS isento de regulador (5,7) e quando se testou o efeito do BAP e TDZ nas concentrações de 0,125; 0,25; 0,5 e 1,00 mg.L<sup>-1</sup>, quanto ao número de brotos/segmento nodal, altura das brotações e número de raízes, observou uma superioridade do BAP em todas características avaliadas. Maior altura das brotações ocorreu no meio com 0,125 mg.L<sup>-1</sup> de BAP (2,6); houve um aumento no número de brotos à medida que aumentou a concentração de BAP no meio, 4,1 brotos em meio suplementado com 1 mg.L<sup>-1</sup> de BAP. Com relação ao número de raízes, ocorreu uma diminuição à medida que aumentou a concentração do regulador, sendo 6,9 raízes/explante no meio contendo 0,125 mg.L<sup>-1</sup> de BAP e 2,6 raízes/explante no meio contendo 1 mg.L<sup>-1</sup> de BAP.

Nos trabalhos desenvolvidos com a planta medicinal espinheira santa, Pereira, (1993) estudou a micropropagação das espécies *Maytenus aquifolium* e *Maytenus ilicifolia*. Como explante primário utilizou-se gemas axilares obtidas a partir de plantas adultas das duas espécies e inoculadas em meio MS durante 30 dias. Para a multiplicação, o meio MS foi suplementado com 0,4; 1,0; 3,0 e 6,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP; e os melhores resultados para as duas espécies em estudo quanto à altura das brotações ocorreu na concentração de 0,4 mg.L<sup>-1</sup> de BAP (1,50 e 1,40 cm) respectivamente e quanto ao número de brotações na concentração de 3,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP (3,40 e 3,60) respectivamente. Quando a mesma pesquisadora estudou a ação do BAP juntamente com a CIN, resultados superiores quanto à altura das brotações e número de brotações também ocorreu quando o meio estava suplementado com BAP nas mesmas concentrações já citadas. A altura máxima das brotações para as duas espécies ocorreu quando se adicionou juntamente ao BAP na concentração de 0,4 mg.L<sup>-1</sup> e 0,2 mg.L<sup>-1</sup> de AIA (1,95 e 1,90) respectivamente. Quando testou auxinas no meio para

enraizamento das plântulas, observou que 1 e 2 mg.L<sup>-1</sup> de AIB apresentaram o mesmo efeito quanto ao número, porcentagem e tempo de indução de raízes, sendo 0,1; 2 e 70 dias respectivamente. Quando adicionou 1 e 2 mg.L<sup>-1</sup> de ANA ao meio, a porcentagem foi de 0,2 e o tempo de indução de 78 dias.

Para a obtenção de sucesso no processo de multiplicação, pode-se perceber a essencialidade da presença de citocininas no meio de cultura, como também um menor tamanho das brotações na sua presença, já que maiores alturas das brotações são observadas no meio de cultura isento do regulador. Segundo Grattapaglia & Machado (1998), o excesso de citocinina no meio de multiplicação é tóxico e caracteriza-se pelo demasiado entufamento e falta de alongamento das culturas, redução no tamanho das folhas, encurtamento dos entrenós, engrossamento exagerado dos caules e vitrificação generalizada.

Kulkarni *et al.*, (2000) inocularam sementes de *Withania somnifera* L. em meio MS como fonte de explante para o desenvolvimento dos trabalhos de micropropagação da referida espécie onde testaram 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 1,0 e 5,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP e 0,0; 0,05; 0,1; 0,2 e 0,3 mg.L<sup>-1</sup> de TDZ em explantes nodais, internodais e hipocótilo para obtenção de múltiplas brotações. Maior número de brotos foram obtidos a partir de explantes nodais, em MS nas concentrações de 0,5; 1,0 e 5,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP, sendo 4,53; 4,58 e 4,07, respectivamente. Quando o explante utilizado foi o internodal observaram alto número de brotos em maiores concentrações de BAP, sendo 25 na concentração de 1,0 mg.L<sup>-1</sup> e 40 na concentração de 5,0 mg.L<sup>-1</sup>. Quando utilizaram o TDZ, observaram que 0,2 mg.L<sup>-1</sup> foi capaz de induzir maior número de brotos a partir de explantes nodais (24,13), não ocorrendo indução de brotações nos explantes internodais. Plântulas foram enraizadas em meio MS contendo 0,01 mg.L<sup>-1</sup> de BAP e também MS/2.

O tipo de explante, idade das sementes, tipo de meio, reguladores de crescimento, diferentes extratos complexos e antioxidantes influenciaram os

estudos de micropropagação *in vitro* realizados por Komalavalli & Rao (2000) com a espécie *Gymnema sylvestre*, uma planta medicinal típica de regiões tropicais e subtropicais, muito utilizada para diabetes. O máximo número de brotos (57,2%) foi induzido após 30 dias em explantes nodais axilares em meio MS contendo 1 mg.L<sup>-1</sup> de BAP; 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de cinetina; 0,1 mg.L<sup>-1</sup> de ANA 100 mg.L<sup>-1</sup> de extrato de malte e 100 mg.L<sup>-1</sup> de ácido cítrico e alta frequência de enraizamento (50%) foi obtido com a metade da força dos sais do MS suplementado com 3,0 mg.L<sup>-1</sup> de AIB.

A micropropagação *in vitro* da espécie *Parthenium argentatum* foi conseguida com bastante êxito em cultura de brotos mantidos em meio MS completo suplementado com 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP e 0,025 mg.L<sup>-1</sup> de ANA para indução de múltiplas brotações, posteriormente individualizadas para a metade dos sais do meio MS líquido sem vitaminas ou sacarose, suplementado com 100 mg.L<sup>-1</sup> de AIB, ANA e AIA e mantidas durante 14 a 18 horas no escuro, para enraizamento. Quando o meio estava suplementado com 100 mg.L<sup>-1</sup> de AIB, ocorreu 100% de enraizamento, contra 73% ocorrido nos meios contendo as auxinas ANA e AIA (Castillón & Cornish, 2000).

*Catalpa ovata* (bignoniaceae) é uma planta comum do norte da Ásia, cujas árvores são de interesse ornamental e medicinal, usada no tratamento de asma e diurético. Kataryna & Wysokinska (2000), ao estudarem a propagação *in vitro* da espécie, testaram o meio SH (Schenk & Hildebrant, 1972) e WPM suplementados com BAP nas concentrações de 2,2; 4,4; 8,9 µM juntamente com 6,6 µM de AIA e nas mesmas concentrações mais a de 22,2 µM de BAP, sem a auxina. Conseguiram 96% dos explantes produzindo brotos (4,6) quando utilizaram brotos apicais inoculados em meio SH suplementado com 8,9 µM de BAP e 4,7 brotos/explante quando usaram 4,4 µM de BAP juntamente com 0,6 µM de AIA. Quando o explante utilizado foi segmento nodal, também o meio SH quando suplementado com 2.2 µM de BAP e com 0.6 µM de AIA, propiciou

melhores resultados, 98% dos explantes produziram brotos em uma média de 4,3. Na mesma concentração de BAP em ausência do AIA, a média de brotos produzidos também foi de 4,3, porém apenas 84% dos segmentos nodais produziram brotos. Quando utilizaram o meio MS suplementado com 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de AIB, induziram 80% de enraizamento nas brotações.

Salvi *et al.*, (2001) estudaram a regeneração de plantas de Nim (*Azadirachta indica*) a partir de diferentes explantes, como cotilédones, epicótilo, hipocótilo, raiz, folhas e nós cotiledonares, inoculados em meio de cultura MS suplementado com 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP + 0,1 mg.L<sup>-1</sup> de AIA; obtidos através da germinação de embriões em meio de cultura MS sem adição de reguladores. Maior número de brotos/explante ocorreu nos nós cotiledonares, e 40% dos brotos produziram raiz no meio MS suplementado com 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de AIB.

O protocolo de propagação *in vitro* a partir de segmentos nodais da espécie *Pittosporum napaulensis*, uma planta medicinal endêmica do Himalaia, geralmente propagada por sementes, foi desenvolvido por Dhar *et al.*, (2000). A melhor proliferação de brotos (83,1%), número de brotos/explante (21) e alongamento de brotos (5,5 cm), ocorreu em meio MS suplementado com 5,0 µM de BAP e 0,1 µM de ANA e o enraizamento foi conseguido quando os brotos já regenerados foram inoculados em meio MS líquido com a metade da força dos sais suplementados com 20 µM de AIB, por 48 horas.

Salles *et al.*, (2002) desenvolveram a propagação *in vitro* da espécie *Valeriana glechmifolia* através de brotos apicais em meio MS/3 suplementado com 15 g.L<sup>-1</sup> de PVP e 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose sem regulador de crescimento e de brotos axilares inoculados neste mesmo meio suplementado com 0,4 mg.L<sup>-1</sup> de BAP.

Quando Bello *et al.*, (2002) avaliaram a influência da AIA, AIB e ANA nas concentrações de 0,0; 1,0; 2,5 e 5,0 mg.L<sup>-1</sup> no enraizamento de estacas

micropropagadas da referida espécie, inoculadas em meio MS/3 semi-sólido com 30 g/L de sacarose, observaram que os meios contendo AIB induziram a formação de calos e raízes em todas as concentrações, como as outras auxinas na concentração de 5,0 mg.L<sup>-1</sup>. Os meios com concentrações de 1 e 2,5 mg.L<sup>-1</sup> de ANA e AIA promoveram o enraizamento, além de induzir raízes morfológicamente similares às encontradas nas plantas a campo.

Sementes de *L. ericoides* também foram usadas como fonte de explante para o desenvolvimento dos trabalhos de micropropagação da espécie. Pereira *et al.*, (2002) conseguiram a germinação a partir de sementes assépticas coletadas da planta adulta e inoculadas em meio MS cultivadas durante três meses em meio MS suplementado com 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de ANA e 4,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP. Quando os brotações axilares foram repicadas para o meio MS contendo BAP nas concentrações de 0,25; 0,5; 1,0 e 2,0 mg.L<sup>-1</sup> e 4,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP + 2,0 de AIA, os resultados obtidos mostraram significativa alteração no número de brotos, sendo a concentração de 0,25 mg.L<sup>-1</sup> a mais adequada para o desenvolvimento *in vitro*, onde observaram uma média de 8,7 brotos por explante. O meio MS suplementado com 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de AIB mostrou-se o mais adequado para o enraizamento *in vitro* da espécie.

## 2.9 Anatomia de plantas medicinais

O conhecimento das estruturas internas dos vegetais são de grande importância no entendimento das funções específicas desencadeadas em cada órgão da planta, visto que diferentes condições ambientais influenciam diretamente a sua estrutura anatômica.

Segundo Castro (2002), a compreensão apropriada da estrutura básica de uma planta ou órgão é essencial e indispensável para se chegar a um conhecimento preciso de um vegetal.

As plantas medicinais por serem, pode-se dizer, microlaboratórios naturais, apresentam estruturas e funções específicas no processo de obtenção do princípio ativo, como tricomas, canais secretores, dentre outros, que podem ser totalmente modificados dependendo das condições ambientais em que se encontram.

Os níveis de luminosidade no ambiente influenciam as respostas anatômicas de folhas, caules e raízes. A estrutura das folhas de um grande número de espécies podem ser anatomicamente distintas quando cultivadas em diferentes níveis de luz. Folhas de plantas crescidas em ambientes ensolarados apresentam-se menores, mais espessas em relação às cultivadas à sombra, devido a taxa fotossintética ser mais elevada na primeira condição. Entretanto, é normal na maioria das espécies crescidas à sombra o desenvolvimento de diferentes estruturas anatômicas em folhas. Segundo (Spurr & Barnes, 1980), citados por Castro (2002), as folhas de sombra apresentam-se mais delgadas, mais lobuladas, com epiderme mais fina e mais espaços intercelulares.

Plantas características de regiões com algumas limitações, como precipitação, altas temperaturas, solos geralmente pobres em matéria orgânica e frequentemente salinos, são chamadas de xerófitas (Fahn & Cutler, 1992), onde se encontra a espécie *Lychnophora pinaster*, característica de ambientes extremamente xéricos (Semir, 1991).

Essas espécies xerófitas podem apresentar características anatômicas específicas de adaptação para condições áridas, como redução da área de transpiração, dentre outros. No entanto, algumas estruturas de adaptação para condições áridas também podem ocorrer em algumas espécies de habitat úmido (Fahn & Cutler, 1992).

Fahn & Cutler, (1992) também ressaltam como importante característica, a presença de um grande número de tricomas que cobrem os

órgãos fotossintetizantes, nos quais a parede de sua células basais são completamente cutinizadas (Fahn & Cutler, 1992).

Entretanto, além do habitat da espécie quanto ao suprimento hídrico e regime de luz, em um estudo de anatomia foliar devem ser levados em consideração também, a idade do órgão e sua posição no ramo, devido à relação estreita entre morfologia e anatomia foliar e o ambiente em que a espécie se desenvolve, além de outros fatores que também podem influenciar a estrutura anatômica em plantas, como o comprimento dos entrenós, a formação de pigmentos, o tamanho das nervuras, a espessura das paredes celulares da epiderme, a forma, o tamanho e o número das células do mesofilo, sendo também influenciados em respostas a mudanças na duração diária dos períodos de luz (fotoperíodo) (Castro, 2002).

Quando plantas são cultivadas fora do ambiente natural, anomalias anatômicas que prejudiquem o seu desenvolvimento normal podem ou não ocorrer. Entretanto, de posse de tecnologias altamente benéficas, tais questões não apresentam grandes problemas nesse contexto; e plantas consideradas endêmicas, como a espécie *L. pinaster*, podem perfeitamente ser cultivadas fora do local de origem.

A técnica da cultura de tecidos permite cultivar plantas em condições semelhantes às condições naturais de campo, onde o suprimento hídrico e principalmente o fotoperíodo que afetam diretamente a anatomia foliar, podem ser controlados de acordo com o requerido pela espécie, permitindo a obtenção de plantas anatomicamente perfeitas e idênticas àquelas provenientes das condições naturais.

### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADÁMOLI, J.; MACÊDO, J.; AZEVEDO, L. G.; NETTO, J. M. Caracterização da região dos cerrados. In: GOEDERT, W. J. (Ed.) *Solos dos cerrados: tecnologias e estratégias de manejo*. Planaltina: EMBRAPA-CPAC. 1987. p. 33-98.

ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, C. E. B.; SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F. *Cerrado: espécies vegetais úteis*. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998. 464 p. .

ALMEIDA JR., J. M. G. de. Uma proposta de ecologia humana para o Cerrado. In: PINTO, M. N. (Org) *Cerrado: caracterização, ocupação e perspectivas*. 2. ed. rev. atual. Brasília: UNB, 1993. p. 569-583.

AÑEZ, L. M. M.; VUADEN, E. R.; COELHO, M. F. B. de. *et al.* Superação de dormência em sementes de mata-pasto (*Senna alata* (L)ROXB). In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 57., 2002, Cuiabá. *Anais....* Cuiabá: UFMT, 2002. 1 CD.

ARRIGONI-BLANK, M. F. de.; OLIVEIRA, A. S. dos.; BLANK, A. F.; DANGELLY, L.F.M.; SILVA-MANN, R. Influência da luz e soluções de pó de coco na germinação de sementes de erva cidreira verdadeira (*Melissa officinalis* L.). *Horticultura Brasileira*, Brasília, v. 20, n. 2, p. 366, jul. 2002. Suplemento 1. (CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 42.; CONGRESSO LATINO AMERICANO DE HORTICULTURA, 11., 2002, Uberlândia, MG).

ASSIS, T. F. de.; TELXEIRA, S. L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa-CNPH, 1998. v. 1, p. 261-296.

ÁVILA, F. *Guia ilustrado de plantas do Cerrado de Minas Gerais*. Companhia Energética de Minas Gerais (CEMIG). Empresa das Artes. 2001. 96 p.

AZEVEDO, K. S. de.; PAIVA, R.; SANTOS, C. G. DOS. *et al.* Efeito de diferentes concentrações de sacarose na germinação in vitro de sementes de

copaíba (*Copaiba* spp). In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 27., 2002, Cuiabá. Anais... Cuiabá: UFMT, 2002. 1 CD.

BAJAJ, Y. P. S.; FURMANOWA, M.; OLSZOWSKA, O. Biotechnology of the Micropropagation of Medicinal and Aromatic Plants. In: BAJAJ, Y. P. S. **Medicinal and Aromatic Plants**. 1988. v. 1, p. 60-103. (Biotechnology in Agriculture and Forestry, 4)

BASTOS, M.; CERQUEIRA, S.; SOUZA, J. T.; JÚNIOR, R. A.; PEIXOTO, A. B. F. Ação analgésica do extrato bruto aquoso liofilizado do caule e folhas de *Lychnophora ericoides* Mart (arnica). **Ciência e Cultura**, Campinas, v. 6, p. 551-553, maio/jun. 1987.

BELLO, C. M.; MAURMANN, N.; LUZ, D. I. *et al.* Otimização da micropropagação e enraizamento de *Valeriana glehnmifolia* MEYER. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 17., 2002, Cuiabá. Anais... Cuiabá: UFMT, 2002. 1 CD.

BERTOLUCCI, S. K. V. Micropropagação, calogênese e abordagem fitoquímica in vivo e in vitro de *Tournefortia cf paniculata* Cham. 2000. 79 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica e Agrobioquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

BERTONI, B. W.; PINA, E. S.; FRNAÇA, S. C. de *et al.* Micropropagação de *Zeyheria montana* MART. uma planta medicinal do cerrado. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 27., 2002, Cuiabá. Anais.... Cuiabá: UFMT, 2002. 1 CD.

BEZERRA, J. C. B.; SILVA, I. A.; FERREIRA, H. D.; FERRI, P. H. SANTOS, S. C. Molluscicidal activity against *Biõmphalaria glabrata* of Brazilian Cerrado medicinal plants. **Fitoterapia**, Amsterdam, v. 73, n. 5, p. 428-430, Aug. 2002.

BEZERRA, A. M. E.; ALVES, T. T. L.; OLIVEIRA, M. R.; MEDEIROS, S. M. Propagação sexuada de macela: crescimento inicial da planta. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 2, p. 310, 2002. Suplemento 1. (CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 42., CONGRESSO LATINO AMERICANO DE HORTICULTURA, 11., 2002, Uberlândia). b

BEZERRA, A. M. E.; MOMENTÉ, V. G.; FILHOE, S. M.; INNECCO, R.; MEDEIROS, S. M. Germinação e desenvolvimento de plântulas de cumaru em diferentes substratos. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v. 20, n. 2, p. 368, 2002. Suplemento 1. (CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 42., CONGRESSO LATINO AMERICANO DE HORTICULTURA, 11., 2002, Uberlândia). a

BLANK, A. F.; SANTOS, P. R. dos.; ARRIGONI-BLANK, M. F. de *et al.* Efeito de recipientes e composições de substratos na produção de mudas de erva cidreira verdadeira (*Melissa officinalis* L.). *Horticultura Brasileira*, Brasília, v. 20, n. 2, p. 362, 2002. Suplemento 1. (CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 42., CONGRESSO LATINO AMERICANO DE HORTICULTURA, 11., 2002, Uberlândia).

BOHLMANN, F.; ZDERO, C.; ROBINSON, H.; KING, R. M. Caryophyllene derivatives and a heliangolide from *Lychnophora* species. *Phytochemistry*, Oxford, v. 19, n. 11, p. 2381-2385, Nov. 1980.

BOHLMANN, F.; ZDERO, C.; ROBINSON, H.; KING, R. M. Germacranolides from *Lychnophora* species *Phytochemistry*, Oxford, v. 21, n. 5, p. 1087-1091, May 1982.

BONILLA, M. G. O. Propagação *in vitro*, indução, curva de crescimento de calos e abordagem fitoquímica em *Rudgea viburnoides* (CHAM.) BENTH. 2002. 162 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

BORBA, A. M.; MACEDO, M. Levantamento de plantas medicinais utilizadas como alternativa terapêutica para saúde bucal no Bairro de Santa Cruz – Chapada dos guimarães – Mato Grosso. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 27., 2002, Cuiabá. *Anais....* Cuiabá: UFMT, 2002. 1 CD.

BORELLA, J. C.; LOPES, J. L. C.; VICHENEWSKI, W.; CUNHA, W. R.; HERZ, W. Sesquiterpene lactones, triterpenes and flavones from *Lychnophora ericoides* and *Lychnophora pseudovillosissima*. *Biochemical systematics and ecology*, Oxford, v. 26, n. 6, p. 671-676, Sept. 1998.

BORSATO, M. L. C.; GRAEL, C. F. F.; SOUZA, G. E. P.; LOPES, N. P. Analgesic activity of the lignans from *Lychnophora ericoides*. *Phytochemistry*, Oxford, v. 55, n. 7, p. 809-813, Dec. 2000.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. *Cultura de Tecidos e Transformação genética de Plantas*. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, 1998. v. 1, p. 87-132.

CARDOSO, J. C.; MING, L. C.; PEREIRA, A. M. S. Influência de fitorreguladores em diferentes concentrações e substratos no enraizamento de estacas caulinares de bolsa-de-pastor. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v. 20, n. 2, p. 359, jul. 2002. Suplemento 1. (CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 42.; CONGRESSO LATINO AMERICANO DE HORTICULTURA, 11., 2002, Uberlândia).

CARVALHO, D. A. Flora fanerogâmica de campos rupestre da Serra da Bocaina, Minas Gerais: caracterização e lista de espécies. *Ciência e Prática*, Lavras, v. 16, n. 1, p. 97-122, jan./mar. 1992.

CASTILLÓN, J.; CORNISH, K. A simplified protocol for micropropagation of Guayule (*Parthenium argentatum* Gray). *In Vitro Cellular Development Biology-Plant*, Largo, v. 36, n. 3, p. 215-219, May/June 2000.

CASTRO, E. M. de. Alterações anatômicas, fisiológicas e fitoquímicas em *Mikania glomerata* Sprengel (guaco) sob diferentes fotoperíodos e níveis de sombreamento. 2002. 221 p. Tese (Doutorado em fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

CERQUEIRA, E. S. Propagação e calogênese *in vitro* em erva-de-touro (*Tridax procumbens* L.), uma planta medicinal. 1999. 81 p. Dissertação (Mestrado em fisiologia vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

COELHO, M. C. F. de. Germinação de sementes e propagação "in vitro" de Sucupira Branca [*Pterodon pubescens* (Benth.) Benth. ]. 1999. 119 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

COELHO, M. F. B. DE.; MESSIAS, U. Efeito do ácido indolbutírico no enraizamento de estacas de alecrim. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v. 18, p. 933-934, 2000. Suplemento. (CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 43.; CONGRESSO IBERO-AMERICANO SOBRE UTILIZAÇÃO DE PLÁSTICO NA AGRICULTURA, 2.; SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE PRODUÇÃO DE PLANTAS MEDICINAIS, AROMÁTICAS E CONDIMENTARES, 1., 2000, São Pedro, SP.

COILE, N. C.; JONES JR. , S. B. *Lychnophora* (Compositae: Vernocieae), a genus endemic to the Brazilian planalto. *Brittonia*, New York, v. 33, n. 4, p. 528-542, 1981.

CORRÊA JÚNIOR, C.; MING. L. C. SCHEFFER, M. C. *Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas*. 2 ed. Jaboticabal: FUNEP, 1994. 162 p.

CORREIA, J. R. Solos, paisagem e conservação da biodiversidade do Cerrado. In: IORIS, E. *Plantas Medicinais do Cerrado: perspectivas comunitárias para a saúde, o meio ambiente e o desenvolvimento sustentável*. Anais do Workshop Plantas Medicinais do Cerrado. Mineiros. 1999. p127-148.

CUNHA, W. R.; LOPES, J. L. C.; VICHNEWSKI, W.; DÍAZ, J. G. Eremantholides and guaianolide from *Lychnophora rupestris*. *Pytochemistry*, Oxford, v. 19, n. 2, p. 387-389, May 1995.

DHAR, U.; UPRETI, J.; BHATT, I. D. Micropropagation of *Pittosporum napaulensis* (DC.) Rehder & Wilson - a rare, endemic Himalayan medicinal tree. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v. 63, n. 3, p. 231-235, 2000.

DIAS, B. F. S. Cerrado: uma caracterização. In: INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E RECURSOS NATURAIS/FUNDAÇÃO PRO-NATURA. *Alternativas de desenvolvimento dos cerrados: Manejo e conservação dos recursos renováveis*. Brasília, 1992. p. 11-34

DI STASI, L. C. (Org.). *Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar*. São Paulo: UNESP, 1996. 230 p.

DUARTE, D. S. Estudo químico-biológico de *Lychnophora pinaster* Mart. 1993. 99 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

EINSET, J. W. Woody plant micropropagation with cytokinins. In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.) *High-Tech and Micropropagation 1*. Berlin: Springer-Verlag, 1991. p. 190-201. (Biotechnology in Agriculture and Forestry, 17).

EINTEN, G. Vegetação do Cerrado. In: PINTO, M. N. (Coord.). *Cerrado: caracterização, ocupação e perspectivas*. 2. ed. Brasília: UnB/SEMATEC, 1994. p. 9-65.

ECHEVERRIGARAY, S.; FRACARO, F.; ANDRADE, L. B.; BIASIO, S.; ATTI-SERAFINI, L. *In vitro* regeneration from leaf explants of Roman Chamomile. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v. 60, n. 1, p. 1-4, 2000.

FAHN, A.; CUTLER, D. F. *Xerophytes*. Berlin, 1992. 176 p.

FARIAS, M. R.; SIMÕES, C. M. O.; RECH, N.; BOFF, P. R.; STORB, B. H.; ROVARIS, D. A. Espécies vegetais empregadas na produção de fitoterápicos em Santa Catarina. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 12., 1994, Fortaleza. *Anais. . . Fortaleza*, 1994. p. 125.

FILGUEIRAS, T. Vegetação herbácea arbustiva. In: RIBEIRO, J. F. (Coord.). *Levantamento da biodiversidade do bioma cerrado: um estudo para promover a conservação em Alto Paraíso de Goiás, GO*. Brasília: WWF/EMBRAPA-CPAC, 1994.

FRACARO, F.; ECHEVERRIGARAY, S. Micropropagation of *Cunila galioides*, a popular medicinal plant of south Brazil. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v. 64, n. 1, p. 1-4, 2001.

FRANÇA, S. C. de. Abordagens biotecnológicas para a obtenção de substâncias ativas. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.*(Org.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 3. ed. rev. Porto Alegre/Florianópolis : Ed. Universidade/UFRGS / Ed. UFSC, 2001. p. 105-124.

GAVILANES, M. L. Potencialidade Medicinal de espécies do Cerrado. In: SEMINÁRIO MINEIRO DE PLANTAS MEDICINAIS: Fitoterapicos: uma visão multidisciplinar, 7., Alfenas, 1998. Anais... Alfenas, 1998. p. 14-15.

GILES, K. L.; FRIESEN, K. R. D. Micropropagation. In: SHARGOOL, P. D.; NGO, T. T. (Ed.). *Biotechnological applications of plant cultures*. Canada: CRC series of current topics in plant molecular biology, 1994. p. 111-128.

GIULIETTI, A. M.; FORERO, E. "Workshop" Diversidade taxonômica das angiospermas brasileiras: introdução. *Acta Botanica Brasilica*, São Carlos, v. 4, n. 1, p. 3-10, jan./fev. 1990.

GONÇALVES, W. S. dos; SOUZA, I. G. B.; MARTINS, E. R. Germinação de Fava-Danta (*Dimporphandra mollis*). In: SEMINÁRIO MINEIRO DE PLANTAS MEDICINAIS SER TÃO PLANTA SERTÃO GENTE, 7., 2001, Montes Claros. Anais. . . Montes Claros: UFMG, 2001.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa-CNPQ, 1998. v. 1, p. 183-260.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Biodiversidade: Aspectos biológicos, geográficos legais e éticos. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.*( Org.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 3. ed. rev. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS / Ed. da UFSC, 2001. p. 13-26.

HARLEY, R. M. Introdução. In: STANNARD, B. L. (Ed.). *Flora of the Pico das Almas: chapada Diamantina, Bahia, Brazil*. Richmond, Surrey: Royal Botanic Gardens Kew, 1995. p. 43-76.

HIDALGO, A. F. de. Formas de propagação de espécies de uso medicinal popular no Estado do Amazonas. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v. 18, p. 957, jul. 2000. Suplemento. . (CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 43.; CONGRESSO IBERO-AMERICANO SOBRE UTILIZAÇÃO DE PLÁSTICO NA AGRICULTURA, 2.; SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE PRODUÇÃO DE PLANTAS MEDICINAIS, AROMÁTICAS E CONDIMENTARES, 1., 2000, São Pedro, SP.

HU, C. Y.; FERREIRA, A. G. *In vitro* embryology of *Ilex*. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, 1998. v. 2, p. 371-393.

KATARYNA, L.; WYSOKINSKA, H. *In vitro* propagation of *Catalpa ovata* G. Don. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 60, n. 3, p. 171-176, 2000.

KOMALAVALLI, N.; RAO, M. V. *In vitro* micropropagation of *Gymnema sylvestre* - A multipurpose medicinal plant. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 61, n. 2, p. 97-105, 2000.

KULKARNI, A. A.; THENGANE, S. R.; KRISHNAMURTHY, K. V. Direct shoot regeneration from node, internode, hypocotyl and embryo explants of *Withania somnifera*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 62, n. 2, p. 203-209, 2000.

LAUREANO, L. C. A manipulação artesanal de medicamentos. In: IORIS, E. (Coord.). **Plantas medicinais do cerrado: perspectivas comunitárias para a saúde, o meio ambiente e o desenvolvimento sustentável**, Mineiros. 1999. p. 97-110. Anais do Workshop Plantas Medicinais do Cerrado.

LLOYD, G.; MC COWN, B. Commercially-feasible Micropropagation of moutain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **International plant Propagator's Society Combined proceedings os annual meeting**, Washington, v. 30, p. 421-427, 1981.

MACHADO, L.; OLIVEIRA, S.; SILVA, A. Z. *et al.* Efeitos de concentrações de AIB e substrato na propagação de *Punica granatum*. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 27., Cuiabá, 2002, Cuiabá. Anais... Cuiabá: UFMT, 2002. 1 CD.

MAGALHÃES, G. M. Sobre os cerrados de Minas Gerais. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 38. supl. , p. 59-70, 1966.

MENDONÇA, M. C. da.; ARRIGONI-BLANK, M. F. de.; BLANK, A. F.; SILVA, P. A.; AMANCIO, V. F. Efeito de soluções de pó de coco na germinação de sementes de hortelã (*Mentha piperita* L.). **Horticultura**

Brasileira, Brasília, v. 20, n. 2, p. 367, jul. 2002a. Suplemento 1. (CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 42.; CONGRESSO LATINO AMERICANO DE HORTICULTURA, 11., 2002, Uberlândia, MG.)

MENDONÇA, M. C. DA.; BLANK, A. F.; MENDES, S. S.; OLIVEIRA, A. S.; AMANCIO, V. F. Efeito de recipientes e composições de substratos na produção de mudas de hortelã (*Mentha piperita* L.). *Horticultura Brasileira*, Brasília, v. 20, n. 2, p. 355, jul. 2002b. Suplemento 1. (CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 42.; CONGRESSO LATINO AMERICANO DE HORTICULTURA, 11., 2002, Uberlândia, MG.)

MING, L. C.; CORRÊA JÚNIO, C.; CHAVES, F. C. M. Influência do diâmetro e posição no ramo no pegamento de estacas caulinares de *Pfaffia glomerata* (SPRENG.) PEDERSEN. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 45, 2002, Cuiabá. Anais... Cuiabá: UFMT, 2002. 1 CD.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v. 1, p. 437-496, 1962.

NIMER, E. *Climatologia do Brasil*. Rio de Janeiro: IBGE, 1989. 422 p.

OLIVEIRA, A. S. dos; AMÂNCIO, V. F.; BLANK, A. F.; ARRIGONI, M. F.; MENDONÇA, M. C. Efeito de soluções de pó de coco na germinação de sementes de manjeriço doce (*Ocimum basilicum* L.). *Horticultura Brasileira*, Brasília, v. 20, n. 2, p. 367, jul. 2002. Suplemento 1. (CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 42.; CONGRESSO LATINO AMERICANO DE HORTICULTURA, 11., 2002, Uberlândia, MG.)

PARON, M. E.; LOPES, N. P.; MACHADO, J. O. Estudos de propagação de *Lychnophora ericoides* Mart. (arnica-da-serra). In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 17., 2002, Cuiabá. Anais... Cuiabá: UFMT, 2002. 1 CD.

PEREIRA, A. M. S. Micropropagação de *Maytenus aquifolium* Mart. e *Maytenus ilicifolia* Mart. (espinheira-santa). 1993. 67 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Jaboticabal, SP.

**PEREIRA, F. D.** Propagação in vitro e identificação de metabólitos secundários em chapéu de couro (*Echinodorus cf. saber* RATAJ), uma planta medicinal. 1999. 112 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

**PEREIRA, R. C. A. de.; PINTO, J. E. B. P.; SILVA, F. G.; GOMES, C. C.; ARAUJO, D. K.; BERTOLUCCI, J. A. S.** Efeito de diferentes concentrações de benzilaminopurina na indução de brotações em embriões de unha-de-gato. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v. 20, n. 2, p. 348, jul. 2002. Suplemento 1. (CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 42.; CONGRESSO LATINO AMERICANO DE HORTICULTURA, 11., 2002, Uberlândia, MG.)

**PINHEIRO, R. C.** Abordagem Fitoquímica, rendimento de óleo essencial de *Lychnophora pinaster* Mart. utilizando dois métodos de secagem. 2002. 41 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica e Agrobioquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

**PINTO, J. E. B. P.; LAMEIRA, O. A.** Micropropagação e metabólitos secundários in vitro de plantas medicinais. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 101 p. (Textos Acadêmicos).

**PIRES, M. O.** Cerrado: Sociedade e Biodiversidade. In: IORIS, E. *Plantas Medicinais do Cerrado: perspectivas comunitárias para a saúde, o meio ambiente e o desenvolvimento sustentável*. Mineiros. 1999. p. 155-173. (Anais do Workshop Plantas Medicinais do Cerrado)

**PIVETTA, K. F. L.; CORREA, C. D. S. da; PEDRINHO, D. R.** Efeito de concentrações do ácido indolbutírico no enraizamento de estacas de duas variedades de azaléia. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v. 20, n. 2, p. 369, jul. 2002. Suplemento 1. (CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 42.; CONGRESSO LATINO AMERICANO DE HORTICULTURA, 11., 2002, Uberlândia, MG.)

**PRADO, M. A. do; FREITAS, S. P. de; SUDRÉ, C. P.** Efeitos de concentrações de AIB e substratos na propagação de alecrim. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v. 18, p. 900-901, dez. 2000. Suplemento. (CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 40.; CONGRESSO IBERO-AMERICANO SOBRE UTILIZAÇÃO DE PLÁSTICO NA AGRICULTURA, 2.; SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE PRODUÇÃO DE PLANTASS

MEDICINAIS, AROMÁTICAS E CONDIMENTARES, 1., 2000, São Pedro, SP.)

PUERTAS, A. P.; MARTINS, D. T. de O. Estudo etnobotânico de plantas medicinais conhecidas em Mato Grosso (MT) como amica. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 17., 2002, Cuiabá. Anais.... Cuiabá: UFMT, 2002. 1 CD.

REATTO, A.; CORREIA, J. R.; SPERA, S. T. Solos do bioma Cerrado: aspectos pedológicos. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. de. (Ed.) Cerrado: ambiente e flora. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998. p. 47-86.

REIS, M. S. dos; MARIOT, A. Diversidade natural e aspectos agrônômicos de plantas medicinais. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* Org. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3. ed. rev. - Porto Alegre/Florianópolis : Ed. Universidade/UFRGS/Ed. UFSC, 2001. p. 41-62.

RIBEIRO, J. F.; WALTER, B. M. T. Fitofisionomias do bioma Cerrado. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. de. **Cerrado ambiente e flora**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998. p. 89-166.

RODRIGUES, V. E. G. Levantamento florístico e etnobotânico de plantas medicinais dos cerrados na região do Alto Rio Grande - Minas Gerais. 1998. 235 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

ROSENBECKER, V. K.; SILVA, J. B.; GOMES, J. C. C. et al. Efeito de diferentes concentrações do meio de cultura MS e de BAP na multiplicação de hortelã (*Mentha piperita* L.). In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 17., 2002, Cuiabá. Anais... Cuiabá: UFMT, 2002. 1 CD.

SALLES, L. D. de; SILVA, A. L.; FETT-NETO, A. G.; Von POSER, G. L.; RECH, S. B. *Valeriana glechomifolia: in vitro* propagation and production of valepotiates. *Plant Science*, Clare, v. 163, n, 1, p. 165-168, July 2002.

SALVI, N. D.; SINGH, H.; TIVAREKAR, S.; EAPEN, S. Plant regeneration from different explants od neem. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v. 65, n. 2, p. 159-162, 2001.

SANDES, A. R. R.; DI BLASI, G. Biodiversidade e diversidade Química e genética. In: **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Uberlândia, Ano 2, n. 13, p. 28-32, 2000.

SARTORI, F. T.; SACILLOTO, A. C. B. C.; LOPES, J. L. C.; LOPES, N. P.; VICHNEWSKI, W. Phytochemical study of *Lychnopora markgravii* (Asteraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 30, n. 6, p. 609-612, June 2002.

SASAKI, J. L. S.; YAMAKI, F. L.; SENO, S. Propagação vegetativa do guaco (*Mikania glomerata* Sprengel). **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 2, p. 358, jul. 2002. Suplemento 1. (CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 42.; CONGRESSO LATINO AMERICANO DE HORTICULTURA, 11., 2002, Uberlândia, MG.)

SCHENK, R. V.; HILDEBRANDT, A. C. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 50, n. 1, p. 199-204, Jan. 1972.

SEMIR, J. Revisão taxonômica de *Lychnophora* Mart. (Vernoniaceae: Compositae). 1991. 515. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Universidade de Campinas, Campinas, SP.

SILVA, A. F. DA.; POHLIT, A. M.; SAMPAIO, P. T. DE. Propagação de *Tachia grandiflora* AUBL. por estaquia. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 17., 2002, Cuiabá. Anais... Cuiabá: UFMT, 2002. 1 CD.

SILVA, A. Z.; MACHADO, S. O.; RÉGO, T. J. A. S. de et al. Formas de propagação de espécies medicinais utilizadas no programa de fitoterapia da Universidade Federal do Maranhão. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 17., 2002, Cuiabá. Anais... Cuiabá: UFMT, 2002. 1 CD.

SILVA, R. da.; LUZ, J. M. Q.; CORNETA, E. M.; NUNES, M. F. Propagação vegetativa de estacas de malva-santa (*Coleus barbatus* Benth) em bandejas multicelulares. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 2, p. 309, jul. 2002. Suplemento 1. (CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA. 42.;

CONGRESSO LATINO AMERICANO DE HORTICULTURA, 11., 2002, Uberlândia, MG.)

SILVA, S. M. P. da. Aspectos da fenologia e da reprodução sexuada da arnica (*Lychnophora pinaster* Mart.) - Asteraceae. 1994. 45 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SOCIEDADE BOTÂNICA DO BRASIL. *Centuria plantarum brasiliensium extintionis miniata*. Brasília, 1992. 167p.

SOUSA, C. M.; CORDEIRO, L. F.; MIRANDA, R. M.; REIS, C. V.; CARVALHO, A. C.P. P. Germinação e desenvolvimento de seedlings de Vinca *in vitro*. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v. 20, n. 2, p. 351, jul. 2002. Suplemento 1. (CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA. 42.; CONGRESSO LATINO AMERICANO DE HORTICULTURA, 11., 2002, Uberlândia, MG.)

STAFFLEN, F. A. *International code of botanical nomenclature*. Utrecht: Bohn, Scheltema & Holkema, 1981. p. 430.

TESKE, M.; TRENTINI, A. M. M. *Herbarium compêndio de fitoterapia*. 3. ed. Curitiba, 1997. p. 43.

THIES, S. F.; ROSENBECKER, V. K.; VIÉGAS, J.; *et al.* Micropropagação de camomila romana (*Anthemis nobilis* L.). In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 17., 2002, Cuiabá. *Anais...* Cuiabá: UFMT, 2002. 1 CD.

TIWARI, K. N.; SHARMA, N. C.; TIWARI, V.; SINGH, B. D. Micropropagation of *Centella asiatica* (L.), a valuable medicinal herb. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v. 63, n. 3, p. 179-185, 2000.

VIOL, F.; SWIECH, M.; PIETROVSKI, E. F.; *et al.* Estudo biomonitorado de *Calendula officinalis* L. (Asteraceae), avaliação de metabólitos secundários e investigação de seu potencial antimicrobiano da espécie cultivada no solo e *in vitro*. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 17., 2002, Cuiabá. *Anais...* Cuiabá: UFMT, 2002. 1 CD.

## CAPÍTULO 2

### MICROPROPAGAÇÃO DE *Lychnophora pinaster* MART.

#### RESUMO

SOUZA, Ana Valéria de. Micropropagação de *Lychnophora pinaster* MART. In.\_\_\_\_. Propagação *in vitro* e aspectos anatômicos de (*Lychnophora pinaster*) MART.. 2003. Cap. 2. Dissertação (Dissertação – mestrado em Fitotecnia) Universidade Federal de Lavras, Lavras . \*

Este trabalho foi realizado com o objetivo de estabelecer um protocolo para a micropropagação da arnica por meio de segmentos nodais obtidos de embriões zigóticos assepticamente germinados *in vitro*, finalizando com a aclimatização das plântulas em casa de vegetação, em diferentes substratos. Boa porcentagem de germinação dos embriões e melhor crescimento das plântulas *in vitro* foi obtido em meio MS/4 sólido com 7,5 g de açúcar (padrão). Para a indução de múltiplas brotações, segmentos nodais com 2 gemas axilares inoculados no meio padrão suplementado com níveis de 0,0; 0,25; 0,50 e 1,00 mg.L<sup>-1</sup> de BAP e TDZ foram deixados em sala de crescimento e avaliados aos 45 dias. Pôde-se inferir que o BAP na concentração de 0,62 mg.L<sup>-1</sup> apresentou melhores respostas para a multiplicação. Para o alongamento das partes aéreas das brotações (> 1,00 cm) antes do enraizamento, é preferível que estas sejam deixadas no meio padrão suplementado com 3 mg.L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> durante 19 dias. Para a indução de enraizamento o meio padrão foi suplementado com 1,00 e 2,00 mg.L<sup>-1</sup> de ANA e AIB, onde as brotações permaneceram por 24 hs, 5, 10, 15 e 30 dias. Quando as brotações permaneceram durante 15 dias na presença de 2,00 mg.L<sup>-1</sup> de ANA, ocorreu melhor enraizamento. Na aclimatização, obteve-se 100% de sobrevivência das plântulas no solo do local de ocorrência da espécie e 0% quando usado plantmax®.

---

\* Comitê Orientador: José Eduardo Brasil Pereira Pinto (Orientador), Evaristo Mauro de Castro - UFLA.

## ABSTRACT

SOUZA, Ana Valéria de. *Lychnophora pinaster* MART. micropropagation. In. \_\_\_\_\_. *In vitro* propagation and anatomical aspects of (*Lychnophora pinaster*) MART.. 2003. Cap. 2. Dissertação (Dissertação – mestrado em Fitotecnia) Universidade Federal de Lavras, Lavras . \*

This work was developed with the objective to establish a protocol for arnica's micropropagation, by nodal segments obtained from zygotic embryos aseptically germinated *in vitro* and finishing with plantlets acclimatized in greenhouse using different substratum. Good percentage of the germination and the best growth of the plantlets *in vitro*, occurred in medium MS/4 solid with 7,5 g of sugar (standard). For the induction of the multiple shoots, nodal segments with 2 axillary shoots were inoculated in standard medium supplemented with 0,0; 0,25; 0,50 e 1,00 mg.L<sup>-1</sup> of the BAP and TDZ, maintained in growth room and evaluated at 45 days. Through results, the BAP in the concentration of the 0,62 mg.L<sup>-1</sup> showed the best results for the multiplication. For a length of the aerial parts of arnica's shoots before rooting, is preferable that shoots larger 1,00 cm stay in the standard medium supplemented with 3 mg.L<sup>-1</sup> of GA<sub>3</sub>, for 19 days. For induction to rooting the standard medium was supplemented with 1,00 and 2,00 mg.L<sup>-1</sup> of the NAA and IBA, in which the shoots stayed for 24 hs, 5, 10, 15 and 30 days. When the shoots stayed for 15 days in 2,00 of the NAA, occurred the best rooting. In the acclimatization, obtained 100% of survival of the plantlets in the soil of the occurrence local of the species and 0% when was used plantmax®.

---

\* Comitê Orientador: José Eduardo Brasil Pereira Pinto (Orientador), Evaristo Mauro de Castro - UFLA.

## 1 INTRODUÇÃO

A grande importância do emprego das plantas no tratamento de diversas enfermidades é expressiva no grande aumento no consumo de fitoterápicos pela população no contexto mundial; e também no crescente interesse pela pesquisa científica, tendo em vista os inúmeros trabalhos que vêm sendo realizados em diversas áreas que acreditam no poder terapêutico das plantas medicinais.

A espécie *Lychnophora pinaster* Mart. é uma planta medicinal conhecida popularmente como arnica ou arnica mineira muito utilizada pela população há algumas décadas. É uma espécie nativa característica dos campos rupestres do cerrado brasileiro, considerada endêmica, cujas plantas variam de subarbusto ereto com muitos ramos a pequenos arbustos com 0,4 a 2,4 m e mais raramente arbustos mais altos que geralmente ocorrem em várias populações de poucos indivíduos (Semir, 1991). Sua floração acontece entre os meses de agosto a outubro e a dispersão dos frutos se dá entre os meses de dezembro, janeiro e fevereiro (Silva, 1994). Suas flores são lilazes a púrpuras com 8,0 a 10,0 mm de comprimento (Semir, 1991).

Seu emprego como medicamento é considerável e se faz através de suas folhas e flores aromáticas na forma de extrato alcoólico, como antiinflamatório, anestésico e cicatrizante, em machucados, contusões, hematomas e picadas de insetos. Por ser uma espécie medicinal lenhosa, nativa e endêmica, apresenta certa dificuldade de propagação vegetativa pelo método convencional através de estaquia, como também pela forma sexuada, devido à baixa viabilidade dos aquênios; levando a uma exploração extrativista de forma predatória.

Durante os últimos anos, o interesse em massa pela propagação de plantas medicinais *in vitro* aumentou claramente por serem elas as mais importantes fontes de medicamentos e de outros produtos farmacêuticos (Bajaj *et al.*, 1988). Quando o cultivo convencional é inviável, o emprego de técnicas

biotecnológicas constitui ferramenta bastante útil para a reprodução de exemplares com propriedades desejáveis, como resistência a pragas e a outras condições de estresse, alta produtividade e rendimento em substâncias ativas de interesse (França, 2001).

Vários problemas em biotecnologia de plantas podem ser resolvidos pela técnica da cultura de tecidos, como micropropagação, biossíntese e biotransformação de compostos com atividade biológica, armazenagem de órgãos e células de plantas e engenharia genética. A técnica da micropropagação tem sido a mais utilizada por possibilitar a obtenção de um grande número de plantas idênticas à planta mãe em curto período de tempo e espaço reduzido, produção de clones uniformes, de raros e importantes germoplasmas, como também a introdução de novas variedades, além da manutenção em bancos de germoplasma de espécies ameaçadas de extinção (Bajaj *et al.*, 1988).

Duas estratégias têm sido utilizadas para a micropropagação de espécies lenhosas: a regeneração de calos e a multiplicação de brotos. No entanto, a regeneração de plantas a partir da formação de calo pode não constituir um método seguro no tocante à manutenção da integridade genética desejada da espécie em estudo. A multiplicação de brotos constitui o método mais confiável (Einset, 1991).

Esta técnica vem sendo empregada com sucesso em estudos com diversas espécies medicinais nativas e/ou exóticas e tem mostrado excelentes resultados, como naqueles trabalhos realizados com as espécies medicinais conhecidas popularmente como folha-dura ou douradinha (Bonilla, 2002); marmelinho (Bertolucci, 2000); chapéu-de-couro (Pereira, 1999); Sucupira-branca (Coelho, 1999) e espineira-santa (Pereira, 1993), dentre outras.

Contudo, para a obtenção de tão esperado sucesso em programas de micropropagação com plantas medicinais, certas particularidades devem ser

observadas. O uso de reguladores de crescimento nas diferentes fases do processo pode ser considerado como essencial para a realização dos trabalhos.

Dentre as classes de reguladores de crescimento mais empregados citam-se as citocininas, consideradas necessárias e favoráveis na fase de multiplicação, onde o 6-benzilaminopurina ou BAP te-se sobressaído, além das giberelinas e auxinas, como o ANA, o AIB e o AIA, necessárias ou não na fase enraizamento, dependendo da espécie (Grattapaglia & Machado, 1998).

Como a técnica da micropropagação possibilita a obtenção de grandes sucessos neste contexto e por não existir estudos de propagação com a espécie em questão, neste trabalho procurou-se desenvolver um protocolo de micropropagação para a arnica, por meio de segmentos nodais assepticamente obtidos de embriões zigóticos germinados *in vitro*, e o posterior desenvolvimento das plântulas na fase de aclimatização em casa de vegetação, com diferentes substratos.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Localização do experimento**

O trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais e Plantas Medicinais do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras e na casa de vegetação nas dependências do referido laboratório

### **2.2 Estabelecimento da cultura *in vitro***

#### **2.2.1 Procedência das sementes**

Como fonte de explantes foram utilizados aquênios (sementes) coletados de plantas adultas pertencentes a uma população da espécie localizada em uma área de campo rupestre do Parque Florestal Municipal Abraham Kasinsk, no município de Lavras - MG, com coordenadas de 21°14'30" S e 45°20'10" W e cotas altimétricas variando de 900 a 1200 metros. O clima da região é do tipo Cwb (mesotérmico), segundo a classificação de Köppen, caracterizado por um período quente e úmido (outubro a março) e outro período frio e seco (abril à setembro). A precipitação média anual (média de 25 anos) é de 1529,7 mm e as médias de temperaturas máxima e mínimas são 26,1° C e 14,8° C, respectivamente.

Os aquênios foram coletados durante os meses de outubro a dezembro de 2000 e beneficiados no Laboratório de Análise de Sementes da Universidade Federal de Lavras, através da limpeza por fluxo de ar. Posteriormente foram colocados em béquer de 1000 ml com água destilada e feita a determinação entre aquênios chochos (95%) e não chochos (5%) pelo método densimétrico, sendo descartados os de menor densidade e utilizando-se para os diferentes tratamentos apenas os que imergiram.

### **2.2.2 Desinfestação das sementes**

Em um experimento preliminar de germinação de embriões de arnica, os aquênios selecionados foram imersos em álcool 70% em agitação durante 1 minuto e posteriormente em água sanitária 100% em agitação durante 10 minutos. Depois foram lavados 4X com água destilada autoclavada em câmara de fluxo laminar horizontal.

A partir dos resultados obtidos com a assepsia descrita acima, tendo notado um índice significativo de contaminação dos embriões inoculados; procedeu-se da seguinte maneira: os aquênios selecionados foram imersos em álcool 70%, em agitação durante 1 minuto e posteriormente em água sanitária 100% em agitação durante 20 minutos. Depois foram lavados 6X com água destilada autoclavada em câmara de fluxo laminar horizontal.

### **2.2.3 Efeito do meio de cultura na germinação de embriões de *Lychnophora pinaster* (1).**

Realizou-se um experimento preliminar de germinação de embriões de arnica, para avaliar qual o melhor meio de cultura capaz de promover maior porcentagem de germinação, como também plântulas viáveis para a continuação dos trabalhos de micropropagação.

Os embriões foram retirados com o auxílio de pinça, bisturi e uma lupa estereoscópica em câmara de fluxo laminar horizontal e inoculados diretamente em tubos de ensaio (25 x 150 mm) tampados com tampa plástica e vedados com parafilme. Os meios de cultura utilizados foram MS, MS/2 e MS/4 na consistência sólido e líquido; tendo a água e água + ágar, como controle. Nos meios solidificados utilizou-se 0,6% de ágar. O pH foi ajustado em  $5,7 \pm 0,1$  antes da autoclavagem. Os tubos foram colocados em sala de crescimento sob condições controladas de temperatura  $26 \pm 1^\circ \text{C}$ , fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de  $25 \mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  fornecida por lâmpadas do tipo

fluorescente branca fria. As mesmas condições de preparo do meio sólido, como também, as condições de incubação dos tubos em sala de crescimento foram adotadas em todos os outros experimentos.

Vinte e cinco embriões foram colocados nos diferentes tratamentos em delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC) e avaliados aos 15 dias após a inoculação, quanto à porcentagem de germinação dos embriões, e aos 45 dias quanto ao comprimento da parte aérea e comprimento de raiz.

#### **2.2.4 Efeito do meio de cultura na germinação dos embriões de *Lychnophora pinaster* (2).**

Os embriões foram retirados como descrito anteriormente. Os meios de cultura utilizados foram o MS/4, WPM e WPM/2 na ausência e presença de sacarose cuja concentração correspondeu proporcionalmente à concentração de meio.

Os tratamentos foram dispostos em esquema fatorial 3 x 2, onde o delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), com 8 repetições e 5 tubos/repetição. As avaliações foram realizadas a cada 2 dias, durante um período de 30 dias quanto à porcentagem de germinação dado pela emissão da radícula ou da parte aérea. Os dados foram transformados pela equação  $\sqrt{X + 0,5}$ .

#### **2.2.5 Efeito das citocininas BAP e TDZ na indução de múltiplas brotações em segmentos nodais de *Lychnophora pinaster***

Com o objetivo de avaliar o efeito das citocininas BAP e TDZ em diferentes concentrações capaz de promover a formação de maior número de brotos viáveis ao enraizamento e posterior desenvolvimento normal das plântulas de *Lychnophora pinaster*, instalaram-se dois experimentos. No primeiro experimento foram testadas doses crescentes de BAP: 0,25; 0,5 e 1,00

mg.L<sup>-1</sup>; mais o controle, sem a adição do regulador de crescimento; e no segundo experimento, testou-se o TDZ nas mesmas concentrações citadas, mais o controle, também sem a adição do regulador de crescimento.

Foram utilizados segmentos nodais com aproximadamente 1 cm de comprimento contendo 2 gemas axilares inoculados verticalmente em tubos de ensaio (25 x 150 mm) tampados com tampa plástica e vedados com parafilme. O meio utilizado foi MS/4 com 7,5 g.L<sup>-1</sup> de sacarose. As avaliações foram realizadas aos 45 dias, quanto ao número de brotações/segmento nodal e comprimento das brotações.

Os experimentos foram conduzidos utilizando-se o delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), sendo cada tratamento constituído de 5 repetições e 4 tubos/repetição.

#### **2.2.6 Efeito do tempo de permanência em GA<sub>3</sub> no alongamento de partes aéreas das brotações de *Lychnophora pinaster***

Com o objetivo de avaliar a influência do GA<sub>3</sub> no alongamento de partes aéreas de brotações de arnica, visto que estas não apresentavam tamanho adequado para o enraizamento, instalou-se esse experimento.

As brotações foram separadas em tamanho pequeno – (até 1 cm) e tamanho grande (de 1 a 1,5 cm) e medidas aleatoriamente as alturas de 10 brotações pequenas e 10 brotações grandes no dia da inoculação.

Estas foram inoculadas verticalmente em tubos de ensaio (25 x 150 mm) tampados com tampa plástica e vedados com parafilme. O meio utilizado foi MS/4 com 7,5 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, suplementado com 3 mg.L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>.

As brotações permaneceram no meio com GA<sub>3</sub> durante 5, 10 e 15 dias; e posteriormente foram transferidas para o mesmo meio de cultura na ausência do regulador e 30 dias, o qual foi considerado como período constante de permanência.

Aos 30 dias após a transferência, avaliou-se o comprimento da parte aérea de todas as plântulas grandes e pequenas. Aquelas plântulas deixadas no tratamento constante não foram transferidas, e também foram avaliadas ao final dos 30 dias.

O experimento foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), onde os tratamentos foram dispostos em esquema fatorial 2x4, constituído de 5 repetições e 4 tubos/repetição.

### **2.2.7 Efeito do tempo de permanência nas auxinas ANA e AIB sobre o enraizamento de brotações de *Lychnophora pinaster***

Com o objetivo de avaliar o tempo de permanência X efeito das auxinas AIB e ANA em diferentes concentrações sobre a indução de enraizamento em plântulas de *Lychnophora pinaster*, instalaram-se dois experimentos. O meio utilizado foi o MS/4 com 7,5 g.L<sup>-1</sup> de sacarose. No primeiro experimento, o meio foi suplementado com doses crescentes de ANA nas concentrações de 1,00 e 2,00 mg.L<sup>-1</sup>, onde alternou-se o tempo de permanência das plântulas em 24 horas, 5; 10; 15 e 30 dias. No segundo experimento, o meio foi suplementado com AIB nas mesmas doses de ANA (1 e 2 mg.L<sup>-1</sup>), onde as plântulas permaneceram durante os mesmos períodos de tempo citados (24 horas, 5; 10; 15 e 30 dias).

As plântulas foram inoculadas verticalmente em tubos de ensaio (25 x 150 mm) tampados com tampa plástica e vedados com parafilme. O período de 30 dias foi tomado como controle, já que as plântulas permaneceram constantemente. Nos outros tratamentos, após o tempo de permanência, as plântulas foram transferidas para o mesmo meio de cultura na ausência do regulador. As avaliações foram realizadas aos 30 dias após a transferência, quanto ao comprimento da parte aérea e número total de raízes.

[REDACTED]

O delineamento experimental utilizado para os dois experimentos, foi o inteiramente casualizado, onde os tratamentos foram dispostos em esquema fatorial 2 x 5, constituído de 5 repetições e 4 tubos/repetição.

### 2.2.8 Efeito do tipo de substrato na aclimatização de plântulas de *Lychnophora pinaster*

Com o objetivo de avaliar o tipo de substrato adequado para aclimatização de plântulas de *Lychnophora pinaster* obtidas a partir da cultura de tecidos, quanto à sua sobrevivência e posterior desenvolvimento, instalou-se este experimento.

As plântulas enraizadas *in vitro* foram levadas à casa de vegetação e transplantadas para copos plásticos de 50 ml contendo plantmax<sup>®</sup>; solo do local de ocorrência da espécie e plantmax<sup>®</sup> + solo do local de ocorrência da espécie, na proporção de 1:1 e cobertos com saco plástico para manutenção da umidade durante 7 dias. Após a retirada dos sacos plásticos, as plântulas foram deixadas em casa de vegetação sob sombrite, onde permaneceram por 45 dias. Durante todo esse período de condução do experimento, as plântulas foram avaliadas semanalmente quanto ao desenvolvimento da parte aérea, irrigadas quando necessário. Ao final dos 45 dias, foi feita a avaliação final, quanto à porcentagem de sobrevivência das plântulas nos diferentes substratos, observando-se também o seu crescimento.

O experimento foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado em casa de vegetação, onde cada tratamento se constituiu de 10 repetições.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Desinfestação das sementes e germinação de embriões de arnica *in vitro*

Para o início da condução dos trabalhos de micropropagação de espécies de interesse, uma das fases, pode-se dizer mais críticas, é o estabelecimento do explante inicial *in vitro*, pois como o material é coletado no campo ou em casa de vegetação, fora de condições totalmente assépticas; certo índice de contaminação por patógenos, como fungos, pode ser significativo, se a metodologia desenvolvida para a assepsia deles não for adequada. Entretanto, quando o explante inicial for no caso, embriões, a contaminação poderá ser mínima, e talvez esse problema não seja tão significativo, visto que os embriões das fanerógamas estão alojados em óvulos protegidos pelas paredes do ovário, estando portanto, encerrados dentro de um ambiente estéril. Nesse caso, é necessário então, a adequada assepsia de sementes e frutos para que os embriões, quando excisados, não sejam contaminados.

Segundo Hu & Ferreira (1998), hipoclorito de sódio e etanol são os desinfestantes de uso mais freqüente e humectantes como o Tween 20 ou 80, ou detergentes de cozinha podem ser adicionados, no intuito de aumentar a eficácia do procedimento.

Dependendo do tipo da estrutura física que envolve o embrião, como no caso da arnica onde os aquênios possuem várias reentrâncias, as metodologias de assepsia a serem empregadas já em condições de laboratório, talvez devam ser mais rigorosas quanto à concentração da solução desinfestante e também quanto ao tempo de exposição do explante nesta solução. Entretanto, concentrações das soluções desinfestantes, assim como as combinações dos princípios ativos desinfestantes e os tempos de exposição, podem variar muito (Grattapaglia & Machado, 1998).

Além do fator contaminação, sabe-se que o meio de cultura a ser utilizado nesta primeira fase também influencia diretamente no estabelecimento do explante *in vitro*. A diversidade de formulações, concentrações de macro e micronutrientes, presença ou ausência de fonte de energia (sacarose), além de sua condição sólido, líquido, ou semi-sólido devem ser consideradas.

Como é a primeira vez que se estuda a propagação *in vitro* da espécie *L. pinaster*, experimentos preliminares de assepsia e germinação de embriões como explante inicial, se fizeram necessários por permitirem avaliar qual a melhor concentração do meio de cultura MS capaz de promover maior porcentagem de germinação dos embriões e o desenvolvimento normal das plântulas, além da eficiência da assepsia.

Durante a assepsia, quando o tempo de exposição dos aquênios na solução desinfestante ocorreu por apenas 10 minutos, mesmo utilizando-se água sanitária na concentração de 100%, os resultados não se mostraram satisfatórios (Figura 1).

Conforme os resultados apresentados na Figura 1, nota-se que a metodologia de assepsia desenvolvida neste experimento preliminar não foi altamente eficiente para a desinfestação dos aquênios, visto a porcentagem de contaminação considerável dos embriões de arnica inoculados *in vitro* em todos os tratamentos, em geral.

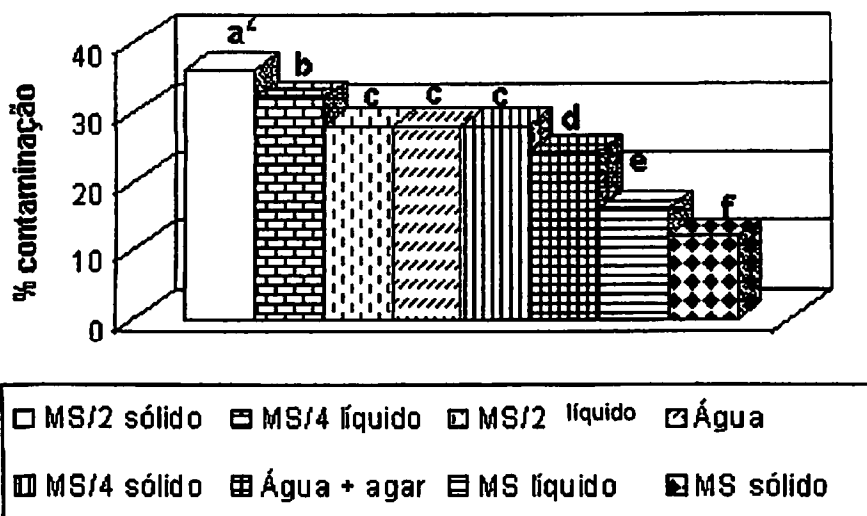


FIGURA 1. Valores médios das variáveis de resposta para porcentagem de contaminação de embriões de arnica *in vitro* inoculados em diferentes meios de cultura em diferentes condições. UFLA, Lavras – MG, 2003.

<sup>z</sup> Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% probabilidade.

A concentração dos meios de cultura utilizados no estabelecimento do explante inicial *in vitro* podem influenciar no seu desenvolvimento. Observa-se pelos resultados apresentados na Tabela 1 que a germinação dos embriões e o crescimento das plântulas de arnica foram influenciados pelos diferentes meios no qual foram inoculados.

TABELA 1. Valores médios para porcentagem de germinação de embriões *in vitro* aos 15 dias seguida do intervalo de confiança (I.C.) e valores médios para comprimento da parte aérea – cm (PA) e comprimento de raízes – cm (CR) de plântulas de *Lychnophora pinaster* aos 45 dias. UFLA, Lavras – MG, 2003.

Tratamentos	% sementes germinadas	PA	CR
Água	56 I. C.[ 0,36 ; 0,76 ]	0,54	0,28
Água + ágar	56 I. C.[ 0,36 ; 0,76 ]	0,41	1,14
MS sólido	48 I. C.[ 0,28 ; 0,68 ]	0,55	0,95
MS líquido	60 I. C.[ 0,41 ; 0,79 ]	0,49	2,5
MS/2 sólido	44 I. C.[ 0,24 ; 0,64 ]	0,50	1,91
MS/2 líquido	48 I. C.[ 0,28 ; 0,68 ]	0,49	4,1
MS/4 sólido	68 I. C.[ 0,50 ; 0,86 ]	0,80	2,97
MS/4 líquido	56 I. C.[ 0,36 ; 0,76 ]	0,69	4,0

O meio MS em menores concentrações proporcionou melhores resultados, sendo o meio MS/4 sólido o melhor, com 68% de embriões germinados e maior comprimento da parte aérea. O tratamento MS/2, mesmo com a concentração mais diluída, apresentou porcentagem de germinação inferior a 50%, tanto no líquido como sólido, e neste último, as plântulas não apresentaram crescimento satisfatório da parte aérea e da raiz, sendo os comprimentos 0,50 cm e 1,91 cm respectivamente (Tabela 1).

De acordo com Grattapaglia & Machado (1998), meios geleificados são mais utilizados na fase de isolamento, embora em alguns casos melhores resultados possam ser obtidos quando se utiliza meios líquidos, como aconteceu

para a característica comprimento das raízes. Maior comprimento foi obtido em condições líquidas, mas também em menores concentrações do meio MS, onde o meio MS/4 não diferiu do MS/2. Resultados semelhantes foram obtidos quando Coelho (1999), conseguiu maior comprimento da raiz em embriões de sucupira branca inoculados em meio MS líquido diluído para metade da força dos sais dos macro e micronutrientes, suplementado com vitaminas de MS e 2% de sacarose.

Altas concentrações de nutrientes como no meio MS completo, não se mostraram adequadas quanto às características avaliadas, como também a sua ausência, quando se utilizou apenas água, onde a porcentagem de germinação foi de apenas 56% nas duas condições, além do baixo crescimento da parte aérea e das raízes (Tabela 1). No meio MS sólido completo, além da porcentagem de germinação ter sido menor que 50% e o comprimento médio das raízes não terem atingido nem 1,0 cm, várias plântulas apresentaram-se vitrificadas, e portanto, inviáveis como fonte de explante secundário. Esse fato pode ter ocorrido em função da elevada concentração de macronutrientes neste meio, como também devido a alta concentração de sacarose, visto que concentrações acima de 4% de sacarose podem incorrer em problemas de redução do potencial hídrico do meio e causar alguns problemas nas plântulas (Grattapaglia & Machado, 1998), dependendo da espécie, como neste caso, a ocorrência de vitrificação.

De acordo com esses resultados, pode-se concordar quando Grattapaglia & Machado (1998), afirmam que o meio MS em 100% de sua concentração não tem se mostrado satisfatório em alguns casos para espécies lenhosas, e composições mais diluídas podem apresentar melhores resultados.

A espécie *L. pinaster* é característica de ambientes pobres em fertilidade do solo; quando estabeleceu-se o seu cultivo *in vitro*, exigência semelhante quanto a nutrição mineral pode ter ocorrido, visto que aquelas plântulas obtidas

a partir da germinação de embriões *in vitro*, cultivados em menores concentrações de nutrientes em condições de meio sólido, apresentaram-se perfeitamente viáveis como fonte de explante secundário (segmento nodal), para a continuação dos trabalhos de micropropagação, ao contrário daquelas obtidas a partir de embriões germinados no meio MS completo, com maior concentração.

Na Figura 2 observa-se os aquênios, embriões e o efeito das diferentes concentrações do meio MS em condição sólida e líquida utilizado na germinação de embriões *in vitro* de *Lychnophora pinaster*.

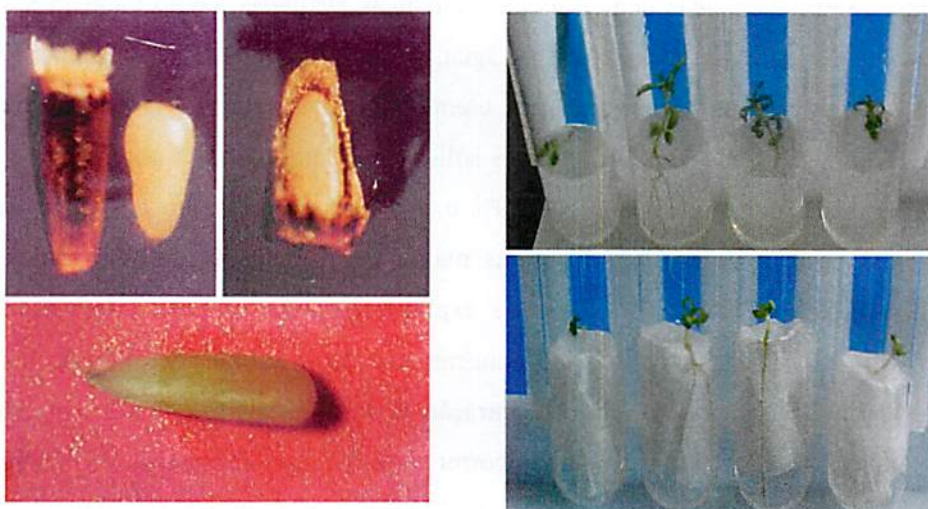


FIGURA 2: Aspecto geral dos aquênios, embriões e plântulas de *Lychnophora pinaster* germinadas em água; MS/4; MS/2 e MS, em condições sólida e líquida aos 45 dias. UFLA, Lavras – MG, 2003.

Quando Conceição (2000), estudou a germinação de sementes de timbó (*Derris urucu*), verificou que as variações nas concentrações dos sais de macro e micronutrientes do meio MS não interferiram no número de sementes germinadas aos 12 dias de cultivo *in vitro*, não existindo diferença estatística entre os meios MS; MS/2; MS/4; 1/8 e 1/16. Entretanto, em mesma data, o

número de sementes germinadas variou de 70 a 85% respectivamente, para os meios MS/4 e 1/8 das concentrações de sais dos macro e micronutrientes do meio MS.

Nos trabalhos de germinação de sementes e propagação *in vitro* de sucupira branca desenvolvidos por Coelho (1999), houve uma superioridade dos embriões quanto ao índice de germinação *in vitro*, número de folhas, comprimento da raiz e comprimento da parte aérea; quando comparados com sementes escarificadas e/ou seccionadas, nas mesmas características. Entretanto, houve uma superioridade do meio líquido, tanto na germinação quanto no crescimento de embriões quando comparado aos meios em diferentes condições gelificantes. Como se sabe que diferentes respostas dependem da espécie em estudo, resultados diferentes foram encontrados com a espécie *L. pinaster*.

A partir dos resultados obtidos no experimento preliminar descrito acima, deu-se continuidade aos trabalhos.

### **3.2 Efeito do meio de cultura na germinação de embriões de *Lychnophora pinaster***

A partir dos resultados obtidos com a assepsia das sementes descrita anteriormente, foi notado um índice significativo de contaminação dos embriões. Assim, quando se utilizou água sanitária a 100% e se aumentou o tempo de exposição dos aquênios nesta solução de 10 para 20 minutos em agitação, lavando posteriormente seis vezes em água destilada autoclavada, obteve-se 0% de contaminação dos embriões *in vitro*.

Sementes de *L. ericoides* também foram usadas como fonte de explante para o estudo de micropropagação da espécie. Estas foram lavadas em água corrente por 12 horas, posteriormente colocadas em agitação em solução contendo 1% de Benomyl por 24 horas, depois imersas em álcool 70% durante 1 minuto e finalmente imersas em solução de hipoclorito de cálcio 0,5% por 30

minutos (Pereira *et al.*, 2002). No entanto, mesmo que esta metodologia tenha sido eficiente na desinfestação das sementes da referida espécie, nota-se a necessidade de maior tempo na sua condução, podendo inferir, neste contexto, que a metodologia de assepsia descrita acima para a espécie *L. pinaster* é altamente eficiente quando o explante inicial é embrião, como também bastante rápida para o início da condução dos trabalhos.

De acordo com os resultados do experimento preliminar de germinação dos embriões, selecionou-se dentre os meios utilizados, aquele que melhor sobressaiu em todas as características avaliadas, excetuando-se a contaminação, ou seja, MS/4 sólido, com o objetivo de compará-lo aos meios WPM e WPM/2, e também a presença de uma fonte de energia, aqui, sacarose; visto que, dependendo da espécie, não há necessidade de suplementação do meio com esta.

O experimento preliminar confirmou a necessidade da utilização de meios de cultura menos concentrados no estabelecimento do explante inicial da espécie em estudo, no caso embriões; e optou-se por essa comparação, visto ser o meio WPM, composto por baixa concentração de nutrientes e muito utilizado para estudos com espécies lenhosas.

Como no experimento preliminar, aqui também houve diferença na porcentagem de germinação de embriões de arnica cultivados *in vitro*. Observa-se que a germinação dos embriões de arnica não foram homogêneos, necessitando de um período mais longo para se obter uma boa porcentagem de germinação. De modo geral, notou-se que embriões de arnica quando inoculados *in vitro* iniciaram a germinação a partir do 4º dia, e já no 6º dia após a inoculação todos os tratamentos apresentavam embriões germinados, sem diferença estatística (Tabela 2 e Figura 3).

TABELA 2. Resumo da análise de variância para porcentagem de germinação de embriões de amíga *in vitro* aos 6 dias após inoculação. UFLA, Lavras – MG, 2003. Dados transformados  $\sqrt{X + 0.5}$ .

Fonte de variação	GL.	QM	% germinação
Tratamento	5	0,0205	0,62 <sup>ns</sup>
Resíduo	234	0,0330	
CV (%)	23,27		

<sup>ns</sup> - não significativo

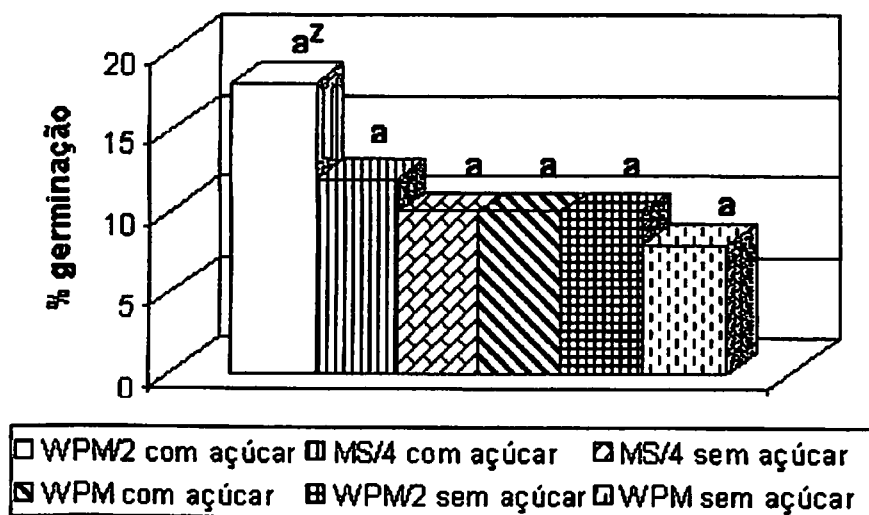


FIGURA 3. Valores médios das variáveis de resposta para porcentagem de germinação de embriões de amíga *in vitro* inoculados em diferentes meios de cultura aos 6 dias após inoculação. UFLA, Lavras – MG, 2003.

<sup>z</sup> Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Scott-Knott ao nível de 5% probabilidade.

De acordo com os resultados obtidos através da análise de variância (Tabelas 3 e 4), pode-se observar que os tratamentos utilizados influenciaram significativamente na germinação dos embriões de arnica cultivados *in vitro* aos 16 e 30 dias após a inoculação.

TABELA 3. Resumo da análise de variância para porcentagem de germinação de embriões de arnica *in vitro* aos 16 dias após inoculação. UFLA, Lavras – MG, 2003. Dados transformados  $\sqrt{X + 0.5}$ .

Fonte de variação	GL.	QM	% germinação
Tratamento	5	0,2429	3,85**
Resíduo	234	0,0630	
CV (%)	26,59		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

TABELA 4. Resumo da análise de variância para porcentagem de germinação de embriões de arnica *in vitro* aos 30 dias após inoculação. UFLA, Lavras – MG, 2003. Dados transformados  $\sqrt{X + 0.5}$ .

Fonte de variação	GL.	QM	% germinação
Tratamento	5	0,2396	4,15**
Resíduo	234	0,0577	
CV (%)	23,07		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Apesar do meio WPM ser bastante empregado no cultivo *in vitro* de espécies lenhosas; pode-se observar, de acordo com os resultados apresentados na Figura 4, uma superioridade do meio MS/4, na porcentagem de germinação dos embriões de arnica *in vitro*.

Aos 16 dias de cultivo, nota-se que não ocorreu diferença estatística quando o meio MS/4 é comparado ao meio WPM/2. Entretanto, aos 30 dias de cultivo, o meio WPM/2 com açúcar diferenciou.

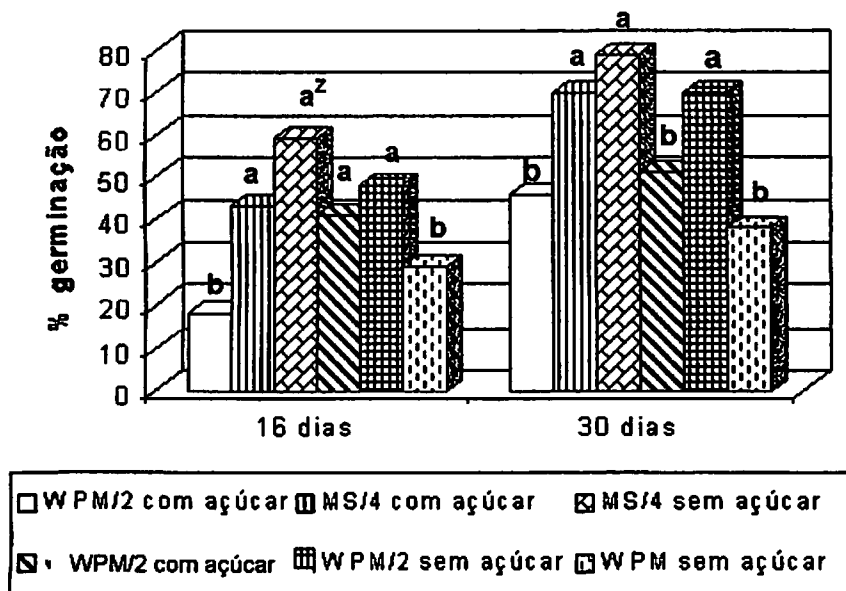


FIGURA 4. Valores médios das variáveis de resposta para porcentagem de germinação de embriões de arnica *in vitro* inoculados em diferentes meios de cultura em diferentes concentrações aos 16 e 30 dias após inoculação. UFLA, Lavras – MG, 2003.

<sup>2</sup> Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Scott-Knott ao nível de 5% probabilidade.

Quando se comparam os tratamentos com presença ou ausência de sacarose, pode-se inferir que os meios MS/4 e WPM/2 sem açúcar não diferiram estatisticamente dos meios MS/4 e WPM/2 com açúcar, principalmente aos 16 dias após a inoculação, existindo uma superioridade do meio MS/4 em relação ao meio WPM/2, principalmente na ausência de sacarose. Aos 30 dias de

cultivo, apenas o meio WPM/2 sem açúcar com 70 % de embriões germinados iguala-se estatisticamente aos meio MS/4 com açúcar, também com 70 % de embriões germinados e ao meio MS/4 sem açúcar, quando este apresentou 79% de embriões germinados, valor este aproximado daqueles resultados obtidos por Conceição (2000), quando estudou o cultivo *in vitro* de sementes de timbó e obteve 70% de sementes germinadas, aos 12 dias.

Os embriões inoculados em meio WPM completo, tanto na presença como na ausência de sacarose, não apresentaram boa porcentagem de germinação - menos que 50% em nenhuma das duas datas avaliadas (Figura 4). Certa variabilidade também ocorreu durante a germinação dos embriões *in vitro*; esta foi maior até os 16 dias, quando os melhores tratamentos com mais embriões germinados, apresentaram uma variabilidade entre 41 e 59 %. Aos 30 dias, nota-se menor variabilidade; 70 e 79%, entre os tratamentos com maior número de embriões germinados.

Fontes de carbono talvez possam ser dispensadas nesta primeira fase se o explante inicial for embriões, como neste caso, por possuírem certa quantidade de energia nos tecidos de reserva, como o endosperma, suficiente para o início do processo de germinação, além do fato da presença de sacarose no meio de cultura para explantes iniciais desta natureza, dependendo da sua concentração, poder causar certa vitrificação das plântulas.

No presente trabalho não foi observado a ocorrência de nenhuma plântula vitrificada após a germinação. Entretanto, ocorreu um inconveniente: plântulas germinadas à partir daqueles embriões inoculados em meio de cultura sem açúcar não apresentaram um bom crescimento, morrendo logo em seguida. Esse fato pode ter ocorrido devido ao esgotamento das reservas dos embriões para a germinação, não possuindo eles quantidade suficiente para um crescimento satisfatório das plântulas, já que os embriões da arnica são

pequenos; com 0,2 cm em média e também por não existir no meio de cultura a fonte de energia necessária.

No meio WPM/2 sem açúcar, mesmo com 70% de embriões germinados, houve necessidade da transferência das plântulas quando ai germinadas; para um meio contendo fonte de energia para o seu desenvolvimento normal. Entretanto, não havendo diferença estatística entre o meio MS/4 sem açúcar e o meio MS/4 com açúcar, mesmo este último apresentando 9% a menos de embriões germinados, optou-se pela sua seleção, como o meio mais adequado para a continuidade dos trabalhos de micropropagação com a espécie, visto não haver a necessidade da transferência das plântulas germinadas.

Resultados semelhantes foram obtidos por Sousa *et al.*, (2002) quando estudaram a germinação e o desenvolvimento de seedlings de vinca *in vitro*, sob três níveis de concentração dos sais contidos no meio MS (0; 25 e 50%), combinados com quatro níveis de sacarose (0; 2; 4 e 6 %), na ausência de luz ou fotoperíodo de 16 horas. Maiores taxas de germinação foram obtidas em ausência de luz, com menores concentrações de sacarose. Entretanto, os seedlings não se apresentaram viáveis para manutenção da espécie *in vitro*. Seedlings obtidos nos meios com 25 e 50% da concentração de sais do meio MS, combinados com as maiores concentrações de sacarose, sob fotoperíodo de 16 horas, mostraram-se melhores para implantar, manter e multiplicar a cultura *in vitro*.

Entretanto, quando Azevedo *et al.*, (2002), estudaram o efeito de diferentes concentrações de sacarose na germinação *in vitro* de sementes de copaíba (*Copaiba spp*), juntamente com o ácido giberélico, em meio MS, concluíram que não houve diferença estatística na porcentagem de germinação, independente do uso ou não de giberelina e o maior número de sementes germinadas (92%) foi observada em meio sem a adição de sacarose.

Como é muito comum a utilização da mesma composição básica do meio de cultura no isolamento e na multiplicação, além de meios mais diluídos também apresentarem melhores resultados na fase de enraizamento e sendo nesse caso o meio MS/4 o melhor, ele foi empregado para todos os experimentos seguintes.

### **3.3 Efeito das citocininas BAP e TDZ na indução de múltiplas brotações em segmentos nodais de *Lychnophora pinaster***

A suplementação do meio de cultura com citocininas nesta fase é essencial para a obtenção de sucessos no tocante à multiplicação, dependendo da espécie. Diferentes respostas, porém, também podem ser obtidas dependendo do tipo e da concentração da citocinina empregada. No caso da espécie *L. pinaster*, pôde-se notar que a presença, o tipo e a concentração desta classe de reguladores são fundamentais neste contexto.

Quando segmentos nodais de arnica foram inoculados em meio de cultura contendo citocinina, para a proliferação de múltiplos brotos, notou-se que, tanto o número quanto o comprimento dos brotos foram influenciados pelas diferentes citocininas empregadas, como também pelas suas concentrações (Tabelas 5 e 6). Grattapaglia & Machado (1998) afirmam que o tipo de citocinina e sua concentração são os fatores que mais influenciam o sucesso da multiplicação *in vitro*.

Quando se testou diferentes concentrações de BAP, pôde-se notar que esta influenciou significativamente as variáveis em estudo aos 45 dias, de acordo com os resultados da análise de variância apresentados na Tabela 5, ao passo que resultados bem diferentes foram encontrados quando se testou o TDZ. Nesse caso, não houve diferença estatística quanto ao número e comprimento dos brotos entre as diferentes concentrações testadas, como pode-se notar pelos resultados da análise de variância apresentados na Tabela 6.

TABELA 5: Resumo da análise de variância para número de brotos (NB) e comprimento de brotos (CB), aos 45 obtidos de segmentos nodais de *Lychnophora pinaster* submetido a diferentes concentrações de BAP. UFLA, Lavras – MG, 2003.

Fontes de variação	GL	Quadrados médios	
		NB	CB
BAP	3	3,124**	0,022**
Resíduo	16	0,280	0,004
CV (%)		14,22	22,13

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

TABELA 6: Resumo da análise de variância para número de brotos (NB) e comprimento de brotos (CB) aos 45 dias, obtidos de segmentos nodais de *Lychnophora pinaster* submetido a diferentes concentrações de TDZ. UFLA, Lavras – MG, 2003.

Fontes de variação	GL	Quadrados médios	
		NB	CB
TDZ	3	0,285 <sup>ns</sup>	0,004 <sup>ns</sup>
Resíduo	16	0,239	0,003
CV (%)		20,94	25,28

<sup>ns</sup> - não significativo

Diferentes respostas podem ser obtidas dependendo da espécie em estudo, mas Grattapaglia & Machado (1998) afirmam que o BAP têm se mostrado muito eficaz e parece ser a citocinina por excelência para multiplicação de partes aéreas e indução de gemas adventícias. Por outro lado, a indução de gemas axilares em *Psiadia arguta* (Asteraceae) foi satisfatória em

meio MS suplementado com TDZ na concentração de 1,00 mg.L<sup>-1</sup> (Kodja, *et al.*, 1998).

Como pode-se verificar na Figura 5, no caso da espécie *L. pinaster*, obteve-se uma diferença no número de brotos/segmento nodal à medida que variou a concentração de BAP no meio de cultura.

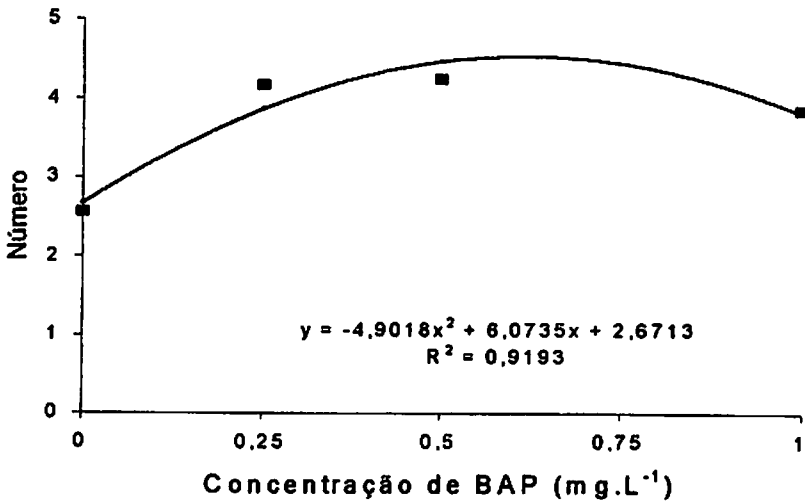


FIGURA 5 .Número de brotos de *Lychnophora pinaster* aos 45 dias em função de diferentes concentrações de BAP. UFLA, Lavras – MG, 2003.

A concentração da citocinina empregada na multiplicação de partes aéreas *in vitro*, além de estar diretamente ligada ao número de brotos obtidos, pode afetar diretamente o sucesso dos trabalhos, visto que quando se usa de concentrações maiores, dependendo da espécie, pode ocorrer uma toxidez que causa entufamento e falta de alongamento das culturas, além de uma vitrificação.

Com relação ao BAP, pode-se observar na Figura 5 que maior número de brotos (4,6) foram obtidos em meio suplementado com menores concentrações, sendo mais precisamente a concentração de  $0,62 \text{ mg.L}^{-1}$  a melhor, após 45 dias de cultivo. Maiores concentrações de BAP não promoveram resultados satisfatórios quando comparadas ao número de brotos obtidos em menores concentrações, pois à medida que se aumentou a sua concentração no meio de cultura, houve uma diminuição dos mesmos. Nos segmentos nodais de arnica inoculados em  $1,00 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP, o número médio de brotos obtidos variou em torno de 3,8. Para *Petasites hybridus* (Asteraceae), um estudo determinou que entre várias concentrações de BAP em combinação com  $0,10 \text{ mg.L}^{-1}$  de ANA, a dose de  $3,96 \text{ mg.L}^{-1}$  foi a mais eficiente na indução de brotações. Segundo o autor, esta melhor resposta em maiores concentrações de BAP se deve à redução na quantidade de polifenóis livres (Wildi, 1998).

Nos tratamentos tomados como controle, ou seja, meio de cultura sem a adição do regulador, não houve multiplicação; mas apenas a regeneração das gemas axilares, visto que os segmentos nodais foram inoculados contendo em média 2 gemas/segmento nodal.

Quando se avaliou o comprimento dos brotos aos 45 dias, os resultados também foram diferentes entre as duas citocininas empregadas. Quando testou-se o BAP, o comprimento dos brotos foi significativamente influenciado em função da sua concentração e maior comprimento ( $0,32 \text{ cm}$ ) foi obtido também com menores concentrações do mesmo, sendo mais precisamente a concentração de  $0,07 \text{ mg.L}^{-1}$ , a melhor (Figura 6).

No meio contendo  $1,00 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP, além do número de brotos, como também seus tamanhos terem sido menores quando comparados às outras concentrações do mesmo, estes também se mostraram com sintomas de entufamento e vitrificação, como pode ocorrer com algumas espécies, quando

maiores concentrações de citocinina são adicionadas ao meio de cultura, causando certa toxidez.

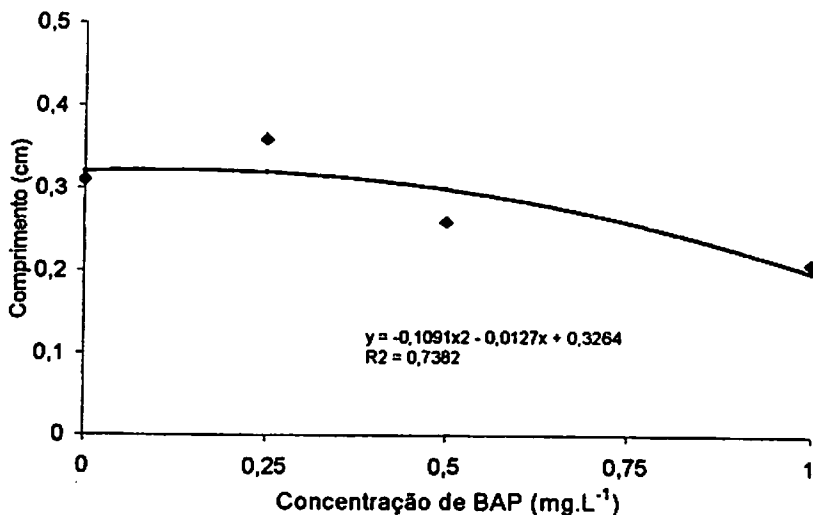


FIGURA 6. Comprimento de brotos de *Lychnophora pinaster* aos 45 dias em função de diferentes concentrações de BAP. UFLA, Lavras – MG, 2003.

Esse fato também ocorreu nos tratamentos em que se utilizou TDZ. Algumas brotações apresentaram-se vitrificadas sem desenvolvimento normal, além de um entufamento, semelhantes também aos sintomas característicos de altas concentrações de citocininas. Fato semelhante ocorreu em *Petasites hyhidus* (Asteraceae); a adição de TDZ em concentrações entre 0,22 mg.L<sup>-1</sup> e 2,22 mg.L<sup>-1</sup> induziu brotos com má formação morfológica e com concentrações de 0,0002 mg.L<sup>-1</sup> a 0,022 mg.L<sup>-1</sup>, calo vitrificado (Wildi, 1998).

Nos meios com menores concentrações de BAP, os brotos não mostraram nenhum sintoma prejudicial como vitrificação ou entufamento que

pudesse comprometer o seu desenvolvimento. Todas as brotações apresentaram-se perfeitamente viáveis à posterior repicagem.

Mesmo que maiores comprimentos dos brotos de arnica (0,32 cm) tenham sido obtidos em concentrações 0,07 mg.L<sup>-1</sup> de BAP; quando o meio é suplementado com 0,62 mg.L<sup>-1</sup>, além de permitir a obtenção de um satisfatório número de brotos, também não há diferença quanto ao comprimento, quando comparados àqueles obtidos em 0,07 mg.L<sup>-1</sup> de BAP, sendo a média em torno de 0,29 cm. Portanto, de acordo com os resultados obtidos pode-se inferir que para a espécie *L. pinaster*, o BAP mostrou-se superior quanto à multiplicação de partes aéreas, já que o TDZ não apresentou diferença estatística entre as diferentes concentrações testadas para nenhuma característica avaliada.

Entretanto, resultados diferentes têm sido obtidos em alguns estudos realizados com diferentes espécies de plantas medicinais, em que baixas concentrações de BAP não são suficientes para a indução de múltiplos brotos. Bonilla (2002) conseguiu maior número de brotos (4,13) da espécie *R. viburnoides* em meio de cultura suplementado com 4,00 mg.L<sup>-1</sup> de BAP. Resultados diferentes também foram obtidos quanto ao comprimento das brotações, visto que, na maioria dos trabalhos um maior comprimento da parte aérea é conseguido em meios isentos ou com baixas concentrações de citocinina, nesse caso, o meio suplementado com 6,00 mg.L<sup>-1</sup> de BAP foi o que permitiu maior comprimento dos brotos (3,95 cm).

Quando Pereira (1999) estudou a multiplicação da espécie *Echinodorus cf. scaber*, conseguiu um número de 1 a 7 brotações, também em maiores concentrações de BAP (6,00 mg.L<sup>-1</sup>), porém maior comprimento das mesmas também ocorreu em meio isento do regulador (3,5 cm).

Resultados semelhantes à espécie *L. pinaster* também foram obtidos por Coelho (1999) quando conseguiu uma média de 7,65 brotos de sucupira branca por segmento nodal em meio suplementado com BAP; ou ainda com o

marmelinho, quando Bertolucci (2000) conseguiu maior crescimento das brotações (4,93 cm) em meio de cultura também isento de regulador. Maior número de brotos dessa espécie foi obtido na concentração de 1,00 mg.L<sup>-1</sup> de BAP (6,86), diferindo da arnica, já que nesta concentração de BAP, os resultados não foram os melhores.

Em vários estudos de multiplicação em que se empregou juntamente o TDZ, os resultados também mostraram certa superioridade do BAP; como naqueles trabalhos desenvolvidos por Cerqueira (1999), quando obteve maior número de brotos/segmento nodal e maior altura das brotações em meio suplementado com essa citocinina. Neste trabalho, a concentração de 1,00 mg.L<sup>-1</sup> de BAP também foi a melhor para número de brotos (4,1), mas para o tamanho das brotações os resultados foram semelhantes à espécie *L. pinaster*; em meio contendo 0,125 mg.L<sup>-1</sup> de BAP (a menor concentração testada), pois as brotações apresentaram 2,6 cm.

Em alguns trabalhos utilizando o TDZ para a multiplicação de partes aéreas, bons resultados puderam ser obtidos com concentrações bem baixas quando comparado ao BAP, dependendo da espécie e do explante utilizado. Quando Kulkarni *et al.*, (2000) compararam o BAP ao TDZ na multiplicação de *Withania somnifera* L., conseguiu uma média de 24,13 brotos a partir de explantes nodais na concentração de 0,2 mg.L<sup>-1</sup> de TDZ. Quando utilizaram o BAP, maior número de brotos foram obtidos em 0,5; 1,0 e 5,0 mg.L<sup>-1</sup>; sendo 4,53; 4,58 e 4,07 respectivamente. No entanto, quando utilizaram o segmento internodal, observaram 25 brotos na concentração de 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP e 40 brotos na concentração de 5,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP e o TDZ, não exerceu ação nesse tipo de explante.

Baixa concentração de BAP (0,25 mg.L<sup>-1</sup>) também permitiu maior número de brotos (8,7) em segmentos nodais de *L. ericoides*, cultivados antecipadamente durante 90 dias em meio suplementado com 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de

ANA e  $4,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP (Pereira *et al.*, 2002). Esses autores desenvolveram esse cultivo preliminar em meio contendo citocinina/auxina, visando talvez o desenvolvimento da parte aérea da espécie, tendo em vista que, semelhante a *L. pinaster*, esta também apresenta um lento crescimento *in vitro*, dispensando a etapa de posterior alongamento das brotações, como foi desenvolvido com a espécie em estudo, como também o aproveitamento nesse caso, do efeito residual da mesma, para também obtenção de maior número de brotos com o uso de baixas concentrações.

As respostas obtidas quando se avalia a multiplicação *in vitro*, além de ser dependente de diferentes concentrações e de diferentes citocininas, claramente é variável também entre espécies. Mesmo sendo essencial a presença da citocinina no meio de cultura para a multiplicação da espécie *L. pinaster*, os resultados obtidos foram muito bons neste contexto, pois além da citocinina mais barata ter se sobressaído, melhores respostas ocorreram em concentrações bem baixas, apresentando a considerável vantagem de menor custo para a multiplicação da espécie *in vitro*.

### **3.4 Efeito do tempo de permanência em $\text{GA}_3$ no alongamento de partes aéreas das brotações de *Lychnophora pinaster***

O uso de giberelinas na cultura de tecidos é empregado quando o interesse é o alongamento de partes aéreas durante a multiplicação ou antes do enraizamento, onde pode-se variar o tempo de exposição do explante neste regulador.

Quando brotações de arnica foram submetidas à ação do  $\text{GA}_3$  durante diferentes períodos de tempo, antes do enraizamento, pôde-se perceber que este influenciou no alongamento de suas partes aéreas, apresentando diferentes respostas sobre o tamanho da brotação utilizada.

De acordo com o resultado da análise de variância apresentado na Tabela 7, pode-se verificar que os fatores em estudo, ou seja, comprimento das brotações inoculadas e o tempo em que estas permaneceram na presença do GA<sub>3</sub>, apresentaram diferença estatística, como também quando se estudou a interação entre os mesmos. Entretanto, quando se inoculou brotações consideradas pequenas, apresentando até 1 cm de comprimento em meio contendo GA<sub>3</sub>, pôde-se notar que os diferentes períodos de tempo nos quais essas brotações ficaram expostas sob a ação da giberelina não influenciaram significativamente no tamanho das mesmas, ao passo que diferentes respostas foram obtidas quando se utilizou brotações maiores. Quando brotações apresentando de 1 a 1,5 cm, tomadas como grandes, permaneceram na presença de GA<sub>3</sub>, por diferentes períodos de tempo, notou-se que ocorreu uma diferença estatística nos seus comprimentos entre os diferentes períodos avaliados.

**TABELA 7:** Resumo da análise de variância para comprimento de brotações de *Lychnophora pinaster* em função de diferentes tempos de permanência em 3 mg.L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>. UFLA, Lavras – MG, 2003.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio
DIAS	3	32,883 **
COMPRIMENTO	1	1288,225 **
DIAS*COMPRIMENTO	3	27,841 *
DIAS/BROT. PEQ.	3	9,913 <sup>ns</sup>
DIAS/BROT. GDE.	3	50,813 **
RESÍDUO	152	7,613
CV (%)		24,10

<sup>ns</sup> - não significativo

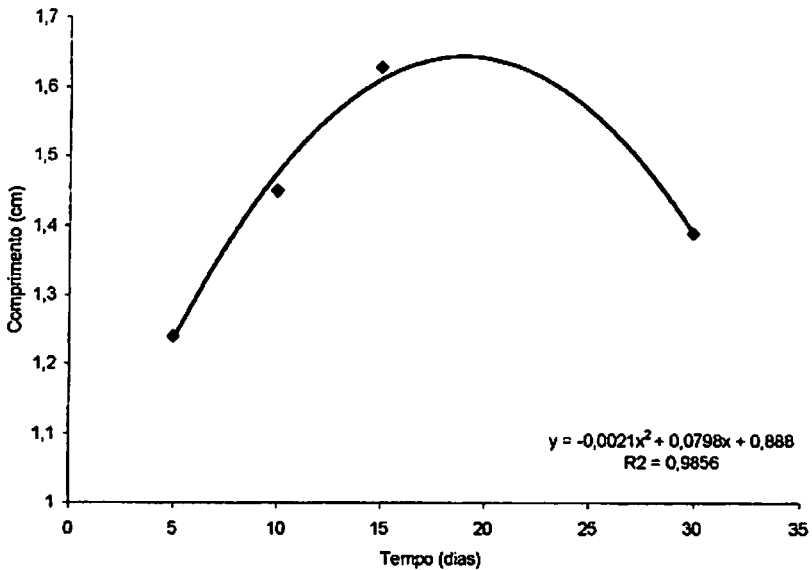
\* significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Estabelecendo-se uma concentração de GA<sub>3</sub> utilizada e variando os dias em que as brotações permaneceram em sua presença, pôde-se perceber que bons resultados foram obtidos quando se empregou brotações maiores, onde o tempo é fator fundamental a ser considerado.

Como as brotações tomadas como pequenas não responderam à ação do GA<sub>3</sub>, nos períodos em que ficaram sob sua ação, pode-se notar na Figura 7 que o comprimento das partes aéreas das brotações de amica com 1-1,5 cm foram crescentes proporcionalmente ao aumento de dias, onde existe um período de tempo mais adequado para esse aumento das brotações maiores. Quando permaneceram em GA<sub>3</sub> somente por 5 dias, sendo depois transferidas para o mesmo meio de cultura, isento do regulador, não revelaram um ganho significativo nos seus comprimentos, visto que após o período de avaliação, estas apresentavam em média 1,23 cm. Situação diferente pôde ser notada quando as brotações maiores permaneceram na presença da giberelina durante 10 dias; houve um incremento considerável nos seus comprimentos quando comparado ao de 5 dias, essas apresentaram em média 1,50 cm. Entretanto, percebeu-se que esses dois valores ainda estão dentro do comprimento médio inicial em que as brotações foram inoculadas.

Existindo um período mais adequado para o ganho de comprimento das partes aéreas das brotações maiores, pôde-se notar que ele situa-se entre 15 a 19 dias aproximadamente, visto que aos 15 dias as brotações apresentaram 1,61 cm, aumentando para 1,65 cm quando permaneceram durante 19 dias sob a ação do GA<sub>3</sub>; período em que se obteve maior comprimento. A partir de então, notou-se um certo decréscimo no comprimento das partes aéreas das brotações, podendo ter ocorrido um efeito inibitório causado pela maior exposição na giberelina, visto que os valores diminuíram à medida que se aumentou o tempo de permanência das mesmas no GA<sub>3</sub>, talvez devido a uma toxidez (Figura 7).



**FIGURA 7.** Comprimento de brotações de *Lychnophora pinaster* em função do tempo de permanência em 3 mg.L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> e comprimento inicial. UFLA, Lavras – MG, 2003.

Experimentos desta natureza, onde alterna-se tempo X concentração de determinado regulador de crescimento, são de grande interesse da cultura de tecidos, visto que existe um tempo ideal em função da concentração do regulador utilizado, para obtenção de melhores resultados conforme o objetivo. Geralmente pode ocorrer uma indução durante os primeiros dias de exposição à ação do regulador, e um processo inverso, se o explante permanecer sob efeito constante deste, havendo um efeito inibitório.

No caso da espécie *L. pinaster*, além do comprimento das brotações ter apresentado respostas diferentes, o fator tempo de exposição na concentração de 3 mg.L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> foi de fundamental importância. Nota-se que houve realmente uma indução no alongamento das partes aéreas, durante os primeiros 20 dias

aproximadamente, podendo ser percebido à partir do momento em que estas foram inoculadas em meio isento, como também uma inibição das mesmas, quando permaneceram por um período maior que 20 dias.

Semelhante ao período de 5 dias também foram os resultados obtidos quando as brotações permaneceram por um período constante de 30 dias na presença de GA<sub>3</sub>, visto que apresentaram um comprimento de 1,40 cm (Figura 7).

Como a arnica é uma espécie que apresenta um lento crescimento tanto *in vitro*, como *in vivo*, o uso de giberelinas para um alongamento de suas partes aéreas pode mostrar-se de grande valia na obtenção de plântulas aptas ao enraizamento. Os fatores comprimento das brotações x tempo de exposição sob a ação do referido regulador, deve ser considerado, visto que períodos menores que 15 dias ou maiores que 19 dias aproximadamente, não apresentaram boas respostas quando o objetivo foi o alongamento de partes aéreas de brotações de arnica com 1 a 1,5 cm.

Similar à espécie *L. pinaster*, Figueiredo, Albarello e Viana (2001), relatam a necessidade do GA<sub>3</sub> para o alongamento de partes aéreas de *Rollinia mucosa*, assim como os resultados obtidos por Gomes (1999), quando observaram que a utilização de GA<sub>3</sub> em concentrações que variam de 1 a 6 mg.L<sup>-1</sup> favoreceu o alongamento *in vitro* de moreira.

Yui *et al.*, (1993), também afirmam que são necessárias a adição de concentrações superiores à 1 mg.L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> para a obtenção de brotos de macieira alongados, apropriados para a fase de enraizamento. No entanto, Mishra *et al.*, (1999), descreveram a alongação de internódios de *Emblia officinalis* quando utilizaram 1 mg.L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>, enquanto que 3 mg.L<sup>-1</sup> causou o desfolhamento de alguns explantes.

De Fossard *et al.*, (1978), citados por Grattapaglia e Machado (1998), também constataram efeito deletério desse regulador em culturas de *Eucalyptus*

*ficifolia*, provocando alongamento excessivo, deformação nas folhas e formação de calo na base das brotações laterais.

### **3.5 Efeito do tempo de permanência nas auxinas ANA e AIB sobre o enraizamento de brotações de *Lychnophora pinaster***

O enraizamento em plântulas de arnica *in vitro* foi influenciado pela auxina utilizada. Diferentes respostas quanto ao comprimento da parte aérea e o número de raízes/plântula foram obtidas entre as diferentes concentrações utilizadas, como também em relação ao tempo em que as plântulas permaneceram na presença da auxina.

Quando se estuda o enraizamento *in vitro*, um fator a ser considerado é a dependência entre concentração da auxina utilizada e o tempo de exposição dos explantes nestas, visto que podem estar diretamente relacionados, influenciando além do enraizamento das plântulas, também o crescimento da parte aérea.

O tempo de exposição de plântulas na presença de auxina, quando estas se faz necessária ao enraizamento de determinadas espécies, influencia diretamente nos resultados, além da sua concentração, porque pode ocorrer uma toxidez quando esta última é excessiva, acarretando na formação de calo na base do explante, comprometendo a rizogênese e o crescimento da parte aérea. Entretanto, outros sintomas de toxidez podem manifestar-se somente na fase de alongamento das raízes, visto que existe uma etapa auxina-dependente, na qual ocorre a indução e iniciação do enraizamento, e se as plântulas permanecerem na presença da auxina, o crescimento das raízes é inibido.

Entretanto, algumas espécies podem permanecer na presença constante de auxina, sem que se observe essa toxidez (Bonilla, 2002); o que não ocorreu com a espécie *L. pinaster*, pois o tempo de permanência das plântulas na presença das auxinas utilizadas realmente influenciou nas características avaliadas, ou seja, comprimento da parte aérea e número de raízes.

De acordo com os resultados da análise de variância apresentados na Tabela 8, quando se avaliou o comprimento da parte aérea daquelas plântulas deixadas em ANA durante diferentes períodos de tempo, pôde-se notar que entre as diferentes concentrações utilizadas não ocorreu diferença estatística, como também quando esta se interage com tempo de permanência. No entanto, pôde-se verificar que o tempo em dias em que as plântulas permaneceram na presença de ANA influenciou significativamente no comprimento da suas partes aéreas. Entretanto, quando se avaliou a característica número de raízes/plântulas, resultados diferentes foram obtidos, pois todos os fatores avaliados influenciaram significativamente essa característica.

**TABELA 8:** Resumo da análise de variância para comprimento da parte aérea (PA) (cm) e número de raízes (NR) em plântulas de *Lychnophora pinaster* em função de diferentes tempos de permanência em diferentes concentrações de ANA. UFLA, Lavras – MG, 2003.

Fontes de Variação	GL	Quadrados médios	
		PA	NR
ANA	1	0,001 <sup>ns</sup>	90,048 **
Dias	4	1,136 **	78,161 **
ANA * Dias	4	0,091 <sup>ns</sup>	33,663 **
Resíduo	40	0,212	4,645
CV (%)		22,65	61,75

<sup>ns</sup> - não significativo

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Em relação ao AIB, quando se avaliou a sua influência no comprimento da parte aérea e no número de raízes *in vitro*/plântulas de arnica, resultados semelhantes foram encontrados. De acordo com a análise de variância (Tabela

9), pôde-se notar que apenas o tempo de permanência das plântulas na presença da referida auxina em dias influenciou no crescimento da parte aérea. Semelhantemente aos resultados obtidos com o ANA sobre o número de raízes das plântulas, aqui também todos os fatores em estudo apresentaram diferença significativa.

TABELA 9: Resumo da análise de variância para comprimento da parte aérea (PA) (cm) e número de raízes (NR) em plântulas de *Lychnophora pinaster* em função de diferentes tempos de permanência em diferentes concentrações de AIB. UFLA, Lavras – MG, 2003.

Fontes de Variação	GL	Quadrados médios	
		PA	NR
AIB	1	0,003 <sup>ns</sup>	28,426 **
Dias	4	0,560 **	46,243 **
AIB * Dias	4	0,050 <sup>ns</sup>	10,393 *
Resíduo	40	0,077	3,129
CV (%)		13,84	49,33

<sup>ns</sup> - não significativo

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

Na Figura 8, pode-se verificar a influência dos diferentes períodos de tempo em que as plântulas de arnica permaneceram na presença das auxinas ANA e AIB, no comprimento das partes aéreas de plântulas de arnica.

Não houve diferença estatística entre as concentrações das auxinas utilizadas. Entretanto, o fator dias foi fundamental, pois maior comprimento das partes aéreas das plântulas de arnica ocorreu entre os dias 10 e 20 aproximadamente, nas duas auxinas. Aos 10 dias de cultivo, as plântulas

apresentavam um comprimento das partes aéreas de 2,31 cm em ANA e 2,20 cm em AIB. Entretanto, maior comprimento das plântulas foi observado quando elas permaneceram na presença de ANA durante 17 dias, quando atingiram 2,46 cm; e quando permaneceram na presença de AIB durante 18 dias, quando apresentaram um comprimento de 2,30 cm (Figura 8).

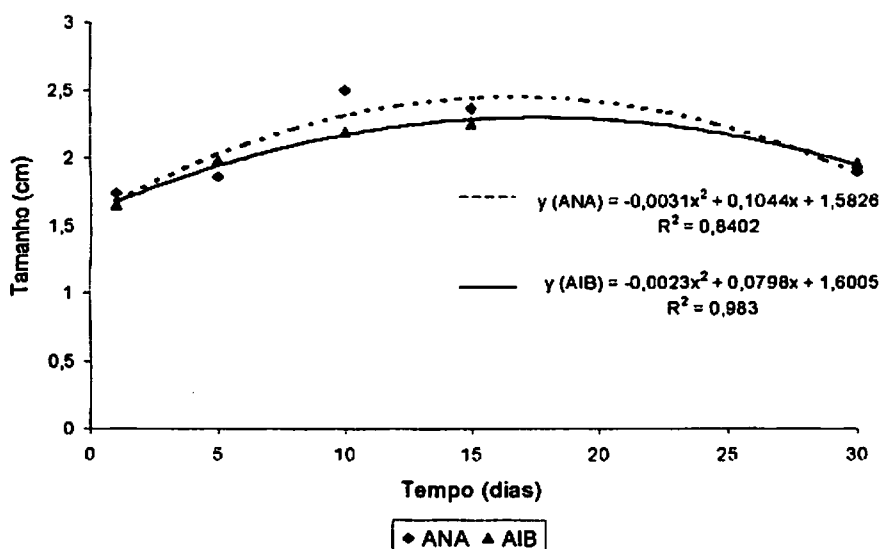


FIGURA 8: Comprimento da parte aérea (cm) de plântulas de *L. pinaster* em função do tempo de permanência em dias em ANA e AIB. UFLA, Lavras – MG, 2003.

Como já discutido anteriormente que a concentração de auxina influencia no crescimento da parte aérea; dependendo também do tempo em que os explantes permanecem em sua presença, podendo ocorrer uma toxidez, nesse caso, mesmo sendo baixas as concentrações das auxinas utilizadas (1 e 2 mg.L<sup>-1</sup>) notou-se que quando as plântulas permaneceram durante maior período de tempo em sua presença, houve uma inibição no crescimento. Quando as

plântulas foram deixadas até aproximadamente 15 ou 20 dias, e depois transferidas para um meio isento de regulador, cresceram normalmente. Após 20 dias aproximadamente, pode-se verificar também na Figura 8, que o crescimento foi inibido. A toxidez ocorrida nesse caso, pode não se dever à concentração utilizada, mas talvez ao tempo de permanência das plântulas na auxina, visto que ocorre um processo de indução e iniciação e se estas permanecerem no mesmo meio; inibição do crescimento da parte aérea.

Pela concentração empregada ter sido consideravelmente baixa, quando as plântulas permaneceram na presença de ANA e AIB, durante 24 horas, não ocorreu um crescimento satisfatório de suas partes aéreas, quando comparada àquelas que permaneceram durante 17 ou 18 dias, pois nas duas auxinas utilizadas apresentaram um comprimento de 1,68 cm. Aos 5 dias de cultivo as partes aéreas inoculadas em ANA e AIB apresentaram um comprimento de 2,0 cm e 1,90 cm respectivamente. Nesse caso, quando o objetivo for menor tempo de permanência em presença de auxina, concentrações maiores devem ser empregadas, tanto para um crescimento mais rápido das partes aéreas, como também para a indução do enraizamento, como naqueles trabalhos de enraizamento *Eucalyptus* desenvolvidos por Gupta *et al.*, (1983) citados por Grattapaglia & Machado, (1998) que utilizaram diversas auxinas isoladamente ou combinadas em concentrações de 0,1 a 10 mg.L<sup>-1</sup>, em intervalos de 24 a 96 horas.

Quando as plântulas de arnica permaneceram por um período constante de 30 dias nas duas auxinas, notou-se realmente uma certa inibição no comprimento de suas partes aéreas. Após 20 dias, aproximadamente, ocorreu um decréscimo em valores dos mesmos, sendo 1,89 em ANA e 1,94 cm em AIB.

De acordo com o exposto acima, pode-se notar que a espécie *L. pinaster*, não deve permanecer constantemente nas auxinas citadas, mesmo em

concentrações consideravelmente baixas; haja vista a ocorrência de uma toxidez no tocante ao comprimento de suas partes aéreas.

Aos 15 dias aproximadamente, as plântulas de arnica já apresentavam um comprimento satisfatório das partes aéreas necessário ao enraizamento, pois se sabe que esse é um fator essencial também ao desenvolvimento de um bom sistema radicular.

Quando a característica avaliada foi o número de raízes por plântula de arnica inoculada, pôde-se inferir que este foi diretamente influenciado pelo tipo e concentrações das auxinas utilizadas, bem como pelo tempo em que as mesmas permaneceram em sua presença.

Pelos resultados obtidos, notou-se que existe uma interação entre tempo de permanência das plântulas x concentração da auxina utilizada, pois as respostas foram dependentes desses dois fatores. Sabe-se que a rizogênese ocorre de uma a três semanas e pode ser dividida em indução, iniciação e alongamento de raízes; nas duas primeiras fases, elas podem responder e serem dependentes de auxina, ao contrário desta última, onde o crescimento das raízes pode ser inibido pela sua presença. No caso da espécie *L. pinaster*, pode-se verificar na Figura 9 que ocorreu esse processo inicial de indução do enraizamento no referido tempo, como também certa inibição após o mesmo, para as concentrações de 1 e 2 mg.L<sup>-1</sup> de ANA e 1 mg.L<sup>-1</sup> de AIB. Maior número de raízes (9,79) foi obtido em meio suplementado com 2 mg.L<sup>-1</sup> de ANA, aos 16 dias de cultivo. Esse número se mostrou superior em relação a todos os outros, pois quando a concentração utilizada foi de 1 mg.L<sup>-1</sup> de ANA, obteve-se 3,68 raízes aos 17 dias e 4,61 aos 20 dias, quando se utilizou 1 mg.L<sup>-1</sup> de AIB. Na concentração de 2 mg.L<sup>-1</sup> de AIB, o número de raízes foi menor dentro do prazo avaliado (Figura 9).

Quando a avaliação foi realizada aos 10 dias, os resultados obtidos foram de 3,1; 3,4; 8,3 e aproximadamente 4, em 1 mg.L<sup>-1</sup> de ANA e AIB e em 2 mg.L<sup>-1</sup> de ANA e AIB, respectivamente.

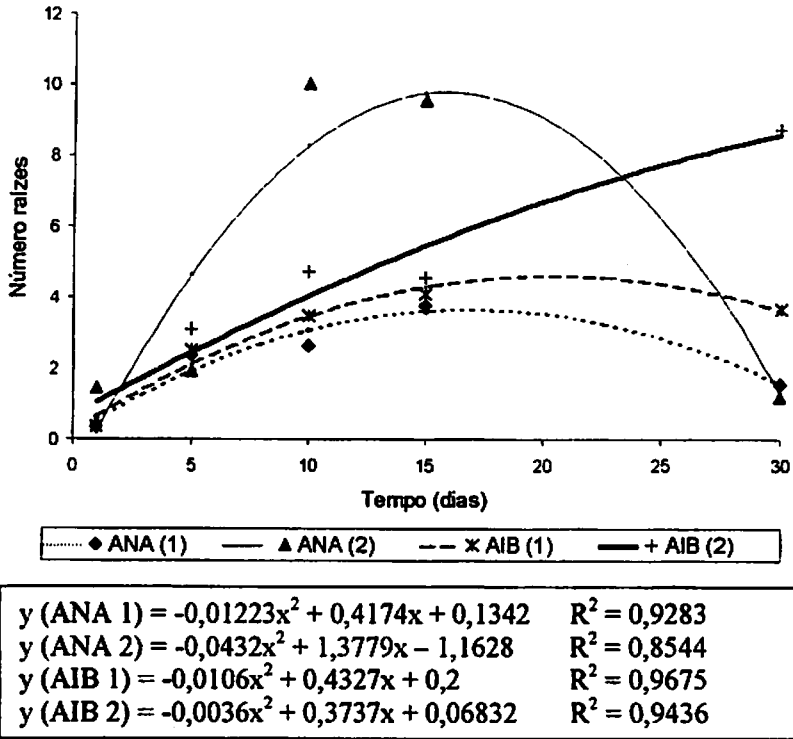


FIGURA 9. Número de raízes de plântulas de *Lychnophora pinaster* em função do tempo de permanência em diferentes concentrações de ANA (1 e 2 mg.L<sup>-1</sup>) e AIB (1 e 2 mg.L<sup>-1</sup>). UFLA, Lavras – MG, 2003.

De acordo com o exposto anteriormente, pode-se notar na Figura 9 que as duas auxinas em todas as concentrações, excetuando-se a de 2 mg.L<sup>-1</sup> de AIB, causaram certa toxidez em relação ao número de raízes/plântulas de amica. Ocorreu um processo de iniciação e indução das raízes, mas como as plântulas

permaneceram por mais tempo na auxina, as raízes não cresceram, prejudicando uma visualização mais perfeita, pois algumas plântulas apresentaram um aglomerado na base, como um calo, visto que os números apresentados na figura, são menores, sendo respectivamente 1,6; 3,6 e 1,3 quando em 1 mg.L<sup>-1</sup> de ANA e AIB e 2 mg.L<sup>-1</sup> de ANA.

Períodos menores de permanência como 24 horas ou 5 dias também não foram suficientes para induzir um bom número de raízes nas plântulas de arnica, talvez pela baixa concentração utilizada quando relacionada também ao baixo período de exposição. Quando as plântulas foram deixadas por 24 horas em 1 mg.L<sup>-1</sup> de ANA e AIB, os valores obtidos em média foram menores que 1; 0,54 e 0,62 respectivamente. Na concentração de 2 mg.L<sup>-1</sup>, as plântulas apresentaram em média 0,2 quando inoculadas em ANA e 0,44 quando inoculadas em AIB. Aos 5 dias de cultivo verificou-se um aumento significativo em relação ao 1º tempo, pois os valores obtidos foram de 2,0; 2,1; 5,6 e 2 quando as plantas foram inoculadas em 1 mg.L<sup>-1</sup> de ANA e AIB e 2 mg.L<sup>-1</sup> de ANA e AIB, respectivamente. Neste caso, como também no comprimento das partes aéreas, quando o objetivo for menor tempo de permanência das plântulas na presença de auxina, deve-se aumentar a concentração desta. Para a espécie *L. pinaster*, esta deve ser maior que 1 ou 2 mg.L<sup>-1</sup> de qualquer uma das duas auxinas empregadas (Figura 9).

Após ter observado a superioridade do ANA na concentração de 2 mg.L<sup>-1</sup>, quanto a o número de raízes em plântulas de arnica, verificou-se um efeito crescente/decrescente proporcional ao período avaliado, pois o número de raízes aumentou até aproximadamente 15 dias, e depois decresceu conforme aumentou o tempo de permanência das plântulas em sua presença. Naquelas plântulas inoculadas em 1 mg.L<sup>-1</sup> tanto de AIB quanto de ANA, o efeito sobre o aumento no número de raízes, conforme o tempo de permanência foi mais brando, como também sua diminuição, que começou a ocorrer aproximadamente aos 20 dias.

Não houve aumento nem decréscimo exagerado quando se comparam as curvas de regressão em relação àquela obtida em 2 mg.L<sup>-1</sup> de ANA.

O uso de dois meios de cultura quando do enraizamento de plântulas de espécies lenhosas é sugerido por Grattapaglia & Machado (1998), e tem sido utilizado freqüentemente para espécies lenhosas como *Eucalyptus*, *Tectonas grandis*, diversas espécies de coníferas e frutíferas como *Prunus*, macieira e mamoeiro. No caso, o primeiro, no qual as partes aéreas permaneceriam desde algumas horas até alguns dias, é rico em auxina, deve-se alternar concentração x tempo, favorecendo a indução e iniciação; e o segundo meio, sem qualquer regulador de crescimento, estimularia a exteriorização e o crescimento das raízes. Este fato foi observado com a espécie *L. pinaster*, como pôde-se verificar de acordo com o que foi exposto acima, mesmo que não se tenha usado altas concentrações de auxina, como nos trabalhos de Gupta *et al.*, (1983) citados por Grattapaglia & Machado, (1998) para o enraizamento de *Eucalyptus*, Aqui também notou-se a inibição do crescimento das raízes.

Estes resultados podem ser interessantes para a espécie *L. pinaster*, pois não foi preciso utilizar altas doses de auxinas para se obter um número satisfatório de raízes, visto que aos 15 dias aproximadamente, as plântulas inoculadas em 2 mg.L<sup>-1</sup> de ANA apresentavam um número considerável de raízes, perfeitamente aptas ao transplantio em casa de vegetação.

Menor comprimento das raízes às vezes pode ser preferível, por estas se apresentarem em fase de crescimento ativo. Todos os tratamentos apresentaram plântulas com raízes pequenas, excetuando-se aquelas obtidas em meio contendo 2 mg.L<sup>-1</sup> de ANA que aos 10 e 15 dias apresentaram raízes com um comprimento considerável, quando comparada às raízes das plântulas dos outros tratamentos. No entanto, este fato não é considerado como um inconveniente, visto que as raízes maiores podem ser podadas durante a toailete, antes do transplantio.

A resposta da ação das auxinas sobre o enraizamento *in vitro* pode ser variável entre o grande número de espécies em que são empregadas; também a não ocorrência de toxidez pode ser observado. No caso da espécie *Rudgea viburnoides*, as plântulas permaneceram durante 60 dias na presença de 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de AIB (Bonilla, 2002). Nesse caso, pela concentração ser consideravelmente baixa e menor que aquelas utilizadas nesse experimento, pode não ter ocorrido um efeito tóxico sobre o crescimento das raízes desta espécie. Entretanto, o tempo em que as plântulas permaneceram na presença dessa auxina foram 45 dias a mais quando comparado à espécie *L. pinaster* que já aos 15 dias apresentava um número médio de raízes satisfatório para serem aclimatizadas. Echeverrigaray *et al.*, (2000) também conseguiram melhores respostas, empregando a auxina AIB na concentração de 0,5 µM no enraizamento *in vitro* de camomila romana.

Pereira (1993) também testou as auxinas ANA e AIB no enraizamento *in vitro* das espécies *M. aquifolium* e *M. ilicifolia*, nas mesmas concentrações testadas para a espécie *L. pinaster*. Entretanto as duas concentrações de AIB utilizadas não apresentaram diferença estatística quanto ao número de raiz, porcentagem e tempo de indução, diferindo dos resultados obtidos com a arnica. Quando testou o ANA, a porcentagem foi de 2% e o tempo de indução 78 dias.

Bello *et al.*, (2002) também obtiveram bons resultados com o ANA e AIA quando comparado aos da auxina AIB no enraizamento de *Valeriana glechmifolia*, pois observaram que os meios contendo AIB induziram a formação de calos; e os meios suplementados com ANA e AIA nas concentrações de 1 e 2,5 mg.L<sup>-1</sup>, além de promoverem bom enraizamento, induziram também raízes morfológicamente similares às encontradas nas plantas a campo.

### 3.6 Efeito do tipo de substrato na aclimatização de plântulas de *Lychnophora pinaster*

A etapa de transplântio e aclimatização de plântulas obtidas *in vitro* é considerada uma passagem crítica e em alguns casos representa um fator limitante do processo de micropropagação. O sucesso desta etapa depende da qualidade das plantas provenientes da fase anterior, em que o tipo do sistema radicular é fator fundamental neste contexto.

Os fatores umidade e substrato, além de outros também são pontos fundamentais a serem considerados na obtenção de sucessos durante a fase de aclimatização das plântulas. A umidade porque estas passam de uma condição heterotrófica *in vitro*, onde a umidade relativa é bem alta, para uma condição autotrófia *in vivo*, (Pinto & Pasqual, 1990); e o substrato, porque algumas espécies podem não se adaptar a um determinado tipo utilizado.

Substratos comerciais, como o Plantmax<sup>®</sup> são muito usados para diversas espécies de plantas obtidas através da cultura de tecidos, como medicinais, ornamentais e frutíferas. Entretanto, diversas formulações, utilizando-se areia, vermiculita, solo e adição de matéria orgânica através de húmus ou composto, também têm sido bastante empregadas.

Por ser uma espécie endêmica, restrita a um tipo particular de ambiente e substrato, a sobrevivência das plântulas de arnica advindas da cultura de tecidos, em casa de vegetação foi significativamente influenciada pelo tipo de substrato utilizado.

Quando se transplantou plântulas de *L. pinaster* para o substrato comercial Plantmax<sup>®</sup>, se obteve 0% de sobrevivência; e quando se testou o solo do local de ocorrência das espécie, se obteve 100% de sobrevivência das plântulas. Quando se procedeu a mistura solo do local de ocorrência da espécie + Plantmax<sup>®</sup> na proporção 1:1, obteve-se 80% de sobrevivência das plantas de arnica. Portanto, a utilização dos sacos plásticos para manutenção da umidade

nos primeiros dias de aclimatização foi eficiente, visto que aquelas plântulas sobreviventes apresentaram um bom crescimento.

Espécies desta natureza podem apresentar algumas exigências em relação ao substrato, para seu desenvolvimento. Além dos fatores fertilidade, acidez, pH, matéria orgânica (MO), dentre outros (Tabela 10); a textura (Tabela 11) também pode ter influenciado no processo.

TABELA 10: Resultado na análise química e matéria orgânica do solo do local de ocorrência da espécie *L. pinaster*. UFLA/DCS. Laboratório de Análise de Solo. Lavras – MG, 2003.

Variáveis	Unidades	Valores
PH (H <sub>2</sub> O)		5,0
P	mg.dm <sup>3</sup>	3,1
K	mg.dm <sup>3</sup>	47
Ca <sup>+2</sup>	cmol <sub>c</sub> .dm <sup>3</sup>	0,5
Mg <sup>+2</sup>	cmol <sub>c</sub> .dm <sup>3</sup>	0,2
Al <sup>+3</sup>	cmol <sub>c</sub> .dm <sup>3</sup>	1,1
H + Al	cmol <sub>c</sub> .dm <sup>3</sup>	5,0
SB	cmol <sub>c</sub> .dm <sup>3</sup>	0,8
(t)	cmol <sub>c</sub> .dm <sup>3</sup>	1,9
(T)	cmol <sub>c</sub> .dm <sup>3</sup>	5,8
V	%	14,1
M	%	57
P-rem	mg.L <sup>-1</sup>	18,8
MO	dag.kg <sup>-1</sup>	3,1

TABELA 11: Resultado na análise granulométrica do solo do local de ocorrência da espécie *L. pinaster*. UFLA/DCS. Laboratório de Análise de Solo. Lavras – MG, 2003.

Textura	Unidades	Valores
Areia	dag.kg <sup>-1</sup>	56
Silte	(dag.kg <sup>-1</sup> )	34
Argila	(dag.kg <sup>-1</sup> )	10
Classe Textural		Arenosa

Considerando-se existir além dos fatores citados acima, algum outro essencial à sobrevivência da espécie neste tipo particular de substrato, pode-se inferir que a não sobrevivência das plântulas no substrato comercial foi porque ele não apresentou algumas dessas características semelhantes ao substrato do local de origem; além de ser estéril, pois a questão da microbiota local para plantas medicinais endêmicas nativas, deve ser considerada já que podem influenciar de forma direta a sobrevivência das plântulas, visto que as mesmas advêm de um local totalmente asséptico, e os microrganismos são também importantes agentes na associação planta-ambiente.

De posse destes dados, quando se realizou um procedimento no Laboratório de Microbiologia do Solo do Departamento de Ciência do Solo da mesma instituição, no intuito de identificar a ocorrência ou não destes, houve confirmação real do fato.

No solo do local de ocorrência da espécie foram identificadas a presença de micorrizas nativas, como também a colonização das raízes das plântulas. A espécie predominante de ocorrência identificada foi a *Scutellospora heterogama*, que deve ter influenciado diretamente a sobrevivência das plântulas provenientes da cultura de tecidos. Logo, quando se procedeu a mistura de substratos, pode ter

ocorrido uma associação e/ou multiplicação destes microrganismos nativos essenciais, favorecendo ainda a sobrevivência das plântulas nesse tratamento.

Neste contexto pode-se inferir que a espécie *L. pinaster* é dependente de uma microbiota nativa essencial à sua sobrevivência em outros locais. A não sobrevivência das plântulas no substrato comercial pode ter ocorrido porque ele era isento de microrganismos, ainda que benéficos. No entanto, cabem estudos mais detalhados na quantificação e qualificação destes microrganismos essenciais à sobrevivência da arnica fora do habitat natural.

Algumas espécies de plantas medicinais não apresentam restrições quanto ao tipo substrato para aclimatização. Quando Bertolucci (2000) utilizou o substrato comercial Plantmax® para aclimatização de plântulas da espécie *Tournefortia cf paniculata*, obteve 100% de sobrevivência. 100% de sobrevivência, também foi conseguido com plântulas de chapéu de couro foi obtida por Pereira (1999), quando utilizou composto + latossolo vermelho (2:1), para aclimatizá-las.

Na Figura 10, observam-se a micropropagação de *L. pinaster*, à partir de múltiplos brotos até a fase final de aclimatização.

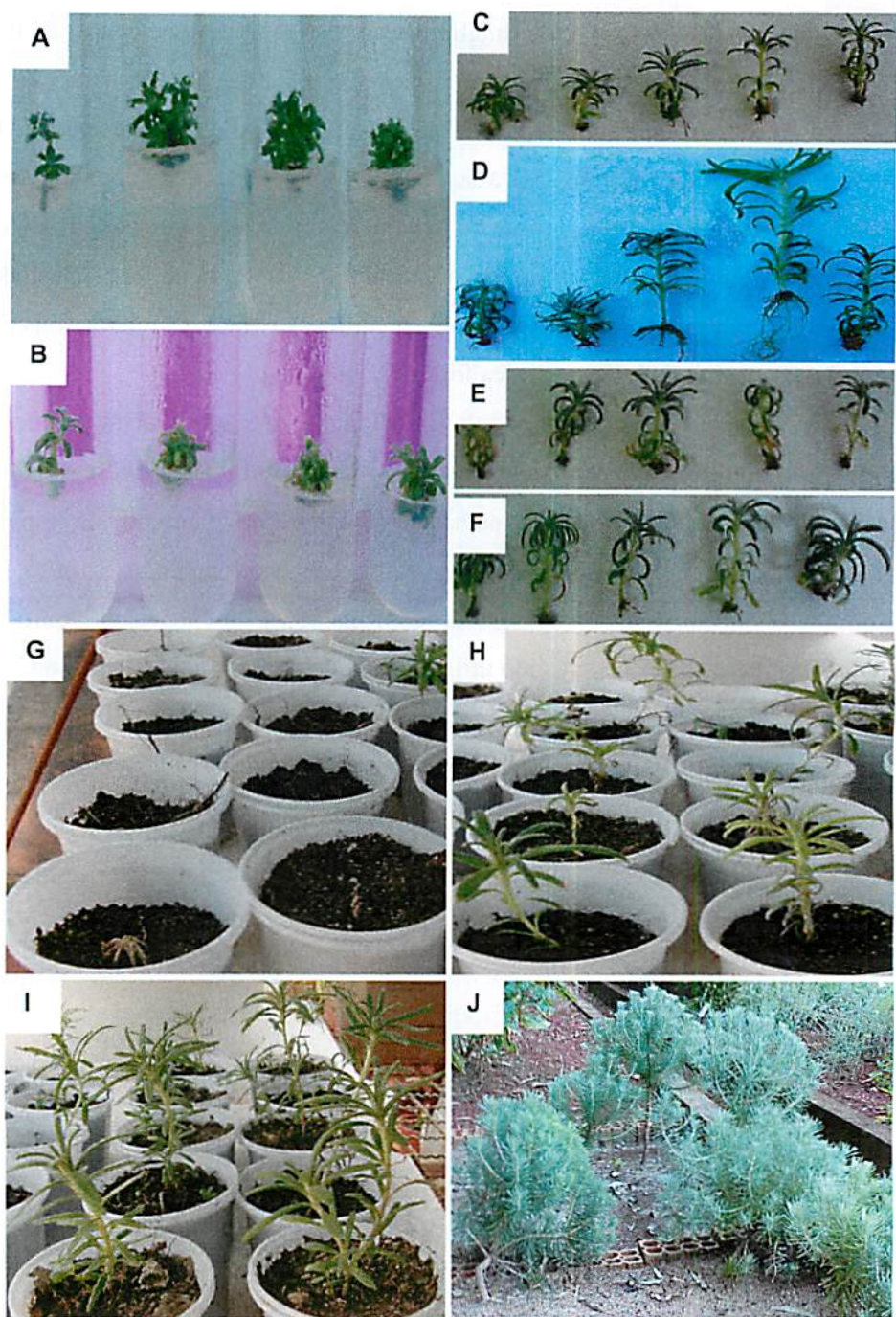


FIGURA 10.

**FIGURA 10: Micropropagação de arnica: A e B) Indução de múltiplos brotos em 0; 0,25; 0,50 e 1,00 mg.L<sup>-1</sup> de BAP e TDZ, respectivamente, aos 45 dias; C, D, E e F) Enraizamento de brotações de arnica em 24 hs, 5, 10, 15 e 30 dias em 1,00 e 2,00 mg.L<sup>-1</sup> de ANA e 1,00 e 2,00 mg.L<sup>-1</sup> de AIB respectivamente; G, H e I) Aclimatização de plântulas de arnica em Plantmax<sup>®</sup>, Plantmax<sup>®</sup> + solo do local de ocorrência da espécie e Solo do local de ocorrência da espécie, respectivamente aos 52 dias; J) Plantas de arnica com 12 meses – HORTO PLANTAS MEDICINAIS. UFLA, Lavras – MG, 2003.**

## 4 CONCLUSÕES

Embriões são bons explantes para o estabelecimento da espécie *Lychnophora pinaster in vitro*.

Meios de cultura menos concentrados permitem melhor desenvolvimento das plântulas, sendo o meio MS/4 o mais indicado para o cultivo *in vitro* dessa espécie.

A multiplicação *in vitro* de arnica é perfeitamente possível, utilizando-se citocininas em baixas concentrações, onde o BAP apresenta bons resultados; como também brotações maiores são preferidas quando o objetivo for o alongamento de suas partes aéreas.

Para um enraizamento satisfatório das plântulas de arnica *in vitro* e um crescimento normal de suas partes aéreas, estas devem permanecer na presença de 2,00 mg.L<sup>-1</sup> de ANA durante um período de 15 a 20 dias aproximadamente.

Plantas de *Lychnophora pinaster* aptas a serem levadas ao campo podem ser perfeitamente obtidas, quando se utiliza o solo do local de ocorrência da espécie para aclimatização das plântulas advindas da cultura de tecidos.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZEVEDO, K. S. de.; PAIVA, R.; SANTOS, C. G. DOS. *et al.* Efeito de diferentes concentrações de sacarose na germinação *in vitro* de sementes de copaíba (*Copaiba* spp). In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 27., 2002, Cuiabá. Anais... Cuiabá: UFMT, 2002. 1 CD.

BAJAJ, Y. P. S.; FURMANOWA, M.; OLSZOWSKA, O. Biotechnology of the Micropropagation of Medicinal and Aromatic Plants. In: BAJAJ, Y. P. S. *Biotechnology in Agriculture and Forestry 4. Medicinal and Aromatic Plants.* v. 1, p. 60-103. 1988.

BELLO, C. M.; MAURMANN, N.; LUZ, D. I. *et al.* Otimização da micropropagação e enraizamento de *Valeriana glechmifolia* MEYER. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 17., 2002, Cuiabá. Anais... Cuiabá: UFMT, 2002. 1 CD.

BERTOLUCCI, S. K. V. Micropropagação, calogênese e abordagem fitoquímica *in vivo* e *in vitro* de *Tournefortia cf paniculata* Cham. 2000. 79 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica e Agrobioquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

BONILLA, M. G. O. Propagação *in vitro*, indução, curva de crescimento de calos e abordagem fitoquímica em *Rudgea viburnoides* (CHAM.) BENTH. 2002. 162 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

CERQUEIRA, E. S. Propagação e calogênese *in vitro* em erva-de-touro (*Tridax procumbens* L.), uma planta medicinal. 1999. 81 p. Dissertação (Mestrado em fisiologia vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

COELHO, M. C. F. de. Germinação de sementes e propagação "in vitro" de Sucupira Branca [*Pterodon pubescens* (Benth.) Benth. ]. 1999. 119 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

ECHVERRIGARAY, S.; FRACARO, F.; ANDRADE, L. B.; BIASIO, S.; ATTI-SERAFINI, L. *In vitro* regeneration from leaf explants of Roman Chamomile. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v. 60, n. 1, p. 1-4, 2000.

FIGUEIREDO, S. F. L.; ALBARELLO, N.; VIANA, V. R. C. Micropropagation of *Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, Dordrecht, v. 37, n.4, p.471-475, 2001.

FRANÇA, S. C. de. Abordagens biotecnológicas para a obtenção de substâncias ativas. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Org.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 3. ed. rev. Porto Alegre/Florianópolis : Ed. Universidade/UFRGS / Ed. UFSC, 2001. p. 105-124.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa-CNPq, 1998. v. 1, p. 183-260.

HU, C. Y.; FERREIRA, A. G. *In vitro* embryology of *Ilex*. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, 1998. v. 2, p. 371-393.

KODJA, H.; GOVIDEN-SOULANGE, J.; GURIB-FAKIM, A.; ROBENE-SOUSTRADE, I.; HUMEAL, L.; FIGIER, J. Micropropagation of *Psiadia arguta* through cotyledonary axillary bud culture. *Plant Growth Regulation*, v. 25, p. 75-80, 1998.

KULKARNI, A. A.; THENGANE, S. R.; KRISHNAMURTHY, K. V. Direct shoot regeneration from node, internode, hypocotyl and embryo explants of *Withania somnifera*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v. 62, n. 2, p. 203-209, 2000.

MISHRA, M.; SAXENA, R. P.; PATHAK, R. K.; SRIVASTAVA, A. K. Studies on micropropagation of aonla (*Emblia officinalis* Gaertn). *Progressive Horticulture*, v.31, n.3-4, p.116-122, 1999.

PEREIRA, A. M. S. Micropropagação de *Maytenus aquifolium* Mart. e *Maytenus ilicifolia* Mart. (espinheira-santa). 1993. 67 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Jaboticabal, SP.

PEREIRA, F. D. Propagação *in vitro* e identificação de metabólitos secundários em chapéu de couro (*Echinodorus cf saber* RATAJ), uma planta medicinal. 1999. 112 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

PINTO, J. E. B. P.; PASQUAL, M. Introdução a cultura de tecidos. Lavras: ESAL, 1990. 73 p. (Apostila).

SEMIR, J. Revisão taxonômica de *Lychnophora* Mart. (Vernoniaceae: Compositae). 1991. 515. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Universidade de Campinas, Campinas, SP.

SOUSA, C. M.; CORDEIRO, L. F.; MIRANDA, R. M.; REIS, C. V.; CARVALHO, A. C.P. P. Germinação e desenvolvimento de seedlings de Vinca *in vitro*. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v. 20, n. 2, p. 351, jul. 2002. Suplemento 1. (CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA. 42.; CONGRESSO LATINO AMERICANO DE HORTICULTURA, 11., 2002, Uberlândia, MG.)

WILDI, E.; SCHAFFNER, K.; BUTER, B. *In vitro* of *Petasites hybridus* (Asteraceae) from leaf and petiole explants and from inflorescence buds. *Plant Cell Reports*, New York, v. 18, n. 3/4, p. 336-340, 1 Dec. 1998.

YUI, E.; PASQUAL, M.; RAMOS, J. D.; CHALFUN, N. N. J.; ISHIDA, J. S. Influência de reguladores de crescimento na proliferação *in vitro* de brotos do porta-enxerto de macieira M-7. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.28, n.5, p.597-602, maio 1993.

## CAPÍTULO 3

### ASPECTOS ANATÔMICOS COMPARATIVOS EM DIFERENTES AMBIENTES EM FOLHAS DE *Lychnophora* *pinaster* Mart.

#### RESUMO

SOUZA, Ana Valéria de. ASPECTOS ANATÔMICOS COMPARATIVOS EM FOLHAS DE *Lychnophora pinaster* MART. EM DIFERENTES AMBIENTES. In. \_\_\_\_\_. Propagação *in vitro* e aspectos anatômicos de (*Lychnophora pinaster*) MART.. 2003. Cap. 2. Dissertação (Dissertação – mestrado em Fitotecnia) Universidade Federal de Lavras, Lavras . \*

O conhecimento das estruturas internas dos vegetais é de grande importância no entendimento das funções específicas desencadeadas em cada órgão da planta. Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de caracterizar alguns aspectos de anatomia foliar das plântulas obtidas *in vitro* e posteriormente aclimatizadas, comparando-as àquelas provenientes do habitat natural. Através de seções transversais das folhas das plantas dos diferentes ambientes de cultivo, pôde-se comprovar a eficiência da técnica. Já nas condições *in vitro*, foi possível observar uma perfeita distinção dos parênquimas paliçádico e esponjoso dos tricomas característicos das espécies xerófitas, a ocorrência de tricomas glandulares em ambas as faces da epiderme, semelhantemente às plantas provenientes das condições naturais. Houve diferença estatística entre as espessuras de todos os tecidos, nos diferentes ambientes de cultivo. Folhas das plantas cultivadas *in vivo* mostraram-se menos espessas quando comparadas às folhas das plantas *in vitro* e aclimatizadas, porém, a cutícula das folhas das plantas *in vivo* apresentou-se mais espessa em relação às folhas das plantas dos outros ambientes de cultivo. As diferenças observadas podem ser relacionadas à sobrevivência das mudas propagadas *in vitro* após transferência para o campo. Nas seções transversais do caule apical e mediano de plantas provenientes do habitat natural, observou-se a ocorrência de anéis de lignina (esclerênquima).

---

\* Comitê Orientador: José Eduardo Brasil Pereira Pinto (Orientador), Evaristo Mauro de Castro - UFLA.

## ABSTRACT

Souza, Ana Valéria de. **COMPARATIVE ANATOMICAL ASPECTS IN LEAVES OF *Lychnophora pinaster* MART. IN DIFFERENT ENVIROMENTS.** In. \_\_\_\_\_. *In vitro* propagation and anatomical aspects of (*Lychnophora pinaster*) MART.. 2003. Cap. 2. Dissertação (Dissertação – mestrado em Fitotecnia) Universidade Federal de Lavras, Lavras . \*

The knowledge of the internal structures of the vegetables are very importante in the understanding of specific functions unchained in each organ of the plant. This work was development with objective of characterize some aspects of leaf anatomy of plantets obtained *in vitro* and acclimatization, comparing them to those from native habitat, regarding the anatomical characteristics of the essential leaves to its survival. Through transversal section of plants leaves from different environments, it could prove the efficiency of the technique. Already *in vitro* conditions, were possible to observe parenchymatous palisade and spongy of tricomas characteristic of the species xerophites, tricomas occurrence glandular in both epidermis faces, likely to the plants from native terms. There was difference statistics among thicknesses of all tissues, in the different environments cultivation. Leaves from cultivated plants *in vivo*, showed thickless, when compared to the leaves of the plants *in vitro* and acclimatized. However, the leaves cuticle of plants *in vivo*, is significantly thicker regarding the leaves of plants from other enviroment of cultivation. In the apical stem's section and medium of plants from native habitat, it was observed the occurency of lignine rings(esclerenchyma).

---

\* Comitê Orientador: José Eduardo Brasil Pereira Pinto (Orientador), Evaristo Mauro de Castro - UFLA.

# 1 INTRODUÇÃO

*Lychnophora pinaster* Mart. (Asteraceae) é uma espécie medicinal lenhosa conhecida popularmente como arnica ou arnica mineira, encontrada nos campos rupestres de algumas regiões do cerrado brasileiro, ocorrendo em ambientes extremamente xéricos, parecendo estar restrita também a um tipo particular de substrato. As plantas variam de subarbusto ereto com muitos ramos a pequenos arbustos e, mais raramente, arbustos mais altos (Semir, 1991). Possuem folhas e flores aromáticas muito utilizadas externamente na medicina popular, há décadas, na forma de extrato alcoólico, como antiinflamatório, anestésico e cicatrizante, em machucados, contusões ou hematomas.

Plantas de ocorrência em regiões mais áridas, como a arnica, podem apresentar algumas características anatômicas específicas que comprometem sua sobrevivência fora do seu habitat natural.

A espécie em estudo apresenta certa dificuldade de sobrevivência quando se busca sua propagação vegetativa pelo método convencional através de estaquia, como também seu cultivo em outros locais, onde esta não sobrevive; acarretando numa exploração predatória, pelo seu uso significativo, colocando-a atualmente na lista de espécies ameaçadas de extinção publicada pelo IBAMA. Entretanto, sendo possível manipular as condições ambientais para a manutenção de espécies dessa natureza fora do local de origem, e estas apresentando as características anatômicas específicas essenciais à sua sobrevivência; grandes sucessos podem ser alcançados e problemas de extinção de determinadas espécies, como nesse caso, podem ser solucionados.

Neste contexto, algumas considerações devem ser observadas, pois os níveis de luminosidade no ambiente influenciam as respostas anatômicas de folhas, caules e raízes, podendo afetar então, as características ditas essenciais à manutenção da espécie fora do habitat natural.

Pela técnica da cultura de tecidos é possível manipular plantas nas mais variadas formas, dependendo do objetivo proposto, permitindo cultivá-las em condições perfeitamente semelhantes àsquelas observadas no campo, bem como obter plantas com morfologia interna e externa semelhantes àsquelas provenientes das condições naturais.

Por essa espécie se encontrar em risco de extinção, e sendo possível a obtenção de plantas sem variabilidade genética e mais homogêneas através da cultura de tecidos, o objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade das plântulas obtidas *in vitro* e posteriormente aclimatizadas, comparando-as àsquelas provenientes do habitat natural, no tocante às características anatômicas das folhas essenciais à sua sobrevivência.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente experimento foi conduzido no Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras.

As plantas utilizadas foram plântulas da espécie *L. pinaster* obtidas em cultura de tecidos, plântulas aclimatizadas no solo do local de ocorrência da espécie durante 30 dias em casa de vegetação e plantas colhidas em uma população da espécie localizada em uma área de campo rupestre do Parque Florestal Municipal Abraham Kasinsk, no município de Lavras - MG, com coordenadas de 21°14'30" S e 45°20'10" W e cotas altimétricas variando de 900 a 1200 metros. O clima da região é do tipo Cwb (mesotérmico), segundo a classificação de Köppen, caracterizado por um período quente e úmido (outubro à março) e outro período frio e seco (abril à setembro). A precipitação média anual (média de 25 anos) é de 1529,7 mm e as médias de temperaturas máxima e mínimas são de 26,1° C e 14,8° C, respectivamente.

O material vegetal da cultura de tecidos, como também o aclimatizado, foram fixados diretamente em álcool 70° GL e o material coletado no campo foi fixado em solução de F.A.A. 70% (Johansen, 1940), por 72 horas e posteriormente conservado em álcool 70° GL. O estudo anatômico das folhas se baseou no exame microscópico de seções obtidas à mão livre, na região mediana das folhas.

Os cortes transversais foram clarificados em solução de hipoclorito de sódio a 20% do produto comercial, por um período que variou de três a cinco minutos e em seguida lavados em água destilada, neutralizadas em água acética 1% e montadas em glicerina a 50%. O corante usado foi a mistura de azul de astra-safranina, seguindo-se os métodos descritos por Kraus e Arduin, 1997.

A partir das seções transversais, foram efetuadas 3 medições, com o auxílio de ocular micrométrica, de 5 folhas, das espessuras das epidermes

adaxial e abaxial e também dos parênquimas esponjoso e paliádico. Portanto, a amostra foi constituída de 15 medições para cada ambiente estudado.

As fotomicrografias foram obtidas utilizando-se fotomicroscópio Olympus BX 60 existente no Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com tratamentos representados por 3 ambientes de cultivo (*in vitro*, *in vivo* e aclimatizadas), com 5 repetições e uma folha por repetição.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diferentes condições ambientais de cultivos podem influenciar a estrutura anatômica foliar das espécies em função principalmente da luminosidade, além de outros fatores.

Em relação à espécie *L. pinaster*, observou-se que diferenças significativas ocorreram na espessura da epiderme das faces adaxial e abaxial, parênquima paliçádico, parênquima esponjoso, como também na espessura total do limbo foliar das plantas cultivadas nos diferentes ambientes, como pode ser observado na Tabela 1.

TABELA 1. Espessura ( $\mu\text{m}$ ) dos tecidos epidérmicos, parênquima paliçádico, parênquima lacunoso e espessura total de plantas de *Lychnophora pinaster* Mart. em diferentes condições ambientais, na posição mediana do ramo. UFLA, Lavras – MG, 2003.

Tratamentos	Face Abaxial	Face Adaxial	Parênquima Paliçádico	Parênquima esponjoso	Espessura do Limbo
<i>In vitro</i>	18,51 b <sup>Z</sup>	26,14 c	42,88 b	52,88 a	140,21 a
Aclimatizada	21,80 a	29,71 b	49,41 a	46,43 a	147,36 a
<i>In vivo</i>	7,98 c	37,42 a	33,26 c	25,84 b	104,51 b

<sup>Z</sup>Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-knott ao nível de 5% de probabilidade.

#### Epiderme

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 1, em seção transversal da lâmina foliar observam-se variações na espessura da epiderme da face adaxial e abaxial. Observa-se na Tabela 1, para os diferentes ambientes, que a superfície adaxial das folhas provenientes de plantas de campo apresentou

maior espessura quando comparadas às das folhas de plantas *in vitro* e aclimatizadas, o que não ocorreu com a espessura da face abaxial, pois esta se revelou maior nas folhas das plantas aclimatizadas e cultivadas *in vitro*.

Essa maior espessura da face abaxial das folhas nas condições de campo, pode se dever à maior espessura da cutícula, como pode-se notar na Figura 1, espessura mais desenvolvida ocorre respectivamente em plantas do campo, aclimatizadas e *in vitro*.

Como o habitat natural apresenta algumas limitações como altas temperaturas, maior espessura da cutícula é justificada como um mecanismo de prevenção da perda de água. Essa maior espessura em condições de campo é útil para refletir a irradiância excessiva e evitar a excessiva perda de água e pode também ser um mecanismo de proteção dos cloroplastos contra altas intensidades luminosas.

Pela Figura 1, nota-se também que as plântulas *in vitro* e aclimatizadas, apesar de menor espessura, não apresentam pobre formação de cera epicuticular, fato que em muitas espécies não ocorre, devido a diversas anormalidades induzidas pelas condições de cultivo *in vitro* (Sutter, 1988; Fuchigami *et al.*, 1981) o que contribui para a perda excessiva de água, acarretando na dessecação e conseqüente morte das mudas após o transplântio para a fase de aclimatização.

Pinto & Pasqual (1990) afirmam que durante o processo de transferência das plântulas obtidas *in vitro* para a condição *ex vitro*, a cutícula é freqüentemente menos desenvolvida devido a alta umidade relativa dos frascos ser de aproximadamente 100%.

Espécies de ambientes mais áridos apresentam caracteres comuns aos das espécies xerófitas. Uma dessas características específicas, dentre outras, é a ocorrência de um grande número de tricomas que cobrem os órgãos fotossintetizantes em folhas e tecidos jovens. Segundo Ehleringer (1984), o valor

adaptativo dos tricomas está relacionado à economia de água pela planta através de um aumento na reflexão da radiação solar, que reduz a temperatura foliar e conseqüentemente, a transpiração, ou através do acúmulo da espessura da camada de ar pela qual o vapor d'água deve difundir.

Nas folhas de plantas cultivadas *in vitro*, como também naquelas de plantas aclimatizadas, já foi possível observar a ocorrência de tricomas característicos da espécie que apresentam a parede das células basais completamente cutinizadas (Fahn & Cutler, 1992) (Figura 1). Observou-se também a presença de tricomas glandulares em ambas as faces da epiderme das folhas das plantas dos três sistemas de cultivo (Figura 1).

Na seção transversal das folhas cultivadas *in vitro*, aclimatizadas e *in vivo*, observou-se que tanto a epiderme adaxial como a abaxial são constituídas por uma camada de células uniseriada, relativamente retas, sem ondulações, como relatado por Fahn & Cutler (1992), como característica de plantas xerófitas. Nas folhas *in vitro* e *in vivo*, as células da epiderme adaxial apresentaram-se em formato mais retangular, diferenciando-se das células das folhas aclimatizadas que, além das células retangulares, apresentou também células em formato arredondado. As células da epiderme adaxial das folhas das plantas provenientes do ambiente *in vivo* mostraram-se mais justapostas quando comparadas àquelas das plantas aclimatizadas, nas quais pode-se notar a ocorrência de alguns espaços intercelulares (Figura 1).

### **Mesofilo**

Observando as médias de espessura para parênquima paliçádico e esponjoso, notou-se que diferenças significativas também ocorreram entre os diferentes ambientes de cultivo (Tabela 1).

Nas seções transversais da lâmina foliar, em todos os ambientes, o mesofilo possui uma organização dorsiventral, em que o parênquima paliçádico

apresentou uma camada de células alongadas em direção perpendicular à superfície da folha (Figura 1).

Na seção transversal das folhas das plantas aclimatizadas, pode-se verificar na Figura 1, que as células do parênquima paliçádico são maiores e bem regulares quanto ao tamanho. Nas folhas das plantas cultivadas *in vivo* e *in vitro*, as células são menores, e neste último ambiente nota-se uma variação considerável no tamanho das mesmas.

O parênquima esponjoso apresentou variação na espessura e formato das células entre os diferentes ambientes de cultivo (Tabela 1 e Figura 1). Pelas médias de espessura apresentadas na Tabela 1, pode-se notar que essa foi maior nas plantas cultivadas *in vitro* e aclimatizadas. Na Figura 1 observa-se a ocorrência de 2 a 3 estratos celulares constituídos por células arredondadas ou lobadas que delimitam espaços intercelulares de diferentes dimensões.

Quanto à espessura total do limbo foliar, notou-se que as plantas do habitat natural apresentam folhas menos espessas que as do ambiente *in vitro* e aclimatizadas (Tabela 1). No entanto, pode-se notar ainda na Figura 1 que nas plantas *in vitro* não houve reduzida diferenciação do mesófilo das folhas e nem alta proporção de espaços intercelulares, segundo afirmação de vários autores (Dimassi-Theriou, *et al.*, 1997; Capella des *et al.*, 1990; Lee *et al.*, 1988), como anormalidades induzidas pelas condições de cultivo *in vitro*.

Nas seções transversais das nervuras centrais, observou-se também grande semelhança anatômica entre os tecidos. Já nas folhas das plantas cultivadas *in vitro*, nota-se perfeitamente a presença de feixes vasculares, porém todas as células do parênquima cortical se mostraram menores quando comparadas àquelas das folhas das plantas aclimatizadas e provenientes do habitat natural. A nervura central das folhas das plantas aclimatizadas apresentou maior número de feixes vasculares. Nas folhas das plantas do local de origem a nervura central apresentou uma estrutura anatômica mais arranjada

quando comparada aos outros dois ambientes. Nas seções transversais da nervura central de todos os três ambientes de cultivo, nota-se a presença de um grande número dos tricomas característicos da espécie (Figura 2).

Entretanto, resultados diferentes foram obtidos por Fidelis *et al.*, (2000), quando estudaram as características anatômicas de estruturas vegetativas da planta medicinal do cerrado *Brosimum gaudichuddi* TREC., conhecida popularmente como mama cadela, pois as organizações dos tecidos foram diferentes em função do material *in vivo* e *in vitro*. A seção transversal da folha *in vivo*, mostrou uma camada de células de parênquima paliçádico e duas camadas de células de parênquima esponjoso; nos tecidos das plantas cultivadas *in vitro* o mesofilo consistia de três a quatro camadas de células, sem distinção entre elas. O corte transversal do caule *in vitro* mostrou uma grande quantidade de tricomas que não foram formados *in vivo*.

Neste contexto, percebe-se que, para a espécie *L. pinaster*, a técnica da micropropagação é perfeitamente válida para a obtenção de plântulas aptas a serem levadas ao campo; ainda nas condições *in vitro*, nota-se perfeitamente a diferenciação entre os tecidos, além de tricomas característicos da espécie (Figuras 1 e 2), como também a presença de feixes vasculares (Figura 2), semelhante à das plantas provenientes do habitat natural.

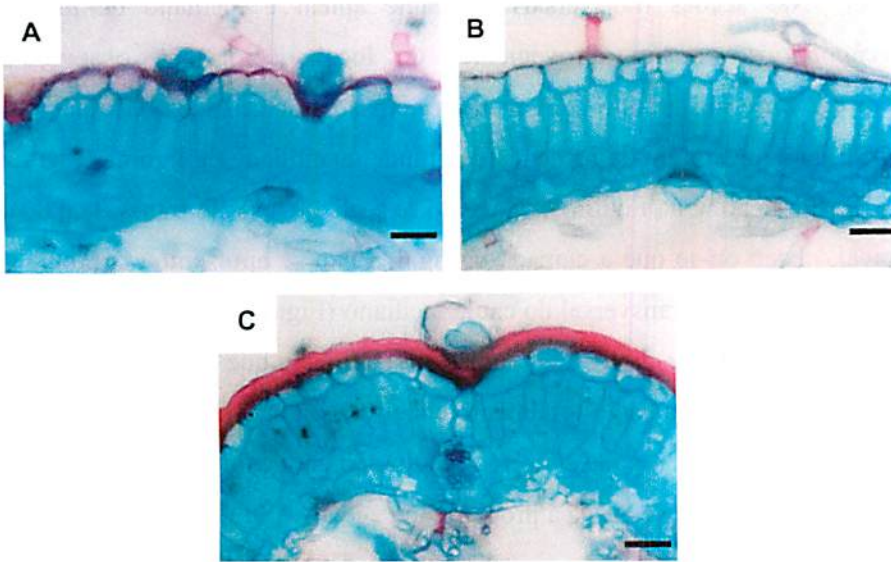


FIGURA 1. Seções transversais da folha de *Lychnophora pinaster* Mart. em condições de cultivo *in vitro* (A), aclimatizada aos 30 dias (B) e *in vivo* (C). Barras = 50  $\mu$ m. UFLA, Lavras – MG, 2003.

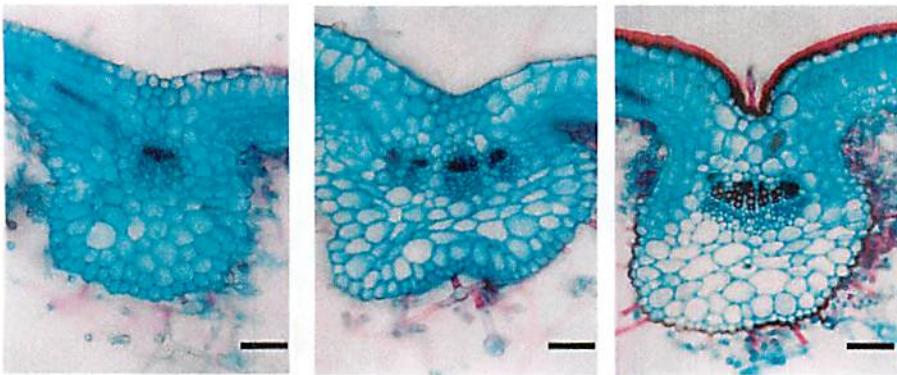


FIGURA 2. Seções transversais da nervura central de folhas de *Lychnophora pinaster* Mart. em condições de cultivo *in vitro* (A), aclimatizada aos 30 dias (B) e *in vivo* (C). Barras = 50  $\mu$ m. UFLA, Lavras – MG, 2003.

Nas seções transversais do caule apical e mediano de plantas de *Lychnophora pinaster*, provenientes do local de origem, observou-se o ocorrência de um grande número de tricomas característicos da espécie como discutido acima; além da presença de grande quantidade de lignina (Figuras 3A e 3B). Em detalhe na Figura 3A, quando se realizou a seção transversal do caule apical, observou-se que a camada de lignina não se apresentou contínua como ocorrido na seção transversal do caule mediano (Figura 3B). Nesse último, além de maior quantidade de lignina, percebeu-se também que a camada é contínua e os vasos condutores estão totalmente cobertos (Figura 3 B). Essa considerável quantidade de lignina pode ser o motivo do não enraizamento de estacas apicais e medianas, quando se busca a propagação vegetativa *in vivo*.

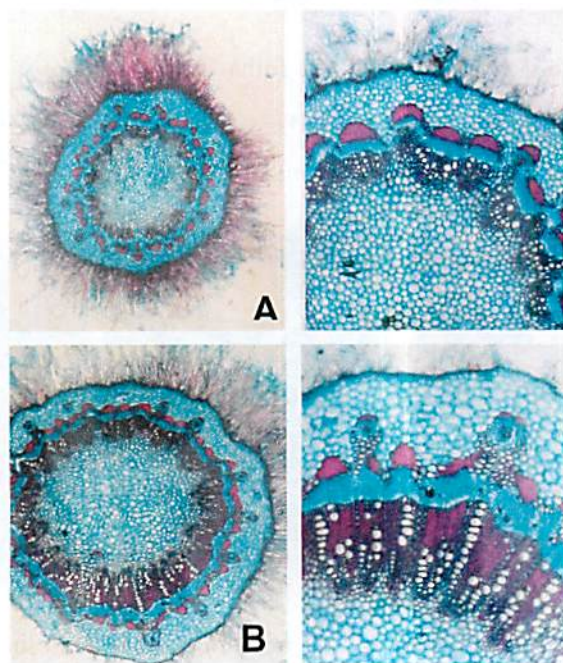


FIGURA 3. Seções transversais do caule apical (A) e caule mediano (B) de plantas de *Lychnophora pinaster* Mart. em condições *in vivo*, UFLA, Lavras – MG, 2003.

## 4 CONCLUSÕES

A cultura de tecidos é altamente segura na produção de plântulas da espécie *Lychnophora pinaster* com qualidade, já que a técnica da micropropagação não afetou a anatomia das plântulas de arnica.

Nas condições *in vitro* foi perfeitamente possível observar a diferenciação dos tecidos, como também sua grande semelhança quando comparados aos das plantas provenientes do habitat natural, além de caracteres xeromorfos característicos da espécie, como os tricomas.

O não enraizamento de estacas de arnica *in vivo*, pode ser devido à presença de anéis de lignina (esclerênquima), caracterizando ser a presença de uma barreira anatômica ao enraizamento.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAPELLADES, R.; FONTARNAU, R.; CARULLA, C.; DEBERGH, P. Environment influences anatomy of stomata and epidermal cells in tissue-cultured *Rosa multiflora*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Alexandria, v. 115, n. 1, p. 141-145, 1990.

DIMASSI-THERIOU, K.; BOSABALIDIS, A. M. Effects of light, magnesium and sucrose on leaf anatomy, photosynthesis, starch and total sugar accumulation, in Kiwifruit cultured *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht,

EHLERINGER, J. Ecology and ecophysiology of leaf pubescence in North American desert plants. In: RODRIGUES, E.; HEALEY, P. C.; MEHTA, I. (Ed.) *Biology and chemistry of trichomes*. New York: Plenum Press, 1984. p. 113-133.

FAHN, A.; CUTLER, D. F. *Xerophytes*. Berlim, 1992. 176 p.

FIDELIS, I.; CASTRO, E. M de.; PINTO, J. E. B. P.; et al. Características anatômicas de estruturas vegetativas de *Brosimum gaudichaudii* TRÉC. Desenvolvidas *in vitro* e *in vivo*. In: *Ciência e agrotecnologia*, Lavras, v. 24, n. 2, p. 327-336, jan./mar. 2000.

FUCHIGAMI, L.H.; CHENG, T.Y.; SOELDNER, A. Abaxial transpiration and water loss in aseptically cultured plum. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Alexandria, v. 106, n. 4, p. 519-522, 1981.

JOHANSEN, B. A. *Plant microtechnique*. New York: Mc Graw-Hill, 1940. 523 p.

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

LEE, N.; WETZSTEIN, H. Y.; SOMMER, H. E. Quantum flux density effects on the anatomy and surface morphology of *in vitro* – and *in vivo* – developed

sweetgum leaves. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 113, n. 1, p. 167-171, 1988.

PINTO, J. E. B. P.; PASQUAL, M. **Introdução a cultura de tecidos**. Lavras: ESAL, 1990.73 p. (Apostila).

SEMIR, J. **Revisão taxonômica de *Lychnophora* Mart. (Vernoniaceae: Compositae)**. 1991. 515 p. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Universidade de Campinas, Campinas, SP.

SUTTER, E.G. Stomatal and cuticular water loss from apple, cherry and sweetgum plants after removal from *in vitro* culture. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 113, n. 2, p. 234-238, Feb. 1988.

