

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

**ALLANNE PILLAR DIAS GONZAGA**

**GERMINAÇÃO E MICROPROPAGAÇÃO DE *Lychnophora pohlii* Sch. Bip.  
(ASTERACEAE)**

**DIAMANTINA – MG**

**2013**

[Digite texto]

**ALLANNE PILLAR DIAS GONZAGA**

**GERMINAÇÃO E MICROPROPAGAÇÃO DE *Lychnophora pohlii* Sch.  
Bip. (ASTERACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal, nível de mestrado, como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre.

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

**Co-orientador: Prof. Dr. Israel Marinho Pereira- UFVJM**

**Co-orientador: Prof. Dr. Evandro Luiz Mendonça Machado – UFVJM**

**DIMANTINA**

[Digite texto]

2013

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

G642g	<p>Gonzaga, Allanne Pillar Dias Germinação e micropropagação de <i>lychnophora pohlii sch. Bip.</i> (Asteraceae) / Allanne Pillar Dias Gonzaga. – Diamantina: UFVJM, 2013. 42 f. : il.</p> <p>Orientador: Miranda Titon Coorientadores: Israel Marinho Pereira, Evandro Luiz Mendonça Machado</p> <p>Dissertação (Mestrado – Curso de Pós-Graduação em Ciência Florestal) - Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.</p> <p>1. Campo rupestre. 2. Cultura de tecidos. 3. Arnica. I. Título II. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.</p> <p style="text-align: right;"><b>CDD 631.53</b></p>
-------	---

Elaborado com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

**GERMINAÇÃO E MICROPROPAGAÇÃO DE *Lychnophora pohlii* Sch.  
Bip. (ASTERACEAE)**

**Allanne Pillar Dias Gonzaga**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal, nível de mestrado, como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre.

APROVADA EM:

---

**Dr<sup>a</sup>. Andrea Dias Koehler – UFV**

---

**Prof. Dr. Israel Marinho Pereira – UFVJM**

---

**Prof. Dr. Marcio Leles Romarco de Oliveira – UFVJM**

---

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

**DIAMANTINA 2013**

[Digite texto]

“Renda-se como eu me rendi. Mergulhe no que você não conhece, como eu mergulhei. Pergunte, sem querer, a resposta, como estou perguntando. Não se preocupe em entender. Viver ultrapassa todo o entendimento”.

Clarice Lispector

Dedico

Aos meus pais pelo imensurável amor;

Meus irmãos pela presença e incentivo;

Meu marido pelo amor e dedicação;

Minha filha, Laura, a luz dos olhos meus.

## AGRADECIMENTOS

Chegar até aqui não foi fácil. Os dois anos que se passam para entregar uma dissertação de mestrado são árduos, porém muito felizes. No meu caso, cheio de descobertas no laboratório, no campo e, sobretudo na vida. O mestrado foi, para mim, uma experiência enriquecedora e de plena superação, onde vi que o erro também faz parte do conhecimento e que pelo erro também podemos alcançá-lo. Aprendi a ver além, mudar, escolher, procurar e a repetir, repetir e repetir, com paciência, até conseguir. E agora eu vejo que consegui. Mas é claro que não foi sozinha, compartilho minha conquista com pessoas incríveis que sempre fizeram parte da minha vida e outras que encontrei no caminho desses dois anos, pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a redação final deste texto.

Em primeiro lugar agradeço a Deus, pela dádiva da vida e por ter me presenteado com pessoas tão especiais, sem as quais eu jamais teria conseguido.

Aos meus pais, Carlos e Diva, meu eterno agradecimento. Pelo amor e cuidado em toda a minha vida, por terem acreditado em mim e nos meus sonhos, sendo sempre meus exemplos de coragem, honestidade e humildade.

Ao meu marido, Hisaias, por ser assim... tão do jeito dele! Por ser tão importante e especial na minha vida. Pela paciência, a dedicação, o carinho e amor que me dedica a cada dia por tanto tempo, e por ter feito da minha história, a nossa história. Além, é claro, da ajuda com a estatística, que sempre foi imprescindível.

À minha princesinha, Laura, por me ensinar o que é um amor sem limites, o que é a felicidade plena. Por me mostrar aquele sorriso lindo, que me ilumina, que me incentiva a querer ser muito mais do que eu fui até hoje.

Aos meus queridos irmãos Júnior e Rodrigo, pelas alegrias da infância, pela confiança e o carinho. À minha irmã e meu cunhado Priscila e Evandro, por toda a colaboração desde a inscrição até o fim do mestrado, pela acolhida tão amável, por tantas vezes abrirem mão do descanso e me levarem para avaliar os experimentos até aos domingos... por tudo!

De um modo muito especial agradeço à professora Miranda, por ser sempre tão compreensiva e solícita, por aceitar o desafio de me orientar, me abrindo os olhos para possibilidades além do que eu esperava.

Aos amigos de uma vida inteira e aos novos, Carol, Luma, Mari, Célio, Maíra, Diêgo, Bel, Luíse, Inaê, Kamilla, Marcelle e tantos outros que não foram mencionados aqui, mas que sabem que tem um lugar muito especial na minha vida.

Aos colegas do Laboratório de Melhoramento Florestal, Bruno, Rafa, Natane e, especialmente, Tamires e Bruna por tanta ajuda na montagem dos experimentos e ao Marcone pelas conversas engraçadas e ajuda com as burocracias. Agradeço a Cristiane Coelho, pela grande ajuda em campo.

Aos amigos do NERAD, pela amizade e discussões que, com certeza, me ajudaram muito para a realização e escrita deste trabalho.

Aos técnicos Auwdréia e Breno e ao Fábio pela grande ajuda durante a montagem e execução dos experimentos.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal pelo excelente trabalho na busca constante pelo ensino de crescimento de nós, alunos.

Aos membros da banca Dr<sup>a</sup> Andréa Koehler, Israel Pereira e Marcio Romarco.

À UFVJM pela oportunidade e suporte e pela bolsa cedida.

A todos o meu mais sincero agradecimento.



## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>11</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>12</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>18</b>
2.1 COLETA E BENEFICIAMENTO DOS AQUÊNIOS .....	18
2.2 EFEITO DO GA <sub>3</sub> E DO H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> SOBRE A GERMINAÇÃO DE <i>L. pohlii</i> EM CÂMARA DE GERMINAÇÃO .....	19
2.3 EXPERIMENTOS <i>in vitro</i> .....	20
2.3.1 Experimentos de desinfestação .....	22
Experimento 1: Influência de diferentes tempos de imersão e concentrações de hipoclorito de sódio na desinfestação de aquênios de <i>L. pohlii</i> .....	22
Experimento 2: Adaptação do experimento 1 utilizando-se sementes recém-coletadas em período seco.....	23
Experimento 3: Influência de diferentes tratamentos na desinfestação de aquênios de <i>L. pohlii</i> .....	23
2.3.2 Influência do H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> e do GA <sub>3</sub> na germinação <i>in vitro</i> de <i>L. pohlii</i> .....	24
3.3.3 Influência dos tratamentos de germinação na multiplicação de <i>L. pohlii</i> .....	24
3.3.4 Análise de dados .....	25
<b>3 RESULTADOS .....</b>	<b>25</b>
3.1 EFEITO DO GA <sub>3</sub> E DO H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> SOBRE A GERMINAÇÃO DE <i>L. pohlii</i> EM CÂMARA DE GERMINAÇÃO .....	25
3.2 EXPERIMENTOS <i>in vitro</i> .....	28
Experimento 1: .....	28
Experimento 2: .....	28
Experimento 3: .....	29
3.3 INFLUÊNCIA DO H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> E DO GA <sub>3</sub> NA GERMINAÇÃO <i>in vitro</i> DE <i>L. pohlii</i> .....	30
3.4 INFLUÊNCIA DOS TRATAMENTOS DE GERMINAÇÃO NA MULTIPLICAÇÃO DE <i>L. pohlii</i> .....	31
<b>4 DISCUSSÃO .....</b>	<b>33</b>
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>36</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>38</b>
<b>APÊNDICE A.....</b>	<b>45</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição do meio de cultura MS (Murashige; Skoog, 1962) utilizado para a inoculação de propágulos de <i>Lychnophora pohlii</i> .....	21
--	----

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Percentual de germinação de aquênios de *Lychnophora pohlii* em câmara de germinação, submetidos a tratamentos com ácido giberélico, aos 70 dias. As barras indicam o desvio-padrão.....26
- Figura 2: Curva do percentual de germinação de aquênios de *Lychnophora pohlii* em câmara de germinação, submetidos a tratamentos com ácido giberélico, ao longo do tempo.....26
- Figura 3: Percentual de germinação de aquênios de *Lychnophora pohlii* em câmara de germinação, submetidos a tratamentos com ácido sulfúrico, aos 70 dias. As barras indicam o desvio-padrão.....27
- Figura 4: Curva do percentual de germinação de aquênios de *Lychnophora pohlii* em câmara de germinação, submetidos a tratamentos com ácido sulfúrico, ao longo do tempo.....28
- Figura 5: Percentual de contaminação de aquênios de *Lychnophora pohlii* inoculados *in vitro* em função dos tratamentos de desinfestação com hipoclorito de sódio, aos 60 dias. As barras indicam o desvio-padrão.....29
- Figura 6: Percentual de contaminação de aquênios de *Lychnophora pohlii* inoculados *in vitro*, submetidos a tratamentos de desinfestação, aos 60 dias. As barras indicam o desvio-padrão.....30
- Figura 7: Percentual de germinação de aquênios de *Lychnophora pohlii* inoculados *in vitro*, submetidos a tratamentos com ácido sulfúrico (5 e 10 min.) e ácido giberélico (GA<sub>3</sub>), aos 70 dias. As barras indicam o desvio-padrão.....30
- Figura 8: Curva do percentual de germinação de aquênios de *Lychnophora pohlii* inoculados *in vitro*, submetidos a tratamentos com ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e ácido giberélico (GA<sub>3</sub>), ao longo do tempo.....31
- Figura 9: Médias de número de brotações de explantes de *Lychnophora pohlii* inoculados *in vitro*, submetidos a tratamentos com ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e ácido giberélico (GA<sub>3</sub>), em dois subcultivos. As barras indicam o desvio-padrão.....32

## RESUMO

GONZAGA, Allanne Pillar Dias. Germinação e multiplicação de *Lychnophora pohlii* Sch. Bip. (ASTERACEAE). 48f. (Dissertação - Mestrado em Ciência Florestal). Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2013.

O trabalho teve por objetivo estabelecer uma metodologia de germinação e propagação de *Lychnophora pohlii* em condições de câmara de germinação e laboratório de cultura de tecidos. Para a germinação em câmara de germinação (BOD), estabeleceu-se dois experimentos, sendo um com imersões em solução de GA<sub>3</sub> a 0,5 mg L<sup>-1</sup> e outro em solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 98%, ambos com quatro tratamentos de tempos de imersão e o grupo controle. Na propagação *in vitro*, iniciou-se com os experimentos de desinfestação. No primeiro experimento de desinfestação, os aquênios, coletados em período chuvoso, foram submetidos a cinco tratamentos de tempos de imersão em hipoclorito de sódio a 5%. No segundo, os aquênios, coletados em período seco, foram submetidos a cinco tratamentos de tempos de imersão em hipoclorito de sódio a 5% e cinco tratamentos a 2,5%. No terceiro experimento, em um primeiro lote de sementes, testou-se dois tempos em solução de hipoclorito de sódio a 5% em duas diferentes condições de imersão; no segundo lote, testou-se dois tempos de imersão em solução de hipoclorito de sódio a 5% em aquênios previamente tratados com solução fungicida; no terceiro e último lote, testou-se quatro tempos de imersão em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, totalizando dez tratamentos. Para a germinação *in vitro*, os aquênios, divididos em dois lotes, foram tratados com dois tempos de imersão em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 98% e inoculados em meio de cultura acrescido de três concentrações de GA<sub>3</sub> e o controle, totalizando oito tratamentos. Na fase de multiplicação, foram realizados dois subcultivos utilizando as plântulas obtidas a partir do experimento de germinação *in vitro*, mantendo-se o histórico de tratamentos do referido experimento. Na germinação em BOD, foi possível notar que maiores taxas de germinação foram alcançadas com o uso de GA<sub>3</sub> em imersões mais longas. Também pode-se observar que o uso de GA<sub>3</sub> mostrou-se mais eficiente que H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e que, este, independente do tempo de imersão, influencia positivamente na germinação da espécie. Os testes de desinfestação revelaram que os aquênios coletados em período seco apresentaram melhores taxas de desinfestação. O uso de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> na descontaminação dos aquênios foi mais eficiente que o uso de hipoclorito de sódio, mesmo em concentração e tempo de imersão mais elevado e combinado com solução fungicida. Na germinação *in vitro*, verificou-se que a imersão H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> por dez minutos apresentou resultados positivos à germinação, não sendo necessário o uso de GA<sub>3</sub>. Além disso, a multiplicação dos explantes foi positivamente influenciada pelos resíduos de tratamentos pré-germinativos, alcançando melhores resultados com o tratamento de imersão em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> por dez minutos, sem a adição de GA<sub>3</sub> ao meio. De modo geral, o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> proporcionou resultados favoráveis em todos os experimentos, sendo considerado um importante fator para o sucesso na propagação de *L. pohlii*.

Palavras-Chave: Campo rupestre, cultura de tecidos, arnica.

## ABSTRACT

The study aimed to establish a methodology for germination and propagation of *Lychnophora pohlii* conditions in a growth chamber and a tissue culture laboratory. To germinate in a germination chamber ( BOD ) , settled two experiments , one with immersion in a solution of GA<sub>3</sub> at 0.5 mg L<sup>-1</sup> and another at H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution at 98 % , both with four treatments of times immersion and the control group . In vitro propagation began with the experiments of disinfection. In the first experiment disinfection, the seeds collected in the rainy season, underwent five treatments of immersion time in sodium hypochlorite 5 % . Then, the seeds collected in dry season, underwent five treatments of immersion time in sodium hypochlorite 5 % and 2.5% five treatments. In the third experiment, in a first lot of seeds were tested twice in a solution of sodium hypochlorite at 5% in two different immersion conditions, the second batch was tested two days of immersion in sodium hypochlorite achenes 5 % in previously treated with fungicide solution, on the third and last batch was tested four times of immersion in H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, totaling ten treatments. For in vitro germination, the seeds were divided into two batches, were treated with two immersions time in H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and 98% inoculated in plus three concentrations of GA<sub>3</sub> and control culture, a total of eight treatments. In the multiplication phase, two subcultures were performed using seedlings obtained from the germination experiment in vitro, in order to maintain historical treatments of this experiment. In BOD germination, it was possible to notice that higher germination rates were achieved with the use of GA<sub>3</sub> on longer immersions. It can also be seen that the use of GA<sub>3</sub> was more efficient than H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and this regardless of immersion time positively influences on the germination of species. Disinfection tests revealed that the seeds collected in dry season had higher rates of disinfection. The use of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in decontaminating achenes was more efficient than the use of sodium hypochlorite, even at higher concentration and immersion time and combined with fungicide solution. In vitro germination, it was found that immersion H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> for ten minutes showed positive results of germination, the use of GA<sub>3</sub> is not necessary. In addition, the multiplication of the explants was positively influenced by the waste of the pre -germination treatment, achieving better results with the immersion in H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> for ten minutes without the addition of GA<sub>3</sub> to the medium. In general, the H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> produced favorable results in all experiments and it is considered an important success factor in the spread of *L. pohlii*.

Keywords: Field rock, tissue culture, arnica.

## 1. Introdução

A Serra do Espinhaço possui cerca de 1200 km de extensão, partindo da porção sul do estado de Minas Gerais, alcançando o final de sua porção setentrional no norte da Bahia (ALMEIDA-ABREU; RENGER, 2002). Há grande diversidade de formações vegetacionais, dentre estas, o campo rupestre (NEMÉSIO; FARIA-JÚNIOR, 2004).

Os campos rupestres normalmente encontram-se associados a áreas montanhosas, acima de 900 metros, bem como a afloramentos de arenito e quartzito, apresentando elevado endemismo e grande variação na composição florística de diferentes áreas (QUEIROZ *et al.*, 1996; RIBEIRO; WALTER, 2008). Apresentam fisionomia predominantemente herbáceo-arbustivo, ocorrendo normalmente em solos ácidos e pobres, onde é comum a presença de elevado número de indivíduos de uma mesma espécie, sendo a família Asteraceae uma das mais frequentes, destacando-se o gênero *Lychnophora*, dentre outros (RIBEIRO; WALTER, 2008).

A família Asteraceae compreende cerca de 1.100 gêneros e 25.000 espécies, sendo sua ocorrência mais comum em regiões tropicais montanhosas na América do Sul (VERDI *et al.*, 2005), com um considerável número de espécies encontrado no Brasil (NAKAJIMA; SEMIR, 2001). Segundo Costa (2007), tem sido cada vez mais frequente o interesse em estudos envolvendo espécies da família Asteraceae, haja vista seu considerável valor econômico, devido principalmente, às propriedades medicinais comuns a várias espécies da família.

A presença de papus, cálice composto por sépalas não laminares e muito modificadas (OLIVEIRA, 2007), comum em frutos de numerosas espécies de Asteraceae, garante uma eficiente dispersão dos propágulos a áreas distantes (FERREIRA, *et al.*, 2001). Em ambientes abertos, como no caso dos campos rupestres, onde o vento flui livremente, compõe uma condição propícia à dispersão de tais tipos de propágulos, denominados aquênios ou cipsela (OLIVEIRA, 2007), que podem permanecer junto à superfície do solo por tempo variável (APÊNDICE 1 I).

Alguns fatores são de extrema importância por influenciarem diretamente no comportamento germinativo de espécies da família Asteraceae, dentre estes, o polimorfismo ou dimorfismo, comuns nesta família (Mc EVOY, 1984) que geram um elevado número de aquênios mal formados e menos vigorosos. Outro impedimento na eficiência da germinação das espécies de Asteraceae pode estar associado à assincronia na maturação dos aquênios (LOPES, 2008), sendo possível observar capítulos em diferentes estádios de desenvolvimento em um mesmo indivíduo, o que representa um obstáculo à obtenção de sementes com idade

fisiológica uniforme e elevado vigor, uma vez que inflorescências com idades e tamanhos diferentes, normalmente, são colhidas conjuntamente.

O gênero *Lychnophora* Mart. (Asteraceae, tribo Vernonieae, subtribo Lychnophorinae) é abundante nos campos rupestres, representado por 68 espécies conhecidas popularmente como arnica, todas com microendemismo bastante pronunciado, encontradas nos estados da Bahia, Goiás e Minas Gerais (SEMIR, 1991). De acordo com Dal Col (2011), o bioma cerrado apresenta uma rica, porém ainda pouco estudada flora medicinal, na qual destaca-se o gênero *Lychnophora*.

Ainda segundo a autora, a descoberta de importantes princípios ativos neste bioma tem gerado um gradativo aumento no extrativismo das plantas com propriedades terapêuticas, acelerando assim, o processo de extinção de tais espécies. Espécies do gênero *Lychnophora* apresentam potencial medicinal (SILVA, 1994) devido, principalmente, às suas propriedades anti-inflamatórias, analgésicas e cicatrizantes (CERQUEIRA *et al.*, 1987; ALMEIDA, 2006), o que agrega valor econômico a estas espécies.

Em espécies de *Lychnophora*, a polinização é normalmente anemocórica ou através de abelhas de pequeno a médio porte (LOPES, 2008) (APÊNDICE 1 D). Estas, por sua vez, tendem a explorar grande parte do recurso disponível numa mesma inflorescência antes de se mover para outra. Segundo John (1980), esse comportamento observado nas abelhas pode vir a aumentar as chances de autopolinização ou polinização entre indivíduos próximos e aparentados, possibilitando rearranjos que diminuem a fecundidade no estado heterozigoto em populações pequenas, como foi observado em *Lychnophora hatschbachii*, uma espécie microendêmica.

Tal situação pode ser ainda mais preocupante, haja vista a conhecida dificuldade de germinação de grande parte das espécies pertencentes à família Asteraceae (LOPES, 2008), aliada à falta de conhecimento a respeito da biologia reprodutiva, especialmente do gênero *Lychnophora* (ALMEIDA, 2006). O conhecimento a cerca do comportamento germinativo de sementes de espécies nativas é fundamental na tentativa de protegê-las da ameaça de extinção, além de ser uma ferramenta chave na reabilitação de ambientes degradados. A compreensão de tais processos germinativos torna-se essencial no caso de espécies com potencial medicinal, uma vez que proporciona adequada emergência e uniformidade de plântulas, levando a melhorias na produção de mudas para plantios comerciais. Segundo Maia-Almeida *et al.*(2011), para tais espécies essas informações são ainda escassas, dificultando a propagação por sementes.



*Lychmophora pohlii*, comum a várias localidades do planalto de Diamantina, principalmente em ambientes muito xéricos, é uma das espécies do gênero que apresenta ampla plasticidade morfológica em relação ao hábito, ocorrendo desde a forma de arbustos a arvoretas candelabroiformes pinóides, ou de constituição mais difusa até subarbustos bromelióides, podendo assemelhar-se a diversas espécies da mesma seção. Apresenta inflorescências em glomérulos simples glabulosos, capítulos cilíndricos com três a quatro flores, cuja cor varia de lilases a magenta (SEMIR, 1991). Gianotti *et al.* (2013), sugerem a existência de microambientes favoráveis ao estabelecimento de *L. pohlii*, com maiores valores de pH, maiores teores de areia grossa e saturação de bases.

Trabalhando com a influência da constituição química de *L. pohlii* sobre o protozoário *Trypanosoma cruzi*, Graef *et al.* (2005) identificaram a presença de sete substâncias ativas contra formas tripomastigotas de *T. cruzi* na espécie. Bem como a existência de propriedades anti-inflamatórias em extratos de *L. pohlii*, pode ser uma ferramenta importante no tratamento de muitas doenças inflamatórias crônicas (KANASHIRO *et al.*, 2006).

No entanto, apesar de sua evidente importância medicinal e ecológica, haja vista ser uma espécie endêmica de ambientes rupestres (SEMIR, 1991), umas das mais diversas, porém ameaçadas, fitofisionomias (AMARAL *et al.*, 2006; BAPTISTA, 2011), estudos que abordem seu comportamento em habitat natural, bem como sua reprodução são ainda inexistentes. Tais estudos permitiriam uma melhor compreensão a cerca da espécie e seu comportamento reprodutivo, auxiliando na conservação da espécie em seu ambiente de ocorrência, bem como na produção comercial de mudas para fins medicinais.

A associação de fatores como o endemismo, somado ao extrativismo gerado pelo interesse medicinal, pode vir a comprometer a manutenção da variabilidade genética da espécie, uma vez que a redução da população propicia o aumento da endogamia, causando efeitos deletérios à sobrevivência e vigor desta. Além da possibilidade de produção natural de sementes sem fecundação, ou apomixia (RICHARDS, 1997), comum em Asteraceae (WERPACHOWSKI, *et al.*, 2004), que também poderia comprometer a variabilidade genética em uma população natural. Por outro lado, tratando-se de uma espécie medicinal, a apomixia, uma das áreas de destaque da biotecnologia, com o controle da clonagem por semente, poderia ser positiva do ponto de vista comercial, estabelecendo plantios clonais via seminal, reduzindo, assim, custos de produção.

Apesar das diversas estratégias de propagação desenvolvidas pelas plantas ao longo da evolução, a semente ainda é o principal meio de perpetuação das espécies lenhosas, sendo esta

o resultado de uma série de eventos biológicos que tem início com a floração, culminando na germinação (KUNIYOSHI, 1983). Davide e Silva (2008) definem a germinação de sementes como sendo a soma dos processos que se iniciam com a embebição de água pela semente, terminando com a protrusão da radícula pelo endosperma ou tegumento.

A germinação é um dos pontos críticos da ontogênese das plantas (SANTOS *et al.*, 2004), na qual ocorre a retomada do desenvolvimento do embrião, quando em condição favorável, que é influenciada por vários fatores como disponibilidade de água, luz, temperatura e nutrientes (HAMMERTON, 1989; HARTMANN *et al.*, 2002; CARDOSO, 2009, DIAS *et al.*, 2009). Segundo Zaidan e Barbedo (2004), a germinação imediata e uniforme de todas as sementes produzidas em um indivíduo em um dado momento, poderia levar à morte subsequente de todas as plântulas logo após sua emergência, uma vez que as condições do ambiente poderiam não ser ideais para o desenvolvimento da plântula ou poderia haver uma intensa competição por recursos.

Neste sentido, destaca-se a importância dos mecanismos de quiescência e dormência. Uma semente quiescente não germina a menos que encontre um conjunto de fatores ambientais não limitantes às suas necessidades, por outro lado, sementes dormentes, ainda que em condições favoráveis, podem não germinar (CARDOSO, 2009). A dormência é um dos principais mecanismos de preservação de espécies em bancos de sementes, distribuindo a germinação ao longo do tempo, e assim, pode garantir a sobrevivência de espécies como semente, quando em condições adversas, mesmo quando a vegetação é completamente eliminada (CARMONA, 1992; ZAIDAN, 2004).

No entanto, a dormência pode constituir um fator limitante à propagação das espécies, uma vez que apenas pequena porcentagem das sementes germina em condições naturais (LOPES *et al.*, 1998). Esse aspecto da dormência pode trazer desvantagens, em especial, para a exploração vegetal, como no caso de produção de mudas de espécies medicinais visando à indústria farmacêutica. O atraso na germinação pode provocar danos à produção, uma vez que as plantas podem não estar suficientemente desenvolvidas na época em que receberão estímulos do ambiente para florescer, frutificar ou acumular reservas em órgãos vegetativos, por exemplo.

A dormência de sementes pode ser causada por um ou mais bloqueios à germinação, que podem variar em intensidade (DAVIDE; SILVA, 2008), portanto, o sucesso no uso de um ou outro tratamento, depende diretamente do tipo e grau de dormência, que varia de acordo com cada espécie (MARTINS *et al.*, 1992; FACHINELLO *et al.*, 2005).

Muitas são as técnicas aprimoradas para a superação de dormência. Zaidan e Babedo (2004) ressaltam o uso de agentes químicos e reguladores de crescimento com este fim. Nos agentes químicos destacam-se os ácidos fortes, como o ácido sulfúrico, que, quando em contato com a semente, enfraquece o tegumento, podendo levar à ruptura da testa, permitindo, assim, uma melhor absorção da água (FACHINELLO *et al.*, 2005; ALVES *et al.*, 2007, BRASIL, 2009).

Os reguladores de crescimento também apresentam alta eficiência na quebra de dormência, em especial as giberelinas, sendo o GA<sub>3</sub> mais utilizado. Segundo Xavier *et al.* (2009), altas concentrações de giberelinas estão disponíveis nas sementes imaturas e nos frutos em desenvolvimento, desempenhando importante função na germinação e no controle da dormência. Passos *et al.* (2004) também destacam a importância das giberelinas, principalmente o GA<sub>3</sub>, na germinação de sementes em várias espécies de plantas.

Os sinais do ambiente são traduzidos em sinais internos na semente, induzindo a síntese e ativação das giberelinas, que por sua vez, estimulam a síntese de enzimas hidrolíticas, responsáveis pela degradação das paredes de células do endosperma, dentre outros efeitos no metabolismo (CASTRO *et al.*, 2004), dando início à retomada do desenvolvimento do embrião, que resultará na germinação da semente.

Assim, muitos são os fatores que favorecem ou dificultam a germinação, todos de grande relevância para a manipulação correta e adequada da produção de mudas e dos recursos providos pelas plantas, tanto para fins de conservação ou comercial, sendo necessários estudos que abordem o comportamento germinativo das espécies, em busca de maiores esclarecimentos.

O objetivo deste trabalho foi estabelecer uma metodologia de germinação e micropropagação de *L. pohlii* em condições de câmara de germinação e laboratório de cultura de tecidos, a partir de aquênios coletados em uma população ocorrente na Serra do Espinhaço, no município de Diamantina-MG.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1 Coleta e beneficiamento dos aquênios**

A coleta das sementes foi realizada em uma área de grande ocorrência da espécie (APÊNDICE 1 B e C), situada no Campus JK, da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), às margens da rodovia BR 367 nas coordenadas geográficas 18°12'09.83"S, 43°34'01.80"W e altitude média de 1.375 metros, no município de

Diamantina, Minas Gerais, inserido na porção meridional da Cadeia do Espinhaço (ALMEIDA-ABREU, 1995). Esta área localiza-se nas proximidades do antigo lixão, atualmente em avançado estágio de recuperação. De acordo com a classificação de Köppen, o clima da região é do tipo Cwb, temperado úmido, com invernos secos e verões chuvosos. A precipitação anual, de acordo com Vieira *et al.* (2010), é de 1.468 mm e a temperatura do mês mais quente é inferior a 22 °C (Souza, 2006). O campo rupestre é o tipo vegetacional predominante no local, com estrato herbáceo-arbustivo (APÊNDICE 1 A).

Foram coletados aleatoriamente capítulos, em estágio de dispersão dos aquênios (APÊNDICE 1 G e H), de várias posições da planta em diferentes épocas. Em cada coleta, os capítulos obtidos de indivíduos adultos, com altura superior a um metro, foram acondicionados em sacos plásticos e conduzidos ao Centro Integrado de Propagação de Espécies Florestais (CIPEF) da UFVJM. Durante o beneficiamento, os capítulos foram debulhados manualmente e, em seguida, submetidos à limpeza por fluxo de ar, para completa remoção das impurezas. Os aquênios foram armazenados em sacos plásticos transparentes e mantidos em condições de temperatura e luminosidade ambiente.

Para todos os experimentos, com exceção do experimento 1 (item 3.3.1), os aquênios utilizados foram selecionados pelo método densimétrico em água destilada (HAMMERTON *et al.*, 1989). Este processo consiste em imergir os aquênios em um béquer contendo três litros de água destilada, em agitação constante durante três minutos, com descanso de dez minutos, separando-se os aquênios sobrenadantes daqueles que se depositarem no fundo do béquer, os quais foram utilizados para os experimentos de germinação.

## **2.2 Efeito do GA<sub>3</sub> e do H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sobre a germinação de *L. pohlii* em câmara de germinação**

Dois experimentos (uso do ácido giberélico – GA<sub>3</sub> e uso do ácido sulfúrico – H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) foram conduzidos, simultaneamente, em câmara de germinação, modelo NI 1718, fabricada pela marca NOVA INSTRUMENTS, regulada a 31°C, com fotoperíodo de 12 horas, no CIPEF. Para a instalação dos experimentos a areia utilizada foi previamente peneirada, lavada e esterilizada em estufa a 200°C durante duas horas e os aquênios foram selecionados por meio de teste densimétrico. Os aquênios utilizados foram distribuídos em caixas do tipo gerbox, previamente lavadas e esterilizadas com hipoclorito de sódio e álcool 70%, com dimensões de 11,0 x 11,0 x 3,0 cm, contendo como substrato a areia estéril (APÊNDICE 1 L).

Para os dois experimentos, os aquênios foram submetidos a quatro tratamentos de tempos de imersão e o grupo controle. No experimento de influência do GA<sub>3</sub> foram avaliados

os tempos de 0; 6; 12; 24 e 36 horas de imersão a uma concentração de 0,5 mg L<sup>-1</sup>. No experimento com o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> os aquênios foram submetidos a tratamentos de 0; 5; 10; 15 e 20 minutos de imersão na concentração de 98%. Após retirados das imersões, os aquênios referentes a cada tratamento foram enxaguados por seis vezes em água destilada autoclavada. Ambos os experimentos foram conduzidos em delineamento em blocos casualizados (DBC), na tentativa de eliminar possíveis interferências do modo de distribuição das lâmpadas na BOD, sendo cinco tratamentos e quatro repetições ou blocos de 25 sementes, totalizando 500 sementes por experimento. A porcentagem de germinação foi avaliada diariamente durante um período de 70 dias, sendo a protrusão da radícula utilizada como critério de inclusão (APÊNDICE 1 J e K).

### **2.3 Experimentos *in vitro***

Todos os experimentos realizados *in vitro* foram conduzidos no Laboratório de Melhoramento Florestal, localizado no Departamento de Engenharia Florestal (DEF) da UFVJM. Para todos os experimentos foi utilizado o meio de cultura MS (Murashige; Skoog, 1962) em sua concentração total de sais e vitaminas (TABELA 1).

Tabela 1: Composição do meio de cultura MS (Murashige; Skoog, 1962) utilizado para a inoculação de propágulos de *Lychnophora pohlii*

<b>Composto</b>	<b>Fórmula Química</b>	<b>Concentração (mg L<sup>-1</sup>)</b>
<b>Macronutrientes</b>		
Nitrato de Amônio	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1.650,0
Nitrato de Potássio	KNO <sub>3</sub>	1.900,0
Cloreto de Cálcio	CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	440,0
Fosfato de Potássio	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170,0
Sulfato de Magnésio	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370,0
<b>Micronutrientes</b>		
Ácido Bórico	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2
Molibdato de Sódio	NaMoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	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
Sulfato de Zinco	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,6
Sulfato de Cobre	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025
Iodeto de Potássio	KI	0,83
<b>FeEDTA</b>		
Sódio EDTA	Na <sub>2</sub> E.D.T.A.	37,2
Sulfato de Ferro	Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	27,8
<b>Vitaminas</b>		
Ácido Nicotínico	-	0,5
PiridoxinaHCL	-	0,1
TiaminaHCL	-	0,1
Glicina	-	2,0

Em todos os experimentos o meio MS foi enriquecido com 0,1 g L<sup>-1</sup> de mio-inositol; 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose; 0,8 g L<sup>-1</sup> de polivinilpirrolidona; e 5 g L<sup>-1</sup> de ágar Merck®. Antes da adição do ágar, o meio teve seu pH ajustado para 5,7 ± 0,1. Foram vertidos 10 mL de meio em cada tubo de ensaio, com capacidade para 57 mL sendo, em seguida, vedados com tampas plásticas e autoclavados por 15 minutos à temperatura de 121°C e pressão de um atm. Após a inoculação dos propágulos, os tubos de ensaio foram mantidos em sala de cultura sob

fotoperíodo de 16 horas com intensidade luminosa de  $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  (APÊNDICE 1T).

### **2.3.1 Experimentos de desinfestação**

Foram instalados três experimentos de desinfestação, sendo realizados em sequência. Inicialmente em cada experimento de desinfestação, antes da aplicação dos tratamentos, os aquênios selecionados foram submetidos a um procedimento padrão inicial de desinfestação, sendo lavados em água corrente, em câmara de fluxo laminar, enxaguados por três vezes em água destilada autoclavada e imersos em solução de álcool 70% durante 30 segundos. Sempre após a aplicação dos tratamentos de desinfestação, os aquênios foram enxaguados por seis vezes em água destilada autoclavada e colocados sobre papel filtro autoclavado para a retirada do excesso de água. Imediatamente após, foram inoculados em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura MS e conduzidos à sala de cultura.

#### **Experimento 1: Influência de diferentes tempos de imersão em hipoclorito de sódio na desinfestação de aquênios de *L. pohlii***

Os aquênios utilizados neste experimento foram obtidos a partir de capítulos, coletados aleatoriamente, em estágio de dispersão dos aquênios, de várias posições da planta, em período chuvoso e conduzidos ao CIPEF, em sacos plásticos. Para secagem dos capítulos, estes foram mantidos em estufa a  $50^\circ\text{C}$  durante uma hora, tendo sido verificados, quanto à secagem, a cada 30 minutos. Em seguida, procedeu-se normalmente com o beneficiamento supracitado, composto por debulha manual e limpeza por fluxo de ar. Os aquênios foram armazenados em sacos plásticos transparentes e mantidos em condições de temperatura e luminosidade ambiente.

Os aquênios foram submetidos aos seguintes tratamentos: 5; 10; 15; 20 e 25 minutos de imersão em hipoclorito de sódio a 5%, todos acrescidos de quatro gotas de detergente Tween 20 para cada 100 ml de solução (APÊNDICE 1 N). O experimento foi realizado em Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC), com cinco tratamentos e quatro repetições, contendo seis aquênios por repetição. A avaliação do número de aquênios contaminados foi feita diariamente por um período de quatro dias.

## **Experimento 2: Adaptação do experimento 1 utilizando-se sementes recém-coletadas em período seco**

Devido aos resultados do experimento anterior, foram coletados novos capítulos, em período seco, seguindo os mesmos critérios de coleta, beneficiamento e armazenagem do item 2.1.

Os aquênios foram submetidos aos tratamentos de desinfestação de 5; 10; 15; 20 e 25 minutos de imersão em hipoclorito de sódio a 2,5 ou 5%. Todos os tratamentos foram acrescidos de quatro gotas de detergente Tween 20 para cada 100 ml de solução. O experimento foi realizado em DIC em esquema fatorial 2x5 (duas concentrações de hipoclorito de sódio e cinco tempos de imersão), com quatro repetições, contendo cinco aquênios por repetição, com um aquênio por tubo. A avaliação do número de aquênios contaminados foi feita diariamente por um período de 60 dias.

## **Experimento 3: Influência de diferentes tratamentos na desinfestação de aquênios de *L. pohlii***

Para este experimento foram utilizados aquênios recém-coletados em período seco, que após a seleção por teste densimétrico e procedimento padrão inicial de desinfestação foram submetidos aos tratamentos, que testavam a influência das substâncias hipoclorito de sódio, e ácido sulfúrico sobre a desinfestação dos aquênios.

Com o hipoclorito de sódio a 5%, acrescido de quatro gotas de detergente Tween 20 para cada 100 ml de solução, os aquênios receberam o tratamento padrão inicial de desinfestação, descrito no item 2.3.1. Neste, testou-se dois tempos de imersão, 20 e 25 minutos, sendo que cada um dos tempos originou três tratamentos, compostos pelos aquênios que imergiram, os aquênios que flutuaram e os aquênios previamente tratadas com solução fungicida Orthocide® na concentração  $1\text{g L}^{-1}$  durante 15 minutos, formando assim seis tratamentos. Com o ácido sulfúrico a 98%, os aquênios não receberam o procedimento inicial padrão de desinfestação, e testou-se quatro tempos de imersão, 5; 10; 15 e 20 minutos, formando quatro tratamentos. A ordem e caracterização dos tratamentos foram a seguinte:

- T1 - Aquênios que imergiram na solução de hipoclorito de sódio por 20 minutos;
- T2 - Aquênios que flutuaram na solução de hipoclorito de sódio por 20 minutos;
- T3 - Aquênios que imergiram na solução de hipoclorito de sódio por 25 minutos;
- T4 - Aquênios que flutuaram na solução de hipoclorito de sódio por 25 minutos;



T5 – Imersão em solução fungicida por 15 minutos + imersão em hipoclorito de sódio por 20 minutos;

T6 - Imersão em solução fungicida por 15 minutos + imersão em hipoclorito de sódio por 25 minutos;

T7 - Imersão em ácido sulfúrico 98% por 5 minutos;

T8 - Imersão em ácido sulfúrico 98% por 10 minutos;

T9 - Imersão em ácido sulfúrico 98% por 15 minutos;

T10 - Imersão em ácido sulfúrico 98% por 20 minutos.

O experimento foi realizado em DIC com dez tratamentos, sendo cada tratamento composto de quatro repetições, contendo cinco aquênios por repetição, com um aquênio por tubo. A avaliação do número de aquênios contaminados foi feita diariamente por um período de 60 dias.

### **2.3.2 Influência do H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e do GA<sub>3</sub> na germinação *in vitro* de *L. pohlii***

Após a seleção dos aquênios, em câmara de fluxo laminar, estes foram enxaguados por três vezes em água destilada autoclavada. Feito isto, os aquênios foram divididos em dois lotes, os quais foram tratados com 5 e 10 minutos de imersão em ácido sulfúrico a 98% e, em seguida, enxaguados, separadamente, por seis vezes em água destilada autoclavada e colocados sobre papel filtro autoclavado em placas de petri para secagem superficial.

Posteriormente, estes foram inoculados em tubos de ensaio contendo 10mL de meio de cultura MS acrescido das seguintes concentrações de GA<sub>3</sub> durante seu preparo: 0; 1; 2 e 4 mg L<sup>-1</sup> (APÊNDICE 1 R). O experimento foi conduzido em DIC, em esquema fatorial 2x4 (dois tempos de imersão em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e quatro concentrações de GA<sub>3</sub>), totalizando oito tratamentos, compostos por quatro repetições de cinco aquênios cada, com um aquênio por tubo. A avaliação do número de aquênios germinados foi feita diariamente por um período de 70 dias.

### **2.3.3 Influência dos tratamentos de germinação na multiplicação de *L. pohlii***

Como fonte de explantes, para estes experimentos, utilizou-se plântulas germinadas a partir do experimento de germinação *in vitro* (item 2.3.2). Aos 109 dias após a instalação do experimento de germinação, das plântulas livres de contaminação por microrganismos, foram retiradas brotações com aproximadamente um centímetro de comprimento.

Os explantes selecionados foram inoculados verticalmente em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura MS (APÊNDICE 1 U e V), conforme TABELA 1, e

acrescido de 0,2 mg L<sup>-1</sup> de Benzilaminopurina (BAP) e 0,1 mg L<sup>-1</sup> de Ácido Naftaleno Acético (ANA). Visando avaliar a influência de possíveis resíduos de GA<sub>3</sub> e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sobre a multiplicação dos explantes de *L. pohlii*, foi mantido o histórico dos tratamentos aos quais pertenciam as plântulas provenientes do experimento de germinação. Dessa forma, foram testados os 8 tratamentos descritos no item 2.3.2.

Foram realizados dois subcultivos, sendo o primeiro conduzido em DIC com seis repetições por tratamento, com um explante por repetição, e o segundo, também conduzido em DIC, foi composto por 10 repetições, com um explante por repetição. Aos três meses após cada subcultivo, foi avaliado o número de brotações por explante (APÊNDICE 1 S).

#### **2.3.4 Análise de dados**

Os dados obtidos a partir dos experimentos foram submetidos à análise estatística utilizando-se o software Statistica 10.0 (STATSOFT, 2010). Realizou-se os testes de normalidade de Shapiro-Wilk, e homogeneidade de Cochran, ambos a 5% de significância. Quando não atendidos os pré-requisitos para análise de variância (ANOVA), procedeu-se com a transformação dos dados (log, raiz quadrada, arco-seno). Quando, mesmo após a transformação, os dados não atenderam aos pressupostos da ANOVA, estes foram submetidos à análise não-paramétrica, com os testes de Kruskal-Wallis e Friedman, a 5% de significância, de acordo com o delineamento.

### **3. Resultados**

#### **3.1 Efeito do GA<sub>3</sub> e do H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sobre a germinação de *L. pohlii* em câmara de germinação**

A partir do teste de Friedman, observou-se que não houve diferença estatística significativa quanto à porcentagem de germinação aos 70 dias entre os tempos de imersão em GA<sub>3</sub> testados ( $F_{4,20}=1,290$ ;  $p=0,290$ ). Numericamente, o maior tempo de imersão em GA<sub>3</sub> (36 horas) proporcionou a maior porcentagem de germinação (59%), representando um acréscimo de 37% sobre o percentual de germinação do tratamento controle (43%) (FIGURA 1).

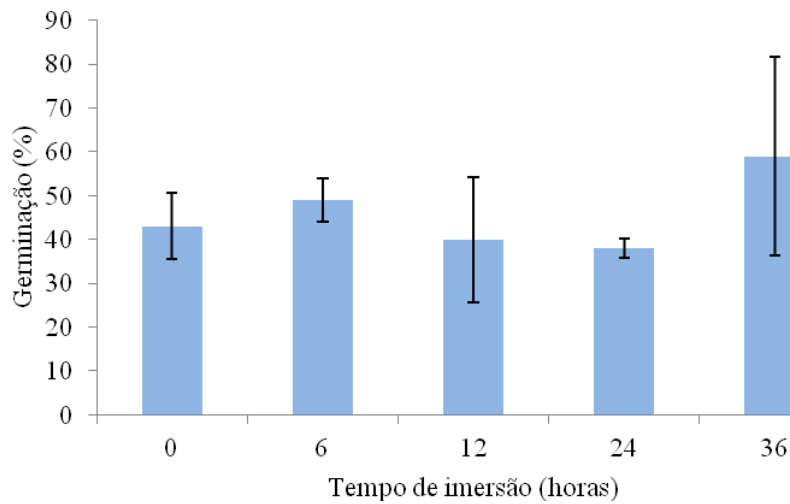


Figura 1: Percentual de germinação de aquênios de *Lychnophora pohlii* em câmara de germinação, submetidos a tratamentos com ácido giberélico, aos 70 dias. As barras indicam o desvio-padrão.

A primeira germinação foi observada ao sexto dia no tratamento 24 horas de imersão; ao oitavo dia no tratamento 6 horas, ao nono dia no tratamento 12 horas, ao décimo primeiro dia no tratamento 36 horas e ao décimo segundo dia pelo tratamento controle, sem imersão. Através da curva de germinação (FIGURA 2), observa-se que todos os tratamentos seguiram uma mesma tendência ao longo do tempo, com germinação sempre crescente.

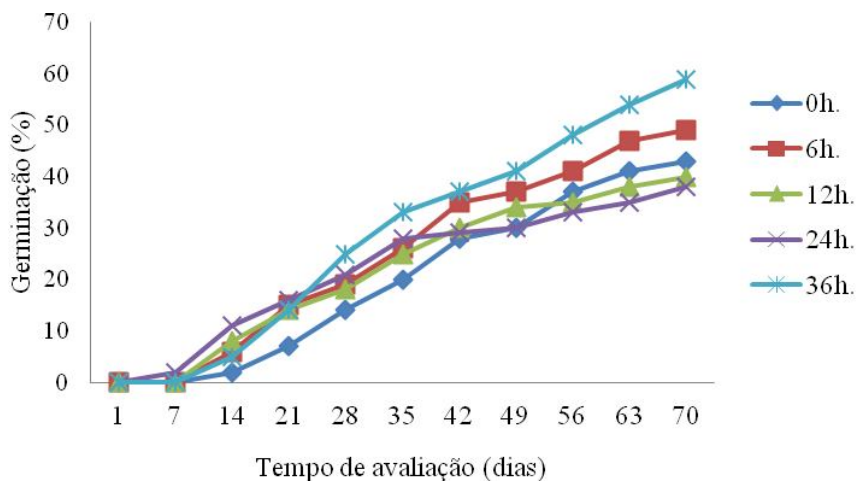


Figura 2: Curva do percentual de germinação de aquênios de *Lychnophora pohlii* em câmara de germinação, submetidos a tratamentos com ácido giberélico, ao longo do tempo.

De acordo com a análise de variância (ANOVA), não houve diferenças significativas entre os tempos de imersão em ácido sulfúrico testados ( $F_{4,20}=0,809$ ;  $p = 0,384$ ;  $N = 20$ ).

Devido a variações intrínsecas à condução do experimento, o tratamento correspondente ao tempo de imersão de 10 minutos em  $H_2SO_4$  foi retirado da realização da análise de dados. Isto ocorreu, uma vez que, nele foram observada taxas de germinação muito baixas (outliers), o que comprometeu a variância e a explicação biológica do conjunto de dados.

Apartir do gráfico de médias (FIGURA 3), a maior porcentagem de germinação foi observada no tratamento 5 minutos (50%), representando um acréscimo de 32% em relação ao tratamento controle.

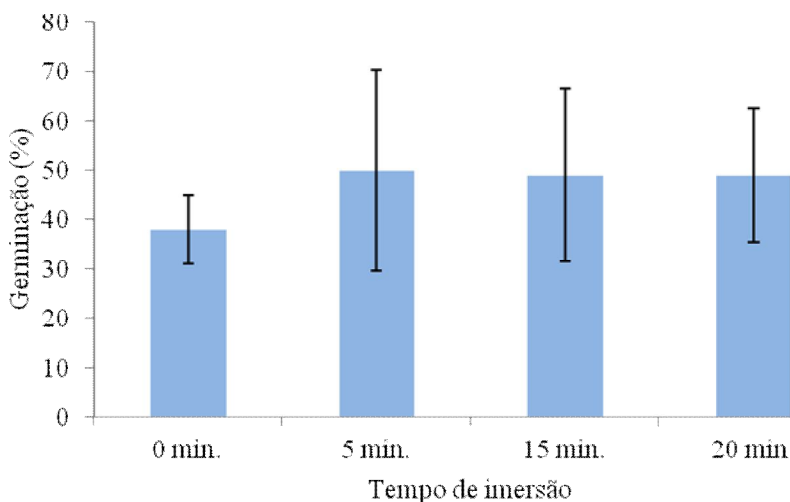


Figura 3: Percentual de germinação de aquênios de *Lychnophora pohlii* em câmara de germinação, submetidos a tratamentos com ácido sulfúrico, aos 70 dias. As barras indicam o desvio-padrão.

A germinação teve início ao sétimo dia, com o tratamento 15 minutos; ao nono dia, iniciou-se a germinação do tratamento 5 minutos; ao décimo dia o tratamento 20 minutos e ao décimo segundo dia o controle (FIGURA 4). Todos os tratamentos permaneceram relativamente estáveis nas primeiras semanas, com dois picos de germinação.

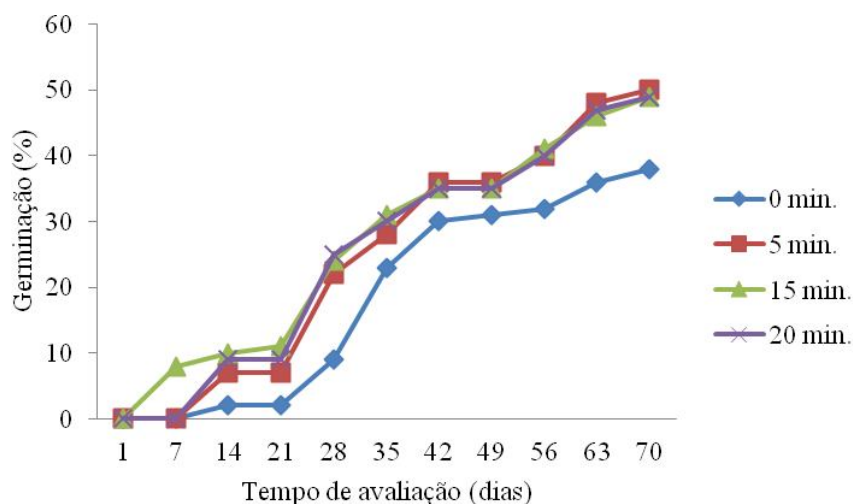


Figura 4: Curva do percentual de germinação de aquênios de *Lychnophora pohlii* em câmara de germinação, submetidos a tratamentos com ácido sulfúrico, ao longo do tempo.

### 3.2 Experimentos *in vitro*

#### Experimento 1:

Ao quarto dia de avaliação, 100% das sementes inoculadas apresentavam contaminação, indicando a interferência da época de coleta sobre a desinfestação das sementes (APÊNDICE 1 O, P e Q).

#### Experimento 2:

A partir do teste de Kruskal-Wallis foi possível identificar diferenças entre os tratamentos testados ( $H_{4,40}=19,012$ ;  $p=0,025$ ), aos 60 dias após a inoculação das sementes. Com 45% dos aquênios contaminados, o tratamento 20 minutos em solução de 5% de hipoclorito de sódio apresentou a menor porcentagem de contaminação diferindo estatisticamente do tratamento 20 minutos em solução de 2,5% de hipoclorito de sódio, que teve contaminação de 100% dos aquênios inoculados. Apesar de não serem encontradas diferenças significativas na maioria dos tratamentos, é possível observar, a partir da FIGURA 5, indícios de redução da contaminação com o aumento da concentração e do tempo de exposição ao hipoclorito de sódio.

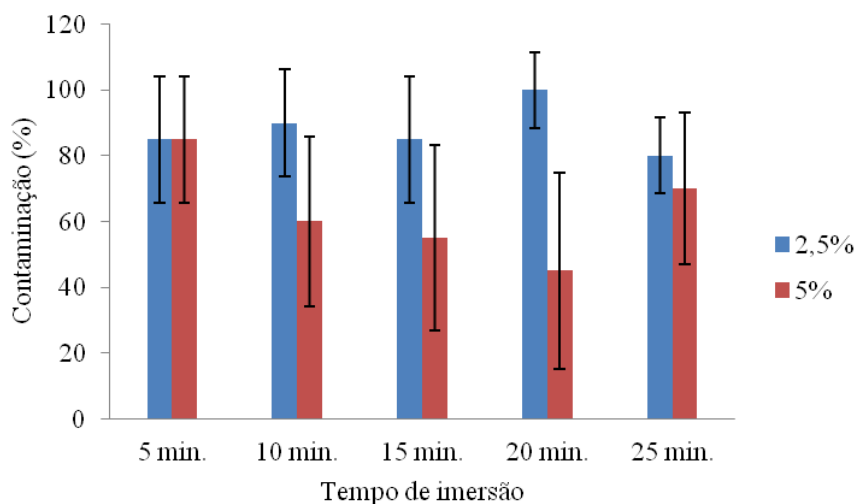


Figura 5: Percentual de contaminação de aquênios de *Lychnophora pohlii* inoculados *in vitro*, em função dos tratamentos de desinfestação com hipoclorito de sódio, aos 60 dias. As barras indicam o desvio-padrão.

### Experimento 3:

A partir do teste de Kruskal-Wallis, observou-se diferenças entre os tratamentos de desinfestação ( $H_{9,38}=26,263$ ;  $p=0,002$ ). Conforme ilustra a FIGURA 6, a maior porcentagem de contaminação foi resultante dos tratamentos T1 e T5, ambos com 95% de aquênios contaminados, sendo então os tratamentos menos eficazes neste experimento, apesar de não diferirem estatisticamente dos tratamentos T3 e T6, com porcentagens de contaminação de 85% e 90%, respectivamente.

Os tratamentos T7, T9 e T10 apresentaram a menor contaminação, apenas 25% de aquênios contaminados, sendo assim, os melhores resultados, mesmo não diferindo do tratamento T8, com 45% de contaminação. Portanto, observa-se uma maior eficiência do ácido sulfúrico sobre o hipoclorito de sódio na desinfestação de aquênios de *L. pohlii*, uma vez que as menores porcentagens de contaminação foram obtidas nos tratamentos com ácido sulfúrico.

O tratamento T4 apresentou um alto valor de desvio padrão ( $\pm 11,471$ ), desproporcional aos demais. Este tratamento se constitui dos aquênios que flutuaram durante 25 minutos de imersão em hipoclorito de sódio, porém o número de aquênios que flutuaram foi inferior ao número necessário para compor o tratamento, deixando duas repetições com um menor número de tubos inoculados, sendo assim, optou-se por retirar os resultados deste tratamento da FIGURA 6.

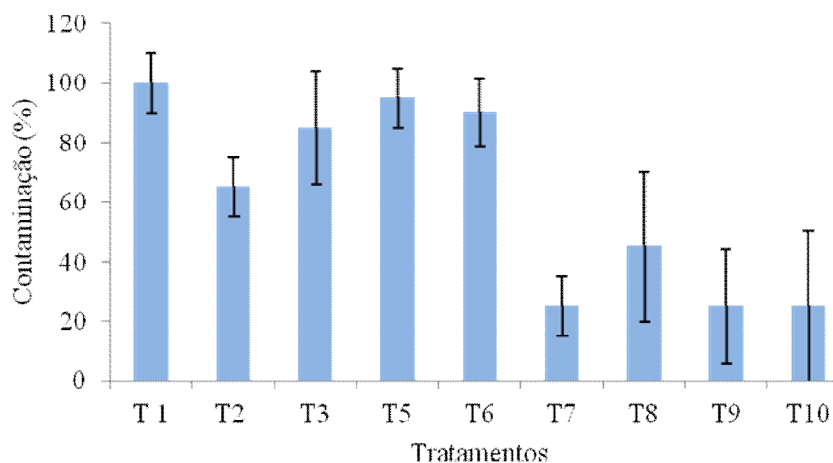


Figura 6: Percentual de contaminação de aquênios de *Lychnophora pohlii* inoculados *in vitro*, submetidos a tratamentos de desinfestação, aos 60 dias. As barras indicam o desvio-padrão.

### 3.3 Influência do H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e do GA<sub>3</sub> na germinação *in vitro* de *L. pohlii*

O teste de Kruskal-Wallis não identificou diferenças estatísticas entre os tratamentos testados ( $H_{7,32}=7,332$ ;  $p = 0,395$ ). No entanto, é possível observar, a partir da FIGURA 7, consideráveis variações numéricas entre as porcentagens de germinação dos tratamentos aos 70 dias.

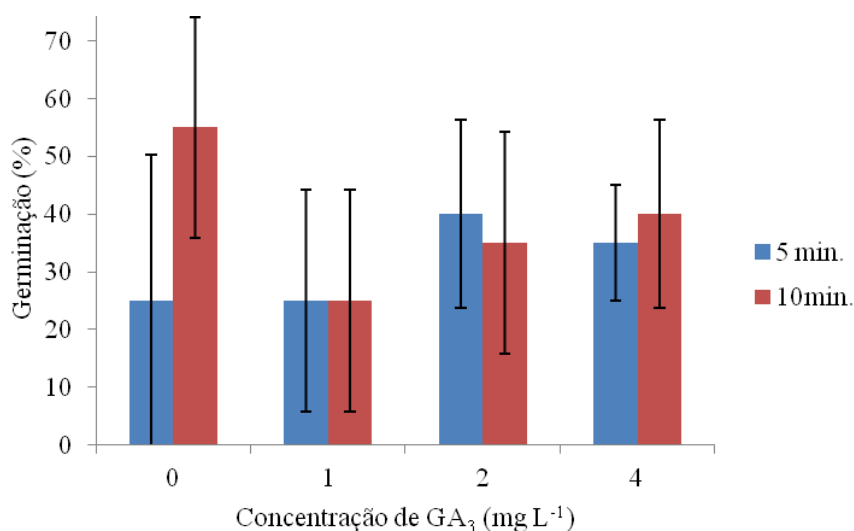


Figura 7: Percentual de germinação de aquênios de *Lychnophora pohlii* inoculados *in vitro*, submetidos a tratamentos com ácido sulfúrico (5 e 10 min.) e ácido giberélico (GA<sub>3</sub>), aos 70 dias. As barras indicam o desvio padrão.

A maior porcentagem de germinação foi encontrada no tratamento de desinfestação em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> por 10 minutos combinado com o meio de cultura sem a adição de GA<sub>3</sub>, com 55% de germinação das sementes, seguido pelos tratamentos de desinfestação em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> por 5 minutos combinado com 2 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> e 10 minutos em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> combinado com 4 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>, ambos com 40% de germinação. Esses resultados demonstram o efeito da escarificação química do H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, onde as sementes que permaneceram por mais tempo na solução química não necessitaram do GA<sub>3</sub> para germinar.

Para todos os tratamentos, a germinação teve início a partir do 21º dia após a inoculação das sementes, como é possível visualizar na FIGURA 8. O tratamento de desinfestação em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> por 10 minutos combinado com meio desprovido de GA<sub>3</sub>, além de maior porcentagem, teve também picos de germinação mais pronunciados que os demais.

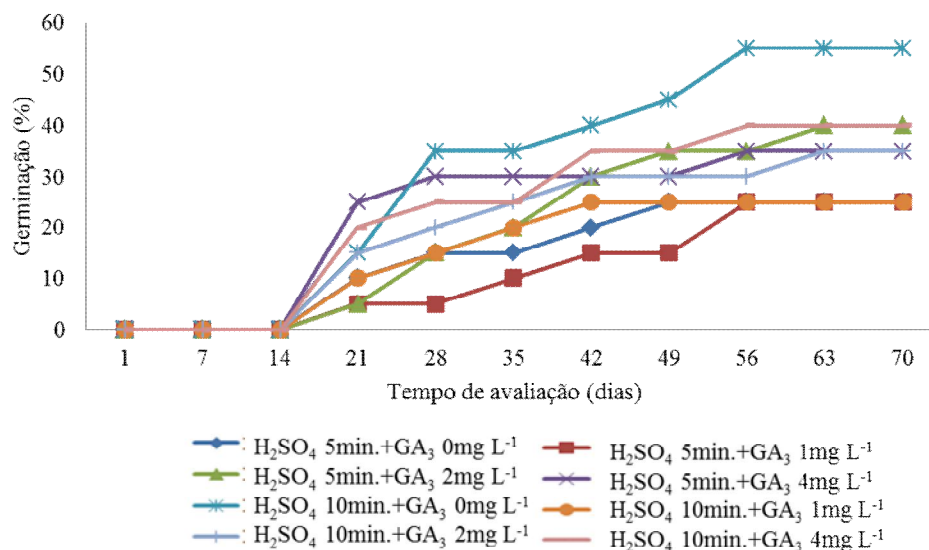


Figura 8: Curva do percentual de germinação de aquênios de *Lychnophora pohlii* inoculados *in vitro*, submetidos a tratamentos com ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e ácido giberélico (GA<sub>3</sub>), ao longo do tempo.

### 3.4 Influência dos tratamentos de germinação na multiplicação de *L. pohlii*

O teste de Kruskal-Wallis identificou diferenças (H=41,90832; p=0,0002) entre os tratamentos tanto para os dois subcultivos realizados (FIGURA 9), como dentro de cada subcultivo. De modo geral, o número de brotações foi superior no primeiro subcultivo para a maioria dos tratamentos, quando comparado ao segundo.

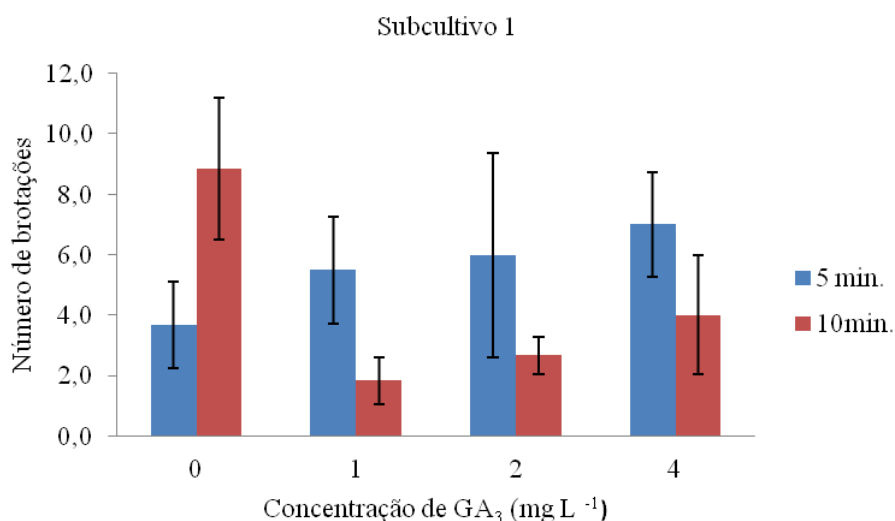
Os tratamentos com 5 minutos de imersão em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> mostraram tendência a aumentar o número de brotações com o aumento das concentrações de GA<sub>3</sub> no primeiro subcultivo. Já



no segundo, o aumento do número de brotações ocorreu até a concentração de 2 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>, e a partir desta houve decréscimo.

Para os tratamentos com imersão de 10 minutos em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a maior média de número de brotações no primeiro subcultivo foi observada no tratamento sem adição de GA<sub>3</sub> ao meio de cultura (8,8 ± 2,3) (APÊNDICE 1 W). No segundo subcultivo ocorreu um aumento no número de brotações até a concentração de 1 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> e posteriormente ocorreu decréscimo.

A



B

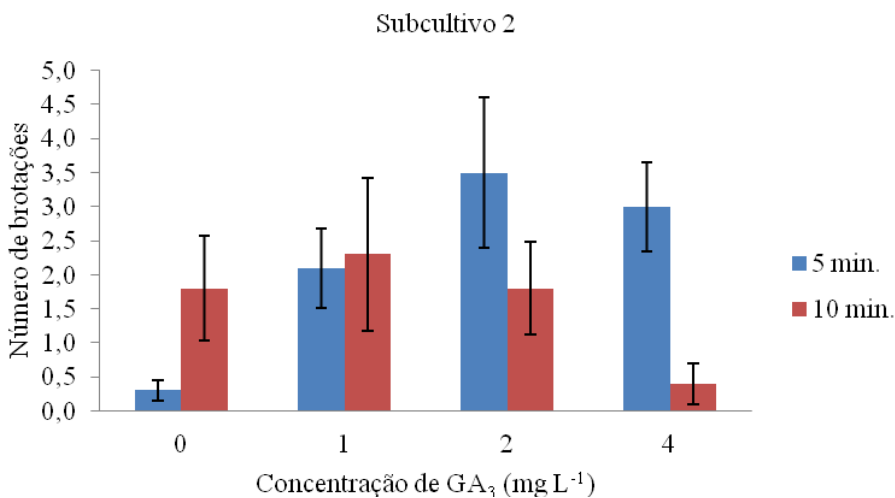


Figura 9: Médias de número de brotações de explantes de *Lychnophora pohlii* inoculados *in vitro*, submetidos a tratamentos com ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e ácido giberélico (GA<sub>3</sub>), em dois subcultivos: Subcultivo1 (A); Subcultivo 2 (B). As barras indicam o desvio-padrão.

#### 4. Discussão

Segundo Kerbauy (2008), as giberelinas enfraquecem os tecidos ao redor da radícula, transpondo a barreira mecânica conferida pelo tegumento da semente e, assim, aumentam o potencial para o crescimento do embrião, incluindo o controle de crescimento do eixo embrionário e dos tecidos caulinares e radiculares, promovido pela divisão e o alongamento celular, o que eleva a plasticidade da parede celular, principalmente em células jovens e meristemáticas. Taiz e Zeiger (2008) destacam a ação das giberelinas nas etapas de ativação do crescimento vegetativo do embrião, não apenas pelo enfraquecimento da camada do endosperma que o envolve, como também na mobilização de reservas energéticas. Tais fatores explicariam o incremento observado na germinação do experimento com GA<sub>3</sub> em câmara germinadora, onde o melhor percentual de germinação foi obtido com o maior tempo de imersão das sementes em GA<sub>3</sub>.

Muitos são os trabalhos que corroboram a eficácia do ácido sulfúrico na quebra de dormência física de sementes de várias espécies (EIRA *et al.*, 1993; CAVALCANTE; PEREZ, 1996; SOUZA *et al.*, 2009; BRANCALION *et al.*, 2011). No entanto, também são encontrados na literatura trabalhos que abordam o efeito prejudicial do ácido na germinação (MAEDA; LAGO, 1986; MACEDO *et al.*, 1994; ALVES *et al.*, 2007). No presente trabalho, os dados sugerem que, de modo geral, o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> promove aumento na germinação de sementes de *L. pohlii*, sendo observados acréscimos do percentual nos tempos de 5, 15 e 20 minutos em relação ao tratamento controle.

Um fator que pode estar relacionado à irregularidade na germinação observada tanto nos tratamentos com GA<sub>3</sub> como com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, seria a assincronia na maturação dos aquênios (LOPES, 2008), uma vez que, além de apresentar capítulos em diferentes estádios de desenvolvimento em um mesmo indivíduo, é comum observar também, os diferentes estádios de desenvolvimento de aquênios em um mesmo capítulo (APÊNDICE 1 E e F), que no momento da coleta são retirados conjuntamente.

Comparando o efeito dos ácidos sobre *L. pohlii*, a germinação foi maior com o uso do GA<sub>3</sub>, com 229 sementes germinadas em 500, contra 204 sementes germinadas no experimento com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Em relação à emergência das plântulas ao longo do tempo, as curvas de germinação mostraram que os tratamentos com GA<sub>3</sub> apresentam uma germinação mais contínua, enquanto na germinação com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> houve mais estabilizações ao longo das avaliações. Somado a estes padrões, o fato do ácido giberélico mostrar maior eficiência na quebra de dormência fisiológica e o ácido sulfúrico na quebra de dormência física (BRASIL,

2009; CARDOSO, 2009; LIMA-JUNIOR, 2010) permite inferir que a espécie apresente dormência fisiológica superior à dormência física.

Quanto à desinfestação das sementes, provavelmente, a total contaminação no experimento 1 em apenas quatro dias de avaliação não seja devida à ineficiência dos tratamentos testados e sim à procedência das sementes, uma vez que estas foram coletadas em período chuvoso. É possível que a água da chuva contaminada com impurezas, tenha penetrado para o interior dos aquênios contaminando as sementes, não sendo os tratamentos testados suficientes para a descontaminação. Tal suspeita é reforçada com os resultados do experimento 2, no qual capítulos novos de *L. pohlii* foram coletados em período seco, apresentando resultados satisfatórios.

Bevilacqua *et al.* (2011), ao trabalhar com *Calendula officinalis* (Asteraceae), encontraram influência do tempo de imersão em tratamentos com hipoclorito de sódio a 2,5% na desinfestação das sementes, sendo os maiores tempos os mais eficientes. O mesmo não foi observado em ambos os experimentos que testavam a desinfestação a 2,5% de hipoclorito de sódio no presente trabalho. Diferentemente da concentração 5%, testada no experimento 2. Além disso, de acordo com Ferreira *et al.* (2009), os índices de descontaminação das sementes podem variar muito com a concentração da solução desinfestante, bem como o tempo de exposição a ela. O que foi observado no experimento 2 que, apesar de não haver diferenças estatísticas entre a maioria dos tratamentos, numericamente, é possível observar uma redução da contaminação com o aumento na concentração de hipoclorito de sódio de 2,5% para 5%, e ainda, uma tendência de decréscimo da contaminação com o aumento do tempo de exposição ao agente.

Aparentemente, a desinfestação de *L. pohlii* a 5% apresenta um tempo ótimo de imersão em torno de 20 minutos, uma vez que no tratamento com tempo superior a este (25 minutos) a porcentagem de contaminação, que vinha declinando, cresce. Ao trabalhar com mangabeira (*Hancornia speciosa*), uma espécie nativa do cerrado, pertencente à família Apocynaceae, Silva (2010) também observou uma melhora na desinfestação com concentrações mais elevadas e maiores tempos de imersão em hipoclorito de sódio, sendo o melhor resultado observado no tratamento com hipoclorito de sódio a 5% por 20 minutos, com até 0% de contaminação das sementes.

Deste modo, a partir dos dois primeiros experimentos de desinfestação, é possível notar que tanto o período de coleta quanto a concentração do hipoclorito de sódio e o tempo de imersão da semente na solução de desinfestação interferem na desinfestação dos aquênios.

Sendo os resultados mais satisfatórios, observados quando há coleta de aquênios em período seco e posteriormente imersos em soluções mais concentradas de hipoclorito de sódio, por um período de 20 minutos.

Contudo, com o experimento 3, foi possível observar a superioridade do H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, independentemente do tempo de imersão, sobre a desinfestação dos aquênios de *L. pohlii*, mesmo nos tratamentos que associavam o hipoclorito de sódio a solução fungicida. Souza *et al.* (2009), trabalhando com germinação de *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) observaram um possível efeito desinfestante do ácido sulfúrico. Isso pode ser explicado pelo efeito corrosivo do ácido, que dissolveria as impurezas aderidas à superfície das sementes.

Diante dos resultados obtidos, é de fato conveniente o uso de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> na desinfestação de sementes de *L. pohlii*, uma vez que este, além de mais eficiente que o hipoclorito de sódio, pode aumentar o potencial germinativo da espécie, uma vez que esta parece apresentar alguma dificuldade de germinação devida também à barreira física imposta pelo aquênio, o que foi confirmado no experimento de germinação *in vitro*.

Observa-se também, que o tempo de imersão em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> influencia na qualidade da germinação, sendo mais eficiente em tempo mais elevado. Sendo assim, pode-se afirmar que, apesar de pequena e aparentemente sensível, a semente não teve o embrião danificado pelo efeito corrosivo do H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, mesmo em imersões mais longas, de até 20 minutos.

Convém ressaltar que os efeitos do H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> em determinados tempos de imersão podem ser potencializados na presença do GA<sub>3</sub>. Vários autores, (e.g. Castro *et al.*, 2004), explicam o efeito do ácido giberélico na retomada do desenvolvimento do embrião das sementes, resultando na germinação. Somado a isto, o ácido sulfúrico também beneficiou a germinação, mesmo após um tempo mínimo de imersão, facilitando a abertura do aquênio.

Apesar do conhecido benefício proporcionado pelo GA<sub>3</sub> na propagação vegetal, em condições de cultura *in vitro*, é possível obter bons resultados na propagação de *L. pohlii*, mesmo sem o uso deste. Haja vista que as maiores taxas de germinação e multiplicação, observadas nos experimentos *in vitro*, ocorram na ausência da giberelina.

Por outro lado, a partir dos dados obtidos no experimento de multiplicação *in vitro*, entre os dois subcultivos, foi observado que os resíduos de GA<sub>3</sub> parecem influenciar positivamente na multiplicação de explantes desta espécie. Do primeiro para o segundo subcultivo houve considerável decréscimo nas médias de brotações, sugerindo que os tratamentos compostos por H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e GA<sub>3</sub> vieram a potencializar a emissão de brotações no primeiro subcultivo.

O controle das citocininas sobre os processos de divisão celular é bastante conhecido (TAIZ; ZEIGER, 2006; KERBAUY, 2012) e, assim, seus consequentes efeitos sobre a fase de multiplicação na micropropagação. Dentre o grupo das citocininas, destaca-se a benzilaminopurina (BAP), devido à sua eficiente contribuição na multiplicação de plantas (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). É importante ressaltar ainda, a existência de interações entre os hormônios fitoreguladores, o que é, normalmente, muito benéfico aos processos existentes no desenvolvimento das plantas. A divisão celular e, conseqüentemente, a multiplicação de brotações em culturas de tecidos é potencializada pelo balanço hormonal entre auxinas e citocininas (KERBAUY, 2012).

Já as giberelinas, indiscutivelmente importantes no desenvolvimento das plantas superiores, tem ação mais proeminente no crescimento caulinar, sendo na cultura de tecidos, de grande importância na fase de alongamento (TAIZ; ZEIGER, 2006; KERBAUY, 2012). O grupo das giberelinas não parece estar diretamente relacionado à multiplicação de brotações, diferentemente do que foi observado no experimento em questão.

A literatura evidencia que a atuação do GA<sub>3</sub> está mais relacionada ao alongamento dos explantes do que à emissão de brotações (MENDES, *et al.*, 2007, VIDAL *et al.*, 2013). De acordo com Grattapaglia e Machado (1998), algumas vezes as giberelinas são utilizadas na fase de multiplicação, mas que, no entanto, em alguns trabalhos as giberelinas não influenciam a multiplicação.

De acordo com TaizeZeiger (2006), as giberelinas também atuam na divisão, além do alongamento celular e, segundo Kerbauy (2012), o balanço hormonal entre giberelinas e citocininas controlam a permanência do caráter meristemático ou especificação de um destino de diferenciação. Um balanço favorável às citocininas garante a predominância dos efeitos dessa classe hormonal. Assim, é possível que a presença do GA<sub>3</sub>, mais evidente no primeiro subcultivo, tenha auxiliado para uma melhor eficiência dos efeitos do BAP, o que pode explicar a maior emissão de brotações no primeiro subcultivo.

## 5. Conclusões

Dentro das condições experimentais testadas, pode-se concluir que:

- Para germinação de *L. pohlii* em câmara germinadora, o tempo ideal de imersão dos aquênios em solução de 0,5 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> é de 36 horas;
- Para uma eficiente desinfestação e germinação *in vitro*, a coleta de capítulos de *L. pohlii* deve ser realizada em períodos secos;

- Deve-se utilizar  $H_2SO_4$  na escarificação dos aquênios que darão origem aos explantes para a propagação *in vitro* de *L. pohlii*, uma vez que este atua na desinfestação dos aquênios, é eficiente na germinação *in vitro* e beneficia a emissão de brotações em explantes.

## 6. Referências Bibliográficas

ALMEIDA, C. I. M. **Germinação e efeito de doses de fósforo no crescimento inicial e atividade *in vivo* da fosfatase ácida em *Lychnophora ericoides* Mart.** 2006, 70f. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu, 2006.

ALMEIDA-ABREU, P. A. O Supergrupo Espinhaço da Serra do Espinhaço Meridional (Minas Gerais): o Rifte, a Bacia e o Orógeno. **Geonomos**, Belo Horizonte, v. 3, n. 1, pp. 1-18, 1995.

ALMEIDA-ABREU, P. A.; RENGER, F. E. Serra do espinhaço meridional: um orógeno de colisão do mesoproterozóico. **Revista Brasileira de Geociências**, Curitiba, v. 32, n. 1, pp. 1-14, 2002.

ALVES, A. F.; ALVES, A. F.; GUERRA, M. E. C.; MEDEIROS FILHO, S. Superação de dormência de sementes de braúna (*Schinopsis brasiliense* Engl.). **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v.38, n.1, pp.74-77, 2007.

AMARAL, G. A.; PEREIRA, F. F. O.; MUNHOZ, C. B. R. Fitossociologia de uma área de cerrado rupestre na Fazenda Sucupira, Brasília-DF. **Cerne**, Lavras, v.12, n.4 pp.350-359, 2006.

BAPTISTA, P. **Panoramas da Serra do Espinhaço – um ensaio de mapeamento fotográfico da paisagem.** 192 f. Tese de doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

BEVILACQUA, C. B.; REINIGER, L. R. S.; GOLLE, D. P.; ROSA, F. C. Desinfestação superficial, germinação e regeneração *in vitro* a partir de sementes de Calêndula. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.41, n.5, pp.761-766, 2011.

BRANCALION, P. H. S.; VAZ MONDO, V. H.; NOVEMBRE, A. D. L. C. Escarificação química para a superação da dormência de sementes de saguaraji vermelho (*Colubrina glandulosa* Perk. - Rhamnaceae). **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v.35, n.1, pp.119-124, 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para Análise de Sementes.** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: Mapa/ACS, 2009. 395p.

CARDOSO, V. J. M. Conceito e classificação da dormência em sementes. **Oecologia Brasiliensis**, Rio de Janeiro, v.13, n. 4, pp. 619-631, 2009.

CARMONA, R. Problemática e manejo de bancos de sementes de invasoras em solos agrícolas. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 10, n. 1/2, pp. 5-16, 1992.

CASTRO, R. D.; BRADFORD, K. J.; HILHORST, H. W. M. **Embebição e reativação do metabolismo**. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. Germinação: do básico ao aplicado. Artmed, Porto Alegre, pp. 149-162, 2004.

CAVALCANTE, A. M. B.; PEREZ, S. C. J. G. A. Efeitos da escarificação química, luz e pH na germinação de sementes de *Leucaenaleu cocephala* Lam (De Wit). **Revista Ceres**, Brasília, v.43, n. 248, pp. 370-381, 1996.

CERQUEIRA, M. B. S.; SOUZA, J.T., JÚNIOR, R.A.; PEIXOTO, A. B. F. Ação analgésica do extrato bruto aquoso liofilizado do caule e folhas de *Lychnophora ericoides* Mart. **Ciência e Cultura**, Campinas, v.39, n.5/6, pp.551-553, 1987.

COSTA, F. B. **Quimiotaxia e potencial farmacológico de Asteraceae do cerrado**. In: BARBOSA, L. M.; SANTOS-JÚNIOR, N. A. (Orgs.) A botânica no Brasil: pesquisa, ensino e políticas públicas ambientais. Sociedade Botânica do Brasil, São Paulo, 2007.

DAL COL, P. D. V. *Lychnophora ericoides* Mart.: **Subsídios para elaboração do plano de ação nacional para conservação de uma espécie ameaçada do cerrado brasileiro**. 49 f. Monografia – Licenciatura em Biologia à Distância, Consórcio Setentrional de Educação à Distância / Universidade de Brasília e Universidade Estadual de Goiás, 2011.

DAVIDE, A. C.; SILVA, E. A. A. **Produção de sementes e mudas de espécies florestais**. UFLA, Lavras, 174p. 2008.

DIAS, A. C. R.; CARVALHO, S. J. P.; BRANCALION, P. H. S.; NOVENBRE, A. D. L. C.; CHRISTOFFOLETI, P. J. Germinação de sementes aéreas pequenas de trapoeraba (*Commelina benghalensis*). **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v. 27, p. 931-939, 2009.

EIRA, M. T. S.; FREITAS, R. W. A.; MELLO, C. M. C. Superação da dormência de sementes de *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong. –Leguminosae. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 15, n. 2, pp. 177-181, 1993.



FACHINELLO, J. C. HOFFMANN, A. NICHTIGAL, J.C. **Propagação de plantas frutíferas**. Embrapa, Brasília, 221p., 2005.

FERREIRA, A. G.; CASSOL, B.; ROSA, S. G. T.; SILVEIRA, T. S.; STIVAL, A. L.; SILVA, A.A. Germinação de sementes de Asteraceae nativas no Rio Grande do Sul, Brasil. **Acta Botânica Brasílica**, São Paulo, v. 15, n. 2, pp. 231-242. 2001.

FERREIRA, M. G. R.; SANTOS, M. R. A.; BRAGADO, A. C. R. Propagação *in vitro* de cupuaçuzeiro: desinfestação de explantes Florais. **Saber Científico**, Porto Velho, v.2, n. 2, pp.37 – 44, 2009.

GIANOTTI, A. R. C.; SOUZA, M. J. H.; PEREIRA, I. M.; MACHADO. E. L. M.; VIEIRA, A. D.; MAGALHÃES, M. R. Soil and phytosociological characterization of an area with predominance of arnica (*Lychnophorapohlii* Sch. Bip.). **Revista Brasileira Ciências do Solo**, Viçosa, v.37, pp. 565-571, 2013.

GRAEL, C. F. F.; ALBUQUERQUE, S.; LOPES, J. L. Chemical constituents of *Lychnophora pohlii* and trypanocidal activity of crude plant extracts and of isolated compounds. **Fitoterapia**, v. 76, n 1, pp. 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, v. 1, pp. 183–260, 1998.

HAMMERTON, R. D.; SMITH, M. T.; VAN STANDEN, J. Factors influencing seeds viability and germination in: *Hypoxis hemerocallidea* Fish. & Mayer. **Seed Science & Technology**, New Delhi, v.17. n. 1, pp. 613-624, 1989.

HARTMAN, H.T., KESTER, D.E., DAVIES, T.T. & GENEVE, R. L. **Plant propagation: principles and practice**. 7<sup>a</sup> Ed. Prentice Hall, Upper Saddle River, 880p. 2002.

JOHN, B. **Citogenética de populações**. EDUSP, São Paulo, 1980.

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 chemiluminescence inhibition and free radical scavenger activity. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, Londres, v. 58, pp: 853–858, 2006.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal**. 2ª ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 452p., 2012.

KUNIYOSHI, Y. S. **Morfologia da semente e da germinação de 25 espécies arbóreas de uma floresta de araucária**. 23f. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1983.

LIMA JUNIOR, M. J. V. **Manual de Procedimentos para Análise de Sementes Florestais**. UFAM, Manaus, 146p, 2010.

LOPES, J. C.; CAPUCHO, M. T.; KROHLING, B.; ZANOTTI, P. Germinação de sementes de espécies florestais de *Caesalpineafferrea* Mart. ExTul. Var. *leiostachya* Benth., *Cassia grandis* L. E *Samaneasaman* Merrill, após tratamentos para superar a dormência. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 20, n. 1, pp. 80-86, 1998.

LOPES, S. W. **Características físicas e fisiológicas de aquênios de *Lychnophoraericoides* Mart. (arnica-do-campo) de uma população ocorrente na Serra da Bocaina, região do Alto Paranaíba-MG**. 36f. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2008.

MACEDO, E. C.; GROTH, D.; LAGO, A. A. Efeito de escarificação com ácido sulfúrico na germinação de sementes de *Brachariahumidicola* (Rendle) Schweick. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 3, pp. 455-460, 1994.

MAEDA, J. A. A.; LAGO, A. A. Germinação de sementes de mucuna-preta após tratamentos para superação da impermeabilidade do tegumento. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 8, n. 1, p. 79-84, 1986.

MAIA-ALMEIDA, C. I.; CAVARIANI, C.; OLIVEIRA, P.F.C.; MING, L. C.; MATTANA, R. S.; LIMA, L.P. Comportamento germinativo de sementes de diferentes cores de pariparoba (*Pothomorphe umbellata* (L.) Miq.). **Revista brasileira de plantas medicinais**, Botucatu, v. 13, n. 1, pp.116 –120, 2011.

MARTINS, C. C.; CARVALHO, N. M.; OLIVEIRA, A. P. Quebra de dormência de sementes de sabiá (*Mimosa caesalpiniae folia* Benth.). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 14, n. 1, pp. 5-8, 1992.

Mc EVOY, P. B. Dormancy and dispersal in dimorphic achene soft tansyragwort, *Senecio jacobaea* L. (Compositae) **Oecologia**, Berlim, v. 61, n.1, pp. 160-168, 1984.

MENDES, G. C.; SOARES, C. Q. G.; BRAGA, V. F.; PINTO, L. C.; SANTANA, R.; VICCINI, L. F. PEIXOTO, P. H. P. Multiplicação *in vitro* de explantes de *Billbergia distachia* (Vellozo) MEZ (Bromeliaceae). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 972-974, 2007.

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

NAKAJIMA, J. N.; SEMIR, J. Asteraceae do Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil. **Revista brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 24, n. 4, 2001.

NEMÉSIO, A. FARIA-JÚNIOR, L. R. R. First assessment of the orchid-bee fauna (Hymenoptera: Apidae) at Parque Estadual do Rio Preto, a cerrado area in southeastern Brazil. **Lundiana**, Belo Horizonte, v. 5, n. 2, pp.113-117, 2004.

OLIVEIRA, D. M. T. 2007. **Frutos de Asteraceae: contribuição anatômica e ontogenética para resolução de problemas**. In: BARBOSA, L. M.; SANTOS-JÚNIOR, N. A. (Orgs.) A botânica no Brasil: pesquisa, ensino e políticas públicas ambientais. Sociedade Botânica do Brasil, São Paulo, 2007.

PASSOS, I. R. S.; MATOS, G. V. C.; MELETTI, L. M. M.; SCOTT, M. D. S.; BERNACCI, L. C.; VIEIRA, M. A. R. utilização do ácido giberélico para a quebra de dormência de sementes de *Passiflora nítida* kunth germinadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 26, n. 2, pp. 380-381, 2004.

QUEIROZ, L. P.; SENA, T. S. N. COSTA, M. J. L. S. Flora vascular da Serra de Jibóia, Santa Terezinha, Bahia. In: O campo rupestre. **Sitientibus**, v. 15, pp. 27-40, 1996.

RIBEIRO, J. F. & WALTER, B. M. T. 2008. **As principais fitofisionomias do bioma Cerrado**. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P.; RIBEIRO, J. F. (Eds.) Cerrado: Ecologia e Flora. EMBAPA-CPAC, Planaltina, v. 1, pp. 151-199, 2008.

RICHARDS, A. J. **Plantbreeding systems**. Chapman & Hall, Londres, 529 p. 1997.

SANTOS, C. M. R.; FERREIRA, A. G.; ÁQUILA, M. E. A. Características de frutos e germinação de sementes de seis espécies de Myrtaceae nativas do Rio Grande do Sul. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 14, n. 2, pp. 151-199, 2008.

SEMIR, J. **Revisão taxonômica de *Lychnophora* Mart (Vernoniaceae: Compositae)**. 549 f. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1991.

SILVA, E. O. Propagação e armazenamento de sementes de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). 105f. Dissertação de mestrado, Universidade Federal da Paraíba. Areia, 2010.

SILVA, S. M. P. **Aspectos da ecologia e da reprodução sexuada na arnica (*Lychnophora pinaster* Mart.) – Asteraceae**. 48f. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1994.

SOUZA, C. M.; ROMÃO-JÚNIOR, P. C.; XIMENES, P. A. Efeito da escarificação com ácido sulfúrico e da retirada da carúncula na qualidade fisiológica de sementes de mamona. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, Campina Grande, v.13, n.1, p.37-43, 2009.

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.

STATSOFT. **Statistica (data analysis software system), version 10.0**. Disponível em: <[www.statsoft.com](http://www.statsoft.com)>. Acesso em: 19 outubro. 2012.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. 2004. **Fisiologia Vegetal**. 3ª ed. Artmed, Porto Alegre, 719p., 2008.

VERDI, L. G.; BRIGHENTE, I. M. C.; PIZZOLATTI, M. G. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 1, pp. 85-94, 2005.

VIDAL, F. R.; DINIZ, J. D. N.; SILVA, F. P. Multiplicação *in vitro* de plantas juvenis de mamoeiro. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 43, n. 1, p. 64-70, 2013.

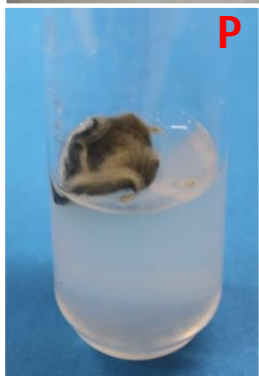
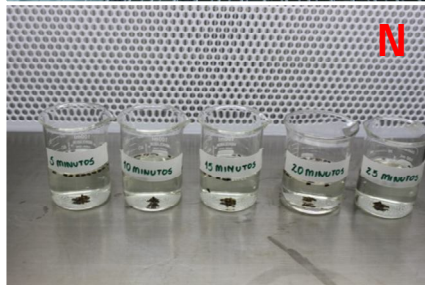
VIEIRA, P. G.; SOUZA, M. J. H.; TEIXEIRA, J. M.; CARVALHO, F. P. Estudo da precipitação mensal durante a estação chuvosa em Diamantina, Minas Gerais. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, São Paulo, v.14, n.7, p.762–767, 2010.

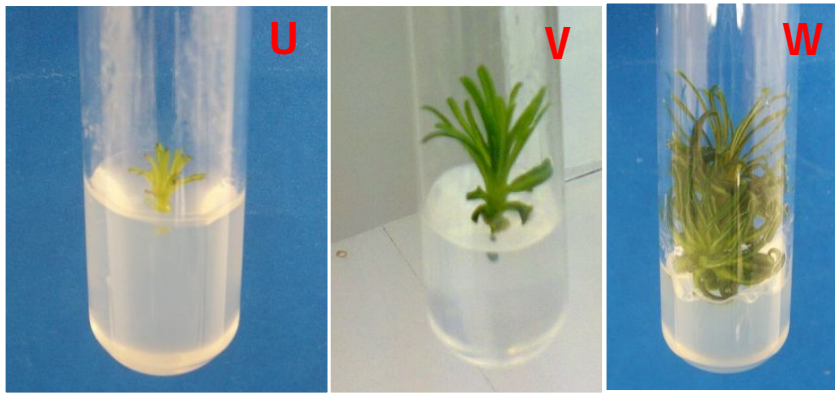
WERPACHOWSKI, J. S.; VARASSIN, I. G.; GONDENBERG, R. Ocorrência de apomixia e partenocarpia em algumas espécies subtropicais de Asteraceae. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.27, n.3, pp.607-613, 2004.

XAVIER, A; WEDLING, I.; SILVA, R. L. **Silvicultura clonal: Princípios e técnicas**. UFV, Viçosa, 272p. 2009.

ZAIDAN, L. B. P.; BARBEDO, C. J. **Quebra de dormência de sementes**. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. Germinação: do básico ao aplicado. Artmed, Porto Alegre, pp. 135-146, 2004.







Apêndice A: Desinfestação, germinação e multiplicação de *Lychinophora pohlii* (Asteraceae), Diamantina, MG. A – Local de coleta; B-C – Indivíduos adultos reprodutivos; D-F – Capítulos compostos em estágios de botão floral e antese; G-H - Capítulos compostos em estágios de frutificação e dispersão; I – Aquênios maduros; J – Repetição do experimento de germinação; K – Detalhe do aquênio germinado em BOD; L – Disposição das repetições do experimento de germinação na BOD; M – Tratamento de desinfestação das sementes com  $H_2SO_4$ ; N – Tratamento de desinfestação das sementes com hipoclorito de sódio; O-Q –Tubos de ensaio com sementes inoculadas, após tratamentos de desinfestação; R – Inoculação da semente em meio de cultura, para germinação *in vitro*; S-T – Montagem do experimento de germinação *in vitro* em ambiente com luz e temperatura controladas; U-V – Explante recém implantado; W – Explante multiplicado.