

**UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI**

**Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal**

**Clara de Almeida Guerra**

**ALONGAMENTO E ENRAIZAMENTO *IN VITRO* E ACLIMATAÇÃO DE  
PLÂNTULAS DE ARNICA (*Lychnophora pohlii* Sch. Bip.).**

**Diamantina**

**2017**

**Clara de Almeida Guerra**

**ALONGAMENTO E ENRAIZAMENTO *IN VITRO* E ACLIMATAÇÃO DE  
PLÂNTULAS DE ARNICA (*Lychnophora pohlii* Sch. Bip.).**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Miranda Titon

**Diamantina**

**2017**

Ficha Catalográfica – Serviço de Bibliotecas/UFVJM  
Bibliotecário Anderson César de Oliveira Silva, CRB6 – 2618.

G934a

Guerra, Clara de Almeida

Alongamento e enraizamento in vitro e aclimação de plântulas de arnica (*Lychnophora pohlii* Sch. Bip.) / Clara de Almeida Guerra. – Diamantina, 2017.

67 p. : il.

Orientador: Miranda Titon

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

1. Micropropagação. 2. Reguladores de crescimento. 3. Meio de cultura. 4. Espécie endêmica. I. Título. II. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

**CDD 631.53**

**Clara de Almeida Guerra**

**ALONGAMENTO E ENRAIZAMENTO *IN VITRO* E ACLIMATAÇÃO DE  
PLÂNTULAS DE ARNICA (*Lychnophora pohlii* Sch. Bip.).**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Miranda Titon

Data da aprovação: 16/02/2017

---

Prof. Dr. José Barbosa dos Santos  
UFVJM

---

Prof. Dr. Márcio Takeshi Sugawara  
IFMG

---

Prof. Dr. Evandro Luiz Mendonça Machado  
UFVJM

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Miranda Titon  
UFVJM

**Diamantina**

## AGRADECIMENTOS

À DEUS por ter me abençoado com essa vitória em minha vida.

Aos meus pais Carlos e Leonildes, pelo amor incondicional, apoio moral e financeiro. Pessoas essenciais no incentivo do meu sucesso pessoal e profissional, obrigada por terem apostado em mim.

Aos meus irmãos Cesar Guerra e Carla Guerra pelo amor, companheirismo ao longo da vida e por sempre estarem presente.

Ao meu namorado Lucas pelo amor, confiança, paciência e compreensão nos melhores e piores momentos dedicados a essa dissertação de mestrado, obrigada pela força para seguir em frente.

Á Sônia e as amigas da pensão, em especial a Aline e Isabel, por todo amor, companheirismo e cuidado que tiveram comigo nesses anos dois anos de mestrado.

As minhas amigas Silviane e Daiane pela amizade sincera e por estarem sempre comigo.

Á Professora, Miranda Titon, pela orientação, confiança, obrigada pelos ensinamentos durante essa importante etapa da minha vida.

Aos colegas de laboratório

À CAPES, pelo apoio financeiro.

À UFVJM, pela oportunidade e formação profissional.

A todos que contribuíram de uma forma ou de outra para a conclusão deste trabalho.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

*Arthur Schopenhauer*

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma metodologia de propagação *in vitro* de *Lychnophora pohlii* Sch. Bip., envolvendo as etapas de alongamento, enraizamento e pré-aclimatação de plântulas cultivadas *in vitro*. Na etapa de alongamento, no primeiro experimento avaliou-se o efeito dos reguladores de crescimento ANA + BAP, ANA + TDZ e GA<sub>3</sub> combinados com os meios MS e MS/2 na altura média e percentual de calos. Ainda nessa etapa, no experimento dois e três, utilizou-se o meio MS e concentrações de GA<sub>3</sub> (0; 0,5; 1; 2 e 4 mg L<sup>-1</sup>) e ANA (0,1; 0,3; 0,6; e 0,9 mg L<sup>-1</sup>), e avaliou-se a altura média, percentual de enraizamento, número médio de raízes e percentual de calos. Na etapa de enraizamento, nos experimento quatro e cinco foram testadas concentrações de ANA e AIB (1,0 e 2 mg L<sup>-1</sup>) e quatro tempos de permanência dos explantes no meio (7, 14, 21 e 28 dias) e as avaliações foram realizadas semanalmente quanto ao percentual de enraizamento, número médio de raiz, altura média e percentual de calos. Também nessa etapa, para os experimentos seis e sete, os tratamentos foram constituídos de dois tipos de meio (MS/2 e WPM/2) e concentrações de ANA e AIB (0,1 e 0,5 mg L<sup>-1</sup>) e avaliados o percentual de enraizamento, número médio de raízes, altura média e percentual de calos. Na etapa de pré-aclimatação, as plântulas foram transplantadas para copos plásticos (200 cm<sup>3</sup>) contendo vermiculita<sup>®</sup> autoclavada e os tratamentos foram constituídos por plântulas cobertas com saco de polietileno intacto, plântulas cobertas com saco de polietileno perfurado e ausência de cobertura, onde se avaliou o percentual de sobrevivência, altura média, comprimento médio da raiz principal, matéria fresca da parte aérea, matéria fresca da raiz, matéria seca da parte aérea e matéria seca da raiz. Na fase de alongamento, a maior média de altura foi verificada em explantes cultivados em meio MS, suplementado com ANA + BAP. A combinação de ANA + TDZ aumentou o percentual de calo. As concentrações de 0,9 e 0,1 mg L<sup>-1</sup> proporcionaram a maior e menor número médio de raiz por tratamento. O menor percentual de calo foi observado na concentração de 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ANA. Na fase de enraizamento a concentração de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA proporcionou maior média de altura e menor percentual de calo e na concentração de 2,0 mg L<sup>-1</sup> se observou a menor média de altura e o maior percentual de calo. O tempo de permanência de 21 dias possibilitou a maior média de altura dos explantes tratados com ANA e AIB. A concentração de 2,0 mg L<sup>-1</sup> de AIB contribuiu com o maior número médio de raízes. O meio WPM/2 suplementado com 0,5 mg L<sup>-1</sup> de ANA obteve o maior número médio de raízes. A maior média para a altura foi encontrada nos explantes cultivados em meio WPM/2. A concentração de 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ANA proporcionou o menor percentual de calo. A

concentração de 0,5 mg L<sup>-1</sup> de AIB proporcionou os maiores valores para o percentual de enraizamento, número médio de raízes e percentual de calo. Na fase de pré-aclimatação, o maior percentual de sobrevivência foi observado no tratamento em que as plântulas foram cobertas com sacos de polietileno intacto. As plântulas cobertas com sacos de polietileno perfurado expressaram maior altura média, comprimento médio da raiz, matéria fresca e seca da parte aérea. Nessas condições os explantes mostraram-se responsivos quanto aos tratamentos testados, denotando boas perspectivas quanto ao cultivo *in vitro* dessa espécie.

Palavras-Chave: Micropropagação; Reguladores de crescimento; Meio de cultura; Espécie endêmica.



## ABSTRACT

The objective of this work was to develop an in vitro propagation methodology of *Lychnophora pohlii* Sch. Bip. including the stretching, rooting and pre-acclimatization of seedlings grown in vitro stages. In the stretching stage, the effect of the growth regulators ANA + BAP, ANA + TDZ and GA3 combined with the MS and MS/2 media were evaluated at the mean height and callus percentage. At this stage, the effect of concentrations of GA3 (0, 0.5, 1, 2 and 4 mg L<sup>-1</sup>) and ANA (0.1, 0.3, 0.6, and 0.9 mg L<sup>-1</sup>) were evaluated at the mean height, rooting percentage, mean number of roots and percentage of callus. In the rooting stage, ANA and IBA concentrations (1.0 and 2 mg L<sup>-1</sup>) and four dwell times of the explants in the medium (7, 14, 21 and 28 days) were tested and rooting percentage, root mean number, mean height and callus percentage were evaluated weekly. Also in this step, the treatments were composed of two types of medium (MS/2 and WPM/2) and ANA and IBA concentrations (0.1 and 0.5 mg L<sup>-1</sup>). In the pre-acclimation stage, the seedlings were transplanted to plastic cups (200 cm<sup>3</sup>) containing autoclaved vermiculite®. The treatments were composed by seedlings covered with intact polyethylene bag, seedlings covered with perforated polyethylene bag and seedling uncovered. It was evaluated the percentage of survival, mean height, mean length of the main root, fresh shoot matter, fresh root matter, shoot dry matter and root dry matter. In the elongation phase, the highest mean height was verified in explants grown in MS medium, supplemented with ANA + BAP. The combination of ANA + TDZ increased the callus percentage. Concentrations of 0.9 and 0.1 mg L<sup>-1</sup> provided the highest and lowest root mean number per treatment, respectively. The lowest percentage of callus was observed for the concentration of 0.1 mg L<sup>-1</sup> of ANA. In the rooting stage, the concentration of 1.0 mg L<sup>-1</sup> of ANA provided a higher average height and a lower percentage of callus. At the concentration of 2.0 mg L<sup>-1</sup>, the lowest mean height and the highest percentage of callus were observed. The dwell time of 21 days allowed the highest average height of the explants treated with ANA and AIB. The concentration of 2.0 mg L<sup>-1</sup> of AIB contributed with the highest average number of roots. The WPM/2 medium supplemented with 0.5 mg L<sup>-1</sup> of ANA obtained the highest mean number of roots. The highest mean height was found in the explants grown on WPM/2 medium. The concentration of 0.1 mg L<sup>-1</sup> of ANA provided the lowest percentage of callus. The concentration of 0.5 mg L<sup>-1</sup> of IBA provided the highest values for rooting percentage, mean number of roots and percentage of callus. In the pre-acclimatization stage, the highest percentage of survival was

observed in the treatment in which the seedlings were covered with bags of intact polyethylene. Seedlings covered with perforated polythene bags expressed higher mean height, root mean length, fresh and dry shoot matter. In these conditions, the explants were responsive to the treatments tested, indicating good perspectives regarding the in vitro cultivation of this species.

**Keywords:** Micropropagation; Growth regulators; Culture medium; Endemic species.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1-** Percentual de calo por classes de intensidade de calejamento em explantes de *Lychnophora pohlii* cultivados *in vitro*, em função das concentrações do meio MS e das combinações de hormônios, aos 45 dias. 0) Inexistente, 1) Baixa, 2) Média, 3) Alta.....**28**
- Figura 2-** Altura média e percentual de calo em explantes de *Lychnophora pohlii* cultivados *in vitro*, função das concentrações do meio MS e das combinações de hormônios, ao longo do tempo.....**29**
- Figura 3-** Altura média de explantes de *Lychnophora pohlii* cultivados *in vitro*, em função das concentrações de GA<sub>3</sub>, na implantação do experimento (A) e aos 60 dias de cultivo (B). Barra = 1 cm.....**30**
- Figura 4-** Altura média de explantes de *Lychnophora pohlii* cultivados *in vitro*, em função das concentrações de GA<sub>3</sub>, ao longo do tempo.....**31**
- Figura 5-** Altura média e percentual de enraizamento de explantes de *Lychnophora pohlii* cultivados *in vitro*, em função das concentrações de ANA, aos 45 dias. As barras indicam o desvio-padrão.....**32**
- Figura 6-** Altura média dos explantes de *Lychnophora pohlii* cultivados *in vitro* em função das concentrações de ANA, na implantação do experimento (A) e aos 45 dias de cultivo (B). Barra = 1 cm.....**32**
- Figura 7-** Número médio de raízes e percentual de calo de explantes de *Lychnophora pohlii* cultivados *in vitro*, em função das concentrações de ANA, aos 45 dias.....**33**
- Figura 8-** Percentual de explantes observados nas quatro classes de calo, em resposta as concentrações de ANA, aos 45 dias de cultivo. 0) Inexistente, 1) Baixa, 2) Média e 3) alta.....**33**
- Figura 9-** Classificação de calo nos explantes de *Lychnophora pohlii* cultivados *in vitro*, em função das concentrações de ANA, aos 45 dias. 0) Inexistente, 1) Baixa, 2) Média e 3) alta. Barra = 1 cm.....**34**
- Figura 10-** Altura média, percentual enraizamento, número médio de raízes e percentual de calo dos explantes de *Lychnophora pohlii*, em função das concentrações de ANA, ao longo do tempo.....**35**
- Figura 11-** Explantes com: folhas enroladas (A), rebaixamento do meio (B), oxidação (C) e crescimento exagerado de calo (D), aos 60 dias de cultivo. Barra = 1 cm.....**35**

<b>Figura 12-</b> Número médio de raízes e percentual de enraizamento dos explantes de <i>Lychnophora pohlii</i> cultivados <i>in vitro</i> , em função das concentrações de ANA e tempo de permanência no meio, aos 28 dias de cultivo. As barras indicam o desvio padrão.....	<b>37</b>
<b>Figura 13-</b> Número médio de raízes e percentual de enraizamento dos explantes de <i>Lychnophora pohlii</i> cultivados <i>in vitro</i> , em função das concentrações de ANA e tempo de permanência no meio, ao longo do tempo.....	<b>39</b>
<b>Figura 14-</b> Altura média e percentual de calo dos explantes de <i>Lychnophora pohlii</i> cultivados <i>in vitro</i> , em função das concentrações de ANA e tempo de permanência no meio, ao longo do tempo.....	<b>40</b>
<b>Figura 15-</b> Percentual de enraizamento dos explantes de <i>Lychnophora pohlii</i> cultivados <i>in vitro</i> , em função das concentrações de AIB e tempo de permanência no meio, aos 35 dias de cultivo. As barras indicam o desvio padrão.....	<b>42</b>
<b>Figura 16-</b> Número médio de raízes, altura média e percentual de calo dos explantes de <i>Lychnophora pohlii</i> cultivados <i>in vitro</i> , em função das concentrações de AIB e tempo de permanência no meio, ao longo do tempo.....	<b>43</b>
<b>Figura 17-</b> Percentual de enraizamento dos explantes de <i>Lychnophora pohlii</i> cultivados <i>in vitro</i> , em função das concentrações de AIB e tempo de permanência no meio, ao longo do tempo.....	<b>44</b>
<b>Figura 18-</b> Percentual de enraizamento dos explantes de <i>Lychnophora pohlii</i> cultivados <i>in vitro</i> , em função dos meios de cultura (MS/2 e WPM/2) e das concentrações de ANA, aos 30 dias. As barras indicam o desvio-padrão.....	<b>45</b>
<b>Figura 19-</b> Percentual de calos em explantes de <i>Lychnophora pohlii</i> cultivados <i>in vitro</i> , em função dos meios de cultura e das concentrações de ANA, aos 30 dias.0) Inexistente, 1) Baixa, 2) Média e 3) alta.....	<b>46</b>
<b>Figura 20-</b> Classificação de calo nos explantes de <i>Lychnophora pohlii</i> cultivados <i>in vitro</i> , em função dos meios de cultura e das concentrações de ANA, aos 30 dias. 0) Inexistente, 1) Baixa, 2) Média e 3) Alta. Barra = 1 cm.....	<b>47</b>
<b>Figura 21-</b> Percentual de calo dos explantes de <i>Lychnophora pohlii</i> cultivados <i>in vitro</i> , em função dos meios de cultura e das concentrações de AIB, aos 30 dias. 0) Inexistente, 1) Baixa e 2) Média.....	<b>48</b>
<b>Figura 22-</b> Classificação de calo nos explantes de <i>Lychnophora pohlii</i> cultivados <i>in vitro</i> , em função dos meios de cultura e das concentrações de AIB, aos 30 dias. 0) Inexistente, 1) Baixa e 2) Média. Barra = 1 cm.....	<b>49</b>
<b>Figura 23-</b> Matéria fresca das raízes e matéria seca das raízes das plântulas de plântulas de <i>Lychnophora pohlii</i> cobertas com sacos de polietileno, saco de polietileno perfurado e ausência de cobertura, aos 35 dias de cultivo.....	<b>51</b>

**Figura 24-** Sobrevivência das plântulas de *Lychnophora pohlii* cobertas com sacos de polietileno, saco de polietileno perfurado e ausência de cobertura, ao longo do tempo.....52

**Figura 25-** Aspecto das folhas e raízes de plântulas de *L. pohlii*. A e D) cobertas com sacos de polietileno; B e E) cobertas com saco de polietileno perfurado e C e F) ausência de cobertura, aos 35 dias de cultivo.....52

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1-** Composição do meio de cultura MS e WPM, utilizados nos experimentos de alongamento e enraizamento de explantes de *Lychnophora pohlii*.....**23**
- Tabela 2-** Resultado da análise de variância para a característica altura média e percentual de calo dos explantes de *Lychnophora pohlii* cultivados *in vitro*, em resposta às concentrações do meio MS e combinações de hormônios, aos 45 dias.....**27**
- Tabela 3-** Altura média e percentual de calos em função da interação concentrações do meio MS x combinações de hormônios e do fator combinações de hormônio, para os explantes de *Lychnophora pohlii* cultivados *in vitro*, aos 45 dias.....**28**
- Tabela 4-** Resultado da análise de variância para a característica altura média de explantes de *Lychnophora pohlii* cultivados *in vitro*, em resposta às concentrações de GA<sub>3</sub>, aos 60 dias.....**30**
- Tabela 5-** Altura média de explantes de *Lychnophora pohlii* cultivados *in vitro*, em resposta às concentrações de GA<sub>3</sub>, aos 60 dias.....**30**
- Tabela 6-** Resultado da análise de variância para as características altura média, percentual de enraizamento, número médio de raízes e percentual de calo dos explantes de *Lychnophora pohlii*, cultivados *in vitro*, em resposta às concentrações de ANA, aos 45 dias de cultivo.....**31**
- Tabela 7-** Resultado da análise de variância para as características percentual de enraizamento, número médio de raiz, altura média e percentual de calo dos explantes de *Lychnophora pohlii* cultivados *in vitro*, em resposta as concentrações de ANA e o tempo de permanência dos explantes no meio.....**36**
- Tabela 8-** Altura média e percentual de calo em função das concentrações de ANA, aos 35 e 28 dias, respectivamente e tempo de permanência no meio, para os explantes de *Lychnophora pohlii* cultivados *in vitro*.....**38**
- Tabela 9-** Resultado da análise de variância para as características percentual de enraizamento, número médio de raiz, altura média e percentual de calo dos explantes de *Lychnophora pohlii* cultivados *in vitro*, em resposta as concentrações de AIB e o tempo de permanência dos explantes no meio.....**41**
- Tabela 10-** Valores médios para número de raiz, altura e percentual de calo em função das concentrações de AIB e tempo de permanência no meio, para os explantes de *Lychnophora pohlii* cultivados *in vitro*.....**41**
- Tabela 11-** Resultado da análise de variância para as características percentual de enraizamento, número médio de raiz, altura média e percentual de calo em explantes de *Lychnophora pohlii* cultivados *in vitro*, em resposta aos meios de cultura x concentrações de ANA, aos 30 dias.....**44**

**Tabela 12-** Valores médios para número de raízes, altura e percentual de calo em função da interação meio de cultura x concentrações de ANA e dos fatores isolados, meios de cultura e concentrações de ANA para os explantes de *Lychnophora pohlii* cultivados *in vitro*, aos 30 dias.....**46**

**Tabela 13-** Resultado da análise de variância para as características percentual de enraizamento, NR, altura média e percentual de calo em explantes de *Lychnophora pohlii* cultivados *in vitro*, em resposta aos meios de cultura e concentrações de AIB, aos 30 dias.....**47**

**Tabela 14-** Valores médios de percentual de enraizamento, número médio de raiz, altura média e percentual de calo em função dos fatores meios de cultura e concentrações de AIB, para os explantes de *Lychnophora pohlii* cultivados *in vitro*.....**48**

**Tabela 15-** Resultado da análise de variância para as características percentual de sobrevivência, altura média, comprimento médio da raiz, matéria fresca da parte aérea, matéria fresca da raiz, matéria seca da parte aérea e matéria seca da raiz, de plântulas de *Lychnophora pohlii*, em resposta aos tratamentos de pré-aclimação.....**49**

**Tabela 16-** Valores médios para as variáveis percentual de sobrevivência (SOB%), altura média, comprimento médio da raiz, matéria fresca da parte aérea (MFPA) e matéria seca da parte aérea (MSPA), de plântulas de *Lychnophora pohlii*, em resposta aos tratamentos de pré-aclimação.....**50**

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANA	Ácido naftalenoacético
BAP	6-benzilaminopurina
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CNCFLORA	Centro Nacional de Conservação da Flora
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CVexp	Coefficiente de variação experimental
DEF	Departamento de Engenharia Florestal
DIC	Delineamento experimental inteiramente casualizado
DNA	Ácido desoxirribonucléico
F	Fisher
GA <sub>3</sub>	Ácido Giberélico
JK	Juscelino Kubitschek
LMF	Laboratório de Melhoramento Florestal
MFPA	Matéria Fresca da Parte Aérea
MFR	Matéria Fresca de Raízes
MS	Meio de cultura formulado por Murashigue & Skoog (1962)
MSPA	Matéria Seca da Parte Aérea
MSR	Matéria Seca de Raízes
PVP	Polivinilpirrolidona
SOB	Sobrevivência
TDZ	Thidiazuron
UFVJM	Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri
WPM	Wood Plant Medium, meio de cultura formulado por Lloyd & McCown (1981)



## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>7</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>9</b>
<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES</b> .....	<b>11</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>14</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	<b>16</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>21</b>
2.1 Fase de Alongamento .....	<b>23</b>
2.1.1 Experimento I: Influência do BAP, TDZ e GA <sub>3</sub> no alongamento de explantes de <i>L. pohlii</i> .....	<b>23</b>
2.1.2 Experimento II: Influência de concentrações de GA <sub>3</sub> no alongamento de explantes de <i>L. pohlii</i> .....	<b>24</b>
2.1.3 Experimento III: Efeito da combinação ANA e BAP no alongamento de explantes de <i>L. pohlii</i> .....	<b>24</b>
2.2 Fase de Enraizamento.....	<b>25</b>
2.2.1 Experimento IV e V: Efeito de diferentes concentrações e tempos de permanência em meio de cultura com ANA ou AIB no enraizamento de <i>L. pohlii</i> .....	<b>25</b>
2.2.2 Experimento VI e VII: Influência do meio de cultura e de auxinas no enraizamento de explantes de <i>L. pohlii</i> .....	<b>25</b>
2.3 Fase de pré-aclimatação.....	<b>26</b>
2.3.1 Experimento VIII: Influência de métodos para a manutenção da umidade em ambiente fechado na pré-aclimatação de plântulas de <i>L. pohlii</i> .....	<b>26</b>
2.4 Análise de dados.....	<b>26</b>
<b>3. RESULTADOS</b> .....	<b>27</b>
3.1 Fase de Alongamento .....	<b>27</b>
3.1.1 Experimento I: Influência do BAP, TDZ e GA <sub>3</sub> no alongamento de explantes de <i>L. pohlii</i> .....	<b>27</b>
3.1.2 Experimento II: Influência de concentrações de GA <sub>3</sub> no alongamento de explantes de <i>L. pohlii</i> .....	<b>29</b>
3.1.3 Experimento III: Efeito da combinação ANA e BAP no alongamento de <i>L. pohlii</i> .....	<b>31</b>
3.2. Fase de Enraizamento.....	<b>36</b>
3.2.1. Experimento IV: Efeito de diferentes concentrações de ANA e tempos de permanência em meio de cultura no enraizamento de <i>L. pohlii</i> .....	<b>36</b>
3.2.2. Experimento V: Efeito de diferentes concentrações de AIB e tempos de permanência em meio de cultura no enraizamento de <i>L. pohlii</i> .....	<b>40</b>

3.2.3 Experimento VI: Influência do meio MS e WPM e da auxina ANA no enraizamento de explantes de <i>L. pohlii</i> .....	44
3.2.4 Experimento VII: Influência do meio MS e WPM e da auxina AIB no enraizamento de explantes de <i>L. pohlii</i> .....	47
3.3. Fase de pré-aclimação.....	49
3.3.1 Experimento VIII: Influência de métodos para a manutenção da umidade em ambiente fechado na pré-aclimação de plântulas de <i>L. pohlii</i> .....	49
<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	<b>53</b>
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	<b>61</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>61</b>

## 1. INTRODUÇÃO

As indústrias, em especial do ramo farmacêutico, têm despertado interesse na flora do cerrado. Dessa maneira, como efeito colateral, a descoberta de novos princípios bioativos ocasiona o aumento do extrativismo das plantas medicinais e com isso acelera o processo de extinção de muitas espécies (FERREIRA, 2010).

Em virtude do alto nível de endemismo associado ao intenso extrativismo predatório e características peculiares de reprodução que dificultam a propagação por métodos convencionais, parte da flora do cerrado encontra-se em risco de extinção, destacando-se as espécies do gênero *Lychnophora* (SEMIR, 1991; SOUZA et al., 2004).

O gênero *Lychnophora*, constituído por 68 espécies, pertencente à família Asteraceae, é endêmico do Brasil, sendo sua disseminação restrita aos complexos rupestres de quartzito, campo sujo e campo limpo em altitudes elevadas na região de cerrado dos estados da Bahia, Minas Gerais e Goiás (SEMIR, 1991). Nessas áreas, ocorre expressiva diversidade de microambientes, conferindo um alto grau de endemismo e um grande número de plantas ainda não conhecidas, configurando como áreas de importância ecológica e de valor extremo (ALMEIDA et al., 2014).

Plantas desse gênero apresentam em suas folhas, cascas e raízes, compostos bioativos. São consideradas plantas com potencial medicinal com relevância socioeconômica bastante pronunciada, sendo muito utilizadas pelas populações do meio rural brasileiro, uma vez que, apresentam baixa toxicidade e risco mínimo de efeitos colaterais (RODRIGUES; CARVALHO, 2001).

As áreas de ocorrência do gênero *Lychnophora* estão relacionadas os ambientes de topografia acidentada, solos e climas secos, alta irradiação de luz ultravioleta, alternância entre períodos de seca e chuva e ocorrência de queimadas (FERREIRA et al., 2010). A coevolução dessas plantas com tais características particulares gerou mecanismos de proteção contra efeitos deletérios das condições ambientais estressantes, o que pode estar associado à produção de compostos citotóxico e pigmentos protetores de UV, especificadamente as lactonas sesquiterpênicas e flavonóides (CHICARO et al., 2004; FERREIRA et al., 2010).

As lactonas sesquiterpênicas são consideradas marcadores químicos da família Asteraceae, conhecidas pela ampla variedade de atividade biológica e farmacológica, como exemplo, a ação antibacteriana e antitumoral devido à habilidade das lactonas de inibir a síntese de DNA (SEAMAN, 1982).

Os flavonóides são substâncias químicas polifenólicas com grande potencial de atividade biológica tais como: antibacteriana, antiviral, antialérgica, antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral, analgésica, antidiabética, antiulcera, hormonal e antitrombótica (HARBORNE; WILLIAMS, 2000).

A espécie *Lychnophora pohlii* Sch. Bip., conhecida popularmente como arnica, é uma espécie nativa do cerrado brasileiro, considerada endêmica. É diferenciada pela sua morfologia altamente diversificada em relação ao hábito, apresentando-se na forma de arbustos, arvoretas candelabrifformes pinóides e subarbustos bromelióides, com 2,5 metros nas formas mais altas (SEMIR, 1991).

É comumente empregada na medicina popular na forma de extrato alcoólico, em consequência de suas propriedades anti-inflamatórias, analgésicas e cicatrizante. Salienta-se ainda o seu potencial de uso na terapia de várias doenças inflamatórias crônicas e também utilizada na indústria farmacêutica como matéria prima para a fabricação de gel e pomadas (SOUZA et al., 2004; KANASHIRO et al., 2006). Não obstante, segundo Graef et al. (2005) compostos bioativos de *L.pohlii* expressam efeito deletérios contra formas tripomastigotas do protozoário *Trypanosoma cruzi*.

*Lychnophora pohlii* enquadra-se na lista vermelha de espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção, na categoria “em perigo de extinção”, do Centro Nacional de Conservação da Flora (CNCFlora, 2012). Tal situação é resultante da intensificação das intervenções antrópicas no cerrado, como o extrativismo considerado predatório, visto que, a espécie apresenta excessiva dificuldade de propagação e o crescimento exponencial da agricultura e pecuária, que manejadas com exiguidade de qualquer técnica de manejo sustentável fomentou efeitos negativos claramente perceptíveis como a fragmentação florestal que favorece a endogamia, ocasionando a perda da variabilidade genética e do vigor da espécie (LOPES, 2011).

As sementes de *L. pohlii* apresentam baixo potencial de germinação, ainda que submetidas a tratamentos pré-germinativos, mecânicos ou químicos, caracterizando a dormência das sementes (GONZAGA, 2013). A dormência pode ser resultante do efeito da presença de dimorfismo dos aquênios, no caso, representado por distintas colorações e tamanhos, característica partilhada por espécies da família Asteraceae (CARDAZZO; SNAPÓ, 2002), o que ocasiona aquênios malformados e menos vigorosos.

Na presença desse panorama de dificuldade de propagação natural e por métodos convencionais, dado que, *L. pohlii* expressa grande potencial tanto na medicina popular, quanto nas indústrias de fármacos, servindo como matéria prima para produção dos mesmos e

ainda como ferramenta importante na restauração ecológica de ambientes degradados, torna-se imprescindível a realização de estudos mais aprofundados com técnicas de propagação avançadas, que possibilitem a produção de mudas para atender a demanda de mercado, tanto medicinal, quanto para outros fins, objetivando a conservação dessa espécie e o manejo racional, prevenindo assim o seu desaparecimento, uma vez que, estudos sobre a germinação e propagação clonal ainda são incipientes (CARDOZZO & SNAPÓ, 2002; SOUZA & LORENZI, 2012).

Neste contexto, uma das alternativas é o emprego de ferramentas biotecnológicas, como a cultura de tecidos vegetais, que consiste na utilização de técnicas de cultivo *in vitro* de órgãos e células vegetais, através da multiplicação sistematizada de plantas (PINHAL; ANASTÁCIO; CARNEIRO, 2011). Esta técnica tem colaborado para a conservação de espécies em extinção e de interesse econômico e científico em bancos de germoplasma (COLOMBO et al., 2004).

O estabelecimento *in vitro* dos explante equivale à etapa inicial de um sistema de micropropagação, iniciando-se com a seleção dos explantes mais adequados para a posterior multiplicação, alongamento e enraizamento e consumando-se a obtenção de uma cultura suficientemente adaptada às condições *in vitro* (BASSAM et al., 2006).

Para o estabelecimento *in vitro* dos explantes, é também importante determinar o meio de cultura adequado. O meio de cultura deve proporcionar condições adequadas ao crescimento e desenvolvimento *in vitro* dos explantes, semelhante àquela que os explantes possuíam quando estavam integro a planta matriz. Os meios de cultura fundamentam-se nas exigências nutricionais das plantas, bem como se adequam às necessidades de cada espécie e etapas *in vitro* (PAIVA; GOMES, 2012).

Atualmente, diversas formulações de meios básicos têm sido utilizadas, no entanto, não há uma formulação padrão, mas o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suas modificações e diluições tem apresentado resultados satisfatórios para várias espécies, tornando-se o meio mais utilizado na micropropagação. Já o meio WPM – *Wood Plant Medium* (LLOYD; MCCOWN, 1981) tem sido bastante utilizado no cultivo de espécies lenhosas.

Normalmente, os meios de cultura são suplementados com reguladores de crescimento, objetivando suprir as deficiências dos teores endógenos de hormônios nos explantes que se encontram isolados das regiões produtoras da planta matriz. Os hormônios utilizados são em especial as citocininas, auxinas e as giberelinas, devido à interação destes

proporcionarem respostas morfogênicas nos tecidos, sendo essenciais para as diferentes fases da micropropagação (SOUZA et al., 2003; DINIZ et al., 2008).

As citocininas desempenham papel crucial no crescimento e na morfogênese em cultura de tecidos, uma vez que estimulam a divisão celular, bem como a indução e a proliferação de brotações adventícias (FLORES et al., 1998). Dentre as citocinas frequentemente utilizadas na micropropagação, destacam-se o 6-benzilaminopurina (BAP) e o tiadiazurum (TDZ). O BAP promove a multiplicação por meio da indução de gemas adventícias. É uma das citocininas comercialmente disponível, sendo uma das mais utilizadas e em geral a que apresenta melhores resultados. O TDZ é uma citocinina sintética também utilizada para a indução de múltiplas brotações (BORGATTO; HAYASHI, 2002).

As auxinas adicionadas ao meio de cultura, apesar de não motivar a proliferação de brotações, podem promover a formação de raízes e o aumento no comprimento das brotações, em função do estímulo à divisão e alongamento das células (MÉTRAUX, 1987). As auxinas mais utilizadas na cultura de tecidos são o ácido-indol-3-acético (AIA), que é uma auxina endógena de ocorrência natural, menos estável que as auxinas sintéticas; o ácido-indol-3-butírico (AIB) e o ácido naftalenoacético (ANA) que são auxinas sintéticas de efeito semelhante às auxinas naturais, porém mais estáveis à degradação (SOUZA; PEREIRA, 2007; ROCHA et al., 2009).

As giberelinas, principalmente na forma de ácido giberélico ( $GA_3$ ), são comumente empregadas na cultura de tecidos, em razão de aumentarem a plasticidade da parede celular e a divisão das células, proporcionando o alongamento de partes aéreas dos vegetais (SANTOS; WENDLING; GROSSI, 2004; ROCHA; MARTINS, 2010).

É conhecida a eficácia dos reguladores de crescimento nas diferentes fases da micropropagação. No intuito de favorecer o aumento do comprimento dos brotos, na fase de alongamento, é imprescindível a suplementação do meio de cultura com um balanço auxinas/citocininas em alto/baixo, visto que as auxinas anulam o efeito inibitório que as citocininas têm sobre o alongamento das culturas (SANTOS; WENDLING; GROSSI, 2004), pois é sabido que o aumento em comprimento da parte aérea é um fator essencial para o desenvolvimento de um bom sistema radicular (SOUZA et al., 2004).

As concentrações dos reguladores de crescimento adicionados ao meio devem adequar-se as necessidades hormonais de cada espécie, haja vista, que a concentração excessiva de auxinas pode gerar toxidez com efeitos claramente perceptíveis, como a formação de calos na base dos explantes, e como consequência o comprometimento da rizogênese e o crescimento da parte aérea (SOUZA et al., 2004).

Na fase de enraizamento, sabe-se que um dos fatores que influenciam diretamente o processo de formação de raízes adventícias *in vitro* é inerente à presença e /ou ausência de auxina, devido seu papel fundamental na rizogênese, sendo ANA e AIB as mais utilizadas (SOUZA; PEREIRA, 2007).

Segundo Grattapaglia e Machado (1998), as auxinas estão inseridas na maioria dos meios de enraizamento, cerca de 80%, podendo ser adicionadas sozinhas ou em combinação. O tipo e a concentração empregada são as variáveis que influenciam o processo, elas podem ser utilizadas associadas com citocininas (BAP e TDZ) e giberilinas (GA<sub>3</sub>), mostrando seus efeitos principalmente durante a indução e iniciação de raiz.

A composição do meio de cultura influencia o enraizamento adventício *in vitro*, em função das concentrações dos sais minerais e dos reguladores de crescimento, pois a alta concentração de sais minerais no meio de cultura mesmo na presença de auxinas pode inibir o enraizamento. Desse modo, meios menos concentrados, na metade dos sais têm favorecido melhores resultados no enraizamento de plântulas *in vitro* (SOUZA; PEREIRA, 2007).

A aclimação é considerada a fase final da micropropagação, onde as plântulas são transferidas do meio de cultura para recipientes contendo substrato que proporcione o desenvolvimento tanto sistema radicular, quanto da parte aérea. Segundo Noletto e Silvera (2004), as plântulas devem ser protegidas da desidratação excessiva utilizando sacos plásticos ou incubação em telado com nebulização intermitente, dado que, após a transferência para as condições *ex vitro*, as plântulas são expostas a diversas condições de estresse, o que, conseqüentemente, pode ocasionar altas taxas de mortalidade, devido ao controle deficiente da perda de água e da baixa taxa fotossintética das plântulas, uma vez que, em condições *in vitro* há baixas concentrações de CO<sub>2</sub> nos frascos.

Na literatura ainda são escassos os trabalhos sobre a micropropagação de *L. pohlii*. Assim, o objetivo do presente estudo foi desenvolver uma metodologia de propagação *in vitro* dessa espécie, visando o alongamento, enraizamento e aclimação de plântulas multiplicadas *in vitro*.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

A *Lychnophora pohlii* Sch. Bip. foi coletada em Minas Gerais, Brasil. Um espécime de voucher (N0 1625) é depositado no Herbário do Departamento de Engenharia florestal, UFVJM, Diamantina, MG.

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Melhoramento Florestal (LMF), do Departamento de Engenharia Florestal (DEF) da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), no campus JK, em Diamantina, Minas Gerais.

Os explantes utilizados nos experimentos de alongamento e enraizamento foram brotações originadas da germinação e multiplicação *in vitro* de *L. pohlii*, mantidas no laboratório em meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) para multiplicação, na concentração total de sais e vitaminas, adicionado de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 0,1 g L<sup>-1</sup> mio-inositol, 0,8 g L<sup>-1</sup> polivinilpirrolidona (PVP), 0,8 mg L<sup>-1</sup> de 6-benzilaminopurina (BAP) e 0,05 mg L<sup>-1</sup> de ácido naftalenoacético (ANA). Já os explantes utilizados no experimento de pré-aclimatação foram originados da germinação *in vitro* em meio MS para germinação, na concentração total de sais e vitaminas, 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 0,1 g L<sup>-1</sup> mio-inositol, 0,8 mg L<sup>-1</sup> PVP e sem adição de reguladores de crescimento.

Para os experimentos de alongamento e enraizamento de *L. pohlii*, foi utilizado o meio de cultura básico MS ou WPM (Tabela 1), adicionado de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 0,1 g L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 0,8 g L<sup>-1</sup> de PVP e vitaminas de White (1943), variando-se as concentrações dos reguladores de crescimento de acordo com os tratamentos definidos.

Em todos os experimentos foi utilizado como agente gelificante o ágar bacteriológico Merck® (6,5 g L<sup>-1</sup>). Anteriormente a adição do ágar, o meio de cultivo teve o pH ajustado para 5,75 ± 0,05, e em seguida foi vertido 10 ml do meio de cultura em tubos de ensaio de vidro, com dimensões de 25 x 150 mm e capacidade de 57 mL. Posteriormente foi realizada a autoclavagem a uma temperatura de 121 °C e pressão de um (1) atm, durante 15 minutos.

Subsequente à individualização das brotações nos tubos, estes foram acondicionados em sala de crescimento, sob fotoperíodo de 16 horas, intensidade luminosa de 40 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e temperatura de 25 ± 2°C.



**Tabela 1-** Composição do meio de cultura MS e WPM, utilizados nos experimentos de alongamento e enraizamento de explantes de *Lychnophora pohlii*

Composto	Fórmula Química	Concentração (mg L <sup>-1</sup> )	
		MS	WPM
<b>Macronutrientes</b>			
Nitrato de Amônio	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1.650,00	400
Nitrato de Potássio	KNO <sub>3</sub>	1.900,00	
Cloreto de Cálcio	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440	96
Sulfato de Potássio	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		990
Nitrato de Cálcio	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O		556
Fosfato de Potássio	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	170
Sulfato de Magnésio	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370	370
<b>Micronutrientes</b>			
ÁcidoBórico	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	6,2
Molibdato de Sódio	NaMoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,25	0,25
Cloreto de Cobalto	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025	
Sulfato de Manganês	MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	16,9	22,3
Sulfato de Zinco	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,6	8,6
Sulfato de Cobre	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025	0,25
Iodeto de Potássio	KI	0,83	
<b>FeEDTA</b>			
Sódio EDTA	Na <sub>2</sub> E.D.T.A.	37,2	37,2
Sulfato de Ferro	Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	27,8	27,8
<b>Vitaminas</b>			
ÁcidoNícotínico		0,5	0,5
Piridoxina.HCL		0,1	0,5
Tiamina.HCL		0,1	1
Glicina		2	2

## 2.1 Fase de Alongamento

Para os experimentos de alongamento, foram utilizadas brotações com apenas a gema apical, provenientes da fase de multiplicação *in vitro*.

### 2.1.1 Experimento I: Influência do BAP, TDZ e GA<sub>3</sub> no alongamento de explantes de *L. pohlii*

Depois de preparados, os explantes foram inoculados em meio MS, com 50% (MS/2) ou 100% (MS) das concentrações dos sais e das vitaminas e, suplementados com diferentes combinações dos reguladores crescimento, sendo: 0,1 mg L<sup>-1</sup> ANA + 0,05 mg L<sup>-1</sup> BAP; 0,1 mg L<sup>-1</sup> ANA + 0,05 mg L<sup>-1</sup> TDZ; e 3 mg L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>, totalizando 6 tratamentos. As avaliações foram realizadas aos 30, 45 e 60 dias, quanto às características: altura média da parte aérea, com auxílio de uma régua milimetrada e percentual de formação de calos

(classificados em uma escala de 0 a 3, de forma que quando os explantes não apresentavam calos eram classificados como 0= inexistente, quando a calosidade alcançava até 25% do diâmetro do tubo de ensaio era classificada como 1= baixa, quando alcançava de 25% a 50% do diâmetro do tubo de ensaio era considerada 2= média e acima de 50% do diâmetro classificada como 3= alta).

Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC) onde os tratamentos foram dispostos no esquema fatorial 2 x 3 (duas concentrações de sais e três combinações de reguladores de crescimento), constituído por quatro repetições, com cinco tubos por repetição e um explante por tubo, totalizando 120 tubos.

### **2.1.2 Experimento II: Influência de concentrações de GA<sub>3</sub> no alongamento de explantes de *L. pohlii***

Nesse experimento foi utilizado o meio MS na concentração total de sais e vitaminas e suplementado com diferentes concentrações de GA<sub>3</sub> (0,0; 0,5; 1,0; 2,0; e 4,0 mg L<sup>-1</sup>). As avaliações foram realizadas aos 30, 45 e 60 dias quanto à altura média da parte aérea, com auxílio de uma régua milimetrada.

Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), constituído por quatro repetições, com cinco tubos por repetição e um explante por tubo, totalizando 100 tubos.

### **2.1.3 Experimento III: Efeito da combinação ANA e BAP no alongamento de explantes de *L. pohlii***

Foi utilizado o meio MS na concentração total de sais e vitaminas, suplementado com 0,05 mg L<sup>-1</sup> de BAP e diferentes concentrações de ANA (0,1; 0,3, 0,6 e 0,9 mg L<sup>-1</sup>). As avaliações foram realizadas aos 30, 45 e 60 dias, quanto às características: altura média da parte aérea, com auxílio de uma régua milimetrada, percentual de enraizamento, número médio de raízes (NR) e percentual de formação de calos (critérios descritos no item 2.1.1).

Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), constituído por quatro repetições, com cinco tubos por repetição e um explante por tubo, totalizando 80 tubos.

## 2.2 Fase de Enraizamento

Os explantes utilizados nos experimentos de enraizamento foram provenientes do melhor tratamento da fase de alongamento. Para atender a demanda de material vegetativo, foi realizada uma repicagem para o meio de alongamento em sua concentração total de sais e vitaminas, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 0,1 g L<sup>-1</sup> mio-inositol, 0,8 g L<sup>-1</sup> PVP suplementado com 0,05 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ANA, visando à manutenção de um banco de propágulos alongados.

### 2.2.1 Experimento IV e V: Efeito de diferentes concentrações e tempos de permanência em meio de cultura com ANA ou AIB no enraizamento de *L. pohlii*

Foram instalados dois experimentos simultâneos, sendo um deles com o regulador de crescimento ANA e o outro com AIB, sendo para ambos utilizadas as concentrações de 1,0 e 2,0 mg L<sup>-1</sup>.

Para os dois experimentos, foi utilizado o meio MS na concentração de 50% de sais e vitaminas, suplementados com 0,05 mg L<sup>-1</sup> de BAP. Os tempos de permanência dos explantes em meio de cultura com os reguladores de crescimento foram 7, 14, 21 e 28 dias. Ao completar os tempos de permanência no meio de cultura, os explantes foram transferidos para o novo meio de cultura sem reguladores de crescimento.

Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 2 x 4 (duas concentrações de regulador de crescimento e quatro tempos de permanência no meio), constituído por quatro repetições, com cinco tubos por repetição e um explante por tubo, totalizando 160 tubos de ensaio cada experimento.

As avaliações foram realizadas semanalmente, durante 8 semanas, quanto às características percentual de enraizamento, número total de raízes, altura média e formação de calo.

### 2.2.2 Experimento VI e VII: Influência do meio de cultura e de auxinas no enraizamento de explantes de *L. pohlii*

Foram instalados dois experimentos simultâneos, sendo um deles com o regulador de crescimento ANA e o outro com AIB, sendo para ambos utilizadas as concentrações de 0,1 e 0,5 mg L<sup>-1</sup>.

Para os dois experimentos, foram utilizados os meios MS e WPM na concentração de 50% dos sais e vitaminas (MS/2 e WPM/2), suplementado com 0,05 mg L<sup>-1</sup> de BAP.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), disposto no esquema fatorial 2 x 2 (duas concentrações de regulador de crescimento e dois tipos de meio – MS/2 e WPM/2) constituído por quatro repetições, com cinco tubos por repetição e um explante por tubo, totalizando 80 tubos cada experimento.

As avaliações foram realizadas aos 30 dias, quanto à característica percentual de enraizamento, número médio de raízes (NR), altura média da parte aérea e formação de calos (critérios descritos no item 2.1.1).

## 2.3 Fase de pré-aclimatação

### 2.3.1 Experimento VIII: Influência de métodos para a manutenção da umidade em ambiente fechado na pré-aclimatação de plântulas de *L. pohlii*

As plântulas germinadas *in vitro* foram submetidas à limpeza e poda parcial das raízes com auxílio de pinça e bisturi e imediatamente transferidas para copos plásticos com capacidade de 200 cm<sup>3</sup>, contendo o substrato vermiculita autoclavada.

Os copos contendo as plântulas foram dispostos para a pré-aclimatação em laboratório (sala de crescimento). Após 10 dias foram submetidos a três tratamentos, caracterizados: Tratamento 1: ausência de qualquer cobertura para manter a umidade; Tratamento 2: os copos foram cobertos com sacos de polietileno e Tratamento 3: o saco de polietileno foi perfurado (6 furos, sendo 3 de cada lado com auxílio de bisturi). As plântulas foram irrigadas manualmente de dois em dois dias, com solução de macro e micronutrientes e vitaminas MS na concentração de 50%, semelhante a uma fertirrigação.

As avaliações foram realizadas aos 35 dias quanto às características percentual de sobrevivência, altura média, matéria fresca da parte aérea e da raízes e matéria seca da parte aérea e da raiz.

Foi utilizado delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), constituído por quatro repetições, com cinco copos por repetição e um explante por copo, totalizando 60 copos.

## 2.4 Análise de dados

Os dados obtidos foram submetidos aos testes de normalidade dos resíduos (Lilliefors) e homogeneidade (Cochran) (BANZATTO; KRONKA, 2006; RIBEIRO JÚNIOR, 2012). Os dados expressos em porcentagem foram transformados em  $\text{arc sen } \sqrt{x/100}$ . Posteriormente, procedeu-se com a análise de variância, testes de média,

análise de regressão e estatística descritiva, com o auxílio do *Software Statistica* 10.0 (STATSOFT, 2010).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Fase de Alongamento

##### 3.1.1 Experimento I: Influência do BAP, TDZ e GA<sub>3</sub> no alongamento de explantes de *L. pohlii*

Pela análise de variância (Tabela 2), aos 45 dias de cultivo, constatou-se que a altura média dos explantes de *L. pohlii* foi significativamente influenciada pela interação entre os fatores concentrações do meio MS x combinações de hormônios. Também foi observado efeito estatístico significativo ( $p < 0,05$ ) do fator combinações de hormônios isoladamente, para o percentual de calo.

**Tabela 2-** Resultado da análise de variância para a característica altura média e percentual de calo dos explantes de *Lychnophora pohlii* cultivados *in vitro*, em resposta às concentrações do meio MS e combinações de hormônios, aos 45 dias

Fonte de Variação	Quadrados médios		
	GL	Altura (cm)	Calo (%)
Meio	1	0,5720*	0,2083 <sup>ns</sup>
Hormônio	2	0,1293*	4,6446*
Meio*Hormônio	2	0,2582*	0,0566 <sup>ns</sup>
Resíduo	18	0,0200	0,0880
CVexp (%)		6,7632	30,4487

\*GL: Graus de Liberdade; CVexp (%): Coeficiente de variação experimental; \* Diferença significativa a 5% de significância, pelo teste F; <sup>ns</sup> Diferença não significativa a 5% de significância, pelo teste F.

A maior média de altura (2,4 cm) foi verificada em explantes cultivados em meio MS, suplementado com a combinação de ANA + BAP, diferindo estatisticamente do meio MS/2, suplementado com a mesma combinação de hormônios (Tabela 3). A respeito do percentual de calos, a combinação de ANA + TDZ favoreceu o maior percentual, diferindo estatisticamente dos explantes tratados com GA<sub>3</sub> (Tabela 3).

**Tabela 3-** Altura média e percentual de calos em função da interação concentrações do meio MS x combinações de hormônios e do fator combinações de hormônio, para os explantes de *Lychnophora pohlii* cultivados *in vitro*, aos 45 dias

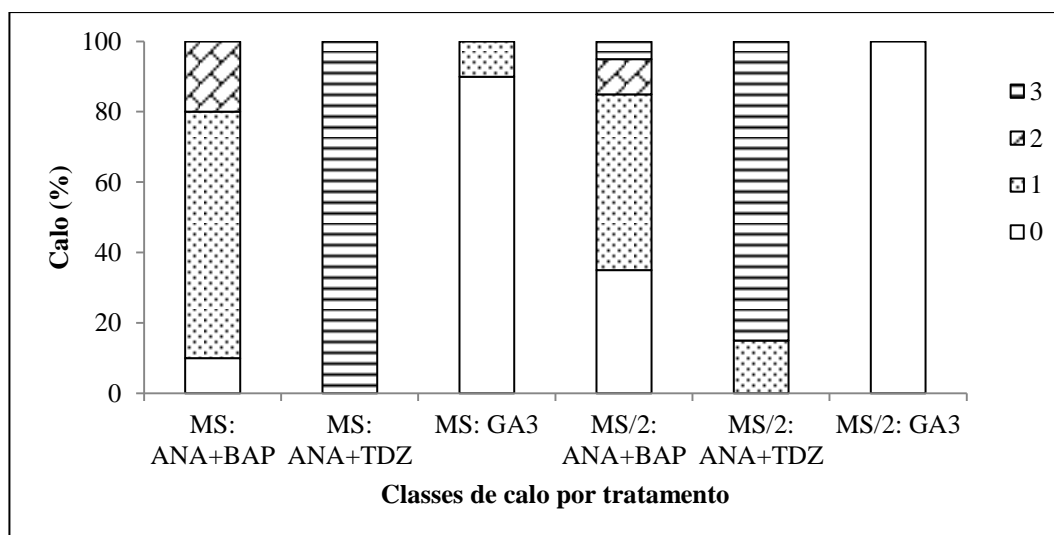
Altura média (cm)			
Meio	Hormônio		
	ANA + BAP	ANA+ TDZ	GA <sub>3</sub>
MS	2,4 Aa	2,2 Aa	2,2 Aa
MS/2	1,8 Bb	1,7 Bb	2,3 Aa

Calo (%)	
Hormônio	
ANA + BAP	77,5 A
ANA+ TDZ	100 A
GA <sub>3</sub>	5 B

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e mesma letra minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

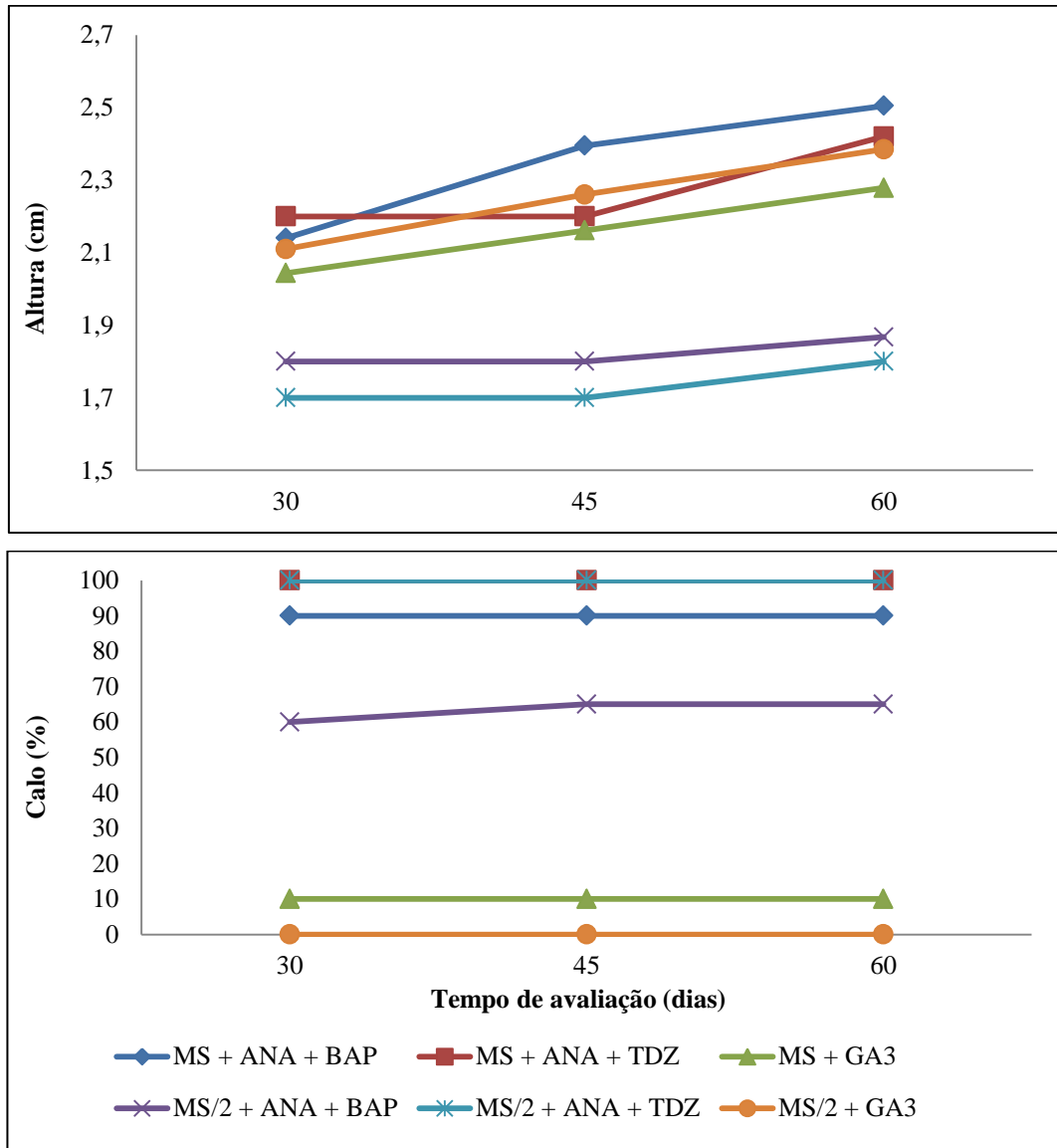
Sobre as classes de calo, os explantes tratados com GA<sub>3</sub> em meio MS/2 não apresentaram calo, e em meio MS apresentaram o menor percentual de calo (10%), sendo esses classificados em classe 1 (Figura 1). A combinação de ANA + TDZ no meio MS expressou o maior percentual de calo (100%) classificados em classe 3 (Figura 1).



**Figura 1-** Percentual de calo por classes de intensidade de calejamento em explantes de *Lychnophora pohlii* cultivados *in vitro*, em função das concentrações do meio MS e das combinações de hormônios, aos 45 dias. 0) Inexistente, 1) Baixa, 2) Média, 3) Alta.

A altura média dos explantes de *L. pohlii*, conservou-se crescente até o fim das avaliações (60 dias), enquanto que para o percentual de calo houve a estagnação para a maioria dos tratamentos aos 30 dias, ocorrendo à estagnação completa aos 45 dias de cultivo

(Figura 2). Após os 45 dias de cultivo os explantes apresentaram folhas enroladas, rebaixamento do meio de cultura e leve oxidação do meio. Em vista disso o tempo de 45 dias foi considerado o melhor tempo de alongamento para estes tratamentos.



**Figura 2-** Altura média e percentual de calo em explantes de *Lychnophora pohlii* cultivados *in vitro*, função das concentrações do meio MS e das combinações de hormônios, ao longo do tempo.

### 3.1.2 Experimento II: Influência de concentrações de GA<sub>3</sub> no alongamento de explantes de *L. pohlii*

Aos 60 dias de cultivo, as concentrações de GA<sub>3</sub> testadas influenciaram significativamente ( $p < 0,05$ ) a altura dos explantes de *L. pohlii*, cultivados *in vitro* (Tabela 4).

**Tabela 4-** Resultado da análise de variância para a característica altura média de explantes de *Lychnophora pohlii* cultivados *in vitro*, em resposta às concentrações de GA<sub>3</sub>, aos 60 dias

Fonte de Variação	Quadrados médios	
	GL	
GA <sub>3</sub>	4	0,1087*
Resíduo	15	0,0249
CVexp (%)		11,8535

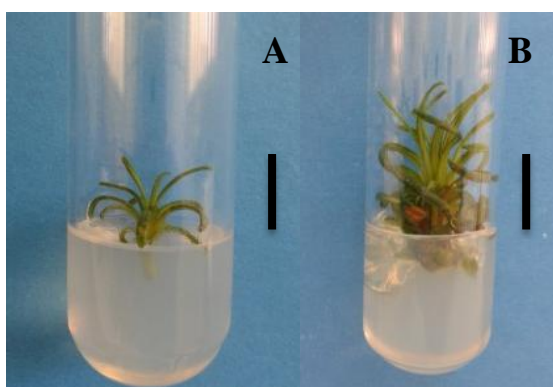
\*GL: Graus de Liberdade; CVexp (%): Coeficiente de variação experimental; \* Diferença significativa a 5% de significância, pelo teste F.

Não foi possível estabelecer um modelo de regressão adequado que estabelecesse uma relação biológica entre os tratamentos e as repostas dos explantes. A maior média de altura foi verificada na concentração de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> (1,5 cm) (Figura 3), diferindo estatisticamente da concentração de 4 mg L<sup>-1</sup>, a qual contribui com a menor altura média (1,1 cm) (Tabela 5).

**Tabela 5-** Altura média de explantes de *Lychnophora pohlii* cultivados *in vitro*, em resposta às concentrações de GA<sub>3</sub>, aos 60 dias

GA <sub>3</sub> mg L <sup>-1</sup>	Altura (cm)
0	1,4AB
0,5	1,3AB
1	1,5 A
2	1,3 AB
4	1,1B

\*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

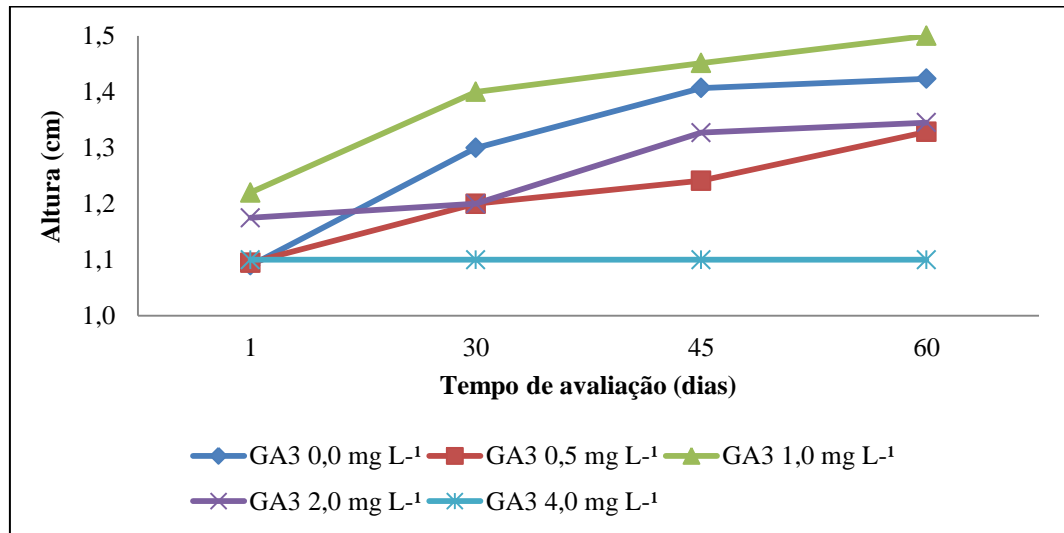


**Figura 3-** Altura média de explantes de *Lychnophora pohlii* cultivados *in vitro*, em função das concentrações de GA<sub>3</sub>, na implantação do experimento (A) e aos 60 dias de cultivo (B). Barra = 1 cm.

Houve incremento em altura média dos explantes de *L. pohlii* até os 60 dias de cultivo, exceto quando os explantes foram tratados com a maior concentração de GA<sub>3</sub> (4,0 mg



L<sup>-1</sup>) (Figura 4). Portanto o melhor tempo de cultivo para a promoção do alongamento para estes tratamentos foi 60 dias.



**Figura 4-** Altura média de explantes de *Lychnophora pohlii* cultivados *in vitro*, em função das concentrações de GA<sub>3</sub>, ao longo do tempo.

### 3.1.3 Experimento III: Efeito da combinação ANA e BAP no alongamento de *L. pohlii*

A partir da análise de variância (Tabela 6), verificou-se que as concentrações de ANA empregadas influenciaram significativamente ( $p < 0,05$ ) o número médio de raízes (NR) e o percentual de calo, dos explantes de *L. pohlii*, aos 45 dias de cultivo. Para as demais variáveis a ANOVA não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos.

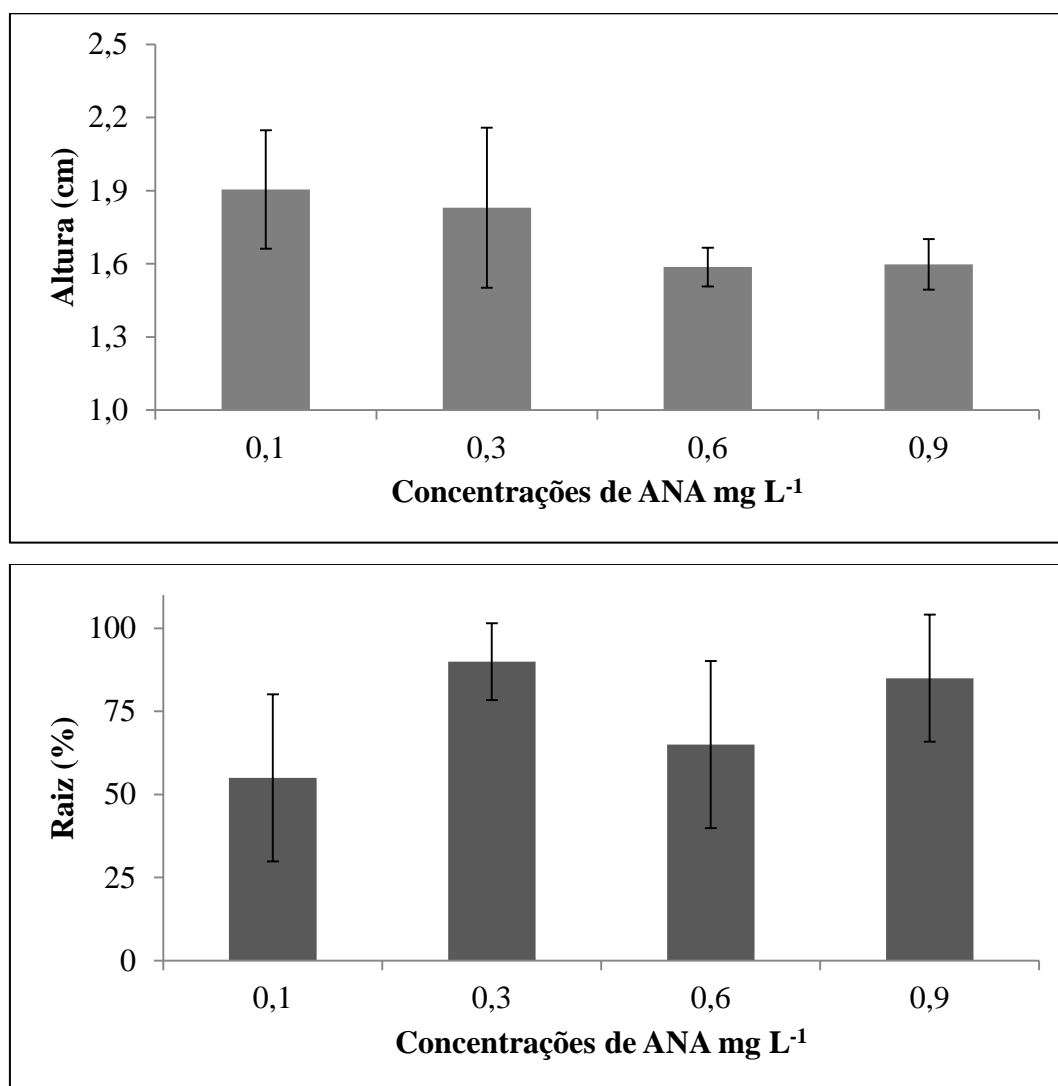
**Tabela 6-** Resultado da análise de variância para as características altura média, percentual de enraizamento, número médio de raízes e percentual de calo dos explantes de *Lychnophora pohlii*, cultivados *in vitro*, em resposta às concentrações de ANA, aos 45 dias de cultivo

Fonte de Variação	Quadrados médios				
	GL	Altura (cm)	Enraizamento (%)	NR	Calo (%)
ANA	3	0,1050 <sup>ns</sup>	1091,6710 <sup>ns</sup>	15,0438*	0,3180*
Resíduo	12	0,0461	441,6710	3,3354	0,0376
CVexp (%)		12,4124	28,4962	33,5680	23,5435

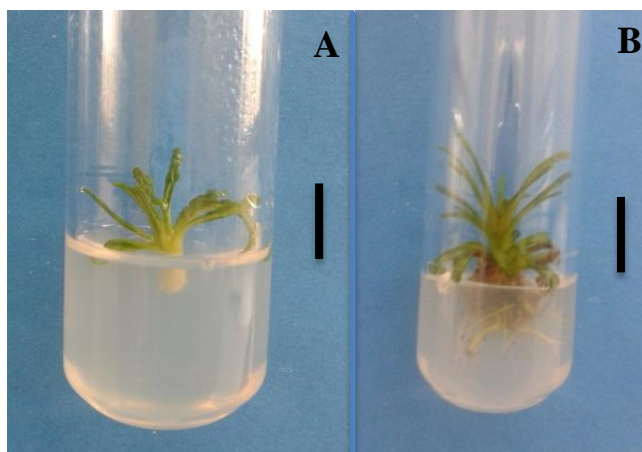
\*GL: Graus de Liberdade; CVexp (%): Coeficiente de variação experimental; NR: Número médio de raiz; \* Diferença significativa a 5% de significância, pelo teste F; <sup>ns</sup> Diferença não significativa a 5% de significância, pelo teste F.

A menor concentração de ANA (0,1 mg L<sup>-1</sup>) promoveu o maior incremento em altura média (1,91 cm) e menor percentual de enraizamento (55%), seguido da concentração

de  $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ , apresentando altura média de  $1,83 \text{ cm}$  e o maior percentual de enraizamento (90%) (Figura 5 e 6).

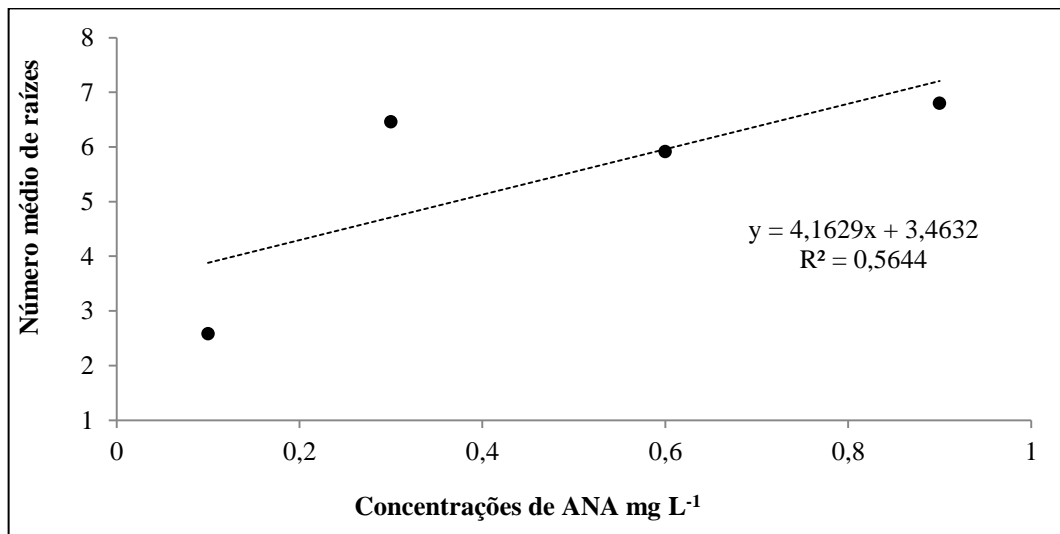


**Figura 5-** Altura média e percentual de enraizamento de explantes de *Lychnophora pohlii* cultivados *in vitro*, em função das concentrações de ANA, aos 45 dias. As barras indicam o desvio-padrão.



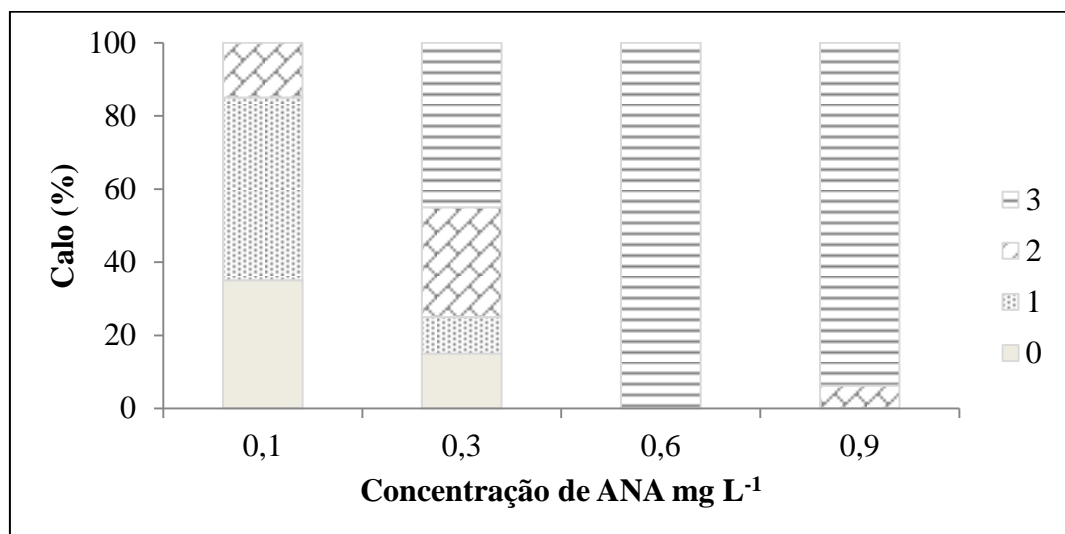
**Figura 6-** Altura média dos explantes de *Lychnophora pohlii* cultivados *in vitro* em função das concentrações de ANA, na implantação do experimento (A) e aos 45 dias de cultivo (B). Barra = 1 cm.

Para o número médio de raízes, observou-se comportamento linear crescente (Figura 7). O aumento das concentrações de ANA favoreceu a formação de raízes adventícias e calo na base dos explantes de *L. pohlii*. As concentrações de 0,9 e 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ANA proporcionaram o maior e menor número médio de raízes por tratamento (6,8 e 2,6 respectivamente). O menor percentual de calo (65%) foi observado na concentração de 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ANA.

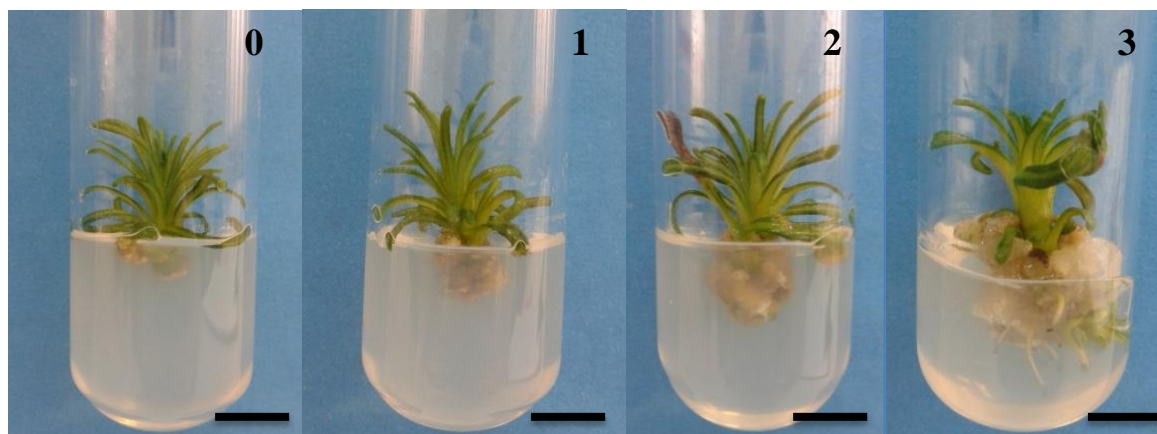


**Figura 7-** Número médio de raízes e percentual de calo de explantes de *Lychnophora pohlii* cultivados *in vitro*, em função das concentrações de ANA, aos 45 dias.

Em referência às classes de calo, observou-se que o aumento das concentrações de ANA foi acompanhado de explantes enquadrados em classe 2 e 3 (Figura 8 e 9)

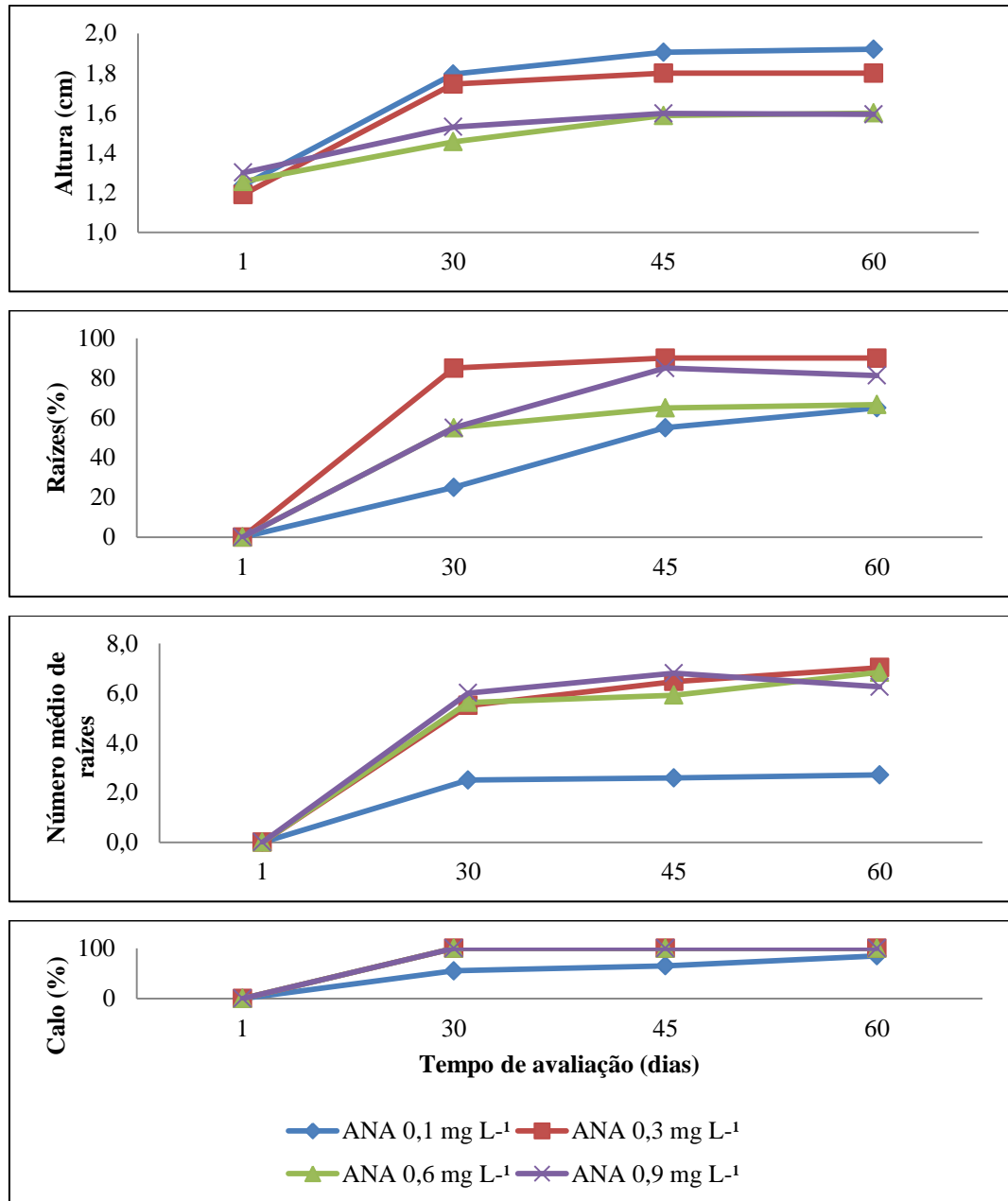


**Figura 8-** Percentual de explantes observados nas quatro classes de calo, em resposta às concentrações de ANA, aos 45 dias de cultivo. 0) Inexistente, 1) Baixa, 2) Média e 3) alta.

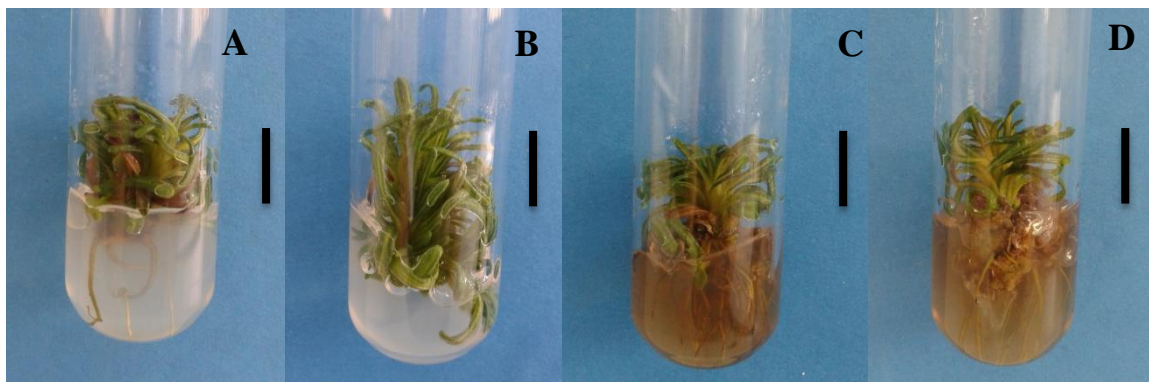


**Figura 9-** Classificação de calo nos explantes de *Lychnophora pohlii* cultivados *in vitro*, em função das concentrações de ANA, aos 45 dias. 0) Inexistente, 1) Baixa, 2) Média e 3) alta. Barra = 1 cm.

Para a altura média dos explantes e número médio de raízes houve incremento até o final das avaliações, salvo quando os explantes foram cultivados em meio suplementado com  $0,9 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA, no qual houve uma queda no número médio de raízes devido a morte de explantes (Figura 10). Houve incremento no percentual de enraizamento até aos 60 dias, exceto quando os explantes foram tratados com  $0,3 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA o qual estagnou-se aos 30 dias de cultivo. Em relação ao percentual de calo houve a estagnação para todos os tratamentos aos 30 dias de cultivo, com exceção dos explantes cultivados em  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA, onde o percentual de calo manteve-se crescente até os 60 dias de cultivo (Figura 10). O tempo de 45 dias é o melhor tempo de cultivo visando o alongamento, para estes tratamentos, uma vez que após os 45 dias de cultivo os explantes apresentaram folhas enroladas rebaixamento do meio de cultura, leve oxidação do meio e aumento de tamanho dos calos (Figura 11).



**Figura 10-** Altura média, percentual enraizamento, número médio de raízes e percentual de calo dos explantes de *Lychnophora pohli*, em função das concentrações de ANA, ao longo do tempo.



**Figura 11-** Explantes com: folhas enroladas (A), rebaixamento do meio (B), oxidação (C) e crescimento exagerado de calo (D), aos 60 dias de cultivo. Barra = 1 cm.

### 3.2. Fase de Enraizamento

#### 3.2.1. Experimento IV: Efeito de diferentes concentrações de ANA e tempos de permanência em meio de cultura no enraizamento de *L. pohlii*

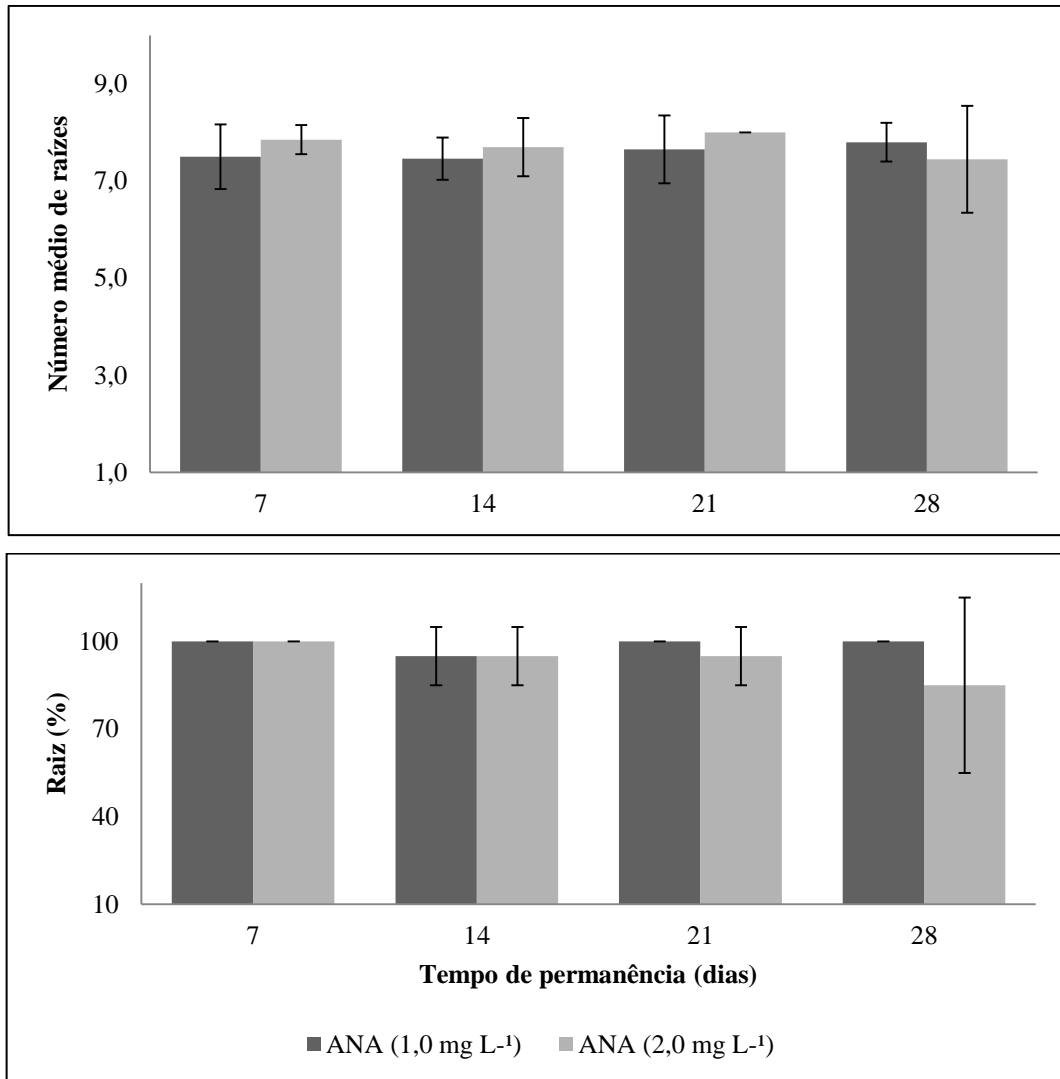
Observou-se na ANOVA (Tabela 7), efeito estatístico significativo ( $p < 0,05$ ) do fator concentrações de ANA e do fator tempo sobre a altura média dos explantes de *L. pohlii*, aos 35 dias de cultivo. Também foi verificado para o percentual de calo, efeito estatístico significativo do fator concentrações de ANA, aos 28 dias de cultivo.

**Tabela 7-** Resultado da análise de variância para as características percentual de enraizamento, número médio de raiz, altura média e percentual de calo dos explantes de *Lychnophora pohlii* cultivados *in vitro*, em resposta as concentrações de ANA e o tempo de permanência dos explantes no meio

Fonte de variação	Quadrados Médios				
	GL	Raiz (%)	NR	Altura	Calo (%)
ANA	1	0,0569 <sup>ns</sup>	0,173 <sup>ns</sup>	0,7110*	0,4742*
Tempo	3	0,0234 <sup>ns</sup>	0,090 <sup>ns</sup>	0,2943*	0,1576 <sup>ns</sup>
ANA*Tempo	3	0,0226 <sup>ns</sup>	0,225 <sup>ns</sup>	0,0716 <sup>ns</sup>	0,0600 <sup>ns</sup>
Resíduo	24	0,0446	0,367	0,0391	0,0829
CVexp (%)		14,0965	7,8956	10,2949	20,7024

\*GL: Graus de Liberdade; CVexp (%): Coeficiente de variação experimental; NR: Número médio de raiz; \* Diferença significativa a 5% de significância, pelo teste F; <sup>ns</sup> Diferença não significativa a 5% de significância, pelo teste F.

Mesmo não verificada diferença significativa entre os tratamentos utilizados, numericamente os maiores percentuais de enraizamento dos explantes (100%) ocorreram na menor concentração de ANA ( $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ ) independente do tempo de permanência. Pequeno decréscimo do percentual ocorreu com o aumento da concentração de ANA para  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  e em função do tempo de permanência dos explantes (Figura 12). Por outro lado, resultados diferentes foram constatados na análise do número médio de raízes aos 28 dias de cultivo, ocorrendo acréscimo no número médio de raízes com o aumento da concentração de ANA e tempo de permanência dos explantes no meio, sendo a maior média (8,0) observada na maior concentração de ANA ( $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ ) e tempo de permanência de 21 dias (Figura 12).



**Figura 12-** Número médio de raízes e percentual de enraizamento dos explantes de *Lychnophora pohlii* cultivados *in vitro*, em função das concentrações de ANA e tempo de permanência no meio, aos 28 dias de cultivo. As barras indicam o desvio padrão.

A maior média de altura foi observada na menor concentração de ANA (1,0 mg L<sup>-1</sup>) diferindo estatisticamente da maior concentração (ANA 2,0 mg L<sup>-1</sup>) (Tabela 8). Em relação ao tempo de permanência dos explantes no meio, aos 21 dias, observou-se a maior média de altura (2,1 cm) diferindo estatisticamente dos tempos de 7 e 14 dias (Tabela 8). Quanto ao percentual de calo, a concentração de 2,0 mg L<sup>-1</sup> foi responsável pelo maior percentual de calo (97,5%) diferindo estatisticamente da concentração de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA (Tabela 8).

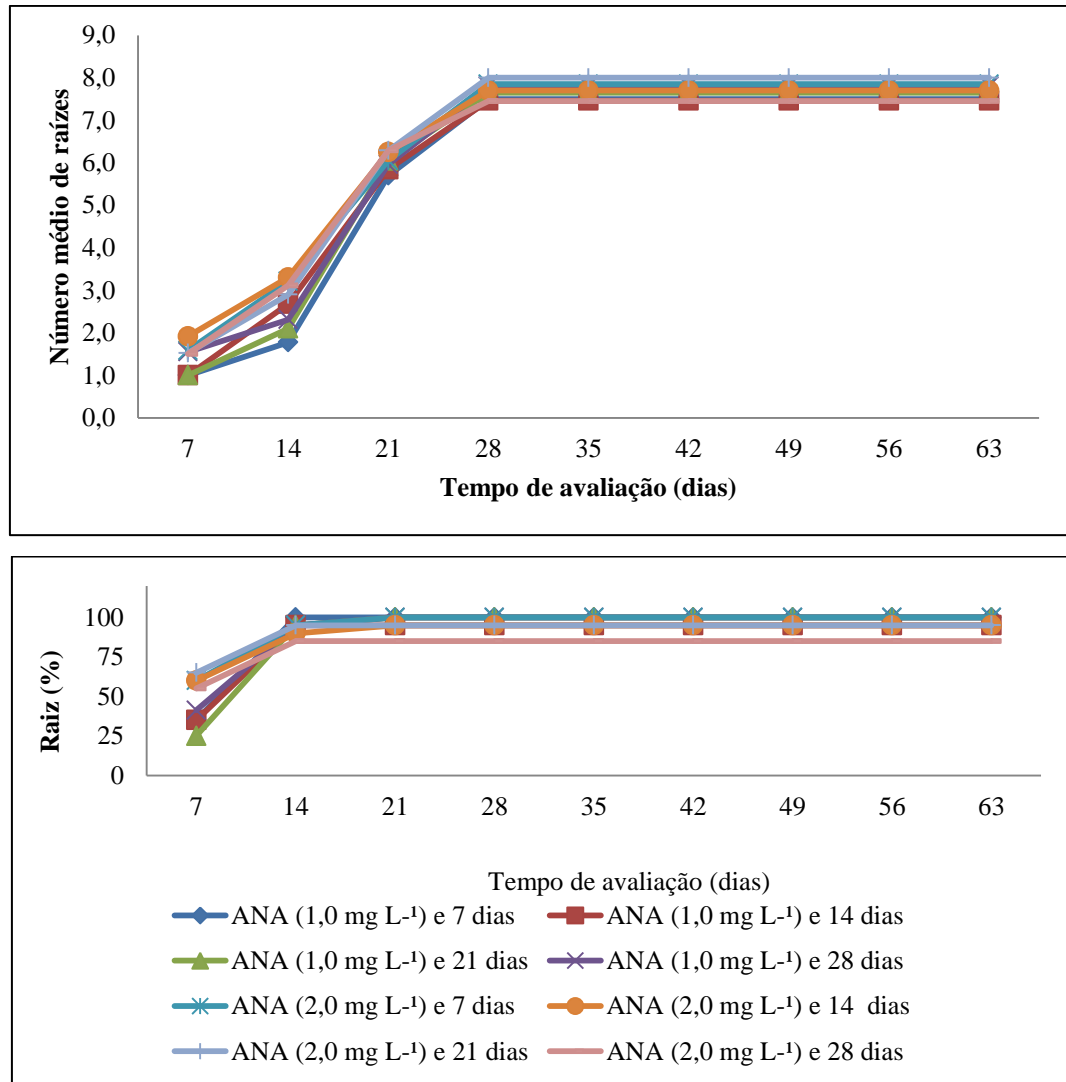
**Tabela 8-** Altura média e percentual de calo em função das concentrações de ANA, aos 35 e 28 dias, respectivamente e tempo de permanência no meio, para os explantes de *Lychnophora pohlii* cultivados *in vitro*

	Altura (cm)	Calo (%)
ANA (mg L <sup>-1</sup> )		
1,0	2,1 A	82,08 B
2,0	1,8 B	97,5 A
Tempo (dias)		
7	1,7 C	
14	1,8 BC	
21	2,1 A	
28	1,9 AB	

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

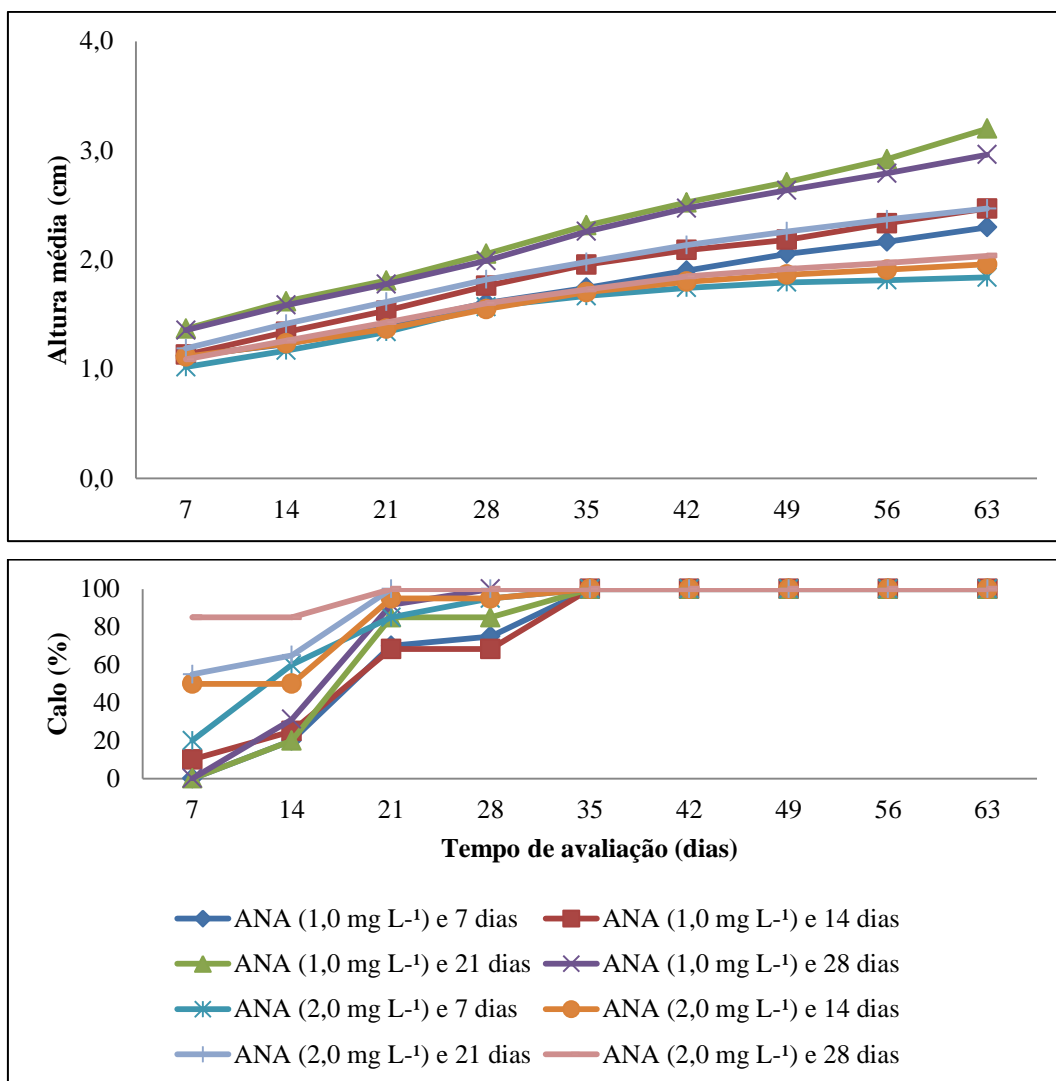
Ao sétimo dia de cultivo foi observado o início do enraizamento dos explantes. O enraizamento para todos os tratamentos permaneceu crescente até os 28 dias (quarta semana), e a partir desse, houve a estagnação no incremento em raízes até o fim das avaliações (63 dias). Para o percentual de enraizamento, ocorreu à estagnação aos 14 dias de cultivo, a contar desse dia os explantes que não haviam iniciado o processo de indução e iniciação das raízes, não foram capazes de iniciar o enraizamento até o fim das avaliações (63 dias) (Figura 13).





**Figura 13-** Número médio de raízes e percentual de enraizamento dos explantes de *Lychnophora pohlii* cultivados *in vitro*, em função das concentrações de ANA e tempo de permanência no meio, ao longo do tempo.

A altura média dos explantes de *L. pohlii*, manteve-se crescente ao longo do tempo, até o fim das avaliações (63 dias) (Figura 14). Sob outra perspectiva, o percentual de calo conservou-se crescente para alguns tratamentos e estagnando-se aos 21 e 28 dias para outros, sendo que a estagnação completa ocorreu aos 35 dias cultivo, o qual foi observado todos os explantes com estruturas calogênicas (Figura 14).



**Figura 14-** Altura média e percentual de calo dos explantes de *Lychnophora pohlii* cultivados *in vitro*, em função das concentrações de ANA e tempo de permanência no meio, ao longo do tempo.

### 3.2.2. Experimento V: Efeito de diferentes concentrações de AIB e tempos de permanência em meio de cultura no enraizamento de *L. pohlii*

A análise de variância demonstrou que a interação concentrações de AIB x tempo de permanência dos explantes no meio foi significativa ( $p < 0,05$ ) apenas para o percentual de calo, aos 49 dias de cultivo (Tabela 9). A auxina AIB apresentou efeito isolado significativo ( $p < 0,05$ ) para o NR, aos 42 dias de cultivo, e o tempo de permanência dos explantes indicou efeito isolado significativo para a altura média dos explantes, aos 63 dias de cultivo (Tabela 9).

**Tabela 9-** Resultado da análise de variância para as características percentual de enraizamento, número médio de raiz, altura média e percentual de calo dos explantes de *Lychnophora pohlii* cultivados *in vitro*, em resposta as concentrações de AIB e o tempo de permanência dos explantes no meio

Fonte de variação	Quadrados médios				
	GL	Raiz (%)	NR	Altura(cm)	Calo (%)
AIB	1	0,00001 <sup>ns</sup>	13,176 <sup>*</sup>	0,1376 <sup>ns</sup>	0,4182 <sup>ns</sup>
Tempo	3	0,0745 <sup>ns</sup>	3,091 <sup>ns</sup>	0,3713 <sup>*</sup>	0,43064 <sup>*</sup>
AIB*Tempo	3	0,0379 <sup>ns</sup>	1,328 <sup>ns</sup>	0,1972 <sup>ns</sup>	0,4151 <sup>*</sup>
Resíduo	24	0,0748	1,167	0,1125	0,1031
CVexp (%)		20,0927	17,3897	12,3946	31,1471

\*GL: Graus de Liberdade; NR: número médio de raiz; CVexp (%): Coeficiente de variação experimental; \* Diferença significativa a 5% de significância, pelo teste F; <sup>ns</sup> Diferença não significativa a 5% de significância, pelo teste F.

O maior percentual de calo (90%) foi verificado em explantes cultivados em meio suplementado com 2,0 mg L<sup>-1</sup> de AIB no tempo aos 21 dias, já menor percentual (26,3 %) foi obtido na concentração de 1,0 mg L<sup>-1</sup> no tempo de permanência de 7 dias e diferiu estatisticamente da concentração de 2,0 mg L<sup>-1</sup> de AIB (Tabela 10).

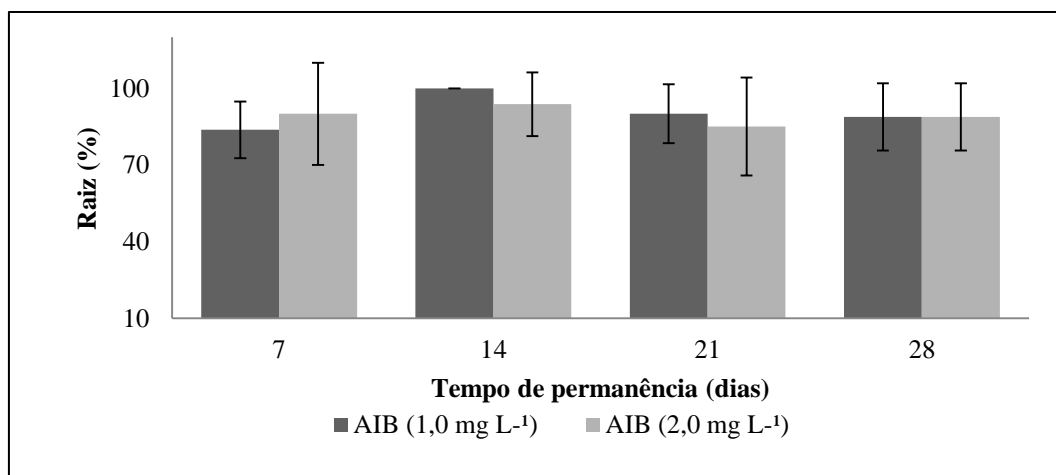
O NR foi elevado com o aumento da concentração de AIB para 2,0 mg L<sup>-1</sup>, a qual contribuiu com a maior média, diferindo estatisticamente da concentração de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de AIB (Tabela 10). Quanto à altura média, aos 21 dias de permanência em meio suplementado com AIB, os explantes apresentaram maior incremento em altura, diferindo estatisticamente do tempo de permanência de 14 dias (Tabela 10).

**Tabela 10-** Valores médios para número de raiz, altura e percentual de calo em função das concentrações de AIB e tempo de permanência no meio, para os explantes de *Lychnophora pohlii* cultivados *in vitro*

AIB mg L <sup>-1</sup>	NR				
1,0	5,6 B				
2,0	6,9 A				
Tempo (dias)	Altura (cm)				
7	2,6 AB				
14	2,5 B				
21	3,0 A				
28	2,7 AB				
AIB mg L <sup>-1</sup> (%)	Calo	Tempo			
		7	14	21	28
1	26,3 Bb	76,3 Aa	81,7 Aa	65 Aab	
2	75 Aab	46,3 Ab	90 Aa	88,8 Aab	

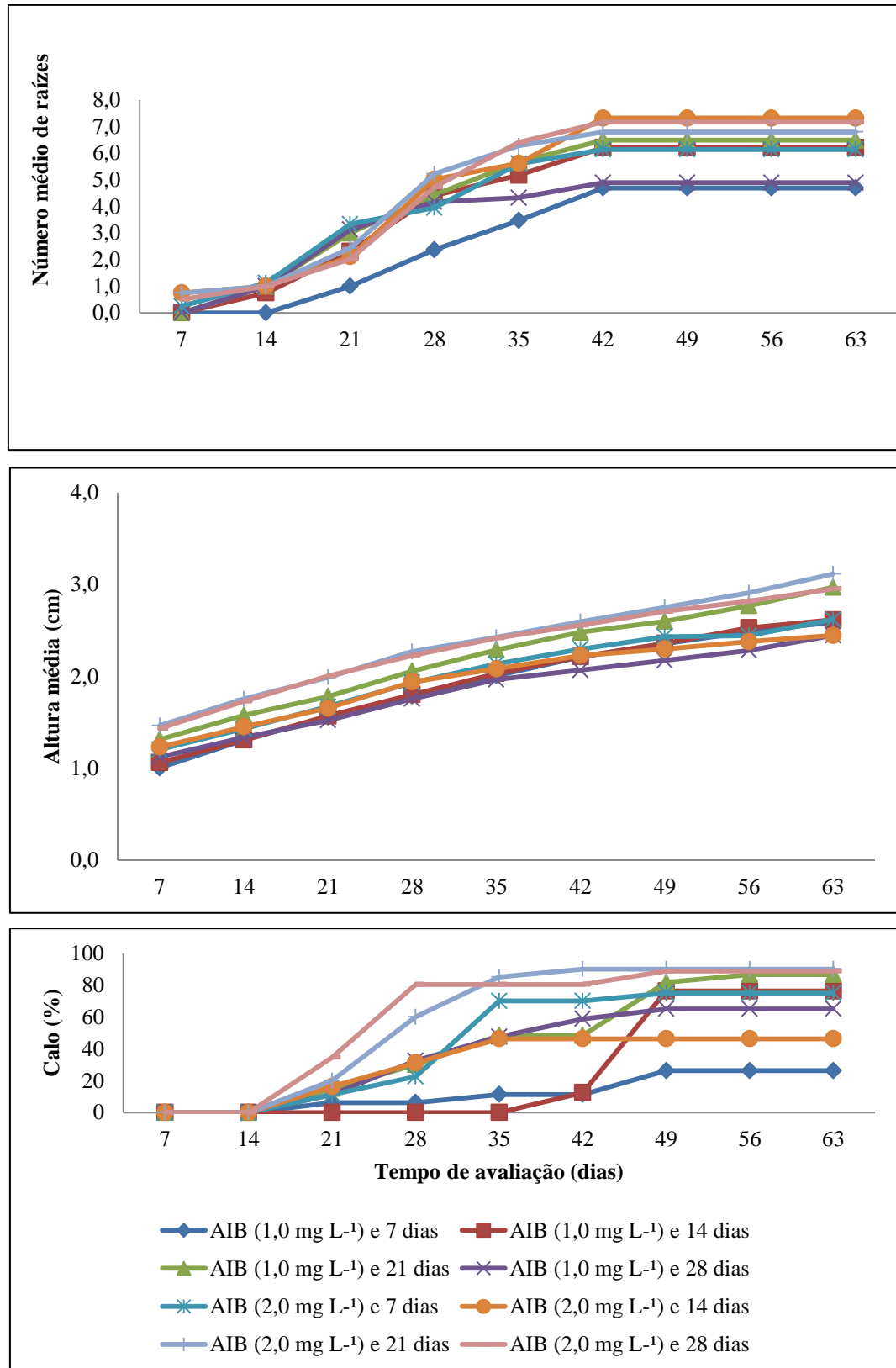
\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

A suplementação do meio com  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB e o tempo de permanência de 14 dias, foi a melhor condição, em que se obteve 100% de enraizamento. Em oposição, quando os explantes permaneceram durante sete dias em  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB, 83,8% apresentaram raízes (Figura 15).



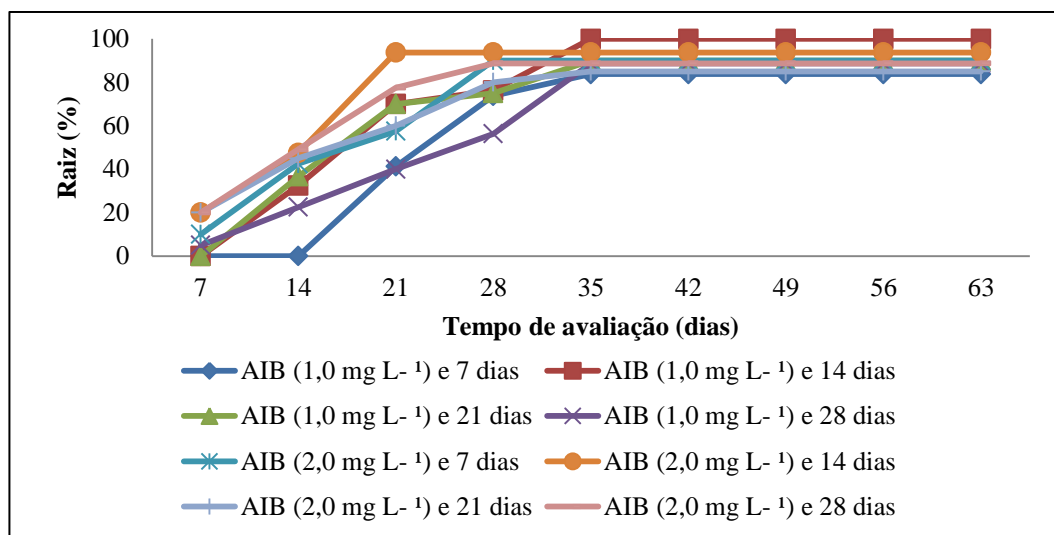
**Figura 15-** Percentual de enraizamento dos explantes de *Lychnophora pohlii* cultivados *in vitro*, em função das concentrações de AIB e tempo de permanência no meio, aos 35 dias de cultivo. As barras indicam o desvio padrão.

Ao sétimo dia, verificou-se o início do enraizamento apenas dos explantes cultivados em meio suplementado de  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB. Os explantes cultivados na presença de  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  tardaram a iniciar o enraizamento, o qual foi verificado aos 14 e 21 dias. Nesse sentido, a iniciação de raízes adventícias manteve-se crescente até aos 42 dias de cultivo, a contar deste momento houve a estagnação até o final das avaliações (63 dias) (Figura 16). Por outro lado, houve incremento em altura até o final das avaliações (63 dias) independente da concentração de AIB e tempo de permanência dos explantes no meio. Em relação à formação de calos na base dos explantes, estes tiveram início aos 21 dias de cultivo para a maioria dos tratamentos. Em contrapartida quando os explantes permaneceram 14 dias em  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB a formação de calos foi tardia, tendo início aos 42 dias de cultivo. Neste contexto a formação de calos obteve leve aumento desde o seu início, ocorrendo estagnação aos 49 dias de cultivo, mantendo-se até o fim das avaliações (63 dias) (Figura 16).



**Figura 16-** Número médio de raízes, altura média e percentual de calo dos explantes de *Lychnophora pohlii* cultivados *in vitro*, em função das concentrações de AIB e tempo de permanência no meio, ao longo do tempo.

Para o percentual de enraizamento, ocorreu estagnação aos 35 dias de cultivo, a contar desse dia os explantes que não haviam iniciado o processo de indução e iniciação das raízes, não foram capazes de iniciar o enraizamento até o fim das avaliações (63 dias) (Figura 17).



**Figura 17-** Percentual de enraizamento dos explantes de *Lychnophora pohlii* cultivados *in vitro*, em função das concentrações de AIB e tempo de permanência no meio, ao longo do tempo.

### 3.2.3 Experimento VI: Influência do meio MS e WPM e da auxina ANA no enraizamento de explantes de *L. pohlii*

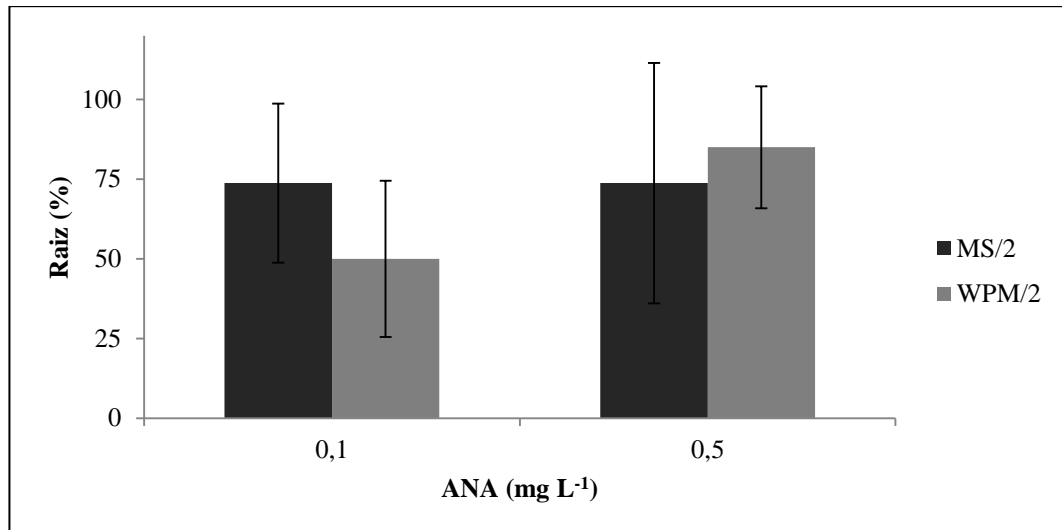
De acordo com a análise de variância (Tabela 11), aos 30 dias de cultivo, verificou-se interação entre os fatores meios de cultura x concentrações de ANA, apenas para o NR. Foi observado efeito estatístico significativo ( $p < 0,05$ ) dos fatores isoladamente, sendo que o fator meio de cultura influenciou a altura média e o fator concentrações de ANA influenciou o percentual de calo.

**Tabela 11-** Resultado da análise de variância para as características percentual de enraizamento, número médio de raiz, altura média e percentual de calo em explantes de *Lychnophora pohlii* cultivados *in vitro*, em resposta aos meios de cultura x concentrações de ANA, aos 30 dias

Fonte de Variação	Quadrados Médios				
	GL	Raiz (%)	NR	Altura (cm)	Calo (%)
Meio	1	0,03860 <sup>ns</sup>	4,3751 <sup>ns</sup>	0,5663*	0,1915 <sup>ns</sup>
ANA	1	0,31243 <sup>ns</sup>	54,0225*	0,1541 <sup>ns</sup>	5,0189*
Meio*ANA	1	0,19155 <sup>ns</sup>	15,7344*	0,2186 <sup>ns</sup>	0,8124
Resíduo	12	0,14943	2,5450	0,0911	0,1763
CVexp (%)		35,6719	41,2354	18,2442	46,9205

\*GL: Graus de Liberdade; CVexp (%): Coeficiente de variação experimental; NR: Número médio de raiz; \* Diferença significativa a 5% de significância, pelo teste F; <sup>ns</sup> Diferença não significativa a 5% de significância, pelo teste F.

O percentual de enraizamento dos explantes de *L. pohlii* não foi influenciado significativamente ( $p > 0,05$ ). Numericamente o maior percentual (85%) foi observado nos explantes cultivados em meio WPM/2 suplementado com  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA. Foi também verificado que o meio WPM/2 suplementado com de  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  ANA forneceu o menor percentual de enraizamento (50%) (Figura 18).



**Figura 18-** Percentual de enraizamento dos explantes de *Lychnophora pohlii* cultivados *in vitro*, em função dos meios de cultura (MS/2 e WPM/2) e das concentrações de ANA, aos 30 dias. As barras indicam o desvio-padrão.

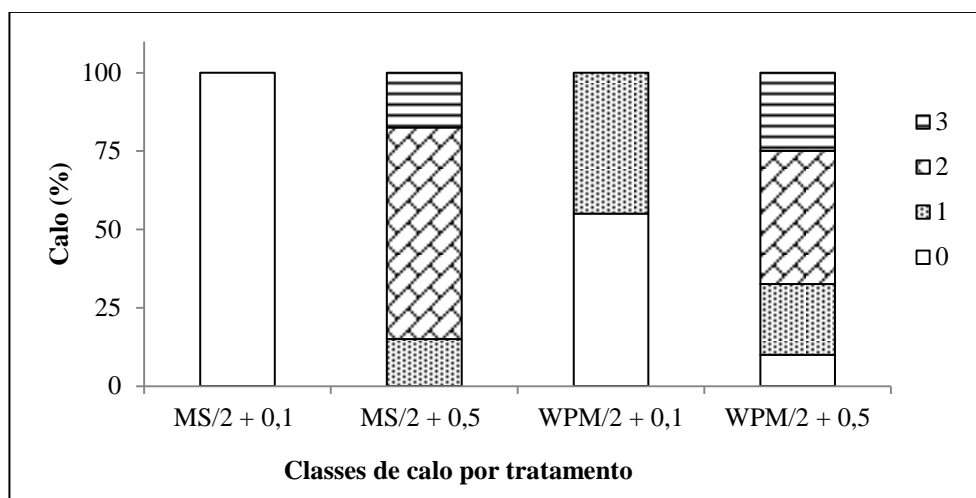
Para o número médio de raízes dos explantes de *L. pohlii*, o melhor resultado foi observado em explantes cultivados em meio WPM/2 suplementado com  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA (7,2 raízes), diferindo estatisticamente do meio WPM/2 acrescido da menor concentração de ANA ( $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ ) (Tabela 12). Também foi verificada superioridade do WPM/2 em relação ao MS/2, na concentração de  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA. A maior média para a altura foi encontrada nos explantes cultivados em meio WPM/2 e a concentração de  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA proporcionou o menor percentual de calo (Tabela 12).

**Tabela 12-** Valores médios para número de raízes, altura e percentual de calo em função da interação meio de cultura x concentrações de ANA e dos fatores isolados, meios de cultura e concentrações de ANA para os explantes de *Lychnophora pohlii* cultivados *in vitro*, aos 30 dias

NR		
Meio	ANA (mg L <sup>-1</sup> )	
	0,1	0,5
MS/2	2,5 Aa	4,2Ba
WPM/2	1,6 Ab	7,2 Aa
Altura (cm)		
Meio		
MS/2	1,47 B	
WPM/2	1,84 A	
Calo(%)		
ANA mg L <sup>-1</sup>		
0,1	22,5B	
0,5	95 A	

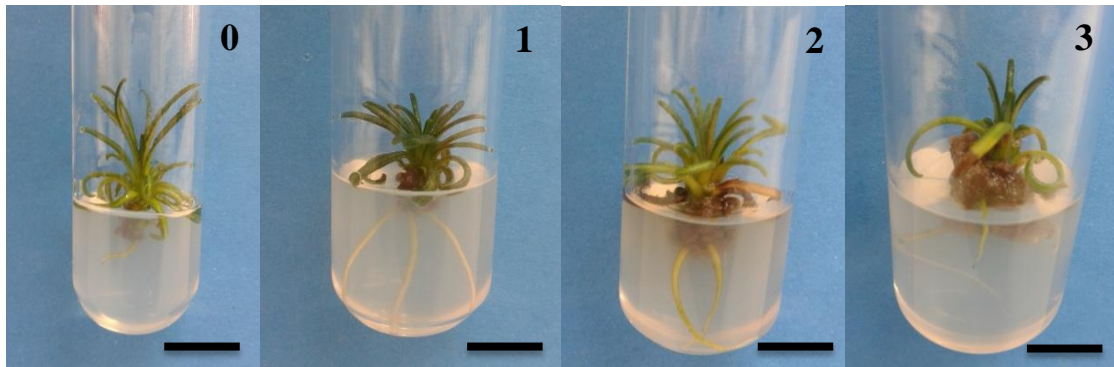
NR: Número médios de raiz; Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e mesma letra minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Em relação à formação de calo na base dos explantes, observou-se que a concentração de 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ANA combinada com o meio MS/2 não apresentou formação de calo. Já a concentração de 0,5 mg L<sup>-1</sup> independente do tipo de meio proporcionou maior percentual de calo. Para o meio MS/2e WPM/2 foi constado presença de calo em 100 e 90% dos explantes respectivamente, sendo 68 e 43% classificados em classe 2 respectivamente (Figura 19 e 20).



**Figura 19-** Percentual de calos em explantes de *Lychnophora pohlii* cultivados *in vitro*, em função dos meios de cultura e das concentrações de ANA, aos 30 dias. 0) Inexistente, 1) Baixa, 2) Média e 3) alta.





**Figura 20-** Classificação de calo nos explantes de *Lychnophora pohlii* cultivados *in vitro*, em função dos meios de cultura e das concentrações de ANA, aos 30 dias. 0) Inexistente, 1) Baixa, 2) Média e 3) Alta. Barra = 1 cm.

### 3.2.4 Experimento VII: Influência do meio MS e WPM e da auxina AIB no enraizamento de explantes de *L. pohlii*

A análise de variância (Tabela 13) demonstrou que não houve interação significativa entre os fatores meio de cultura x concentrações de AIB para as variáveis analisadas, apenas efeito isolado desses fatores. As concentrações de AIB influenciaram significativamente ( $p < 0,05$ ) o percentual de enraizamento, o NR e o percentual de calo. O fator meio de cultura apresentou efeito estatístico significativo somente para a variável altura média.

**Tabela 13-** Resultado da análise de variância para as características percentual de enraizamento, NR, altura média e percentual de calo em explantes de *Lychnophora pohlii* cultivados *in vitro*, em resposta aos meios de cultura e concentrações de AIB, aos 30 dias

Fonte de variação	Quadrados médios				
	GL	Raiz (%)	NR	Altura (cm)	Calo (%)
Meio	1	0,0491 <sup>ns</sup>	0,4444 <sup>ns</sup>	0,6123*	0,0020 <sup>ns</sup>
AIB	1	3,3954*	14,0625*	0,0095 <sup>ns</sup>	2,4201*
Meio*AIB	1	0,0491 <sup>ns</sup>	0,4444 <sup>ns</sup>	0,0023 <sup>ns</sup>	0,0020 <sup>ns</sup>
Resíduo	12	0,0507	0,3646	0,0266	0,0259
CVexp (%)		48,8305	64,3988	11,0714	41,3798

GL: Graus de Liberdade; CVexp (%): Coeficiente de variação experimental; NR: Número médio de raiz; \* Diferença significativa a 5% de significância; <sup>ns</sup> Diferença não significativa a 5% de significância pelo teste F.

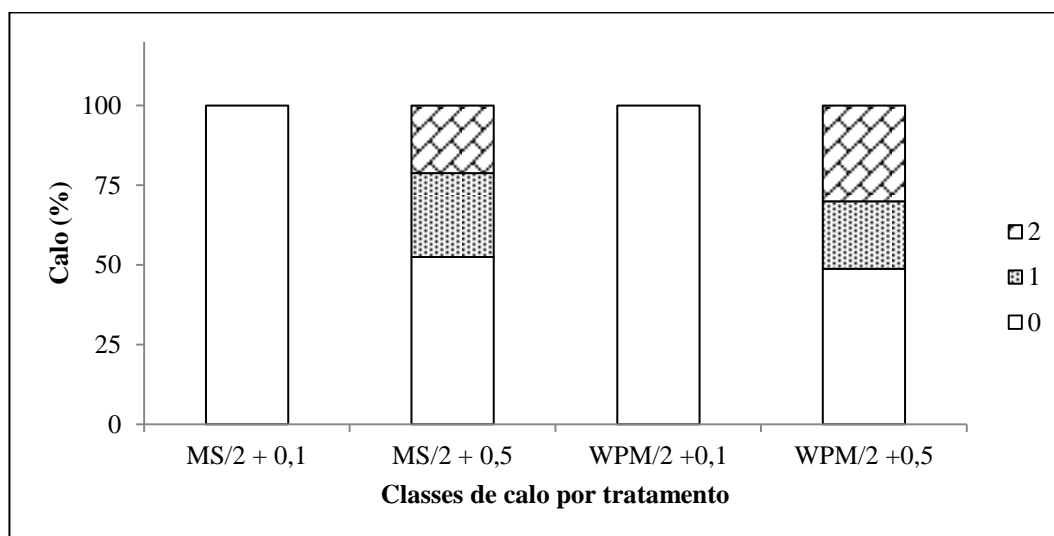
A concentração de 0,5 mg L<sup>-1</sup> de AIB proporcionou os maiores valores para o percentual de enraizamento, número médio de raízes e percentual de calo, diferindo estatisticamente do tratamento 0,1 mg L<sup>-1</sup> de AIB. Verificou-se também a superioridade do meio MS/2 em relação ao WPM/2 para a característica altura média dos explantes, apresentando a maior média (Tabela 14).

**Tabela 14-** Valores médios de percentual de enraizamento, número médio de raiz, altura média e percentual de calo em função dos fatores meios de cultura e concentrações de AIB, para os explantes de *Lychnophora pohlii* cultivados *in vitro*

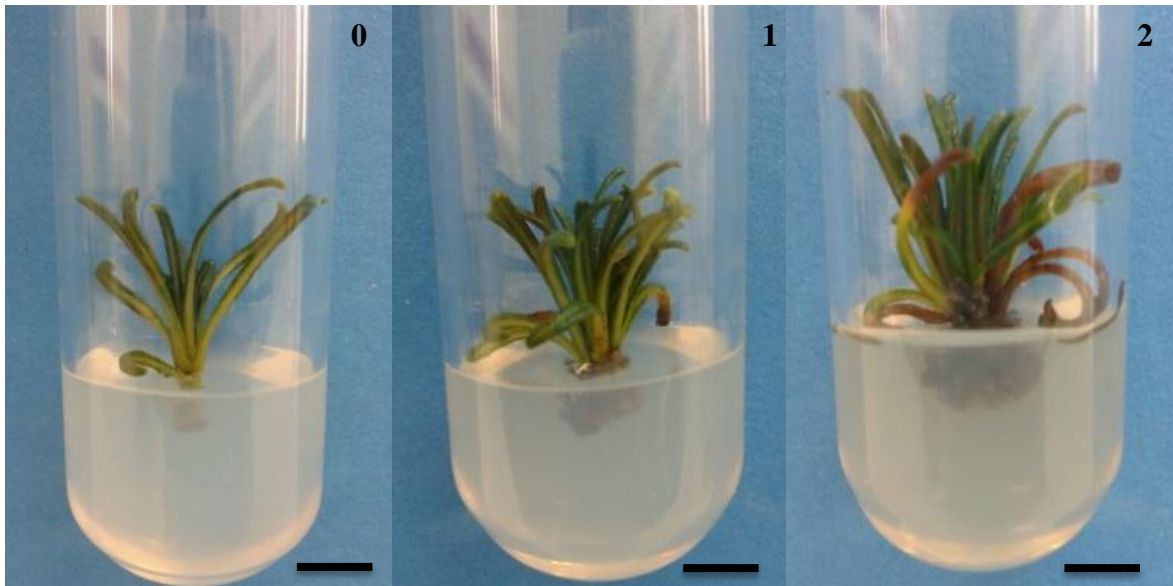
	Variáveis		
	Raiz (%)	NR	Calo (%)
0,1	0 B	0 B	0 B
0,5	60 A	1,85 A	49,4 A
<hr/>			
Meio de cultura	Altura (cm)		
MS/2	1,67 A		
WPM/2	1,28 B		

\*NR: Número médio de raiz; \*médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

No que se refere ao percentual de calo, observou-se que a concentração de 0,1 mg L<sup>-1</sup> de AIB combinada com o meio MS/2e WPM/2 não apresentaram formação de calo (Figura 21). Por outro lado, os explantes cultivados na concentração de 0,5 mg L<sup>-1</sup> de AIB em meio WPM/2 obtiveram maior percentual de calo (51%), desses 30% classificados em classe 2 (Figura 21 e 22).



**Figura 21-** Percentual de calo dos explantes de *Lychnophora pohlii* cultivados *in vitro*, em função dos meios de cultura e das concentrações de AIB, aos 30 dias. 0) Inexistente, 1) Baixa e 2) Média.



**Figura 22-** Classificação de calo nos explantes de *Lychnophora pohlii* cultivados *in vitro*, em função dos meios de cultura e das concentrações de AIB, aos 30 dias. 0) Inexistente, 1) Baixa e 2) Média. Barra = 1 cm.

### 3.3. Fase de pré-aclimatação

#### 3.3.1 Experimento VIII: Influência de métodos para a manutenção da umidade em ambiente fechado na pré-aclimatação de plântulas de *L. pohlii*

De acordo com os resultados da análise de variância (Tabela 15), aos 35 dias de cultivo, constatou-se que as características, percentual de sobrevivência, altura média, comprimento médio da raiz, matéria fresca da parte aérea e matéria seca da parte aérea das plântulas de *L. pohlii* foram significativamente influenciados ( $p < 0,05$ ) pelos tratamentos testados.

**Tabela 15-** Resultado da análise de variância para as características percentual de sobrevivência, altura média, comprimento médio da raiz, matéria fresca da parte aérea, matéria fresca da raiz, matéria seca da parte aérea e matéria seca da raiz, de plântulas de *Lychnophora pohlii*, em resposta aos tratamentos de pré-aclimatação

Fonte de variação	Quadrados Médios							
	GL	SOB (%)	Altura	Raiz	MFPA	MFR	MSPA	MSR
Tratamento	2	0,3331*	5,4476*	17,8509*	0,671*	0,0155 <sup>ns</sup>	0,0040*	0,0009 <sup>ns</sup>
Resíduo	9	0,0342	0,5924	2,9113	0,0872	0,0041	0,0003	0,0005
CVexp (%)		18,2092	16,6173	252945	39,940	69,4711	21,3551	144,211

\*GL: Graus de Liberdade; CVexp (%): Coeficiente de variação experimental; SOB(%): percentual de sobrevivência; MFPA: Matéria fresca da parte aérea; MFR: Matéria fresca da raiz; MSPA: Matéria seca da parte aérea; MSR: Matéria seca da raiz; \* Diferença significativa a 5% de significância, pelo teste F; <sup>ns</sup> Diferença não significativa a 5% de significância, pelo teste F.

O maior percentual de sobrevivência (90,6%) foi observado nas plântulas cobertas com sacos de polietileno intacto, em forma de câmara úmida, diferindo estatisticamente dos outros tratamentos (Tabela 16).

As plântulas cobertas com sacos de polietileno perfurado expressaram a melhor resposta (5,7 cm) no incremento em altura média, igualando-se ao tratamento em que a plântulas foram cultivadas na ausência de cobertura e diferindo estatisticamente das plântulas cobertas com sacos de polietileno intacto, o qual contribui com menor incremento em altura (Tabela 16).

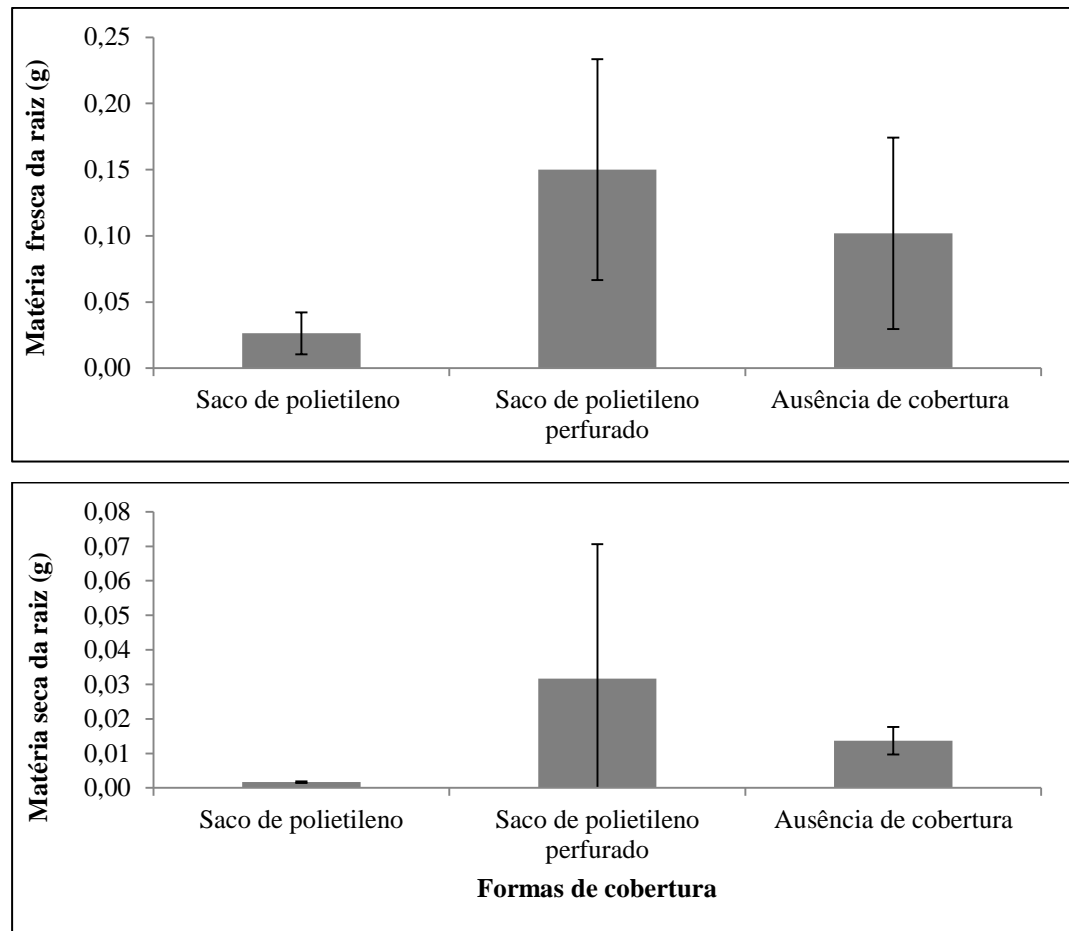
Em relação ao comprimento médio da raiz matéria fresca da parte aérea, as plântulas cobertas com sacos de polietileno perfurado apresentaram plântulas mais responsivas (8,9 cm e 1,1 g respectivamente), igualando-se as plântulas cobertas com sacos de polietileno intacto e diferindo do tratamento em que as plântulas foram cultivadas na ausência de cobertura (Tabela 16). Também foi verificado o melhor resultado para a matéria seca da parte aérea (0,1158g) em plântulas cobertas com saco de polietileno perfurado, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos (Tabela 16).

**Tabela 16-** Valores médios para as variáveis percentual de sobrevivência (SOB%), altura média, comprimento médio da raiz, matéria fresca da parte aérea (MFPA) e matéria seca da parte aérea (MSPA), de plântulas de *Lychnophora pohlii*, em resposta aos tratamentos de pré-aclimação

	SOB (%)	Altura (cm)	Raiz(cm)	MFPA(g)	MSPA(g)
Saco de polietileno	90,6 A	3,4 B	6,5 AB	0,7234 AB	0,0529 B
Saco de polietileno perfurado	56,3 B	5,7 A	8,9 A	1,1565 A	0,1158 A
Ausência de cobertura	56,3 B	4,8 AB	4,8 B	0,3378 B	0,0766 B

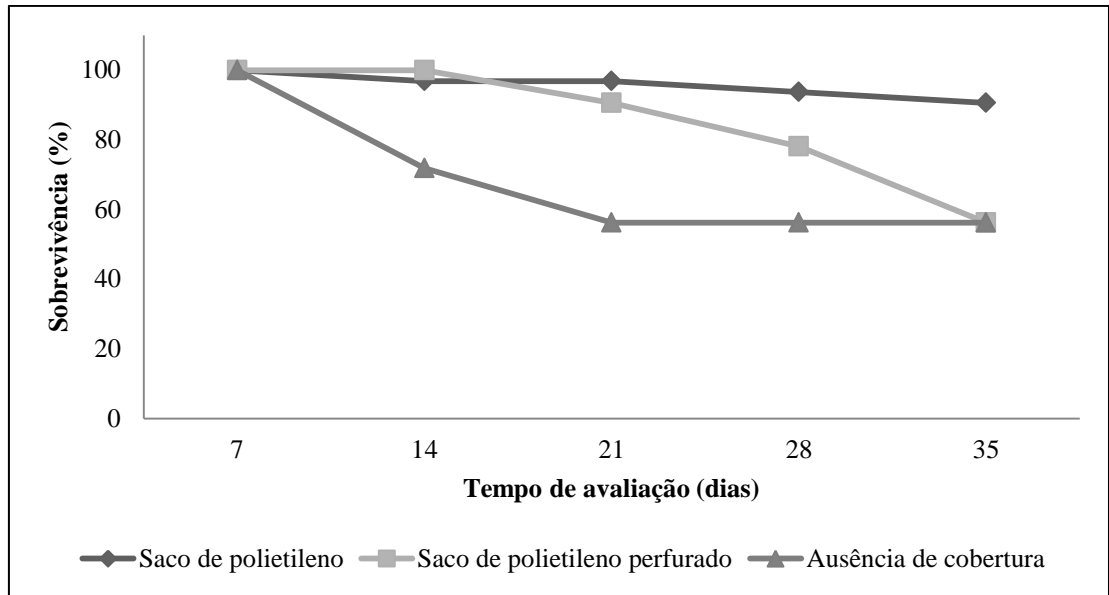
\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Nesse estudo, embora não tenha sido verificada diferença estatística significativa para a matéria fresca e seca das raízes os maiores valores (0,1499 e 0,0317g) foram observados nas plântulas cobertas com sacos de polietileno perfurados seguido das plântulas com ausência de cobertura (Figura 23).

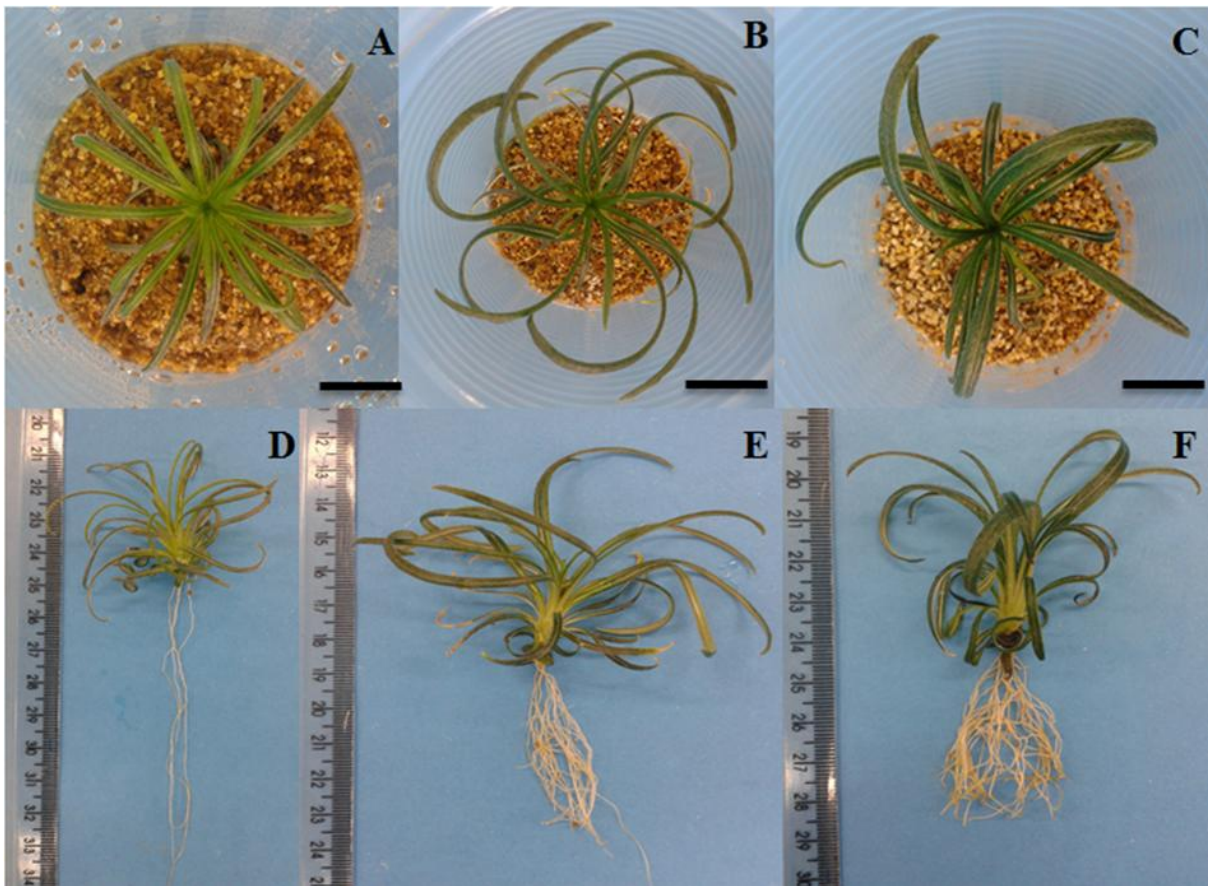


**Figura 23-** Matéria fresca das raízes e matéria seca das raízes das plântulas de *Lychnophora pohlii* cobertas com sacos de polietileno, saco de polietileno perfurado e ausência de cobertura, aos 35 dias de cultivo.

Com relação à sobrevivência ao longo do tempo (Figura 24) as plântulas cobertas com saco de polietileno exibiram o menor índice de mortalidade durante a pré-aclimatação, por outro lado as folhas apresentaram coloração verde claro e visualmente, menor espessura e raízes menos ramificadas e mais finas (Figura 25 A e D), ao passo que resultados bem diferentes foram encontrados ao perfurar o saco de polietileno e na ausência deste. Nesse caso as plântulas exibiram folhas com coloração verde escuro e mais espessas e raízes mais ramificadas (Figuras 25 B, C, E e F). As plântulas de *L. pohlii* cobertas com sacos de polietileno perfurado, quando comparadas com as plântulas com ausência de cobertura, apresentaram menor índice de mortalidade ao longo do tempo e este foi crescente até o fim das avaliações, já as plântulas com ausência de cobertura apesar do maior índice de mortalidade este estabilizou-se aos 21 dias de cultivo, indicando que as plântulas poderiam estar pré-aclimatadas e adaptadas as novas condições.



**Figura 24-** Sobrevivência das plântulas de *Lychnophora pohlii* cobertas com sacos de polietileno, saco de polietileno perfurado e ausência de cobertura, ao longo do tempo.



**Figura 25-** Aspecto das folhas e raízes de plântulas de *L. pohlii*. A e D) cobertas com sacos de polietileno; B e E) cobertas com saco de polietileno perfurado e C e F) ausência de cobertura, aos 35 dias de cultivo.

#### 4. DISCUSSÃO

A fase de alongamento tem por objetivo a transferência dos explantes originados da multiplicação para o meio de cultura com concentrações reduzidas de citocininas, anteriormente ao cultivo em meio de enraizamento. O efeito residual das citocininas utilizadas durante a fase de multiplicação de partes aéreas em subculturas sucessivas pode afetar o alongamento e tornar-se fator limitante na fase de enraizamento, por apresentar reduzida rizogênese ou dar origem à mudas de baixa qualidade para fase posterior, de aclimatização, comprometendo o estabelecimento *in vitro* da maioria das espécies herbáceas ou lenhosas (CALDAS, HARIDASAN, FERREIRA, 1998; SILVA, 2004). Nesse sentido, a fase intermediária de alongamento tem sido essencial para solucionar o problema de efeito residual, com propósito de desintoxicar as culturas.

No intuito de estimular o incremento em altura (alongamento) das brotações procedentes da multiplicação, que não apresentam altura satisfatória para o cultivo direto em meio de enraizamento, essas podem ser individualizadas em meios suplementados com alta relação auxinas/citocininas. Experimentos testando diversas combinações de citocininas e outros fitorreguladores constituem passo importante para o ajustamento dos meios de cultura. O objetivo da suplementação dos meios de cultura com reguladores de crescimento é suprir as possíveis deficiências de teores endógenos de hormônio nos explantes isolados, bem como direcionar o metabolismo do explante *in vitro* para o processo desejado (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Neste estudo, os explantes de *Lychnophora pohlii* cultivados em meio MS (concentração completa de sais) suplementado com 0,1 mg L<sup>-1</sup> ANA + 0,05 mg L<sup>-1</sup> BAP apresentaram o maior incremento em altura. Em contrapartida, ao reduzir a concentração do meio MS para 50% houve decréscimo no incremento em altura.

A superioridade do meio MS (concentração completa de sais) no incremento em altura ocorreu em razão da maior disponibilidade de nutrientes e vitaminas, favorecendo desse modo, o melhor desenvolvimento dos explantes presentes neste meio. Esses resultados concordam com as observações de Reis et al. (2008), que estudando o efeito das diluições do meio MS no comprimento da parte aérea de *Melissa officinalis* (Lamiaceae) concluíram que o meio MS na concentração completa de sais contribuiu com o maior comprimento da parte aérea.

Segundo Dodds e Roberts (1999), o balanço auxina/citocinina na fase de alongamento é fundamental na regulação da divisão celular, alongamento celular, diferenciação celular e formação de órgãos. De acordo com Grattapaglia e Machado (1998), o BAP é uma das citocininas comercialmente disponível mais barata, sendo uma das mais utilizadas e considerada a citocinina de excelência, tal situação é constatada no presente experimento.

Lima e Gonçalves (1998), estudando concentrações de TDZ para verificar o comportamento de um clone do híbrido *E. grandis* x *E. tereticornis* (Myrtaceae) deduziram que houve uma redução gradativa no comprimento médio da parte aérea à medida que se aumentou as concentrações de TDZ. Resultados semelhantes foram encontrados por Flores et al. (2009), que avaliando o efeito das concentrações de BAP e TDZ na propagação *in vitro* da espécie medicinal *Pfaffia glomerata* (Amaranthaceae) verificaram que a redução do comprimento dos brotos foi maior em meio suplemento com TDZ quando comparado ao meio com BAP. Souza et al (2003), estudando o efeito do TDZ no comprimento dos brotos de *Lychnophora pinaster* (Asteraceae) observaram explantes com desenvolvimento anormal e comprimento reduzido.

Contudo, em tratamentos nos quais se utilizou o TDZ, os explantes de *L. pohlii* caracterizaram-se pela redução do alongamento das culturas, desenvolvimento anormal e alto percentual de calosidade, semelhante aos sintomas peculiares de altas concentrações de citocininas causando certa toxidez, tendo conseqüências prejudiciais nas fases de alongamento e enraizamento. Segundo Mok et al. (1987), o TDZ altera o metabolismo de citocininas naturais, ocasionando o aumento do teor endógeno de citocinina. Dessa maneira, a presença de altas concentrações de citocinina induz a excessiva formação de calos na base dos explantes, fato comprovado ao verificar o alto percentual de estruturas calogênicas nos explantes tratados com TDZ, em meio com a concentração completa de sais.

Por meio dos resultados nota-se que a combinação de ANA + BAP foi positiva no incremento em altura, ao passo que resultados contrários foram observados para a combinação de ANA + TDZ.

As giberelinas (GA<sub>3</sub>) aumentam a divisão e expansão das células vegetais, tendo como um dos principais efeitos na micropropagação o alongamento das brotações durante a multiplicação ou antes do enraizamento (TAIZ e ZEIGER, 2004). No presente caso, a adição de GA<sub>3</sub> ao meio de cultura mostrou-se eficiente na promoção do alongamento dos explantes, independente da concentração do meio. Não houve formação de calo nos explantes cultivados



no meio MS/2 e em meio MS (concentração completa) foi de apenas 10%, sugerindo que o GA<sub>3</sub> não apresenta efeito fitotóxico para *L. pohlii* na concentração utilizada.

Resultados semelhantes foram encontrados por Simões et al. (2012), que estudando o efeito das concentrações de GA<sub>3</sub> no comprimento da parte aérea de *Piper hispidinervum* (Piponaceae) concluíram que a concentração de 3,0 mg L<sup>-1</sup> apresentou incremento no alongamento. Menezes et al. (2010), verificaram que a concentração de 0,25 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> apresentou o maior incremento em altura em explantes de *Psidium guajava* (Myrtaceae).

Contudo, no experimento II em comparação com o experimento I, os tratamentos nos quais se utilizou o GA<sub>3</sub> apresentaram incremento em altura bastante reduzido, ocorrendo leve aumento até a concentração de 1,0 mg L<sup>-1</sup>. Este fato pode estar relacionado com o efeito residual das citocininas na fase de multiplicação, devido ao número de subculturas, indicando que os genótipos apresentam respostas diferenciadas quando tratados com GA<sub>3</sub>.

Segundo Grattapaglia e Machado (1998), nem sempre as culturas *in vitro* mostram resposta às giberilinas, desta forma em algumas situações pode inibir o alongamento das partes aéreas. Os resultados obtidos corroboram com o encontrado por Navroski et al. (2013), em que o genótipo 6 de *Eucalyptus dunnii* (Myrtaceae) apresentou redução no incremento em altura, quando cultivados em 0,8 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>.

Os reguladores de crescimento geralmente mais utilizados na micropropagação para a suplementação exógena dos meios de cultura são do grupo das auxinas e citocinas. A disponibilidade, concentração, interação desses hormônios e a exigência da espécie são fatores decisivos no desenvolvimento da parte aérea, formação de raízes adventícias e calo (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Dessa maneira, no experimento III, embora não tenha sido verificada diferença significativa entre as concentrações de ANA, houve decréscimo no comprimento das partes aéreas e acréscimo no percentual de enraizamento dos explantes com o aumento da concentração de ANA, sendo o tratamento de menor concentração (ANA 0,1 mg L<sup>-1</sup>) o que apresentou a maior magnitude de altura média e menor percentual de enraizamento.

Os dados de altura média obtidos nesse experimento revelam que *L. pohlii* não necessita de concentrações superiores que 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ANA para o bom desenvolvimento da parte aérea. No entanto, nota-se dependência da presença de hormônios exógenos no meio de cultura para a formação de raízes adventícias, visto que em concentrações mais alta de ANA os explantes foram mais responsivos quanto ao percentual de enraizamento.

Caldas et al.(1998) consideraram que a formação de estruturas calogênicas em diferentes espécies pode ser independente da presença de auxina e citocinina, dependente de auxina, dependente de citocinina e dependente de ambas. Já Grattapaglia e Machado (1998) afirmaram que concentrações excedentes de auxinas para determinada espécie pode favorecer demasiadamente o enraizamento ou a formação de calo, fato observado no presente experimento, onde concentrações superiores a  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ , contribuíram para um percentual de 100% de explantes com estruturas calogênicas, o que não é desejável no alongamento.

A formação de calo parece não ter afetado o enraizamento dos explantes, visto uma tendência linear crescente em função do aumento das concentrações de ANA para número médio de raízes. O contrário foi observado para a altura média, no qual foi verificada uma tendência de queda em resposta ao aumento das concentrações de ANA. Quando o objetivo é a propagação direta, caso do referente estudo, a formação de estruturas calogênicas afeta negativamente o cultivo *in vitro*. A formação de calos na base do explante pode comprometer a proliferação de gemas axilares e o alongamento de brotações, afetando o desenvolvimento *in vitro* (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

O experimento I apresentou a maior magnitude para a altura média, em comparação com o experimento II e III, o que pode estar relacionado com o número de subculturas. Contudo, observou-se que as concentrações mais baixas de ANA associadas ao BAP são adequadas para o alongamento de *L. pohlii*. Nessas condições os explantes mostraram-se vigorosos e isentos de toxidez, denotando boas perspectivas quanto ao cultivo *in vitro* dessa espécie.

A fase de enraizamento caracteriza-se pela formação de raízes adventícias nas partes aéreas, procedentes da fase de alongamento. É considerada fundamental para a micropropagação, dado que a formação de um bom sistema radicular que seja capaz de incrementar a absorção de sais em meio com disponibilidade reduzida e permita um fluxo transpiratório adequado é fator determinante na fase de aclimação.

O emprego de auxinas exógenas em meios de cultura especialmente na fase de enraizamento é vista por vários autores como fator primordial, principalmente para espécies lenhosas, caso da *L. pohlii*. Segundo Pinhal et al. (2011), o uso de fitorreguladores é um dos fatores que possuem maior influência na micropropagação, visto que o seu efeito positivo já foi constatada em vários trabalhos, sendo essas substâncias, em muitos casos, indispensáveis ao bom desenvolvimento da cultura *in vitro*, tanto no estabelecimento, quanto em fases posteriores.

Souza et al. (2004) afirmam que o tipo e a concentração de auxinas são em geral as variáveis que atuam no processo de enraizamento *in vitro*, dessa maneira um fator a ser considerado é a dependência entre a concentração de auxina utilizada e o tempo de exposição dos explantes em sua presença, visto que estão diretamente relacionados influenciando além do enraizamento, o comprimento da parte aérea da plântulas e formação de calos na base dos explantes.

A rizogênese ocorre de uma a três semanas e pode ser dividida em indução, iniciação e alongamento das raízes, sendo que as duas primeiras fases respondem ou dependem da auxina (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). Para *L. pohlii*, observou-se que o processo de indução e iniciação do enraizamento ocorreu no tempo citado, ou seja, na primeira semana quando utilizou ANA e segunda e terceira semana quando utilizou o AIB.

Neste estudo, a alternância da concentração da auxina e tempo de permanência, aumentou o número médio de raízes e percentual de enraizamento. Resultados similares foram encontrados por Souza et al. (2004), para a espécie medicinal do cerrado *Lychnophora pinaster* (Asteraceae), ao constatarem maior número de raízes(9,79) em explantes cultivados em meio suplementado com 2,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA, aos 15 dias de cultivo. Também foram encontrados pelos mesmos autores resultados discordantes, ao verificarem maior número de raízes (4,61) em explantes tratados com 1,0 mgL<sup>-1</sup> de AIB. Rossato (2015) estudando concentrações de AIB na indução de rizogênese de *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae), uma espécie frutífera nativa do cerrado, verificou que a concentração de 2,0 mg L<sup>-1</sup> AIB proporcionou a maior número médio de raízes (0,33).

Para o percentual de enraizamento a concentração de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA e 1,0 mg L<sup>-1</sup> AIB apresentaram maiores percentuais de explantes enraizados, no entanto quando os explantes permaneceram durante sete dias em 1,0 mg L<sup>-1</sup> de AIB houve o menor percentual de enraizamento. Os resultados encontrados discordam das observações de Souza et al. (2015), os quais estudando concentrações de 1,0 mg L<sup>-1</sup> e 2,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA e AIB na promoção do rizogênese de *Anemopaegma arvense* (Bignoniaceae) uma planta medicinal endêmica do cerrado, verificaram que explantes tratados com 2,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA e o tempo de permanência de 15 dias, foi a melhor condição em que obteve-se 48,33% de enraizamento.

Em relação à altura média dos explantes de *L. pohlii*, a maior média (3,0 cm) foi verificada quando os explantes foram cultivados na maior concentração de AIB (2,0 mg L<sup>-1</sup>) ao 63 dias de cultivo. Resultados distintos foram encontrados quando se utilizou o ANA, uma vez que a maior altura média (2,1 cm) foi observada em explantes cultivados em meio

suplementado com 1,0 mg L<sup>-1</sup> ANA nos maiores tempos de permanência, aos 28 dias de cultivo. O incremento em altura dos explantes cultivados em ambas auxinas manteve-se crescente até o final das avaliações. Resultados divergentes foram encontrados por Souza et al. (2004), os quais comprovaram a inibição do crescimento em altura dos explantes de *Lychnophora pinaster* (Asteraceae), uma espécie medicinal do cerrado, quando permaneceram durante o maior período de tempo (30 dias) na presença de ANA e AIB.

Foi verificada a formação de calos na base dos explantes quando o meio foi suplementado nas concentrações de 1,0 e 2,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA e AIB, todavia os maiores percentuais de explantes com estruturas calogênicas foi favorecido pela concentração de 2,0 mg L<sup>-1</sup> de ambas auxinas, inferindo que a concentração endógena de auxina associada com a concentração exógena induziram a proliferação de células não diferenciadas, o qual não é desejável na etapa de enraizamento. Assim, o crescimento e a organogênese *in vitro* são altamente dependentes da interação entre as substâncias de crescimento que ocorrem naturalmente na planta (hormônios) e os análogos sintéticos (reguladores de crescimento), os quais são adicionados ao meio de cultura (GEORGE,1996). Segundo Grattapaglia e Machado (1998), concentrações excessivas de auxina no meio de cultura podem resultar na formação de calos na base do explante.

Portanto a presença de estruturas calogênicas constitui um fator limitante durante a elaboração de protocolos de micropropagação, devido às massas celulares comprometerem o enraizamento (não ocorreu com *L. pohlii*) e interferir na funcionalidade do sistema radicular, comprometendo principalmente o processo de aclimatização das plantas (SOUZA e PEREIRA, 2007) e ainda afetar negativamente o crescimento da parte aérea dos explantes. Esse fato foi comprovado no presente experimento, o qual foi observado certa toxidez, caracterizada pela demasiada formação de calos em explantes cultivados em meios suplementados com ANA e como consequência contribuíram com menor incremento em altura média quando comparado com os explantes tratados com AIB. Nesse sentido a altura média dos explantes foi dificultada pela competição resultante da proliferação celular desordenada.

Aspecto digno de nota foi observado nos explantes cultivados em meio suplementado com AIB, demonstrando que esta auxina é mais efetiva no incremento em altura e menos tóxica nas concentrações utilizadas para a espécie *L. pohlii*. De acordo com Pinhal et al. (2011), as respostas morfogenéticas variam conforme a espécie, as classes, tipos e doses do regulador de crescimento utilizado.

A concentração de sais minerais que compõem os meios de cultura mesmo na presença de auxinas, pode inibir a formação de raízes adventícias (SOUZA e PEREIRA, 2007) em razão destas não apresentarem somente efeito nutritivo, visto que influenciam as respostas de crescimento celular e na morfogênese por meio de propriedades osmóticas (MALDANER et al., 2006). Neste contexto, a pressão osmótica elevada limita a absorção de água, em contraste a diluição aumenta a disponibilidade hídrica e reduz a oxigenação (TAIZ e ZEIGER, 2004).

Tais fatos explicariam os resultados observados no experimento VI, no qual verificou-se a superioridade do meio WPM/2, apresentando o maior número médio de raízes (7,2), o maior percentual de enraizamento (85%) e o maior crescimento em altura (1,84) em relação ao MS/2. Outro fato que pode ter influenciado esses resultados é a baixa concentração de sais do meio WPM quando comparado ao MS, que apresenta maior concentração de nitrogênio total nas formas de nitrato e amônio (RODRIGUES et al., 2012).

Entretanto, no experimento VII foram observados resultados contrários quanto à altura média, verificando a superioridade do meio MS, embora o crescimento em altura fora de menor magnitude do que o encontrado no meio WPM quando suplementado com a auxina ANA. Esses resultados podem ter sido influenciados pelo fato de *L. pohlii* ser endêmica do cerrado, sendo importante ressaltar que esta espécie é adaptada a um ambiente de solos distróficos saturados em alumínio e com pH muito baixo, onde as chuvas são escassas (SEMIR, 1991). É possível inferir que a espécie está adaptada à restrição hídrica, o que pode ser alcançado em meios com elevada concentração de sais, que é o caso do MS.

Nepomuceno et al. (2014), analisando diluições dos meios de cultura MS e WPM na formação de raízes de *Hyptis leucocephala* e *Hyptis platanifolia* (Lamiaceae) concluíram a superioridade do meio MS/2 no número de raízes em relação as outras diluições.

Nos tratamentos nos quais se utilizou a auxina ANA, certificou-se que a maior concentração desse hormônio ( $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ ) apresentou as melhores respostas quanto a formação de raízes adventícias e maior percentual de calo. Resultados discordantes foram observados quando se utilizou a auxina AIB, em que a menor concentração ( $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ ) houve ausência de enraizamento e estruturas calogênicas.

Diante dos resultados obtidos, nota-se que para os meios MS e WPM diluídos em 50% é necessário o aumento das concentrações das auxinas para o incremento em altura e formação de raízes adventícias de explantes de *L. pohlii*. Também foi constatado a superioridade da auxina ANA, fato que se opõem a afirmação de Grattapaglia e Machado

(1998) indicando que o AIB é frequentemente a melhor auxina para a indução de raízes *in vitro*.

Segundo Grattapaglia e Machado (1998), fase de aclimação compreende a transferência da planta da condição *in vitro*, para a casa de vegetação, a qual é exposta a rustificação e aclimação. De maneira geral, para determinada espécie essa fase é considerada crítica, retratando um fator limitante nos protocolos de cultura de tecidos, tal fato deve-se aos seguintes fatores; a planta passa de uma situação de reduzido fluxo transpiratório, resultante da baixa intensidade de luz e a elevada umidade relativa, para um ambiente que demanda um incremento na taxa de transpiração, ficando muito susceptível ao estresse hídrico; a planta passa de uma existência heterotrófica, para um estado autotrófico, no qual precisa realizar fotossíntese para sobreviver e ainda passa de uma condição de alta disponibilidade de nutrientes no meio para outra onde precisa rapidamente incrementar a absorção de sais.

Diante do exposto, Noletto e Silveira (2004), recomendam que as plântulas devam ser protegidas da desidratação excessiva utilizando sacos plásticos, dado que, após a transferência para as condições *ex vitro*, as plântulas são expostas a diversas condições de estresse, o que conseqüentemente leva altas taxas de mortalidade, devido o controle deficiente da perda de água e da baixa taxa fotossintética das plântulas, o que pode ser comprovado neste experimento, visto que as plântulas cobertas com sacos de polietileno em forma de câmara úmida aprearam maior percentual de sobrevivência ao longo do tempo, até aos 35 dias de pré-aclimação, ao passo que o menor percentual de sobrevivência foi verificado nas plântulas com ausência de cobertura.

Noletto e Silveira (2004), estudando a aclimação de uma espécie do cerrado *Copaifera langsdorffii* (Fabaceae) relataram que ao cobrir os recipientes com sacos plásticos por um período de sete dias, obtiveram todas as plântulas aclimatadas em sala de crescimento.

Pereira et al. (2005), analisando a aclimação de plântulas de *Lychnophora ericoides* (Asteraceae) espécie medicinal do cerrado, constataram 83,3% de sobrevivência das plântulas, quando estas foram mantidas em estufa.

Moura et al. (2014), promovendo a aclimação de *Bowdichia virgilioides* (Fabaceae), observaram 100% de sobrevivência das plântulas quando estas foram cobertas com filme plástico por um período de 60 dias e mantidas em casa de vegetação.

Os resultados obtidos neste experimento estão relacionados às condições de cultivo, em que houve eliminação da fonte de carboidrato (sacarose), aumento da concentração de CO<sub>2</sub>, e umidade relativa alta na atmosfera dos recipientes, em vista disso a

planta passou de uma condição heterotrófica para uma condição autotrófica (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998), portanto, a planta mostrou-se capaz de realizar fotossíntese em níveis suficientes para estimular o desenvolvimento da parte aérea, do sistema radicular mais ramificado, o que possibilita a absorção de água e sais minerais imediatamente do substrato, produção de cera nas folhas, desse modo evitando a perda excessiva de água e como consequência o aumento do incremento em matéria seca e fresca.

## 5. CONCLUSÕES

Para o alongamento *in vitro* de *L. pohlii*, o meio indicado é o MS (concentração completa de sais e vitaminas) suplementado com ANA ( $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ ) + BAP ( $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ ).

O tempo de cultivo ideal foi de 45 dias em meio de alongamento, mas varia de acordo com as concentrações do meio de cultura e as auxinas e citocininas utilizadas. A auxina AIB na concentração de  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  e o tempo de permanência de sete dias dos explantes no meio são eficiente no enraizamento de *L. pohlii*, por apresentarem o melhor percentual de enraizamento e menor percentual de calo.

O meio MS/2 suplementado com  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA é o mais indicado em relação ao WPM/2 para o enraizamento de explantes de *L. pohlii*, por não apresentar formação de calos.

Para a pré-aclimatação é recomendado que as plântulas sejam cobertas com saco de polietileno perfurado.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, G. S. S.; CARVALHO-OKANO, R. M.; NAKAJIMA, J. N.; GARCIA, F. C. P. Asteraceae Dumort nos campos rupestres do Parque Estadual do Itacolomi, Minas Gerais, Brasil: Barnadesieae e Mutisieae. **Revista Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 65, n. 2, p. 311-328, 2014.

BANZATTO, D. A.; KRONKA, S. N. **Experimentação agrícola**. 4 ed. Jaboticabal: Funep, 2006, 237p.

BASSAN, J. S.; REINIGER, L. R.S.; ROCHA, B. H. G.; SEVERO, C. R. P.; FLÔRES, A.V. Oxidação fenólica, tipo de explante e meios de cultura no estabelecimento *in vitro* de

canafístula (*Peltophorumdubium* (Spreng.) Taub.). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 16, n. 4, p. 381-390, 2006.

BORGATTO, F.; HAYASHI, T. K. Biotecnologia de plantas. In: CASTRO, P.R.C.; SENA, J.O.A. de; KLUGE, R.A. (org.). **Introdução à fisiologia do desenvolvimento vegetal**. Maringá: Eduem, 2002. p. 227-254.

BORLAUG, N.E. "Feeding a world of 10 billion people: the miracle ahead". In: R. Bailey (ed.). *Global warming and other eco-myths*. Pp. 29-60, **Roseville**, EUA: Competitive Enterprise Institute. 2002.

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

CHICARO, P.; PINTO, E.; COLEPICCOLO, P.; LOPES, J. L. C.; LOPES, N. P. Flavonoids from *Lychnophora passerina* (Asteraceae): potencial antioxidants and UV-protectants. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, p. 239-243, 2004.

CNCFlora. *Lychnophora pohlii* in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2 Centro Nacional de Conservação da Flora. Disponível em <[http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Lychnophora pohlii](http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Lychnophora_pohlii)>. Acesso em 6 maio 2017.

COLOMBO, L. A.; FARIA, R. T.; CARVALHO, J. F. P.; ASSIS, A. M.; FONSECA, I. C. B. Influência do fungicida clorotalonil no desenvolvimento vegetativo e no enraizamento *in vitro* de duas espécies de orquídeas brasileiras. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 26, n. 2, p. 253-258, 2004.

CORDAZZO, C. V.; SPANÓ, S. Produção e germinação de sementes de *Seneciocrassiflorus* (poir.) dc (Asteraceae), coletadas ao longo de um gradiente nas dunas costeiras o sul do Brasil. **Atlântica**, Rio Grande, 24(1): 11-15, 2002.

DINIZ, J. D. N.; ALMEIDA, J. L.; OLIVEIRA, A. B.; BEZERRA, A. M. E. Protocolo para desinfestação, multiplicação e enraizamento *in vitro* de *Spathiphyllum wallisi*1. **Revista Ciência Agrônômica**. Centro de Ciências Agrárias - Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, v. 39, n. 01, p. 107-113, 2008.

DODDS, J. H.; ROBERTS, L. W. *Experiments in plant tissue culture*. **Cambridge: University Press**, 1999. 256 p.



FERREIRA, S. A.; **Avaliação da toxicidade das atividade analgésica e anti-inflamatória do extrato etanólico de *Lychnophora pinaster* (Arnica)**. 2010. 147 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Universidade Federal de Ouro Preto, Minas Gerais, 2010.

FLORES, R. Regeneração *in vitro* de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart.). **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 4, n. 3, p. 201-205, 1998.

FLORES, R.; NICOLOSO, F. T.; MALDANER, J.; GARLET, T. M. B. Benzilaminopurina (BAP) e thidiazuron (TDZ) na propagação *in vitro* de *Pfaffiaglomerata* (Spreng.) Pedersen. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.11, n.3, p.292-299, 2009.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**, part 1 – the technology. Edington: Exegetics, 1996. 1574 p.

GONZAGA, A. P. D. **Germinação e micropropagação de *Lychnophora pohlii* Sch. Bip. (Asteraceae)**. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Ciência Florestal), Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2013.

GRAEL, C. F. F.; ALBUQUERQUE, S.; LOPES, J. L.C. Chemical constituents of *Lychnophora pohlii* and trypanocidal activity of crude plant extracts and of isolated compounds. **Fitoterapia**, v. 76, n. 1, p. 73–82, 2005.

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 – CNPH, 1998, v. 1, p. 183–260.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v.55, p. 481-504, 2000.

KANASHIRO, A.; KABEYA, L. M.; GRAEL, C. F. F.; JORDÃO, C. O.; AZZOLINE, A. E. C. S.; LOPES, J. L.; LUCISANO-VALIM, Y. M. Sesquiterpene lactones from *Lychnophora pohlii*: neutrophil chemiluminescenceinhibition and free radical scaven geractivity. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, Londres, v. 58, p. 853–858, 2006.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. A conservação do Cerrado brasileiro. A conservação do Cerrado brasileiro. **Mega diversidade**. V. 1, n. 1, 2005.

LIMA, M. M.; GONÇALVES, A. N.; Efeito do Thidiazuron na multiplicação *in vitro* de gemas de um clone de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus tereticornis* *Effect of Thidiazuron on*

*in vitro* shoot multiplication of *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus tereticornis*. **SCIENTIA FORESTALIS**. n. 53, p. 49-56, 1998.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of Mountain laurel, *Kalmialatifolia*, by use of shoot culture. **International Plant Propagation Society Proceedings**, v. 30, p. 421-427, 1981.

LOPES, C. G. R. **Regeneração natural em uma área de campo de agricultura abandonado em ambiente semiárido**. 2011. 141.f. Tese (Doutorado em Botânica) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Biologia, Recife, 2011.

MALDANER, J.; NICOLOSO, F. T.; SANTOS, E. S.; FLORES, R.; SKREBSKY, E. C. Sacarose e nitrogênio na multiplicação *in vitro* de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 4, p. 1201-1206, 2006.

MENEZES, T. P.; RODRIGUES, F. A.; ASMAR, S. A.; PASQUAL, M. Sacarose e GA<sub>3</sub> na germinação de sementes e no desenvolvimento *in vitro* de plântulas de goiabeira 'Pedro sato'. **Plant Cell Culture Micropropagation**, Lavras, v.6, n.2, p. 69-75, 2010.

MÉTRAUX, J. P. Gibberellins and plant cell elongation. In: DAVIES, P. J. (Ed). **Plant hormones and their role in plant growth and development**. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, p. 296-317, 1987.

Mok, M. C.; Mok, D.; Turner, J.; Mujer, C. 1987. Biological and biochemical effects of cytokinin-active phenylurea derivatives in tissue culture systems. **Hort Science** 22: 1194–1197.

MOURA, L. C.; TITON, M.; FERNANDES, J. S. C.; SANTANA, R. C.; Germinação *in vitro* e aclimação de plântulas de sucupira-preta (*Bowdichia virgilioides* Kunth.). **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 30, n. 2, p. 678-687, 2014.

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

NAVROSKI, M. C.; REINIGER, L. R. S.; PEREIRA, M. O.; CURTI, A. R.; PAIM, A. F. Alongamento *in vitro* de genótipos de *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Cerne**, Lavras, v. 19, n. 4, p. 545-550, 2013.

NEPOMUCENO, C. F.; FONSECA, P. T.; SILVA, T. S.; OLIVEIRA, L. M.; SANTANA, J. R. F. Germinação *in vitro* de *Hyptis leucocephala* Mart. ex Benth. e *Hyptis platanifolia* Mart. Ex Benth. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v.16, n.4, p.886-895, 2014.

NOLETO, L. G.; SILVEIRA, C. E. S.; Propagação *in vitro* de *Copaifera langsdorffii* Desf. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento** - Edição nº 33, 2004.

PAIVA, H. N.; GOMES, J. M. **Propagação vegetativa de espécies florestais**. 1ª reimp. 1ª ed. Viçosa: Ed. UFV, 2011. 52 P.

PEREIRA, A. M. S.; BERTONI, B. W.; FONSECA, V. S.; AMARANTE, M. F. C.; LOPES, N. P.; PARON, M. F.; FRANÇA, S. C. Micropropagação de *Lychnophora ericoides* Mart.: uma espécie medicinal do cerrado brasileiro. **Revista Fitos**, Ribeirão Preto, V.1, n.2, p. 69-73, 2005.

PINHAL, H. F.; ANASTÁCIO, M. R.; CARNEIRO, P. A. P.; SILVA, V. J.; MORAIS, T. P.; LUZ, J. M. Q. Aplicações da cultura de tecidos vegetais em frutíferas do Cerrado. **Ciência Rural**, v. 41, n. 7, p. 1136-1142, 2011.

RATTER, J. S. BRIDGEWATER, J. F. RIBEIRO. 2003. Analysis of the floristic composition of the Brazilian Cerrado vegetation. III: comparison of the woody vegetation of 376 areas. **Edinburg Journal of Botany**, p. 60: 57-109.

REIS, E. S.; PINTO, J. E. B. P.; ROSADO, L. D. S.; CORRÊA, R. M. Influência do meio de cultura na germinação de sementes *in vitro* e taxa de multiplicação de *Melissa officinalis* L. **Revista Ceres**. V.55, n.3, p.160-167, 2008.

RIBEIRO JÚNIOR, J. I. **Métodos estatísticos aplicados à melhoria da qualidade**. 1 ed., Viçosa: Editora UFV, 2012, 385p.

ROCHA, P, S, G.; SCHUCH, M. W.; BIANCHI, V. J.; FACHINELLO, J. C. Multiplicação alongamento *in vitro* do porta-enxerto de *Prunus*. **Uberlândia**, v. 25, n. 1, p. 69-74, 2009.

RODRIGUES, M. R.; COSTA, T. H. F.; FESTUCCI-BUSELLI, R. A.; SILVA, L. C. OTONI, W. C. Effects of flask sealing and growth regulators on *in vitro* propagation of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, Plant, v. 48, n. 1, p. 67-72, 2012.

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

ROSSATO, M. **Propagação *in vitro* e aspectos anatômicos e ultraestruturais da calogênese em *Campomanesia adamantium***. 2015. 64 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal)- Universidade Federal de Goiás, Regional Jataí, Jataí, 2015.

SANTOS, D. C.; WENDLING, I.; GROSSI, F. Efeito de diferentes combinações de fitorreguladores e vitaminas no desenvolvimento *in vitro* e *ex vitro* de *Grevillea robusta* Cunn. **Colombo /PR**. 2004.

SEAMAN, F. C. Sesquiterpene lactonas as taxonomic characters in the Asteraceae. **The Botanical Review**, v.48, n.2, p. 121-595, 1982.

SEMIR, J. **Revisão taxonômica de *Lychnophora* Mart. (Vernonieae: Compositae)**. 549 f. Tese de Doutorado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 1991.

SILVA, E. S. B. **Propagação *in vitro* de *Prunus* spp.** 2004. 115 f. Tese (Doutorado em Fruticultura de Clima Temperado) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2004.

SILVA, G. B. S.; MELLO, A. Y. I.; STEINKE, V. A. Unidades de conservação no bioma cerrado: desafios e oportunidades para a conservação no Mato Grosso. **Geografia**, Rio Claro, v. 37, n. 3, p. 541-554, 2012.

SIMÕES, M. A.; VASCONCELOS, J. M.; OLIVEIRA, J. P.; BELTRAO, R. T.; MANFIO, C. E.; JUNIOR, P. C. F.; RAPOSO, A. Efeito do ácido giberélico (ag3) no alongamento *in vitro* de plântulas de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. Dc.) durante a micropropagação. **Amazônia: Ciência e Desenvolvimento**, Belém, v. 7, n. 14. 2012.

SOUZA, A. V.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; CORRÊIA, R. M.; CASTRO, E. M. Germinações de embriões *in vitro* de *Lychnophora pinaster* Mart. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, Edição especial, p. 1532-1538, 2003.

SOUZA, A. V.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; TEIXEIRA, R. N. Enraizamento *in vitro* de plântulas de arnica (*Lychnophora pinaster* Mart.), uma planta medicinal. **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**. Botucatu, v. 7, n.1, p.86-91, 2004.

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

SOUZA, A.V.V.; OLIVEIRA, F. J. V.; BERTONI, B.W.; FRANÇA, S.C.; PEREIRA, A.M.S. Enraizamento *in vitro* de catuaba (*Anemopaegma arvense* (Vell.) Stell. ex de Souza),

uma planta medicinal do Cerrado. **Revista Brasileira Planta Medicinai**s, Campinas, v.17, n.1, p.51-58, 2015.

SOUZA, M. J. H. Potencialidade climática para a viticultura em Diamantina – MG. In: XI Reunião Argentina de Agrometeorologia, 11, 2006, La Plata, Buenos Aires. **Anais**. La Plata, Buenos Aires: Sociedade Argentina de Agrometeorologia, 2006. CD\_Rom.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. 2012. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado na APG III**. 3a ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 768 p.

STATSOFT, INC. (2010). STATISTICA (DATA ANALYSIS SOFTWARE SYSTEM), VERSION 10. [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com)

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**- 3 ed., Porto Alegre: Artmed, 2004.

VIEIRA, P. G.; SOUZA, M. J. H.; TEIXEIRA, J. M.; CARVALHO, F. P. Estudo da precipitação mensal durante a estação chuvosa em Diamantina, Minas Gerais. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, São Paulo, v.14, n.7, p.762–767, 2010.

WHITE, P. R. Further evidence on the significance of glycine, pyridoxine and nicotinic acid in the nutrition of excised tomato roots. **American Journal of Botany**. V. 30, p.33-36, 1943.