

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROBIOLOGIA**

**PROPAGAÇÃO, METABOLISMO SECUNDÁRIO E
GENOTOXICIDADE DE *Solidago chilensis* MEYEN
(ASTERACEAE)**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Lisiane Löbler

Santa Maria, RS, Brasil

2013

**PROPAGAÇÃO, METABOLISMO SECUNDÁRIO E
GENOTOXICIDADE DE *Solidago chilensis* MEYEN
(ASTERACEAE)**

Lisiane Löbler

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do programa de Pós-Graduação em Agrobiologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Agrobiologia.

Orientador: Prof (a). Juçara Terezinha Paranhos

Santa Maria, RS, Brasil

2013

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Löbler, Lisiane

Propagação, metabolismo secundário e genotoxicidade de *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae) / Lisiane Löbler. - 2013.

97 f.; 30cm

Orientador: Juçara Terezinha Paranhos

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia, RS, 2013

1. Erva-lanceta 2. Propagação sexuada 3. Micropropagação 4. Estaquia *ex vitro* 5. *Allium cepa*. I. Paranhos, Juçara Terezinha II. Título.

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

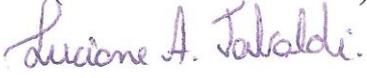
**PROPAGAÇÃO, METABOLISMO SECUNDÁRIO E
GENOTOXICIDADE DE *Solidago chilensis* MEYEN (ASTERACEAE)**

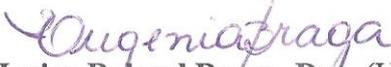
elaborada por
Lisiane Löbler

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Agrobiologia

COMISSÃO EXAMINADORA:


Juçara Terezinha Paranhos, Dra.
(Presidente/Orientadora)


Luciane Almeri Tabaldi, Dra. (UFSM)


Eugenia Jacira Bolacel Braga, Dra. (UFPel)

Santa Maria, 24 de maio de 2013

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre me acompanhar, pela força e coragem em todos os momentos.

Aos meus amados pais, Mauro e Dilce e irmão Vinicius, pelo exemplo de vida que são para mim, por todos os ensinamentos, todo amor, carinho, apoio, incentivo e muito mais, durante todos estes anos.

Ao meu amor, Daniel, a quem admiro muito e não tenho palavras para agradecer por toda força, incentivo, paciência, incansável ajuda e compreensão em todos os momentos, desde o início desta trajetória. O engenheiro agrônomo que despertou a minha admiração pela agronomia e com quem aprendi experimentação vegetal.

Aos demais familiares e amigos que contribuíram de alguma forma nesta realização profissional.

À minha orientadora, Professora Juçara Terezinha Paranhos, por todos os ensinamentos durante a orientação, inúmeras contribuições, todo apoio, ajuda e paciência nestes dois anos, agradeço muito pela oportunidade e por tudo que fez por mim!

As minhas co-orientadoras Professoras Solange Bosio Tedesco e Melânia Palermo Manfron, por toda contribuição, atenção e disponibilidade.

À minha também co-orientadora, Hilda Hildebrand Soriani, a qual foi uma surpresa durante esta trajetória, uma ótima surpresa, uma das pessoas mais humildes e generosas que eu já conheci, agradeço pelas inúmeras contribuições, todas as conversas, conselhos e ajuda!

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia que contribuíram com a minha formação.

À minha amiga Bruna Rocha que esteve comigo em todos os momentos durante esta trajetória, me apoiando e ajudando desde o início. Também à amiga, Rosiana Bertê, por toda a ajuda e apoio. Minhas queridas! Obrigada pelo carinho, amizade, companheirismo, conselhos e por todos os momentos inesquecíveis que lembrarei pra sempre! Terei muita saudade de todas as nossas conversas, desabafos, discussões e tudo mais, sentirei muita falta disso. Nossa união durante o mestrado, fez com que ficássemos mais fortes.

Aos demais colegas do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, Simone Lucho, Tiéle Fernandes, Gabriela Richter e Alberi Zuliani por toda a ajuda, disponibilidade e apoio.

À Tania Viana, por toda a atenção e disponibilidade, sempre querendo ajudar em qualquer que fosse a atividade, muito obrigada por tudo!

Ao pessoal do Laboratório de Citogenética Vegetal e Genotoxicidade pela ajuda e por todas as demais contribuições, sempre com muito bom humor e desejo de sucesso absoluto.

À Roberta Bevilaqua de Quadros pela acolhida, generosidade e toda ajuda no início desta trajetória.

À Amanda Leitão Gindri por toda generosidade, atenção, ajuda e disponibilidade sempre.

Aos colegas do mestrado que de uma forma ou outra contribuíram para que esta etapa se concretizasse, demonstrando amizade e companheirismo.

O meu sincero, MUITO OBRIGADA!

EPÍGRAFE

*Suba o primeiro degrau com fé.
Você não precisa ver toda a escada,
só o primeiro degrau.*

(Martin Luther King Jr.)

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia
Universidade Federal de Santa Maria

PROPAGAÇÃO, METABOLISMO SECUNDÁRIO E GENOTOXICIDADE DE *Solidago chilensis* MEYEN (ASTERACEAE)

AUTORA: Lisiane Löbler

ORIENTADORA: Juçara Terezinha Paranhos

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 24 de maio de 2013.

Plantas nativas medicinais são amplamente utilizadas, porém as informações científicas são insuficientes sobre a propagação e a citotoxicidade de algumas espécies. Este trabalho objetivou estudar a propagação sexuada e vegetativa da espécie *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae), através da germinação de sementes, micropropagação e estaquia, além de avaliar o potencial genotóxico e quantificar o acúmulo de metabólitos secundários das plantas obtidas. Estudos da germinação *in vitro* e *ex vitro* das sementes foram desenvolvidos testando-se condições de armazenamento, doses de ácido giberélico (GA₃), regimes de luz, tempos de embebição em água a 5°C ± 1°C, temperaturas e populações. Para a micropropagação, foram utilizados segmentos apicais e nodais e combinações de benzilaminopurina BAP (0,0 e 2,0 mg L⁻¹) e ácido naftaleno acético ANA (0,0 e 0,2 mg L⁻¹). No estudo da estaquia foram utilizadas estacas de ramos aéreos e de rizomas subterrâneos. Porções apicais, medianas e basais de ramos foram mantidas em água destilada e soluções nutritivas de Murashige e Shoog (20%), contendo ou não ácido indol butírico (AIB) (5,0 mg L⁻¹). Para a estaquia de rizomas, segmentos dos mesmos foram imersos em 0, 600 e 1200 mg L⁻¹ de AIB por seis horas e após cultivados em Plantmax®, areia ou vermiculita. Folhas apicais de quatro procedências: plantas crescendo naturalmente em terreno baldio; plantas oriundas de terreno baldio e cultivadas em casa de vegetação; plantas obtidas das estacas de rizomas e plantas micropropagadas foram coletadas para a avaliação da genotoxicidade e quantificação de polifenóis totais e flavonoides por espectrofotometria, além de ácido clorogênico, quercetina e rutina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. A genotoxicidade foi avaliada através do teste *Allium cepa*, testando-se concentrações de 5 e 20 g L⁻¹ de extratos aquosos das folhas secas. As populações influenciaram na germinação de sementes, sendo as de terreno baldio as que apresentaram em média 57,2% de germinação. As sementes germinaram sob fotoperíodo de 16 horas (em média 2,4% e 22,3%) e escuro contínuo (em média 3,5% e 17,6%) no experimento 1 e 3, respectivamente. A embebição por 36 horas favoreceu a germinação (56% e 24,7%) e velocidade de germinação no experimento 2 e 3, respectivamente. A temperatura de 20°C, no experimento 3, proporcionou a maior porcentagem de germinação das sementes, 26,6%. Na micropropagação, a combinação de 2,0 mg L⁻¹ de BAP + 0,2 mg L⁻¹ de ANA, proporcionou 49% de plantas completas e 37% de sobrevivência na aclimatização. Na estaquia de ramos aéreos, ocorreu superior enraizamento no substrato água com a presença de AIB (29%). O substrato Plantmax® proporcionou 62% de enraizamento nas estacas de rizomas, não diferindo da areia (43%). Na avaliação da genotoxicidade, foi detectado potencial genotóxico dos extratos oriundos das plantas micropropagadas (5 e 20 g L⁻¹) e das cultivadas em casa de vegetação (5 g L⁻¹). Polifenóis e flavonoides foram encontrados em todos os extratos, sendo identificados, os flavonoides, ácido clorogênico e quercetina em maior concentração nas plantas de terreno baldio, 441,4 e 95,7 mg g⁻¹, respectivamente, e rutina em concentração semelhante em todas as amostras (em média 46,9 mg g⁻¹).

Palavras-chave: Erva-lanceta. Propagação sexuada. Micropropagação. Estaquia *ex vitro*. Teste *Allium cepa*.

ABSTRACT

Master Dissertation
Agrobiology Graduate Program
Universidade Federal de Santa Maria

PROPAGATION, SECONDARY METABOLISM AND GENOTOXICITY OF *Solidago chilensis* MEYEN (ASTERACEAE)

AUTHOR: Lisiane Löbler

ADVISER: Juçara Terezinha Paranhos

Date and Local Presentation: Santa Maria, Mai 24th, 2013.

Native medicinal plants are widely used, but are insufficient scientific information on the spread of some species and cytotoxicity. This study investigated the sexual propagation and vegetative species *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae) through seed germination, micropropagation, cuttings, evaluate the genotoxic and quantify the accumulation of secondary metabolites of plants obtained. Studies of germination *in vitro* and *ex vitro* seeds were developed by testing storage conditions, concentrations of gibberellic acid (GA³), light regimes, soaking times in water to 5°C ± 1°C, temperatures and populations. For micropropagation were used apical and nodal segments and combinations of benzylaminopurine BAP (0,0 e 2,0 mg L⁻¹) and naphthalene acetic acid NAA (0,0 e 0,2 mg L⁻¹). In the study of stem cuttings were used cuttings of branches overhead and underground rhizomes. Apical, middle and basal branches were kept in distilled water and nutrient solutions Murashige and Shoog (20%), with or without indole butyric acid (IBA) (5,0 mg L⁻¹). For the cutting of rhizomes, segments thereof were immersed in 0, 600 and 1200 mg L⁻¹ IBA for six hours and after cultured in Plantmax, sand or vermiculite. Apical leaves from four different origins: natural plants growing in wasteland; plants from wasteland and cultivated in the greenhouse, plants from cuttings and rhizomes micropropagated plants were collected for the assessment of genotoxicity and quantification of total polyphenols and flavonoids by spectrophotometry, and chlorogenic acid, quercetin and rutin by High Performance Liquid Chromatography Efficiency. The genotoxicity was assessed using the *Allium cepa* test, testing concentrations of 5 and 20 g L⁻¹ aqueous extracts of dried leaves. Populations influenced the germination of seeds, and the wasteland of the ones who had averaged 57,2% germination. The seeds germinated under 16h photoperiod (2,4% and 22,3%) and continuous darkness (3,5% and 17,6%). The soaking time of 36 hours favored germination (56% and 24,7%) and germination rate in the experiment 2 and 3, respectively. A temperature of 20°C, in experiment 3, provided the highest percentage of seed germination, 26,6%. In micropropagation, the combination of 2,0 mg L⁻¹ of BAP and 0,2 mg L⁻¹ og NAA, provided 49% of complete plants and 37% survival at acclimatization. In cuttings of new shoots, rooting in the substrate occurred over water with the presence of IBA (29%). The Plantmax® provided 62% rooting in cuttings of rhizomes did not differ from sand (43%). In the evaluation of genotoxicity was detected genotoxic potential of extracts derived from micropropagated plants (5 and 20 g L⁻¹) and grown in a greenhouse (5 g L⁻¹). Polyphenols and flavonoids were found in all the extracts and identified flavonoids quercetin and chlorogenic acid in higher concentrations in plants of wasteland, 441,4 and 95,7 mg g⁻¹, respectively, and rutin in similar concentration in all samples (mean 46,9 mg g⁻¹).

Keywords: Herb-lancet. Sexual propagation. Micropropagation. *Ex vitro* cuttings. *Allium cepa* test.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Figura 1 - Plantas de *Solidago chilensis* crescendo naturalmente em terreno baldio no bairro Camobi, em Santa Maria-RS. a: vista geral em período vegetativo; b: vista geral no período de florescimento; c: inflorescência; d: diásporo (cipsela + *pappus*), unidade orgânica destinada à propagação das plantas superiores, e que consiste essencialmente no embrião, acompanhado de estruturas acessórias, podendo ser uma semente, um fruto, etc (FERREIRA, 1994)..... 19

CAPÍTULO II

- Figura 1 - Índice de velocidade de germinação das sementes de *Solidago chilensis* em função dos tempos de embebição na temperatura de 20 e 25°C para a população 1 (terreno baldio)..... 38
- Figura 2 - Porcentagem de germinação das sementes de *Solidago chilensis* submetidas a diferentes temperaturas, tempos de embebição e regimes de luz..... 40
- Figura 3 - Índice de velocidade de germinação das sementes de *Solidago chilensis* submetidas a diferentes temperaturas, tempos de embebição e regimes de luz..... 42

CAPÍTULO III

- Figura 1 - Plantas de *Solidago chilensis* cultivadas em meio MS completo, suplementado com 0,0 + 0,0 mg L⁻¹ e 2,0 + 0,2 mg L⁻¹ de benzilaminopurina (BAP) e ácido naftaleno acético (ANA), respectivamente, 30 g L⁻¹ de sacarose, 6 g L⁻¹ de ágar e 1 g L⁻¹ de carvão ativado, e mantidas em sala de crescimento a 25 ± 2°C com fotoperíodo de 16 horas (R.F.A. de ~36 μmol m⁻² s⁻¹)..... 58
- Figura 2 - Aclimatização de plantas micropropagadas de *Solidago chilensis*, oriundas de segmentos apicais e nodais cultivados em meio MS completo (Murashige e Skoog, 1962), acrescido ou não da combinação de fitorreguladores (2,0 mg L⁻¹ BAP + 0,2 mg L⁻¹ ANA), transferidas para substrato Plantmax® + vermiculita (granulometria média) na proporção 2:1, mantendo-se a origem dos tratamentos e cultivadas em sala de crescimento a 25 ± 2°C, com fotoperíodo de 16 horas (R.F.A. de ~36 μmol m⁻² s⁻¹). a) Início do período de aclimatização (2ª semana); b) Final do período de aclimatização (12ª semana)..... 60
- Figura 3 - Efeito das concentrações 0, 600 e 1200 mg L⁻¹ de ácido indol butírico (AIB) na massa fresca de raízes das estacas de rizomas de *Solidago chilensis*, cultivadas em sala de crescimento a 25 ± 2°C, com fotoperíodo de 16 horas (R.F.A. de ~36 μmol m⁻² s⁻¹)..... 68

CAPÍTULO IV

- Figura 1 - Células meristemáticas de raízes de *Allium cepa* submetidas aos distintos tratamentos. A) Anáfase com cromossomo solto - T11: metanol (100%); B) Metáfase com cromossomos desorganizados - T13: glifosato (20%); C) Telófase com cromossomo adiantado - T3: plantas de terreno baldio (20 g L⁻¹); D) Anáfase com pontes - T8: plantas propagadas por estaquia (5 g L⁻¹); E) Anáfases com cromossomos atrasados e adiantados - T4: plantas micropropagadas (5 g L⁻¹); F) Prófase com

quebras cromossômicas - T9: plantas propagadas por estaquia (20 g L⁻¹);
escala 10 µm.....

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1 - Resumo da análise de variância para a porcentagem de germinação das sementes de <i>Solidago chilensis</i> , nos tipos de armazenamento a 10 e 25 ± 2°C (TA), condições de luminosidade fotoperíodo de 16 horas e escuro contínuo (CL) e fitorregulador nas concentrações 0,0, 1,5 e 3,0 mg L ⁻¹ de GA ₃ (CF), totalizando 12 tratamentos, utilizando-se três repetições por tratamento, cada uma composta por 30 frutos. Santa Maria – RS (2012).....	30
Tabela 2 - Porcentagem de germinação das sementes de <i>Solidago chilensis</i> , submetidas aos tratamentos, com três repetições, cada uma contendo 30 frutos. Santa Maria – RS (2012).....	31
Tabela 3 - Resumo da análise de variância para a porcentagem de germinação das sementes (G) e índice de velocidade de germinação (IVG) de <i>Solidago chilensis</i> , nas temperaturas 20 e 25°C (T), embebição durante 0, 12, 24 e 36 horas (E) e população de terreno baldio em Dona Francisca-RS e casa de vegetação climatizada 25 ± 2°C (P), totalizando 16 tratamentos, utilizando-se quatro repetições por tratamento, cada uma composta por 25 frutos. Santa Maria – RS (2012).....	34
Tabela 4 - Porcentagem de germinação das sementes de <i>Solidago chilensis</i> nas populações em cada um dos tempos de embebição. Santa Maria – RS (2012).....	35
Tabela 5 - Índice de velocidade de germinação das sementes de <i>Solidago chilensis</i> oriundas de duas populações (terreno baldio e casa de vegetação), duas temperaturas (20 e 25°C) e quatro tempos de embebição (0, 12, 24 e 36 horas). Santa Maria – RS (2012).....	37
Tabela 6 - Resumo da análise de variância para a germinação das sementes (G), índice de velocidade de germinação (IVG) e comprimento da raiz principal (CRP) de <i>Solidago chilensis</i> , nas temperaturas 10, 20, 25 e 30°C (T), embebição por 0, 12, 24 e 36 horas (E) e condições de luminosidade fotoperíodo de 16 horas e escuro contínuo (CL), totalizando 32 tratamentos, utilizando-se três repetições por tratamento, cada uma composta por 30 frutos. Santa Maria – RS (2012).....	39
Tabela 7 - Porcentagem de germinação das sementes para as condições de luminosidade em cada uma das temperaturas e tempos de embebição para a espécie <i>Solidago chilensis</i> . Santa Maria – RS (2012).....	44
Tabela 8 - Médias para o comprimento da raiz principal (cm) em plântulas germinadas da espécie <i>Solidago chilensis</i> nas condições de luminosidade em cada uma das temperaturas. Santa Maria – RS (2012).....	45

CAPÍTULO III

Tabela 1- Resumo da análise de variância para o estabelecimento <i>in vitro</i> (E), número de brotos (B), número de folhas (F), número de raízes (R), altura (A), comprimento da raiz principal (CRP), massa fresca total (MFT) e oxidação (O) nos tipos de explante apical e nodal (TE) e ausência ou presença (2,0 + 0,2 mg L ⁻¹) dos fitorreguladores benzilaminopurina e ácido naftaleno acético, respectivamente (F), utilizando-se quatro tratamentos, cada um composto por seis repetições, constituídas de 25 frascos cada. Santa Maria – RS (2012).....	54
Tabela 2 - Plantas completas estabelecidas <i>in vitro</i> e variáveis de crescimento	

obtidas a partir de dois tipos de explantes, submetidos a ausência ou presença dos fitorreguladores benzilaminopurina (BAP) e ácido naftaleno acético (ANA), utilizando-se quatro tratamentos, cada um composto por seis repetições, constituídas de 25 frascos cada. Santa Maria – RS (2012).....	55
Tabela 3 - Número de raízes e porcentagem de oxidação em segmentos apicais e nodais de ramos aéreos de <i>Solidago chilensis</i> , cultivados em meio MS completo (Murashige e Skoog, 1962), acrescido ou não da combinação dos fitorreguladores BAP (benzilaminopurina) e ANA (ácido naftaleno acético). Os fatores constituíram quatro tratamentos, cada um com seis repetições, constituídas de 25 frascos cada. Santa Maria – RS (2012).....	57
Tabela 4 - Médias das variáveis sobrevivência e crescimento das plantas obtidas <i>in vitro</i> e cultivadas em substrato Plantmax® + vermiculita na proporção 2:1, mantendo-se a origem das mesmas. Santa Maria – RS (2012).....	59
Tabela 5 - Resumo da análise de variância para porcentagem de enraizamento (E), número de raízes (R), comprimento da raiz principal (CRP), número de brotos (B), número de folhas (F), porcentagem de oxidação (O) e porcentagem de sobrevivência (S) nos substratos água e MS 20% (S), 0,0 ou 5,0 mg L ⁻¹ do fitorregulador ácido indol butírico (F) e tipo de estaca apical, mediana e basal (TE), totalizando 12 tratamentos, cada um composto por três repetições, constituídas de oito estacas cada. Santa Maria – RS (2012).....	62
Tabela 6 - Porcentagem de enraizamento (E), número de raízes (R) comprimento da maior raiz em cm (CMR) e número de folhas (F) em estacas de ramos aéreos de <i>Solidago chilensis</i> para o substrato água na ausência ou presença de fitorregulador ácido indol butírico (AIB). Santa Maria – RS (2012).....	63
Tabela 7 - Médias do número de brotos e porcentagem de sobrevivência das estacas de <i>Solidago chilensis</i> para o tipo de estaca e cada um dos substratos. Santa Maria – RS (2012).....	64
Tabela 8 - Médias de oxidação (%) das estacas de <i>Solidago chilensis</i> nos substratos, ausência ou presença de fitorregulador ácido indol butírico (AIB) e tipo de estaca. Santa Maria – RS (2012).....	65
Tabela 9 - Médias das variáveis de crescimento em cada um dos substratos para a estaquia de rizomas da espécie <i>Solidago chilensis</i> . Santa Maria – RS (2012).....	66
CAPÍTULO IV	
Tabela 1 – Número de células em intérfase, mitose (prófase, metáfase, anáfase e telófase) e índice mitótico das raízes de <i>Allium cepa</i> submetidas aos tratamentos. Santa Maria – RS (2012).....	76
Tabela 2 - Alterações cromossômicas (cromossomo desorganizado, cromossomo solto ou quebrado, cromossomo atrasado ou adiantado e ponte em anáfase) nas células meristemáticas de raiz de <i>Allium cepa</i> submetidas aos tratamentos. Santa Maria – RS (2012).....	78
Tabela 3 - Conteúdo de polifenóis, flavonoides, ácido clorogênico, quercetina e rutina em extratos aquosos de folhas de plantas de <i>Solidago chilensis</i> oriundas diferentes formas de propagação e cultivo. Santa Maria – RS	

(2012).....

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	15
CAPÍTULO I - REVISÃO DE LITERATURA	17
1.1 Família Asteraceae e Gênero <i>Solidago</i>	17
1.2 <i>Solidago chilensis</i> Meyen.....	18
1.3 Formas de Propagação.....	20
1.3.1 Propagação sexuada.....	20
1.3.2 Propagação vegetativa.....	21
1.4 Potencial genotóxico.....	23
CAPÍTULO II - GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE <i>Solidago chilensis</i> MEYEN (ASTERACEAE)	25
RESUMO	25
2.1 Introdução.....	26
2.2 Material e métodos.....	27
2.3 Resultados e discussão.....	29
2.4 Conclusões.....	45
CAPÍTULO III - PROPAGAÇÃO VEGETATIVA DE <i>Solidago chilensis</i> MEYEN (ASTERACEAE)	47
RESUMO	47
3.1 Introdução.....	48
3.2 Material e métodos.....	49
3.3 Resultados e discussão.....	53
3.4 Conclusões.....	68
CAPÍTULO IV - AVALIAÇÃO DO POTENCIAL GENOTÓXICO DE <i>Solidago chilensis</i> NO CICLO CELULAR DE <i>Allium cepa</i> E ACÚMULO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	69
RESUMO	69
4.1 Introdução.....	70
4.2 Material e Métodos.....	71
4.3 Resultados e discussão.....	75
4.4 Conclusões.....	83
CONCLUSÕES GERAIS	84
REFERÊNCIAS	85

INTRODUÇÃO GERAL

A diversidade vegetal existente no Brasil é imensa, assim como a quantidade de espécies que são utilizadas pela população como medicinais. São inúmeras as plantas nativas utilizadas para essa finalidade, porém carecem estudos que contemplem as formas de propagação e a citotoxicidade para a maioria dessas. As espécies medicinais são retiradas de seu ambiente natural para serem utilizadas pela população em geral ou indústria farmacêutica, culminando em drásticas reduções das populações, sendo importante o estudo de suas formas de propagação, visando o conhecimento e padronização de um sistema de cultivo adequado, como alternativa de matéria prima para os usuários. Seu consumo na forma de infusões na medicina popular precisa ocorrer com segurança, evitando que determinadas substâncias possam apresentar risco a saúde humana, sendo essenciais estudos que avaliem a genotoxicidade das infusões consumidas a partir de diferentes populações e sistemas de cultivo. Dentre as espécies utilizadas, merece destaque a *Solidago chilensis* Meyen, conhecida como erva lanceta ou arnica, encontrada de maneira expressiva na região sul e sudeste do território brasileiro, apresentando crescimento vigoroso em terrenos baldios (LORENZI; MATOS, 2008).

As formas de se propagar uma planta variam e conforme se observam avanços nos métodos utilizados, procura-se aperfeiçoar a maneira de propagar determinada espécie. A propagação sexuada, ou seja, a partir de sementes, é a mais comum, permitindo que a variabilidade genética da espécie permaneça. Durante o desenvolvimento das sementes na planta-mãe, ou após a dispersão dos frutos, fatores ambientais podem afetar a sua germinabilidade, como umidade, luz e temperatura, surtindo efeitos distintos sobre diferentes espécies (FENNER, 1991; GUTTERMAN, 2000). Ren e Bewley (1998) acrescentam que além dos fatores ambientais, o desenvolvimento da semente pode ser afetado por diferentes fatores genéticos e fisiológicos.

Várias são as técnicas de propagação vegetativa empregadas com o objetivo de manter as características desejadas da planta matriz. Dentre elas destacam-se a estaquia, método simples e rápido onde pode-se obter um elevado número de plantas com um menor custo (HARTMANN et al., 2002) e a micropropagação, aplicação mais eficiente da cultura de tecidos vegetais e a de maior impacto, capaz de gerar plantas uniformes e de alta qualidade fitossanitária, multiplicadas rapidamente (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Fatores exógenos e/ou endógenos podem influenciar na obtenção de um protocolo eficiente para a propagação das espécies vegetais de interesse farmacológico bem como no metabolismo secundário. Segundo Gobbo-Neto e Lopes (2007), a interferência de fatores como disponibilidade hídrica, nutrientes, temperatura, umidade relativa do ar, radiação ultravioleta, ataque de patógenos e sazonalidade, pode alterar a síntese e acúmulo dos metabólitos secundários. Esses metabólitos não apresentam função aparente nos processos de crescimento e desenvolvimento vegetal, porém, podem atuar na defesa das plantas contra radiações, predadores, patógenos e outros, além de serem utilizados como fungicidas, inseticidas e medicamentos (TAIZ; ZEIGER, 2009), sendo os últimos, usados na prevenção e tratamento de várias doenças desde os tempos antigos em diversas populações de todo o planeta.

O uso indiscriminado de plantas medicinais pode não ser benéfico para o homem devido à possibilidade de muitos metabólitos secundários serem tóxicos, com efeitos mutagênicos (VICENTINI et al., 2001). Ensaio biológicos que utilizam espécies vegetais como organismos alvos são usados no monitoramento da bioatividade de extratos, frações e compostos isolados de plantas e têm sido incorporados à identificação e monitoramento de substâncias tóxicas (NOLDIN et al., 2003). O teste *Allium cepa* é um dos sistemas vegetais que vem sendo utilizado com eficácia para o estudo de efeitos de extratos vegetais de diferentes espécies, objetivando a detecção de genotoxicidade (TEIXEIRA et al., 2003; FACHINETTO et al., 2007; BAGATINI et al., 2009).

O objetivo geral do trabalho foi estudar a propagação sexuada e vegetativa da espécie *Solidago chilensis* Meyen, através de protocolos para germinação de sementes, micropropagação e estaquia *ex vitro*, além de avaliar o potencial genotóxico dos extratos de suas folhas oriundas de uma população e três sistemas de cultivo e quantificar o acúmulo de metabólitos secundários desses extratos, tendo como objetivos específicos: a) Estabelecer protocolos para germinação *in vitro* e *ex vitro* das sementes; b) Obter regeneração de plantas completas a partir da micropropagação; c) Estudar protocolos de enraizamento adventício e brotações com estacas de ramos aéreos e rizomas subterrâneos; d) Verificar o potencial genotóxico dos extratos aquosos obtidos a partir de folhas apicais de plantas oriundas de uma população (terreno baldio) e de três sistemas de cultivo (casa de vegetação, micropropagação e estaquia) sobre o ciclo celular de cebola (*Allium cepa* L., Amaryllidaceae), além de quantificar o acúmulo dos metabólitos secundários presentes nesses extratos.

CAPÍTULO I

REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Família Asteraceae e Gênero *Solidago*

Asteraceae, conforme o APG III 2009, está incluída nas Eudicotiledôneas, clado Asteride e constitui-se a maior família em número de espécies, possuindo em torno de 25.000, reunidas em 1.500 gêneros (SOUZA; LORENZI, 2012), ocorrendo no Brasil 2.000 espécies e 250 gêneros. Está representada em todo o mundo, podendo ser encontrada principalmente nas regiões tropicais, subtropicais e temperadas (ANDERBERG et al., 2007). Conforme Cronquist (1981) apresenta espécies hidrofíticas, heliofíticas, mesofíticas e xerofíticas, porém, segundo Barroso et al. (1991) são mais abundantes nas regiões áridas que nas florestas úmidas e apresentam espécies altamente diversificadas, tanto em habitat e forma de vida, quanto nos métodos de polinização.

A família está representada por ervas anuais e perenes, lianas, subarbustos, arbustos e árvores (MONDIN, 2006). Um dos fatores que garantem seu sucesso biológico é a elevada capacidade de dispersão, em função da presença de frutos com *pappus*, estruturas de aderência, na maioria plumosos (VENABLE; LEVIN, 1983). Possui o maior número de espécies que apresentam sementes com heteromorfismo (63%), sendo comum ocorrer diferenças entre frutos localizados na periferia e no centro do capítulo, em relação ao tamanho, massa e estrutura de dispersão, considerando a família, modelo biológico adequado para avaliar a evolução das taxas de dispersão ou estratégias de germinação (IMBERT, 2002).

As espécies apresentam importância econômica, tendo destaque o predomínio de plantas medicinais e ornamentais, as quais vêm sendo estudadas nos últimos 25 anos não apenas em aspectos da sua morfologia, ecologia, anatomia e ontogenia, como também nas áreas de fisiologia, fitoquímica, citogenética e molecular (BREMER, 1994).

Dentre os gêneros pertencentes à Asteraceae, *Solidago* é um dos maiores, com cerca de 120 espécies, distribuídas em várias partes do mundo (WEBER; JAKOBS, 2005), sendo a maioria nativa da América do Norte, com característica geralmente perene, porte herbáceo e

caule ereto pouco ramificado (BURKART, 1979). Na América do Sul, destaca-se *Solidago chilensis*, única espécie do gênero registrada no Brasil (CABRERA, 1974; CORREIA et al., 1998).

1.2 *Solidago chilensis* Meyen

Solidago chilensis, conhecida popularmente como erva lanceta, lanceta, arnica, arnica brasileira, arnica-do-campo, dentre outras denominações, é originária da parte meridional da América do Sul, podendo ser encontrada na maior parte do território brasileiro, com maior frequência nas regiões Sul e Sudeste, apresentando como sinonímia o nome *Solidago microglossa* DC., entre outros (LORENZI; MATOS, 2008). Conforme os autores é uma planta perene, sublenhosa, ereta, rizomatosa, sem ramificações, com altura de aproximadamente um metro, apresentando crescimento vigoroso em beira de estradas e terrenos baldios (Figura 1a e b), com florescimento no verão e outono. As flores amarelas estão reunidas em capítulos e esses formam uma panícula vistosa (Figura 1b e c), atualmente utilizadas como ornamentais. O fruto é simples, seco e indeiscente, originário de ovário ínfero, denominado cipsela (Figura 1d) (GONÇALVES; LORENZI, 2011). A espécie é erva invasora de pastagens e tóxica para o gado (BURKART, 1979).

O uso da *S. chilensis* como planta medicinal é muito antigo, estando inscrita na Farmacopeia Brasileira, sob o nome de arnica silvestre (FARMACOPEIA, 1926). As folhas desta espécie podem ser utilizadas como estimulante gastrointestinal, cicatrizante e como agente anti-inflamatório (ROQUE et al., 1983). É empregada externamente no tratamento de ferimentos, escoriações, traumatismos e contusões, em substituição à *Arnica montana* L. (CORRÊA et al., 1998), além de ser utilizada popularmente como antifúngica (FENNER et al., 2006). Estudos recentes comprovaram efeitos significativos no tratamento de feridas em ratos (FACURY NETO et al., 2004).

Devido à utilização de *S. chilensis* na medicina popular, é importante que seja avaliado se as infusões ou chás utilizados apresentam citotoxicidade. Bagatini et al. (2009) observaram potencial antiproliferativo e ausência de toxicidade de extratos de folhas de *Solidago microglossa* nas células de *Allium cepa*, utilizando este sistema teste bioindicador de genotoxicidade.

Vários estudos fitoquímicos foram realizados para a espécie *S. chilensis*, destacando-se Corrêa (1978) que isolou flavonoides em folhas, com possível ação antiespasmódica. Torres et al. (1987) observaram a presença do flavonoide glicosídico quercitrina na parte aérea. Em 1989, esses mesmos autores demonstraram novamente a presença da quercitrina, além de saponinas, resinas e óleos essenciais na parte aérea, assim como diterpenos inulina e rutina, ácido quínico, ramnosídeos e ácido caféico, clorogênico e hidrocínâmico e seus derivados nas raízes. Nas raízes desta espécie também foi isolado o diterpeno solidagenona (SCHMEDA-HIRSCHMANN et al., 2005).

Muitos metabólitos secundários, ainda não estudados, podem permanecer desconhecidos, culminando na perda dessas substâncias potenciais, tendo em vista o desconhecimento de práticas de cultivo e a exploração predatória, a qual que têm ocasionado reduções drásticas das populações naturais de plantas medicinais.

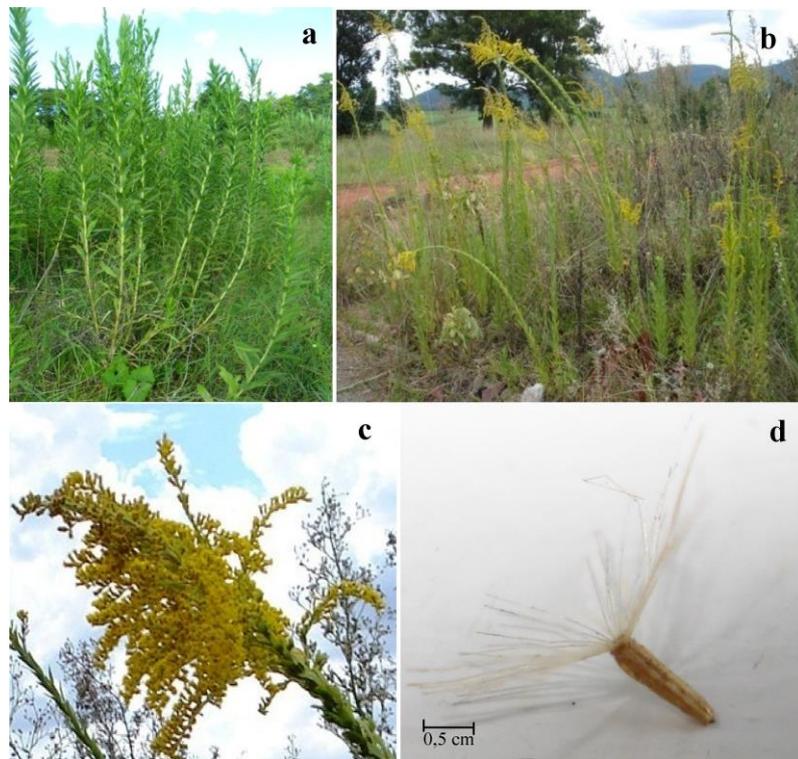


Figura 1 – Plantas de *Solidago chilensis* crescendo naturalmente em terreno baldio no bairro Camobi, em Santa Maria-RS. a: vista geral em período vegetativo; b: vista geral no período de florescimento; c: inflorescência; d: diásporo (cipsela + *pappus*), unidade orgânica destinada à propagação das plantas superiores, e que consiste essencialmente no embrião, acompanhado de estruturas acessórias, podendo ser uma semente, um fruto, etc (FERREIRA, 1994). Fonte: Lisiane Löbler

1.3 Formas de Propagação

1.3.1 Propagação sexuada

O principal mecanismo de multiplicação das plantas vasculares ocorre através da germinação de sementes, tendo como uma de suas características a variabilidade que pode ocorrer entre as plantas obtidas (FACHINELLO et al., 2005). O processo de germinação de sementes corresponde à reativação do metabolismo do embrião, conduzindo ao aparecimento de uma nova planta (HARTMANN et al., 2002).

O desenvolvimento da semente é um evento complexo, com inúmeros sistemas de controle e regulação, em que, dependendo de fatores internos e/ou externos, tem-se uma semente quiescente ou dormente (CARDOSO, 2004a). Diferenças genéticas e fisiológicas bem como fatores ambientais afetam esse desenvolvimento, que pode não ser temporalmente uniforme mesmo que as plantas sejam cultivadas em ambientes idênticos (REN; BEWLEY, 1998). A planta mãe influencia nas características germinativas da progênie através da herança genética e a movimentação de substâncias químicas dos tecidos maternos para a semente em desenvolvimento (CARDOSO, 2004b). Dentre os fatores ambientais que influenciam tem-se temperatura, luz e umidade, causando efeitos distintos nas diferentes espécies (FENNER, 1991, BEWLEY; BLACK, 1994).

Segundo Cardoso (2004b), a disponibilidade de água, temperatura e concentração de oxigênio podem afetar o metabolismo germinativo. Conforme Ching (1972) para que a germinação das sementes possa ocorrer, estas devem estar viáveis, sujeitas às condições ambientais adequadas e qualquer condição primária de dormência superada. A dormência faz com que as sementes não germinem até as condições serem ideais para a sobrevivência das plântulas (BEWLEY; BLACK, 1982). Para a superação da dormência de sementes, entre os principais reguladores de crescimento envolvidos, estão as giberelinas, as quais aceleram a maturação do embrião e promovem a síntese de enzimas envolvidas no enfraquecimento dos tegumentos e/ou a hidrólise de reservas, eventos relacionados principalmente com a protusão da radícula (BEWLEY; BLACK, 1994; HARTMANN et al., 2002; ZAIDAN; BARBEDO, 2004).

Vários são os estudos com o objetivo de superar algum tipo de dormência das sementes em espécies da família Asteraceae e gênero *Solidago* (BRATCHER et al., 1993;

WALCK et al., 2000; MACCHIA et al., 2001; ADEGAS et al., 2003; BEZERRA et al., 2006). O controle da dormência é realizado em parte pela temperatura, fator ambiental mais importante na regulação do tempo de germinação (HARTMANN et al., 2002). Diferentes temperaturas combinadas com a presença ou ausência de luz são fatores desencadeadores da germinação (FERREIRA et al., 2001). A temperatura ótima para a germinação é aquela que resulta no maior número de sementes germinadas em menor tempo, já em relação à luz, as sementes podem apresentar germinação indiferente a luz (afotoblásticas), maior germinabilidade e/ou velocidade de germinação sob luz (fotoblásticas positivas) ou germinarem mais no escuro (fotoblásticas negativas) (CARDOSO, 2004a). Para a espécie *S. chilensis*, estudo envolvendo os fatores fotoblastismo e temperatura foi realizado por Correia et al. (1999), os quais observaram que as sementes são fotoblásticas positivas e a temperatura de 20°C foi a mais eficiente, possibilitando o percentual mais elevado de sementes germinadas (20%) aos 14 dias.

1.3.2 Propagação vegetativa

Entre as diversas técnicas para se propagar plantas vegetativamente encontram-se enxertia, mergulhia, alporquia, estaquia e micropropagação. A propagação vegetativa *in vitro*, denominada micropropagação devido ao tamanho dos propágulos, é a aplicação mais eficiente da cultura de tecidos vegetais, sendo seu sucesso dependente do estabelecimento de protocolos que atendam as necessidades específicas de cada espécie (GRATTAPLAGLIA; MACHADO, 1998).

Esta técnica baseia-se na capacidade que estruturas possuem de formar um novo indivíduo completo e geneticamente idêntico ao progenitor, um clone (HARTMANN et al., 2002; WENDLING et al., 2005). Segundo Hartmann et al. (2002), esse tipo de propagação é possível devido a duas propriedades fundamentais das células vegetais: totipotência e dediferenciação. A primeira está relacionada ao fato de que, teoricamente, toda célula viva da planta contém a informação genética necessária para reconstruir as suas partes e funções e a segunda refere-se à capacidade previamente desenvolvida das células de dediferenciarem, retornando à condição meristemática, desenvolvendo um novo ponto de crescimento.

Um dos aspectos importantes dentro desta técnica é a seleção da planta mãe doadora de explantes ou propágulos, principalmente no que diz respeito às características genéticas,

epigenéticas e o condicionamento fisiológico para otimizar sua capacidade de estabelecer uma cultura e controlar patógenos (GRATTAPLAGLIA; MACHADO, 1998).

O crescimento e o desenvolvimento das plantas são controlados por substâncias orgânicas naturais denominadas hormônios vegetais (TAIZ; ZEIGER, 2009). O tipo e concentrações destas substâncias são determinantes nas respostas *in vitro*, sendo as auxinas e citocininas as mais utilizadas (CALDAS et al., 1998; CID; TEIXEIRA, 2010a). A adição exógena de fitorreguladores ao meio de cultura desencadeia uma alteração do balanço hormonal endógeno nos tecidos dos explantes, de maneira que dependendo da concentração dos fitorreguladores auxina e citocinina isolados ou em combinação, podem proporcionar variadas respostas (LEMOS, 2010). Além da divisão celular, a razão entre a auxina e citocinina determina a diferenciação em raiz ou gema de tecidos vegetais cultivados, onde a alta razão auxina/citocinina estimula a formação de raízes e a baixa razão proporciona a formação de partes aéreas (SKOOG; MILLER, 1957). Vários estudos de propagação vegetativa *in vitro* para espécies de Asteraceae e do gênero *Solidago* utilizaram estes fitorreguladores, obtendo resultados satisfatórios (WASSNER; RAVETTA, 2000; JOSHI; DHAR, 2003; SOUZA et al., 2007; LI et al., 2012; VICTÓRIO et al., 2012).

Uma dificuldade frequente no cultivo *in vitro* é a oxidação dos explantes devido à liberação, no meio de cultura, de compostos fenólicos pelas células danificadas dos mesmos, por ocasião do corte. Como alternativas para minimizar essa ocorrência *in vitro*, Fachinello et al. (2005) propuseram a incubação inicial dos explantes no escuro ou sob intensidade luminosa reduzida, pois a luz facilita a liberação dos compostos fenólicos. Cid e Teixeira (2010b) sugeriram tratar o explante com um antioxidante (ácido cítrico ou ascórbico) e/ou incluindo um material adsorvente destes compostos no meio de cultura (carvão ativado ou polivinilpirrolidona), bem como, transferências mais frequentes do explante para um novo meio de cultivo.

Outro importante processo de propagação vegetativa é a técnica de estaquia, na qual se promove a indução do enraizamento adventício em segmentos de plantas, proporcionando a multiplicação de plantas-matrizes selecionadas, mantendo as características desejáveis das mesmas (MELETTI, 2000). Dentre os fatores que influenciam essa técnica estão a posição da estaca no ramo, a diferenciação dos tecidos, a quantidade de reservas e o grau de lignificação (HARTMANN et al., 2002).

Fatores endógenos e exógenos afetam a capacidade de uma estaca emitir raízes, como idade e condição fisiológica da planta-matriz, tipo de estaca, potencial genético de enraizamento, substrato, oxidação por compostos fenólicos, época do ano, temperatura, luz,

umidade e balanço hormonal (FACHINELLO et al., 2005). Dentre esses, segundo Pasqual et al. (2001), para a emissão de raízes pelas estacas, é necessário que ocorra um balanço hormonal endógeno adequado, especialmente entre auxinas (promotores) e citocininas (inibidores) no processo de iniciação radicular. Conforme Mercier (2004) a auxina estimula células do periciclo a se dividirem formando o primórdio da raiz lateral, o qual se desenvolve atravessando o córtex e emergindo através da epiderme. Auxinas são utilizadas comercialmente para a promoção do enraizamento, especialmente em estacas de plantas que possuem dificuldade no enraizamento. Dentre elas, o ácido indolilbutírico (AIB) é o mais eficiente e utilizado devido a sua propriedade fotoestável, de ação localizada e menos sensível à degradação biológica, quando comparada com as demais auxinas (BIASI, 2002; FACHINELLO et al., 2005; TAIZ; ZEIGER, 2009). O enraizamento adventício é composto por fases que podem ter requisitos hormonais diferentes ou até opostos. Segundo De Klerk et al. (1999), a auxina é necessária para induzir a formação de raízes a partir de 24 até 96 horas após a aplicação, porém pode inibir o crescimento dessas a partir das 96 horas, sendo o tipo e concentração variáveis para cada espécie.

Após a indução da formação de raízes nas estacas, pelo balanço hormonal adequado, conforme Wedling et al. (2002), o substrato apresenta uma importância fundamental para o desenvolvimento dessas raízes, devendo possuir boa capacidade de absorção e retenção de água, baixa densidade, boa aeração e drenagem, isento de pragas, doenças e substâncias tóxicas.

Correia et al. (1998) utilizando estacas de rizomas de *S. chilensis*, obtiveram maior número de raízes e a mais elevada massa seca dessas, através de substrato solo do local de coleta (6,00 e 0,097g), estacas apicais (18,40 e 0,119g) e estacas com 12 gemas (8,22 e 0,125g), respectivamente. Momenté et al. (2001) obtiveram resultados satisfatórios utilizando o fitorregulador AIB no enraizamento de estacas apicais de ramos aéreos de *S. chilensis*, em que a imersão por uma hora em solução aquosa com 250 ppm de AIB promoveu maior acúmulo de massa seca nas raízes e parte aérea.

1.4 Potencial genotóxico

A utilização de plantas na medicina popular de maneira indiscriminada pode causar danos à saúde pública, uma vez que infusões ou chás de plantas medicinais podem conter

substâncias com potencial genotóxico (VICENTINI et al., 2001). Conforme Silva et al. (2003a) a genotoxicidade refere-se à capacidade de substâncias causarem danos ao material genético vegetal e animal, agentes que alteram a sequência do DNA e são “tóxicos” para o gene.

Um bioindicador frequentemente utilizado para avaliar o potencial de genotoxicidade de extratos de plantas medicinais é o sistema teste de *Allium cepa*, de baixo custo, que analisa as células meristemáticas de raízes dessa planta tratadas com infusões ou chás (FACHINETTO et al., 2007; BAGATINI et al., 2009; DALLA NORA et al., 2010; SOUZA et al., 2010). É um teste no qual as raízes são colocadas em contato direto com a substância testada e mensuram danos em sistemas expostos a agentes mutagênicos ou carcinogênicos potenciais, permitindo a avaliação dos efeitos desses danos através da observação de alterações cromossômicas (BAGATINI et al., 2007).

O sistema teste *Allium cepa* é validado pelo Programa Internacional de Segurança Química (IPCS) e o Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP) como um eficiente teste para análise e monitoramento *in situ* da genotoxicidade de substâncias ambientais (CABRERA; RODRIGUEZ, 1999; SILVA et al., 2004). Foi utilizado para detecção de genotoxicidade pela primeira vez por Levan (1938) e em 1985, Fiskesjö realizou as primeiras adaptações do teste para a utilização no monitoramento ambiental, avaliação de compostos solúveis e insolúveis em água até avaliação de efeitos de misturas complexas.

Estudos de sensibilidade e correlação do teste *Allium cepa* com outros testes foram realizados. Rank e Nielsen (1994) mostraram maior sensibilidade do teste de *A. cepa* em relação a outros testes como o de Ames (avaliação do potencial mutagênico de agentes químicos) e *Microscreen* (detecção e identificação de microrganismos em ambientes industriais e biomédicos) e correlação de 82% deste teste com o de carcinogenicidade em roedores. Chauan et al. (1999) indicaram a sensibilidade do teste *Allium cepa* e o correlacionaram com o sistema teste de mamíferos, validando sua utilização para monitorar a genotoxicidade em substâncias de interesse e o potencial de químicos ambientais. Teixeira et al. (2003) realizaram um estudo com a comparação entre o teste de *A. cepa*, células de medula óssea de ratos e linfócitos humanos e foram observados resultados similares nesses três testes *in vivo*.

CAPÍTULO II

GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Solidago chilensis* MEYEN (ASTERACEAE)

RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar o efeito do armazenamento, do ácido giberélico, da embebição, das condições de luminosidade, da população e da temperatura na germinação das sementes de *Solidago chilensis*. Para tanto, foram realizados três experimentos com uso do delineamento inteiramente casualizado: 1) diásporos de uma população de terreno baldio foram armazenados a 10 e 25°C ± 1°C por 15 dias e após assepsia, inoculados em meio Murashige e Skoog 20%, testando-se ácido giberélico nas concentrações 0, 1,5 ou 3,0 mg L⁻¹ e então, mantidos a 25°C sob fotoperíodo de 16 horas ou escuro contínuo; 2) diásporos de duas populações (terreno baldio e casa de vegetação) foram armazenados à temperatura ambiente (± 20°C) por 20 dias e após assepsia foram postos para embeber em água destilada e autoclavada a ± 5°C, durante 0, 12, 24 e 36 horas. Em seguida, foram colocados em caixa gerbox sobre papel filtro e mantidos nas temperaturas de 20 e 25°C em fotoperíodo de 16 horas; 3) diásporos da população de terreno baldio passaram por assepsia e após embebição e semeadura nas mesmas condições do estudo anterior foram mantidos nas temperaturas de 10, 20, 25 e 30°C em fotoperíodo de 16 horas e escuro contínuo. As populações testadas apresentaram diferenças na germinação das sementes, sendo as de terreno baldio as que proporcionaram percentual superior de germinação (57,2%). As sementes germinaram tanto sob escuro contínuo (em média 3,5% e 17,6%) quanto sob fotoperíodo de 16 horas (em média 2,4% e 22,3%) no experimento 1 e 3, respectivamente. O tempo de embebição dos diásporos em água a 5°C ± 1°C por 36 horas, proporcionou maior porcentagem de germinação (56% e 24,7%) e velocidade de germinação no experimento 2 e 3, respectivamente. A temperatura de 20°C, para o experimento 3, proporcionou a maior porcentagem de germinação das sementes de *S. chilensis*, 26,6%.

Palavras-chave: Erva-lanceta. Propagação sexuada. Dormência das sementes.

2.1 Introdução

O conhecimento sobre o comportamento germinativo de sementes é fundamental para estudos futuros em relação à espécie, contribuindo para estratégias adequadas nos diversos âmbitos. *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae), denominada popularmente erva lanceta ou arnica, originária da América do Sul é um subarbusto ereto, com crescimento vigoroso em beira de estradas e terrenos abandonados (LORENZI; MATOS, 2008). Inúmeros fatores podem influenciar o processo de formação e germinação da sua semente.

A planta mãe influencia nas características germinativas da progênie através da herança genética e a movimentação de substâncias químicas dos tecidos maternos para a semente em desenvolvimento (CARDOSO, 2004b). Conforme Ren e Bewley (1998), diferenças genéticas e fisiológicas bem como fatores ambientais ocorrem mesmo se as plantas são cultivadas em ambientes idênticos. Os fatores ambientais incluem a temperatura, luz, umidade e nutrientes, tendo esses, efeitos distintos sobre diferentes espécies (FENNER, 1991).

A temperatura é o fator ambiental mais importante na regulação do tempo de germinação por alterar a velocidade de absorção de água e das reações químicas, sendo que tanto o seu efeito como o da luz, varia muito entre diferentes espécies e populações, (BEWLEY; BLACK, 1994). Para Hartmann et al. (2002) a temperatura regula o tempo de germinação devido ao controle e/ou superação da dormência e à adaptação climática. Conforme esses autores, os efeitos da luz na germinação podem envolver a qualidade (comprimento de onda) e o seu fotoperíodo (duração), fatores que interferem na germinação de sementes como determinantes, dentre outros, do fotoblastismo e da ocorrência ou não de dormência.

Para que a germinação ocorra, deve-se considerar alguns fatores extrínsecos (ambientais) e intrínsecos (sementes), que se não estiverem favoráveis, podem ocasionar a dormência das sementes (BEWLEY; BLACK, 1994). Após serem dispersas, sementes de muitas espécies não germinam até experimentar um período de pós-maturação (BASKIN; BASKIN, 1998).

Vários são os métodos de superação da dormência das sementes, dentre eles a estratificação (tratamento a baixas temperaturas), que parece agir através de uma combinação de alterações fisiológicas no embrião e seus tecidos circundantes (HARTMANN et al., 2002) e as giberelinas, as quais estão entre os principais grupos de reguladores de crescimento

envolvidos na superação da dormência em sementes, por modular o metabolismo celular através da atividade de várias proteínas, de maneira a promover o alongamento embrionário (ZAIDAN; BARBEDO, 2004). Além da dormência, as sementes também podem apresentar inviabilidade. Fatores como polinização insuficiente e estresse ambiental podem influenciar negativamente na viabilidade das sementes, interferindo na reprodução sexuada das espécies (VELTEN; GARCIA, 2005).

As condições para que a propagação por sementes seja bem sucedida dependem, sobretudo, das características da espécie a ser estudada. Na família Asteraceae, estudos sobre a germinação das sementes de várias espécies foram desenvolvidos (FERREIRA et al., 2001; ADEGAS et al., 2003; VELTEN; GARCIA, 2005; MORAIS et al., 2010). No gênero *Solidago* destacam-se as pesquisas de Bratcher et al. (1993) com a espécie *S. petiolaris* Ait. e Walck et al. (2000) com *S. altíssima*, *S. nemoralis* e *S. shortii*. Em relação à espécie *S. chilensis*, estudo realizado por Correia et al. (1999) demonstrou que a temperatura de 20°C foi a que proporcionou maior porcentagem de germinação das sementes (20%), aos 14 dias após a semeadura e consideraram as mesmas como fotoblásticas positivas.

Diante da escassez de estudos sobre os aspectos da germinação das sementes de *S. chilensis* e da baixa porcentagem de germinação das sementes (CORREIA et al., 1999), o objetivo deste trabalho foi obter protocolos eficientes de germinação, testando-se no Experimento I (*in vitro*): condições de armazenamento, condições de luminosidade e doses de ácido giberélico; Experimento II (*ex vitro*): temperaturas, tempos de embebição em água a baixa temperatura e populações; Experimento III (*ex vitro*): temperaturas, tempos de embebição e condições de luminosidade.

2.2 Material e métodos

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais pertencente ao Departamento de Biologia, do Centro de Ciências Naturais e Exatas da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria - RS.

Experimento I - Diásporos (cipsela + *pappus*) coletados em maio/2011 em uma população de plantas crescendo naturalmente em terreno baldio, Bairro Camobi, Santa Maria/RS, foram selecionados visualmente, considerando uniformidade e descartando-se impurezas e frutos deteriorados. Após, foram acondicionados em sacos de papel e

armazenados a 10 e $25 \pm 2^\circ\text{C}$ por 15 dias. A assepsia foi realizada em câmara de fluxo laminar, a qual consistiu de 30 segundos em etanol 70%, 15 minutos em hipoclorito de sódio 1,5% e finalizando com três lavagens em água esterilizada.

Como substrato foi utilizado 20% dos sais totais do meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), semi-solidificado com 6 g L^{-1} de ágar, pH ajustado para $5,8 \pm 2$ e em seguida autoclavado a 120°C , 1,5 atm, durante 20 minutos. Quando a temperatura do meio encontrava-se a $\pm 40^\circ\text{C}$, adicionou-se o fitorregulador ácido giberélico (GA_3) em câmara de fluxo laminar, nas concentrações de 0, 1,5 ou $3,0 \text{ mg L}^{-1}$. Os diásporos foram inoculados em frascos de vidro, em que cada vidro com 4 mL de meio recebeu um diásporo. O experimento foi conduzido em sala de crescimento a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ sob duas condições de luminosidade: fotoperíodo de 16 horas (radiação fotossinteticamente ativa (R.F.A.) de $\sim 36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, lâmpadas fluorescentes brancas) e escuro contínuo.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado e o experimento constituiu-se de um trifatorial $2 \times 2 \times 3$ (duas condições de armazenamento, duas condições de luminosidade e três concentrações de GA_3), totalizando 12 tratamentos, com três repetições cada tratamento e 30 frutos por repetição.

Experimento II - Diásporos coletados em maio/2012 de duas populações, plantas crescendo em terreno baldio em Dona Francisca/RS e plantas cultivadas em casa de vegetação climatizada a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ (provenientes de terreno baldio – Camobi, Santa Maria/RS), no Departamento de Biologia, CCNE, UFSM (Santa Maria/RS), foram selecionados visualmente, acondicionados em sacos de papel e armazenados à temperatura ambiente ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) por 20 dias. Após, passaram pela mesma assepsia do experimento anterior, sendo acrescida imersão durante cinco minutos em Carbendazim 500 mg L^{-1} , na concentração de $0,25 \text{ mg L}^{-1}$.

Os diásporos foram postos para embeber em água esterilizada na temperatura de $5 \pm 1^\circ\text{C}$, por períodos de tempo de 0, 12, 24 e 36 horas. Após a embebição, o experimento foi conduzido em caixas tipo gerbox, em que 25 frutos foram distribuídos de modo uniforme sobre três folhas de papel-filtro, umedecidas com 15 mL de água esterilizada. Os frutos foram mantidos em câmara BOD a 20°C e sala de crescimento a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, ambas sob fotoperíodo de 16 horas, sendo a última com R.F.A. de $\sim 36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado e o experimento constituído de um trifatorial $2 \times 4 \times 2$ (duas temperaturas, quatro tempos de embebição em água e duas populações), totalizando 16 tratamentos, com quatro repetições formadas por 25 frutos.

Experimento III - Diásporos coletados em maio/2012 em uma população de terreno baldio em Santa Maria/RS foram selecionados visualmente e imediatamente após a coleta e seleção passaram pela mesma assepsia dos experimentos anteriores, aumentando-se o tempo de imersão no fungicida de cinco para dez minutos. Após a embebição, o experimento foi conduzido em caixas tipo gerbox, em que 30 frutos foram distribuídos de modo uniforme sobre três folhas de papel-filtro, umedecidas com 15 mL de água esterilizada. Os frutos permaneceram em câmara BOD a 10 e 20°C, e em sala de crescimento a 25 e 30 ± 2°C, sob mesmo fotoperíodo ou escuro contínuo. Nesse último caso, as caixas foram envoltas por duas folhas de papel alumínio, de maneira que nenhum feixe de luz penetrasse nas sementes.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, constituído de um trifatorial 4 x 4 x 2 (quatro tempos de embebição em água, quatro temperaturas e duas condições de luminosidade), totalizando 32 tratamentos, com três repetições formadas por 30 frutos.

Em todos os estudos foram consideradas sementes germinadas quando a protrusão da radícula através dos tegumentos e fruto, se tornou visível. Avaliou-se a porcentagem de germinação para os experimentos I, II e III, aos 60, 21 e 23 dias, respectivamente; o índice de velocidade de germinação (IVG) de acordo com Maguire (1962) nos estudos II e III e o comprimento de raiz no final do 3º experimento. O IVG foi avaliado pela contagem diária das sementes (protrusão da raiz primária) na presença e ausência de luz, sendo que para essa última, a avaliação foi realizada sob luz verde. O comprimento da raiz foi obtido medindo-se desde o colo da plântula até a extremidade da raiz primária, em centímetros.

2.2.1 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), sendo transformados quando necessário. As análises complementares ocorreram através do teste de Tukey e análise de regressão ($p \leq 0,05$), ambos com auxílio do software SOC (EMBRAPA, 1997).

2.3 Resultados e discussão

2.3.1 Experimento I

O resumo da análise de variância (Tabela 1) demonstra que não houve interação entre os fatores. Os tratamentos testados não influenciaram significativamente a germinação das sementes de *S. chilensis* (Tabela 2). De maneira geral, as porcentagens de germinação de todos os tratamentos foram baixas. Embora alguns tenham apresentado o dobro ou mais de sementes germinadas em relação a outros, não ocorreu diferença significativa entre os tratamentos, devido a repetições de um mesmo tratamento apresentarem elevada variação na germinação, sendo muito ocorrente a ausência de sementes germinadas em algumas repetições, ocasionada, possivelmente, devido ao heteromorfismo dessas, característica encontrada em espécies da família Asteraceae (IMBERT, 2002).

Tabela 1 - Resumo da análise de variância para a porcentagem de germinação das sementes de *Solidago chilensis*, nos tipos de armazenamento a 10 e 25 ± 2°C (TA), condições de luminosidade fotoperíodo de 16 horas e escuro contínuo (CL) e fitorregulador nas concentrações 0,0, 1,5 e 3,0 mg L⁻¹ de GA₃ (CF), totalizando 12 tratamentos, utilizando-se três repetições por tratamento, cada uma composta por 30 frutos. Santa Maria – RS (2012).

Fontes de Variação	GL	Quadrado médio Germinação
Tipo de armazenamento (TA)	1	0,051 ^{ns}
Condições de luminosidade (CL)	1	0,051 ^{ns}
Concentrações de GA ₃ (CF)	2	0,111 ^{ns}
TA x CL	1	0,020 ^{ns}
TA x CF	2	0,050 ^{ns}
CL x CF	2	0,011 ^{ns}
TA x CL x CF	2	0,045 ^{ns}
Resíduo	24	0,104
CV (%)		24,531

ns - F não significativo a 5% de probabilidade de erro.

As maiores porcentagens de germinação ocorreram no T8 (6,66%) e T9 (4,44%), nos quais a temperatura de armazenamento foi de 25°C, cultivo em escuro contínuo e utilização de GA₃ nas doses 1,5 e 3,0 mg L⁻¹, respectivamente (Tabela 2). O fato de a germinação ter

ocorrido tanto em fotoperíodo como em escuro contínuo se deve provavelmente à influência de vários fatores, dentre eles, as condições sobre as quais a planta gerou as sementes, diferenças na maturação dessas, sendo comum a ocorrência de heteromorfismo das sementes de espécies desta família. Quando comparada a germinação de sementes de distintas populações oriundas de diferentes regiões, possivelmente fatores ambientais como a temperatura e luz, exercem elevada influência no desenvolvimento das sementes, culminando em diferentes respostas em relação a sua germinação. A menor porcentagem (1,11%) ocorreu nos tratamentos onde o armazenamento foi a 10°C, fotoperíodo de 16 horas, nas doses de 0,0 e 3,0 mg L⁻¹ de GA₃ (T4 e T6) e no T7 (armazenamento a 25°C + escuro contínuo + 0,0 mg L⁻¹ de GA₃) (Tabela 2).

Tabela 2 - Porcentagem de germinação das sementes de *Solidago chilensis*, submetidas aos tratamentos, com três repetições, cada uma contendo 30 frutos. Santa Maria – RS (2012).

Tratamentos	Germinação (%)
T1: 10°C + escuro contínuo + 0,0 mg L ⁻¹ de GA ₃	3,33 a *
T2: 10°C + escuro contínuo + 1,5 mg L ⁻¹ de GA ₃	2,22 a
T3: 10°C + escuro contínuo + 3,0 mg L ⁻¹ de GA ₃	3,33 a
T4: 10°C + fotoperíodo de 16 horas + 0,0 mg L ⁻¹ de GA ₃	1,11 a
T5: 10°C + fotoperíodo de 16 horas + 1,5 mg L ⁻¹ de GA ₃	3,33 a
T6: 10°C + fotoperíodo de 16 horas + 3,0 mg L ⁻¹ de GA ₃	1,11 a
T7: 25°C + escuro contínuo + 0,0 mg L ⁻¹ de GA ₃	1,11 a
T8: 25°C + escuro contínuo + 1,5 mg L ⁻¹ de GA ₃	6,66 a
T9: 25°C + escuro contínuo + 3,0 mg L ⁻¹ de GA ₃	4,44 a
T10: 25°C + fotoperíodo de 16 horas + 0,0 mg L ⁻¹ de GA ₃	2,22 a
T11: 25°C + fotoperíodo de 16 horas + 1,5 mg L ⁻¹ de GA ₃	3,33 a
T12: 25°C + fotoperíodo de 16 horas + 3,0 mg L ⁻¹ de GA ₃	3,33 a

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Esses resultados demonstram que as sementes desta espécie apresentam um tipo de dormência, provavelmente provocada pela impermeabilidade à entrada de água e/ou trocas gasosas, uma vez que o diásporo constitui-se da semente condescida ao fruto. Trabalhos com espécies de Asteraceae como *Echinacea angustifolia*, *Bidens pilosa* e *Egletes viscosa*, foram desenvolvidos com o intuito de superar a dormência das sementes e obtiveram bons resultados testando o efeito da luz, temperatura, GA₃, resfriamento e etileno para *Echinacea angustifolia*, embebição em água para *Bidens pilosa* e embebição em água e GA₃ para *Egletes viscosa* (MACCHIA et al., 2001; ADEGAS et al., 2003; BEZERRA et al., 2006).

As giberelinas estão entre os principais reguladores de crescimento envolvidos na superação da dormência de sementes, por promover a síntese de enzimas envolvidas no enfraquecimento dos tegumentos, hidrólise e mobilização de reservas e no alongamento embrionário, resultando na protusão da radícula (BEWLEY; BLACK, 1994, BEWLEY, 1997, HARTMANN et al., 2002; ZAIDAN; BARBEDO, 2004). A utilização desse fitoregulador não influenciou na germinação das sementes da espécie *S. chilensis* pois com 1,5 ou 3,0 mg L⁻¹ de ácido giberélico no meio de cultivo, a porcentagem de germinação foi em média 3,4%, já a não utilização proporcionou em média 1,9% de sementes germinadas (Tabela 2). Conforme Agustí e Almela (1991), a resposta das plantas aos fitoreguladores depende de muitos fatores, entre eles os genéticos e ambientais, por interferirem no nível endógeno de hormônios e de suas substâncias antagônicas.

Muitas espécies produzem sementes que não germinam logo após a dispersão e requerem um período de armazenamento a seco (BASKIN; BASKIN, 1998). Esse armazenamento foi testado no presente experimento sob duas condições (10 e 25 ± 2°C), porém nenhuma das temperaturas testadas teve efeito significativo sobre a germinação, possivelmente devido aos 15 dias não terem sido suficientes para expressar alguma diferença na maturação das sementes, necessitando de um tempo mais elevado de armazenamento, embora o armazenamento por 15 dias sob 25°C e escuro contínuo tenha apresentado uma tendência de maior germinação (6,66%) (Tabela 2). Isso pode ter ocorrido, devido a semente em seu ambiente natural germinar em temperatura igual ou próxima aos 25°C. Fatores ambientais como umidade, temperatura e oxigênio podem afetar a pós-maturação (BEWLEY; BLACK, 1994) e conforme Cavers (1974), sementes de *Rumex crispus* (Polygonaceae) de diferentes populações ou de plantas matrizes diferentes dentro de uma população, apresentaram respostas divergentes na germinação após o armazenamento.

Embora as porcentagens de germinação tenham sido baixas no presente estudo, as sementes de *S. chilensis* germinaram tanto na presença como na ausência de luz, alcançando

um percentual médio de 3,5% em escuro contínuo e 2,4% em fotoperíodo de 16 horas (Tabela 2), podendo ser consideradas fotoblásticas neutras. Klein e Felipe (1991) estudaram o efeito da luz na germinação de sementes de ervas invasoras e constataram fotoblastismo positivo na maioria das espécies, porém, esses resultados foram quantitativos, uma vez que, ocorreu também germinação das sementes no escuro, como por exemplo, para a espécie *Bidens pilosa* (Asteraceae), sendo considerada fotoblástica preferencial.

O tempo necessário para as sementes de *S. chilensis* germinarem foi relativamente longo e desuniforme, iniciando a germinação no terceiro dia de cultivo, estendendo-se até os sessenta dias (dados não demonstrados). Essa é uma característica das sementes de espécies de Asteraceae, provavelmente devido às flores estarem reunidas num capítulo e a abertura das mesmas ocorrerem da periferia para o centro, promovendo uma produção e maturação diferencial dos frutos. Imbert e Ronce (2001) estudando a plasticidade fenotípica e a habilidade na dispersão dos frutos de *Crepis sancta* (Asteraceae), observaram a existência de diferenças na alocação de recursos devido à estrutura do capítulo. Além disso, as sementes de uma mesma população, planta ou até mesmo na inflorescência, não experimentam as mesmas condições ambientais durante o amadurecimento, podendo em um mesmo genótipo, apresentar diferentes graus de dormência (GUTTERMAN, 1985). Distintas condições e tempo de armazenamento podem causar em sementes de ervas invasoras diferentes condições de maturação, superando a dormência em intervalos de tempo irregulares, exibindo germinação intermitente (QADERI et al., 2003), bem como diferenças na emergência das plântulas.

2.3.2 Experimento II

Como no experimento I os resultados de porcentagem de germinação das sementes foram menores que 10% neste experimento estudou-se outros fatores como embebição, populações e temperaturas. O resumo da análise de variância (Tabela 3) mostra que para a porcentagem de germinação das sementes, houve interação entre os tempos de embebição das sementes em água na temperatura de $5 \pm 2^\circ\text{C}$ (0, 12, 24 e 36 horas) e as sementes coletadas de duas populações (plantas crescendo em terreno baldio em Dona Francisca-RS e plantas cultivadas em casa de vegetação climatizada a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, em Santa Maria-RS). Para o índice de velocidade de germinação, as temperaturas, os tempos de embebição e as populações

interagiram entre si. Assim, cada uma dessas interações recebeu os desdobramentos que as contemplassem.

Tabela 3 - Resumo da análise de variância para a porcentagem de germinação das sementes (G) e índice de velocidade de germinação (IVG) de *Solidago chilensis*, nas temperaturas 20 e 25°C (T), embebição durante 0, 12, 24 e 36 horas (E) e população de terreno baldio em Dona Francisca-RS e casa de vegetação climatizada $25 \pm 2^\circ\text{C}$ (P), totalizando 16 tratamentos, utilizando-se quatro repetições por tratamento, cada uma composta por 25 frutos. Santa Maria – RS (2012).

Fontes de Variação	GL	Quadrado Médio	
		G	IVG
Temperatura (T)	1	0,5630 ^{ns}	106,2797*
Embebição (E)	3	7,2608*	154,3807*
População (P)	1	517,9668*	5116,6*
T x E	3	17,414 ^{ns}	63,1836*
T x P	1	0,5630 ^{ns}	110,0765*
E X P	3	6,6918*	156,9393*
T x E x P	3	0,8251 ^{ns}	59,0915*
Resíduo	48	0,9001	16,5640
CV (%)		26,0627	45,2550

** - F significativo a 5% de probabilidade de erro, ns - F não significativo a 5% de probabilidade de erro.

As temperaturas testadas, 20 e 25°C, não apresentaram efeito sobre a germinação das sementes de *S. chilensis* (dados não demonstrados), tendo percentuais de germinação semelhantes, respectivamente 21 e 23%, os quais não diferiram significativamente, contrariando o estudo de Correia et al. (1999) com essa espécie, onde a temperatura de 20°C foi considerada a mais efetiva para a germinação das sementes (20%), já aos 25°C, a germinação foi de apenas 2%. De acordo com Bewley e Black (1994), a temperatura afeta a capacidade de germinação das sementes de cada população, ocorrendo limites mínimo, máximo e uma faixa térmica ótima, na qual é obtida a maior porcentagem de germinação, em que acima e abaixo desta faixa o processo é mais lento e a porcentagem pode ser menor.

Em relação às populações estudadas e os tempos de embebição, os resultados evidenciam que o ambiente no qual as plantas se desenvolvem influencia na germinação das sementes (Tabela 4). Observa-se que a população 1 (plantas de terreno baldio), em todos os tempos de embebição, apresentou os maiores percentuais de germinação, com um máximo de

59%, diferindo da população 2 (plantas de casa de vegetação climatizada), onde o maior valor foi 0,5%. Para todos os tempos de embebição, as porcentagens de germinação apresentadas pelas sementes oriundas da população 1 diferiram da população 2, a qual praticamente não teve sementes germinadas. Estas, das quais as sementes foram coletadas, eram oriundas do rebrote dos rizomas em casa de vegetação climatizada. Provavelmente, as condições de umidade relativa do ar, fotoperíodo e temperatura, entre outros, tenham influenciado no desenvolvimento das plantas, bem como nas sementes e na maturação do embrião. Além disso, visualmente as sementes, por ocasião da coleta, mostravam-se com menores dimensões do que as oriundas das plantas crescendo naturalmente em terreno baldio (dados não demonstrados). Segundo Cardoso (2004a), a temperatura atua tanto na indução e superação de dormência, como no crescimento embrionário e as flutuações térmicas às quais as sementes são expostas continuamente constituem importante sinal do ambiente no controle das distintas etapas do desenvolvimento das plantas.

Tabela 4 – Porcentagem de germinação das sementes de *Solidago chilensis* nas populações em cada um dos tempos de embebição. Santa Maria – RS (2012).

População	Tempos de embebição (horas)			
	0	12	24	36
1 (terreno baldio)	26,50 aB*	36,00 aB	59,00 aA	56,00 aA
2 (casa de vegetação)	0,00 bA	0,50 bA	0,50 bA	0,00 bA

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Dentre os tempos de permanência das sementes em água a $5 \pm 2^\circ\text{C}$, 24 e 36 horas de embebição foram os tratamentos que forneceram maior porcentagem de germinação, 59 e 56%, respectivamente (Tabela 4), atuando positivamente na superação da dormência das sementes desta espécie, mostrando a necessidade das sementes em passar por algum método de superação, a fim de apresentar porcentagens significativamente superiores de germinação em relação a não embebição ou essa por apenas 12 horas. Bezerra et al. (2006), observaram que sementes de *Egletes viscosa* (Asteraceae) embebidas em água a 25°C por 24 e 48 horas, elevaram a porcentagem de germinação de 50 para 60% e também a velocidade de germinação, assim como, Macedo et al. (2009) em estudo com *Magonia pubescente*

(Sapindaceae), constataram que a pré-embebição das sementes em água por 24 horas, proporcionou elevação no percentual de germinação de 41,5% para 80% e plântulas mais vigorosas.

A temperatura da água para a embebição é importante para a eficiência na superação da dormência das sementes. Segundo Hartmann et al. (2002) a temperatura é o fator mais importante no controle da estratificação de sementes e pode diferir entre as espécies, estando isso relacionado com a origem climática de cada uma, sendo as temperaturas entre -5 a 7°C as mais eficazes. A estratificação de sementes hidratadas à temperatura entre 4 e 6°C é utilizada para casos de dormência fisiológica ou morfológica (CARDOSO, 2004a). Bratcher et al. (1993) testaram o efeito da estratificação a seco (5°C) após 0, 2, 4, 6, 8 e 10 semanas, em cinco espécies ornamentais, dentre as quais *Solidago petiolaris* Ait., sendo observado que a porcentagem de germinação aumentou em todas as espécies após essas semanas de estratificação. Para *Solidago petiolaris*, o tempo máximo de estratificação, 10 semanas, foi o mais eficiente, com 95% de sementes germinadas.

Em relação ao índice de velocidade de germinação (IVG), a Tabela 5 mostra primeiramente cada uma das populações submetidas a diferentes temperaturas e tempos de embebição. Nota-se que as sementes obtidas da população 1 apresentaram um IVG mais elevado, diferindo significativamente das da população 2 (praticamente não teve sementes germinadas, por isso apresentou IVG quase nulo) em todas as temperaturas e tempos de embebição avaliados, com exceção na temperatura de 20°C e na ausência de embebição. Esse fato ocorreu provavelmente devido as sementes que não foram embebidas terem demorado mais para germinar e assim não ser suficiente para diferir da população 2. Ainda na Tabela 5, foi observado que o índice de velocidade de germinação não apresentou diferença entre as temperaturas nos distintos tempos de embebição, com exceção do IVG significativamente superior para a temperatura de 25°C, quando em embebição por 36 horas em água.

Estes resultados demonstram novamente o favorecimento do método de estratificação através da embebição, proporcionando uma maior velocidade de germinação das sementes em relação a não embebição, possivelmente auxiliando nas trocas gasosas e maturação do embrião. Conforme Nakagawa (1999), quanto maior o IVG, maior é a velocidade de germinação, permitindo inferir que mais vigoroso é o lote de sementes. Adegas et al. (2003), estudando a germinação de sementes de *Bidens pilosa*, também observaram que o maior período de embebição (48 horas), foi o que propiciou os maiores índices de velocidade de germinação. O resultado positivo desse método de estratificação ocorreu provavelmente devido a dormência das sementes de *S. chilensis* ter sido superada de maneira mais rápida.

Segundo Cardoso (2004a), a água além de ser um fator determinante no processo de germinação, também pode atuar na superação da dormência.

Tabela 5 – Índice de velocidade de germinação das sementes de *Solidago chilensis* oriundas de duas populações (terreno baldio e casa de vegetação), duas temperaturas (20 e 25°C) e quatro tempos de embebição (0, 12, 24 e 36 horas). Santa Maria – RS (2012).

População	Temperatura (°C) + Embebição (horas)	
	20 + 0	25 + 0
1 (terreno baldio)	10,15 aA*	13,87 aA
2 (casa de vegetação)	0,00 aA	0,00 bA
	20 + 12	25 + 12
1 (terreno baldio)	15,66 aA	11,28 aA
2 (casa de vegetação)	0,29 bA	0,00 bA
	20 + 24	25 + 24
1 (terreno baldio)	17,66 aA	24,63 aA
2 (casa de vegetação)	0,00 bA	0,11 bA
	20 + 36	25 + 36
1 (terreno baldio)	17,86 aB	32,34 aA
2 (casa de vegetação)	0,00 bA	0,00 bA

* Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna indicam comparação entre as populações 1 e 2 em cada uma das temperaturas e tempos de embebição, enquanto que letras maiúsculas na linha indicam comparação entre as temperaturas em cada um dos tempos de embebição e populações. Teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Conforme ocorreu para a porcentagem de germinação de sementes, para o IVG também foram ajustados modelos de regressão para a população 1 (terreno baldio) (Figura 1) e nenhum modelo se ajustou para explicar o comportamento da população 2, devido a baixa quantidade de sementes germinadas (0,5%).

A figura 1 indica que para a temperatura de 20°C, o período ideal em água para que as sementes germinem mais rapidamente, está entre 24 e 36 horas. Na temperatura de 25°C o tempo de embebição ideal foi o de 36 horas, proporcionando um IVG mais elevado (Figura 1).

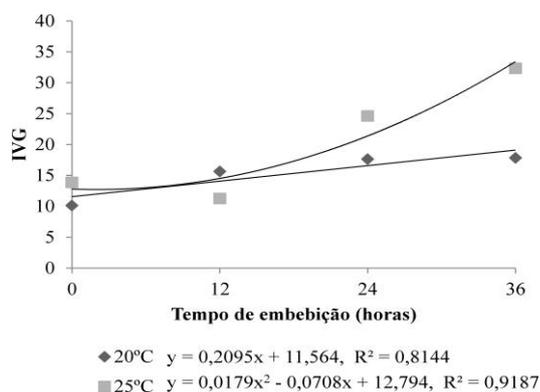


Figura 1 - Índice de velocidade de germinação das sementes de *Solidago chilensis* em função dos tempos de embebição na temperatura de 20 e 25°C para a população 1 (terreno baldio).

A temperatura apresenta elevada influência na velocidade de germinação. Segundo Carvalho e Nakagawa (2000), ela tem efeito na absorção de água pela semente e nas reações bioquímicas que regulam o metabolismo necessário para iniciar o processo germinativo. Dentre os tempos de embebição em água a $5 \pm 2^\circ\text{C}$ utilizados neste estudo, o de 36 horas, tem sido, na maioria das vezes, o mais eficiente como método de estratificação para superar a dormência desta espécie, bem como fazer com que suas sementes germinem mais rapidamente, tendo em vista a necessidade de 21 dias neste experimento (dados não demonstrados) para o término da germinação, período inferior ao de 60 dias necessários no experimento I, no qual outros métodos foram utilizados (armazenamento, tratamento químico com ácido giberélico e dois regimes de luz).

2.3.3 Experimento III

Verificou-se pelo resumo da análise de variância (Tabela 6) que para a germinação e o índice de velocidade de germinação das sementes houve interação entre as temperaturas, tempos de embebição e regimes de luz. Diante disso, as análises complementares foram realizadas de modo a contemplar essa interação. Para a variável comprimento de raiz, ocorreu interação entre as temperaturas e os regimes de luz, recebendo os desdobramentos de forma a contemplá-la.

Conforme observado na figura 2a, quando as sementes ficaram em embebição durante 12 horas e fotoperíodo de 16 horas, proporcionaram uma maior porcentagem de germinação

(55%) na temperatura mínima testada (10°C). Nos tempos de embebição 24 e 36 horas - escuro contínuo, o maior percentual de germinação também foi na temperatura de 10°C. Tanto na ausência de embebição (0), como no tempo máximo (36 horas) e fotoperíodo, a temperatura de 20°C foi a que proporcionou 23% e 33% de sementes germinadas, respectivamente. De maneira geral, independente do tempo de embebição, a germinação de sementes no escuro ocorreu em temperaturas mais baixas (20°C ou inferior) e no fotoperíodo de 16 horas ocorreu em temperaturas mais elevadas (20°C ou superior). A interação ocorrida entre luz e temperatura pode ter influenciado nesse processo, em que, dependendo da temperatura que as sementes permaneceram expostas, foram fotossensíveis ou não. Conforme Taylorson e Hendricks (1972) é comum haver interação entre luz e temperatura, sendo esta, uma das mais importantes para promover a germinação das sementes. Ferreira et al. (2001), também citam a ausência ou presença de luz combinada com diferentes temperaturas, fatores que desencadeiam a germinação das sementes.

Tabela 6 - Resumo da análise de variância para a germinação das sementes (G), índice de velocidade de germinação (IVG) e comprimento da raiz principal (CRP) de *Solidago chilensis*, nas temperaturas 10, 20, 25 e 30°C (T), embebição por 0, 12, 24 e 36 horas (E) e condições de luminosidade fotoperíodo de 16 horas e escuro contínuo (CL), totalizando 32 tratamentos, utilizando-se três repetições por tratamento, cada uma composta por 30 frutos. Santa Maria – RS (2012).

Fontes de Variação	GL	Quadrado Médio		
		G	IVG	CRP
Temperatura (T)	3	1338,7345*	186,0152*	0,1314*
Embebição (E)	3	884,1049*	235,5165*	0,0005 ^{ns}
Condições de luminosidade (CL)	1	535,1851*	210,6148*	0,5701*
T x E	9	247,4794*	47,6938*	0,0068 ^{ns}
T x CL	3	195,6790*	66,7299*	0,1437*
E X CL	3	59,5679 ^{ns}	1,0978 ^{ns}	0,0009 ^{ns}
T x E x CL	9	359,9794*	60,0371*	0,0048 ^{ns}
Resíduo	64	77,5462	17,9717	0,0054
CV (%)		44,1836	49,9478	7,6498

* - F significativo a 5% de probabilidade de erro, ns - F não significativo a 5% de probabilidade de erro.

Na figura 2b, para a maioria das combinações de temperaturas e regimes de luz (10 e 25°C - escuro contínuo; e 20 e 30°C - fotoperíodo), 36 horas em embebição proporcionou o percentual mais elevado de sementes germinadas (em média 30%). Algumas combinações de temperatura, tempos de embebição e condições de luminosidade não estão demonstradas na figura 3, devido a não ocorrência de ajuste destes modelos de regressão para as tais, não sendo significativas (0 horas em embebição e escuro contínuo; 24 horas em embebição e fotoperíodo de 16 horas; 25°C e fotoperíodo de 16 horas e 30°C e escuro contínuo). Isso também ocorreu para as seguintes combinações da figura 3 (0 horas em embebição e escuro contínuo; 0 horas em embebição e fotoperíodo de 16 horas; 12 horas em embebição e fotoperíodo de 16 horas; 24 horas em embebição e escuro contínuo; 10°C e escuro contínuo; 25°C e escuro contínuo e 30°C e escuro contínuo).

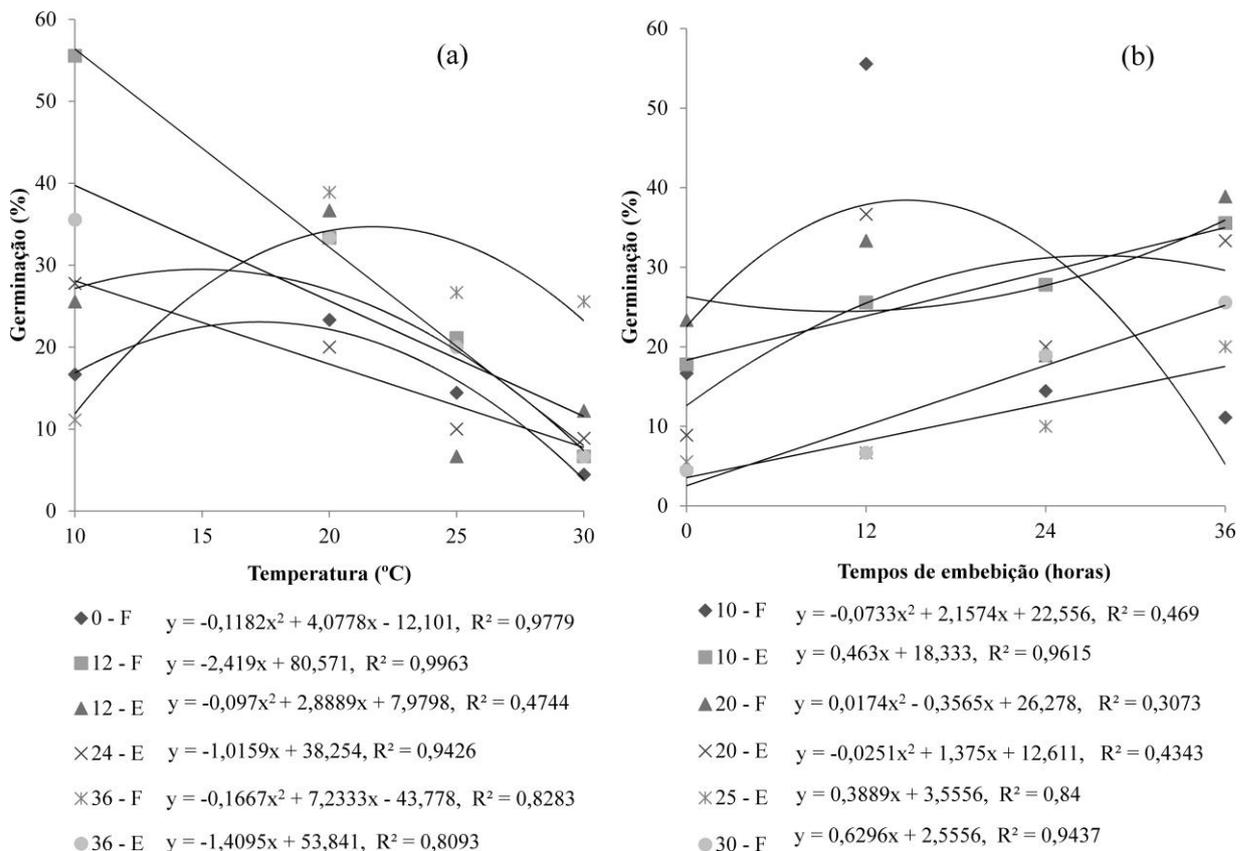


Figura 2 – Porcentagem de germinação das sementes de *Solidago chilensis* submetidas a diferentes temperaturas, tempos de embebição e regimes de luz.

0 - F = 0 horas em embebição e fotoperíodo de 16 horas;
 12 - F = 12 horas em embebição e fotoperíodo de 16 horas;
 12 - E = 12 horas em embebição e escuro contínuo;
 24 - E = 24 horas em embebição e escuro contínuo;
 36 - F = 36 horas em embebição e fotoperíodo de 16 horas;

36 - E = 36 horas em embebição e escuro contínuo;
10 - F = 10°C e fotoperíodo de 16 horas;
10 - E = 10°C e escuro contínuo;
20 - F = 20°C e fotoperíodo de 16 horas;
20 - E = 20°C e escuro contínuo;
25 - E = 25°C e escuro contínuo;
30 - F = 30°C e fotoperíodo de 16 horas.

Pode ser observado na figura 3, o índice de velocidade de germinação das sementes de *S. chilensis*, em que aumentando-se o tempo de embebição (24 ou 36 horas) aliados ao fotoperíodo, a temperatura ideal para um IVG máximo foi 25°C. Em escuro contínuo e 36 horas de embebição, as sementes germinaram mais rápido aos 20°C (Figura 3a), confirmando, de maneira geral, o que ocorreu também para a porcentagem de germinação, ou seja, quando em escuro contínuo as sementes germinaram em temperaturas mais baixas e em fotoperíodo isso ocorreu em temperaturas mais elevadas.

A velocidade de germinação será elevada em decorrência de a temperatura ser apropriada à eficiente atividade das enzimas envolvidas no controle da germinação (LABOURIAU; LABOURIAU, 1997). De acordo com Carvalho e Nakagawa (2000), temperaturas inferiores ou superiores à ótima tendem a reduzir a velocidade do processo germinativo, expondo as plântulas a fatores adversos por maior período, podendo acarretar na redução da germinação. Da mesma maneira que o Experimento II, as sementes reduziram o tempo de germinação em relação ao Experimento I, de 60 para 23 dias, mostrando que os métodos para tentar superar a dormência da espécie foram aprimorados. Esse resultado é benéfico, tendo em vista a maior uniformidade de sementes germinadas.

Na figura 3b, da mesma maneira que a figura 2b, para todas as temperaturas, com exceção de 10°C e fotoperíodo de 16 horas, o tempo de embebição de 36 horas foi o mais adequado para que as sementes germinem mais rapidamente. Esse aumento da porcentagem e IVG no tempo de embebição mais elevado (36 horas) concorda com o encontrado no processo germinativo de espécies da mesma família. Bezerra et al. (2006), verificaram que sementes de *Egletes viscosa*, embebidas em água a $5 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 e 48 horas aumentaram a porcentagem e a velocidade de germinação, sendo que a velocidade aumentou linearmente, em função do tempo de embebição das sementes.

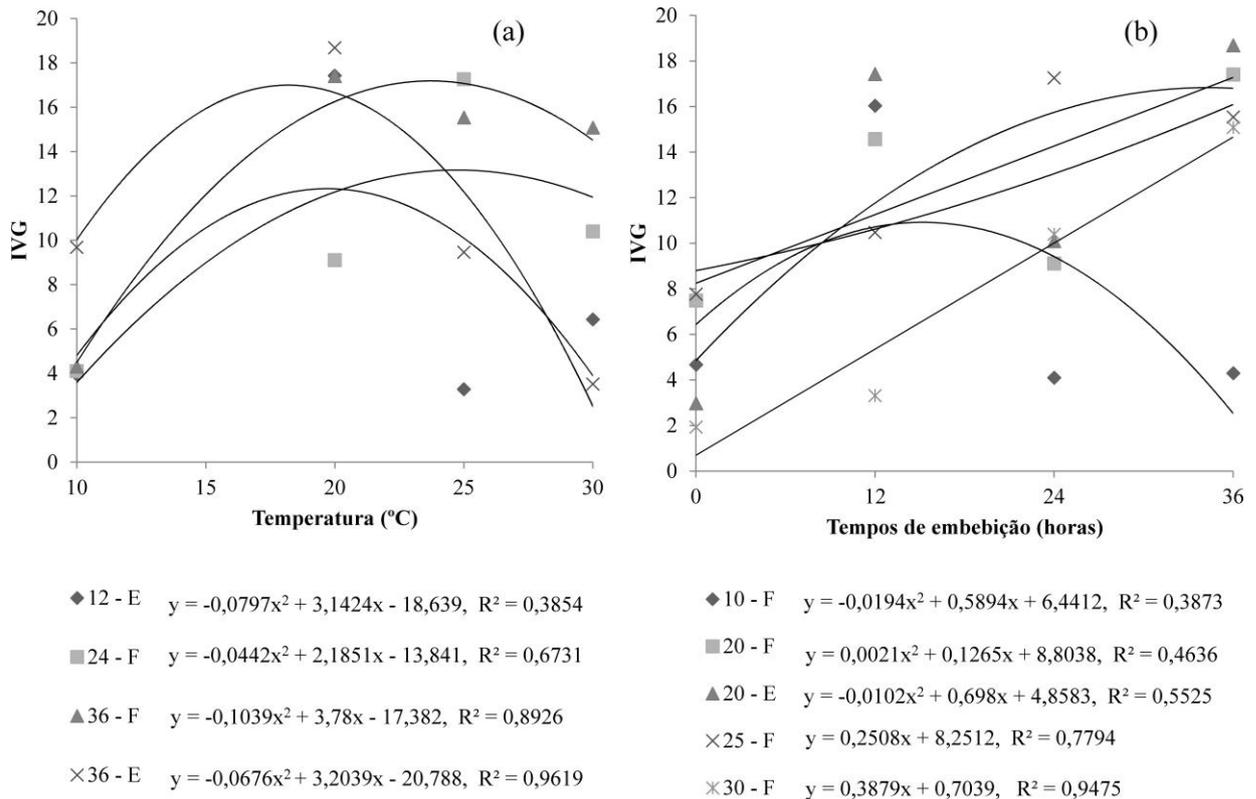


Figura 3 – Índice de velocidade de germinação das sementes de *Solidago chilensis* submetidas a diferentes temperaturas, tempos de embebição e regimes de luz.

12 - E = 12 horas em embebição e escuro contínuo;
 24 - F = 24 horas em embebição e fotoperíodo de 16 horas;
 36 - F = 36 horas em embebição e fotoperíodo de 16 horas;
 36 - E = 36 horas em embebição e escuro contínuo;
 10 - F = 10°C e fotoperíodo de 16 horas;
 20 - F = 20°C e fotoperíodo de 16 horas;
 20 - E = 20°C e escuro contínuo;
 25 - F = 25°C e fotoperíodo de 16 horas;
 30 - F = 30°C e fotoperíodo de 16 horas.

Os melhores resultados para a germinação das sementes bem como para o IVG ocorreram em temperaturas inferiores à máxima testada (30°C). ZHAO et al. (1994) relataram que para sementes de algumas espécies, temperaturas elevadas ($\pm 40^\circ\text{C}$) promovem a aceleração da atividade respiratória, podendo acarretar redução ou até inibição do processo germinativo. No presente experimento, observou-se de maneira geral, que as sementes de *S. chilensis* submetidas ao fotoperíodo de 16 horas, apresentaram a maior porcentagem de germinação e o maior IVG em temperaturas mais elevadas, aproximadamente 20 e 25°C, respectivamente (Figuras 3 e 4). Quando mantidas em escuro contínuo, a temperatura de 10°C ou inferior promoveu a maior porcentagem e a de 20°C ou inferior a essa, o maior IVG. De acordo com Cardoso (2004a), as faixas térmicas ótimas de germinabilidade e de velocidade,

em algumas situações, não coincidem, conforme o ocorrido neste estudo. Braga et al. (2010) obtiveram resultado similar na germinação das sementes de *Senna alata* (L.) Roxb (Fabaceae) em que à temperatura de 15°C, a germinação e o IVG foram estatisticamente superiores no escuro, já entre 20 e 40°C predominaram as fotoblásticas neutras e a velocidade de germinação é favorecida na presença de luz.

Os efeitos da luz podem depender da temperatura (ZAIDAN; BARBEDO, 2004; MORAIS et al., 2010). Algumas variedades de *Lactuca sativa* L. (Asteraceae) aos 25°C necessitam de luz para germinar, porém germinam no escuro quando em temperaturas abaixo dessa (WAREING; PHILLIPS, 1973). Gomes e Fernandes (2002) obtiveram para a espécie *Baccharis dracunculifolia* D. C. (Asteraceae), as maiores porcentagens de germinação (\pm 80%) e índice de velocidade de emergência para frutos incubados a 15 e 20°C na presença de luz e a 15°C no escuro.

A Tabela 7 mostra as porcentagens de germinação das sementes para as condições de luminosidade em cada uma das temperaturas e tempos de embebição. As sementes expostas a 12 horas de embebição em água a $5 \pm 2^\circ\text{C}$, temperatura de 10°C e ao fotoperíodo de 16 horas apresentaram 55,5% de germinação e diferiram das porcentagens das sementes mantidas nas mesmas condições e no escuro contínuo (25,55%). Para as demais combinações, não ocorreram diferenças significativas entre as duas condições de luminosidade. Mesmo que em algumas situações as porcentagens tenham apresentado elevada diferença, essa não se confirmou estatisticamente, devido à elevada variabilidade de sementes germinadas, ocorrida entre as repetições de um mesmo tratamento, ocasionada, possivelmente, em função do heteromorfismo das sementes, característica encontrada em espécies da família Asteraceae (IMBERT, 2002). Ferreira et al. (2001), estudaram a germinação de sementes de diversas espécies nativas da família Asteraceae no Rio Grande do Sul, sendo constatado que a maioria das espécies é fotoblástica positiva, germinando em percentuais mais altos quando a temperatura é em torno de 20°C ou mais baixa.

No presente estudo, a germinação das sementes de *S. chilensis* não foi restrita à presença de luz, uma vez que também ocorreu no escuro contínuo. Segundo Klein e Felipe (1991), as sementes desta espécie respondem como fotoblásticas positivas preferenciais pelo fato de ter ocorrido germinação no escuro, mas preferencialmente essa foi favorecida na presença de luz. Esses resultados discordam de Correia et al. (1999), os quais encontraram fotoblastismo positivo para esta espécie, possivelmente devido a interação que ocorreu entre as condições de luminosidade, temperaturas e embebição, não estudada por esses autores. Porém, concordam com FERREIRA et al. (2001), os quais classificaram, dentre as espécies

estudadas, *Senecio oxyphyllus* e *Senecio selloi* como fotoblásticas positivas preferenciais, devido aos percentuais de germinação terem sido significativamente mais elevados na presença luz, porém não atingiram mais que o dobro do regime do escuro. Fonseca et al. (2012) também encontraram para as sementes da espécie *Vernonia polyanthes* (Asteraceae), fotoblastismo preferencial, cuja germinação é favorecida na presença de luz, embora tenha ocorrido no escuro contínuo.

Tabela 7 - Porcentagem de germinação das sementes para as condições de luminosidade em cada uma das temperaturas e tempos de embebição para a espécie *Solidago chilensis*. Santa Maria – RS (2012).

Condições de Luminosidade	Temperatura (°C) + Tempos de embebição (horas)			
	10 + 0	10 + 12	10 + 24	10 + 36
Fotoperíodo (16 horas)	16,66 a*	55,55 a	14,44 a	11,11 a
Escuro contínuo	17,77 a	25,55 b	27,77 a	35,55 a
	20 + 0	20 + 12	20 + 24	20 + 36
Fotoperíodo (16 horas)	23,33 a	33,33 a	18,88 a	38,88 a
Escuro contínuo	8,88 a	36,66 a	20,00 a	33,33 a
	25 + 0	25 + 12	25 + 24	25 + 36
Fotoperíodo (16 horas)	14,44 a	21,11 a	26,66 a	26,66 a
Escuro contínuo	5,55 a	6,66 a	10,00 a	20,00 a
	30 + 0	30 + 12	30 + 24	30 + 36
Fotoperíodo (16 horas)	4,44 a	6,66 a	18,88 a	25,55 a
Escuro contínuo	5,55 a	12,22 a	8,88 a	6,66 a

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Da mesma maneira que ocorreu no presente estudo, as sementes de uma determinada espécie podem apresentar comportamento germinativo distinto. Isso ocorre segundo Cardoso (2004a), pois a percepção da luz pela semente se dá através do pigmento fitocromo, sendo a resposta dessa percepção, variável, dependente de vários fatores, como as condições de maturação, pré-tratamentos, potencial hídrico e temperatura.

Após as avaliações de porcentagem e velocidade de germinação, aos 23 dias após a semeadura, finalizando o experimento, foi avaliado o comprimento de raiz das plântulas, sendo as de maior expansão do sistema radicular, diferindo significativamente, as obtidas a

partir das sementes germinadas sob fotoperíodo de 16 horas, obtendo-se o maior comprimento médio das raízes (2,14 cm) na temperatura de 25°C (Tabela 8). O fato de os maiores comprimentos terem sido observados em plântulas originadas de sementes germinadas sob fotoperíodo se deve provavelmente, ao fato de que as plântulas obtidas de sementes mantidas no escuro contínuo investirem mais recursos na formação das partes aéreas (estiolamento).

A Tabela 8 também mostra o comportamento do comprimento radicular em função das temperaturas, sendo a temperatura de 25°C a ideal para o maior desenvolvimento radicular (2,14 cm de comprimento), entre todas as testadas, sob fotoperíodo de 16 horas, pois para o escuro contínuo não houve ajuste de nenhum modelo de regressão, devido aos valores baixos (menos de 2mm). Ferreira et al. (2012) constataram para a espécie *Celosia cristata* L. (Amaranthaceae), ao final da germinação (26 dias após a semeadura), a 25°C e sob luz contínua, que as plântulas apresentaram comprimento da raiz máximo de aproximadamente 3,5 cm no tratamento submetido a imersão em água fria por 24 horas. O fato de o maior comprimento da raiz ter ocorrido em 16 horas de luz, nas temperaturas em torno dos 20 e 25°C pode ser explicado na figura 3a, a qual ilustra que em torno dos 25°C ocorreu IVG elevado, sendo conseqüentemente as mais vigorosas.

Tabela 8 - Médias para o comprimento da raiz principal (cm) em plântulas germinadas da espécie *Solidago chilensis* nas condições de luminosidade em cada uma das temperaturas. Santa Maria – RS (2012).

Condições de Luminosidade	Temperaturas (°C)			
	10	20	25	30
Fotoperíodo (16 horas)	0,34 aC*	0,83 aB	2,14 aA	0,19 aC
Escuro contínuo	0,18 aA	0,15 bA	0,09 bA	0,08 aA

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

2.4 Conclusões

1. As plantas crescendo naturalmente em seu habitat (terreno baldio) apresentam maior percentual de germinação.
2. As sementes germinam tanto sob fotoperíodo de 16 horas como em escuro contínuo.

3. O método de estratificação através da embebição em água supera a dormência das sementes da espécie, sendo o tempo máximo de 36 horas, o que proporciona a maior elevação da porcentagem e velocidade de germinação.

4. Para a porcentagem e velocidade de germinação, de maneira geral, independente do tempo de embebição, em fotoperíodo de 16 horas, as sementes germinam à temperatura de 20°C ou superior, já em escuro contínuo as sementes germinam à temperatura de 20°C ou inferior a essa.

5. A temperatura de 20°C proporciona na maioria dos tratamentos, a maior porcentagem de germinação das sementes de *S. chilensis*.

6. O armazenamento das sementes de *S. chilensis* a 10 e 25 ± 2°C e a utilização de ácido giberélico nas doses 1,5 e 3,0 mg L⁻¹ não influenciam na germinação das sementes desta espécie.

CAPÍTULO III

PROPAGAÇÃO VEGETATIVA DE *Solidago chilensis* MEYEN (ASTERACEAE)

RESUMO

O estudo teve por objetivo avaliar a propagação vegetativa da espécie *Solidago chilensis* através da micropropagação e estaquia de ramos aéreos e rizomas subterrâneos. Para tais, foram realizados três experimentos no delineamento inteiramente casualizado: 1) segmentos apicais e nodais, após a assepsia, foram inoculados em tubos de ensaio contendo meio Murashige e Skoog (MS) 100%, com as combinações 0,0 + 0,0 ou 2,0 + 0,2 mg L⁻¹ de benzilaminopurina (BAP) e ácido naftaleno acético (ANA), respectivamente, 30 g L⁻¹ de sacarose, 6,0 g L⁻¹ de ágar e 1,0 g L⁻¹ de carvão ativado; 2) estacas apicais, medianas e basais de ramos aéreos passaram por assepsia e foram submetidas aos substratos água e solução MS 20%, acrescidos de 0,0 ou 5,0 mg L⁻¹ de ácido indolilbutírico (AIB); 3) estacas de rizomas ficaram imersas por seis horas em 0, 600 e 1200 mg L⁻¹ de AIB e após, mantidas em substratos Plantmax®, areia e vermiculita. Nos três experimentos, as culturas e estacas foram mantidas em sala de crescimento a 25 ± 2°C com fotoperíodo de 16 horas. A combinação de 2,0 + 0,2 mg L⁻¹ de BAP e ANA, respectivamente, proporcionou 49% de plantas estabelecidas. Na estaquia de ramos aéreos, ocorreu enraizamento no substrato água com ausência ou presença de AIB, porém, significativamente superior na presença desse fitorregulador (29%). O substrato Plantmax® proporcionou 62% de enraizamento na estaquia de rizomas e as doses de AIB utilizadas foram desnecessárias.

Palavras-chave: Erva-lanceta. Propagação *in vitro*. Enraizamento de estacas. Reguladores de crescimento.

3.1 Introdução

Estudos sobre a propagação vegetativa de espécies medicinais são importantes, servindo de base para o conhecimento e aprimoramento do cultivo dessas plantas, bem como na manutenção das características genéticas da planta-mãe. Entre as espécies medicinais, encontra-se a *Solidago chilensis* (Asteraceae), conhecida popularmente como erva-lanceta e arnica, de característica sublenhosa, ereta, rizomatosa, com altura de aproximadamente um metro, crescendo principalmente em beira de estradas e terrenos baldios (LORENZI; MATOS, 2008).

Dentre as técnicas utilizadas para se propagar, tanto em condições *in vitro* como *ex vitro*, destaca-se a micropropagação e a estaquia. A micropropagação possibilita a obtenção de elevado número de plantas em um breve período de tempo e espaço reduzido, em excelentes condições fitossanitárias (KITTO, 1997). A micropropagação via organogênese direta, segundo os autores, é a técnica de maior aplicabilidade da cultura de tecidos, utilizada frequentemente para multiplicar elevadas quantidades de plantas uniformes.

Diversos são os explantes utilizados na micropropagação, os quais podem influenciar nas respostas *in vitro* bem como na capacidade de regeneração e multiplicação das espécies *in vitro*. Segundo Hartmann et al. (2002), as características genéticas e epigenéticas da planta de origem, seu condicionamento fisiológico e o controle de patógenos nas condições *in vitro* são relevantes na otimização do estabelecimento de uma cultura. Conforme Zhang et al. (2003), um protocolo eficiente de regeneração envolve muitos fatores, como o tipo de meio básico de cultura, seguido do suplemento de fitorreguladores, concentração de sacarose, iluminação, explante, entre outros. A formulação do meio de cultura é essencial para o cultivo *in vitro*, pois é composto por substâncias necessárias para seu desenvolvimento, podendo apresentar diferentes formulações de acordo com os requerimentos de cada espécie (FARIA et al., 2002). Conforme Cid e Teixeira (2010a), quando acrescentados fitorreguladores no meio de cultura, dentre os grupos existentes, auxinas e citocininas, em formas naturais ou sintéticas, são os mais frequentemente utilizados.

Um número expressivo de espécies vegetais micropropagadas *in vitro* não sobrevive quando transferidas das condições *in vitro* para ambiente de casa de vegetação ou campo (HAZARIKA, 2003). De acordo com Grattapaglia e Machado (1998), a maioria das espécies cultivadas *in vitro* requer um processo de aclimatização, o qual consiste de modificações

morfológicas, anatômicas e fisiológicas necessárias às plantas para que possam sobreviver e crescer vigorosamente em um novo ambiente.

A estaquia é a técnica de propagação vegetativa na qual ocorre a indução do enraizamento adventício em segmentos destacados da planta mãe, que, se submetidos à condições favoráveis, originam uma nova planta (FACHINELLO et al., 2005). A partir desse método, mantêm-se as características desejáveis da planta matriz de maneira simples e rápida, onde se pode obter um grande número de mudas com baixo custo, tendo como fatores que interferem, a posição da estaca no ramo, o grau de lignificação, a quantidade de reservas, a diferenciação dos tecidos e o tipo de substrato (HARTMANN et al., 2002). Outros fatores também afetam o enraizamento, entre eles, época de coleta, condições fisiológicas da planta matriz, potencial genético de enraizamento, balanço hormonal, oxidação de compostos fenólicos, temperatura, luz e umidade (FACHINELLO et al., 2005).

Dentre os reguladores de crescimento, os mais efetivos para o enraizamento de estacas são as auxinas, sendo utilizado principalmente o ácido indolilbutírico (AIB) (DE KLERK et al., 1999; MOMENTÉ et al., 2001; BIASI, 2002), devido a sua propriedade fotoestável, de ação localizada e menos sensível à degradação biológica, quando comparado às demais auxinas (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Tendo em vista a escassez de pesquisas sobre a propagação vegetativa *in vitro* ou *ex vitro* para a espécie *S. chilensis* (CORREIA et al., 1998; MOMENTÉ et al., 2001), o objetivo do trabalho foi estabelecer um protocolo de micropropagação e estaquia de ramos aéreos e rizomas subterrâneos para a espécie.

3.2 Material e métodos

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais pertencente ao Departamento de Biologia, do Centro de Ciências Naturais e Exatas da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria - RS.

3.2.1 Experimento I - Micropropagação

3.2.1.1 Material vegetal – cultivo e coleta

Plantas provenientes de uma população de terreno baldio localizado no bairro Camobi, em Santa Maria/RS foram retiradas em condições de senescência (inverno), após seu período de frutificação, cultivadas em potes de polietileno (3500 mL) com substrato Plantmax® + solo do local de coleta (2:1), em casa de vegetação climatizada a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ – *campus* (UFSM). Neste local, se propagaram por rizomas, recebendo irrigação diária, acrescida de solução nutritiva MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) 20% a cada 15 dias e aplicação de Carbendazim 500 mg L^{-1} , na concentração de $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ a cada 20 dias, por um período de dois meses, quando então, ramos aéreos de $\pm 20 \text{ cm}$ contendo os segmentos apicais e nodais foram coletados de brotações jovens.

3.2.1.2 Assepsia e estabelecimento *in vitro* dos explantes

Os ramos foram lavados em água corrente por aproximadamente dois minutos, transferidos para um recipiente contendo um litro de água destilada acrescido de 10 gotas de hipoclorito de sódio (NaClO) 11% por dois minutos e em seguida passaram por enxágue em água destilada. Após, em câmara de fluxo laminar, fez-se a assepsia com etanol 70% por 30 segundos, seguida de hipoclorito de sódio 1,0% durante cinco minutos e três lavagens em água destilada e esterilizada. Dos ramos foram retirados os segmentos apical e nodal com cerca de 1 cm e inoculados em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio nutritivo MS 100%, acrescido das combinações $0,0 + 0,0$ e $2,0 + 0,2 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP e ANA, respectivamente, 30 g L^{-1} de sacarose e 6 g L^{-1} de ágar. O meio MS, após ser preparado, teve seu pH ajustado a $5,8 \pm 2$ e passou por autoclavagem a 120°C , 1,5 atm durante 20 minutos. Logo em seguida, foi acrescentado 1 g L^{-1} de carvão ativado a esse meio.

Os tubos contendo os explantes foram fechados com folha de papel alumínio e filme plástico PVC, permaneceram em sala de crescimento a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, sob escuro contínuo durante cinco dias e após foram transferidos para sala de crescimento a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ com fotoperíodo de 16 horas (R.F.A. de $\sim 36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, sendo os tratamentos arranjados em esquema fatorial 2x2 (explantes apical e nodal e ausência ou presença dos fitorreguladores), totalizando quatro tratamentos

compostos por seis repetições, sendo cada repetição constituída por 25 frascos, contendo um explante cada.

Aos 40 dias após a inoculação foram avaliadas as seguintes variáveis: porcentagem de plantas completas estabelecidas, número de brotos, número de folhas, número de raízes, comprimento da maior raiz (cm), altura (cm), massa fresca total (g) e oxidação (%).

3.2.1.3 Aclimatização

Após 40 dias de cultivo *in vitro*, as plantas completas micropropagadas tiveram suas raízes lavadas em água destilada para remover o meio nutritivo e foram transferidas para copos plásticos (400 mL) com substrato Plantmax® + vermiculita na proporção 2:1 (autoclavado duas vezes durante 50 minutos antes da utilização, com intervalo de 24 horas) e cobertos por um copo transparente com quatro perfurações na base. As plantas foram mantidas em sala de crescimento a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ com fotoperíodo de 16 horas (R.F.A. de $\sim 36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), recebendo irrigação diária com água destilada. Na medida em que as plantas cresciam essas perfurações aumentavam, até que, aos 50 dias os copos foram totalmente removidos.

Ao final da aclimatização (120 dias de cultivo) foi avaliada a sobrevivência (%), o número de brotos, número de folhas, altura (cm), comprimento da maior raiz (cm), massa fresca da parte aérea e das raízes (g), massa seca das raízes (g) e área foliar (cm^2). A massa seca foi obtida utilizando estufa com fluxo de ar forçado a uma temperatura de 60°C até massa constante, e posteriormente seguiu-se a pesagem em balança semi-analítica. A área foliar foi determinada usando o integrador de área foliar portátil modelo AM 300 (ADC BioScientific, Inglaterra).

3.2.2 Experimento II e III – Estaquia

3.2.2.1 Coleta e assepsia do material vegetal

Ramos aéreos (Experimento II) e rizomas subterrâneos (Experimento III) foram coletados de plantas oriundas de uma população de terreno baldio, localizado no bairro Camobi, em Santa Maria/RS. A coleta foi realizada no verão, antes do florescimento da espécie. As plantas matrizes foram pré-selecionadas no campo e dessas foram retirados ramos de ± 50 a 80 cm de comprimento (Experimento II) e a planta completa contendo as estacas de rizomas (Experimento III). Primeiramente, o material vegetal foi lavado em água corrente por aproximadamente dois minutos e após, lavado em água destilada. Como estacas (± 10 cm de comprimento) foram utilizadas as porções apical, mediana e basal dos ramos aéreos, cada uma com um par de folhas e rizomas subterrâneos contendo em torno de 10 gemas, a partir da base da raiz. Após, foram imersos em um litro de solução de água destilada contendo 10 gotas de hipoclorito de sódio (NaClO) 11%, finalizando com enxágue em água destilada.

3.2.2.2 Procedimentos experimentais

Experimento II – As estacas de ramos aéreos foram postas em frascos de vidro (300 mL) envoltos por papel pardo e cobertos por papel alumínio, cada um contendo 250 mL de substrato com quatro estacas, mantidos em sala de crescimento a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ com fotoperíodo de 16 horas (R.F.A. de $\sim 36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Utilizaram-se dois substratos: água destilada e solução nutritiva contendo 20% dos sais de MS, testando-se duas doses do fitorregulador AIB: (0,0 e 5,0 mg L⁻¹). Para desinfecção dos tecidos, nos dois substratos foi acrescido 0,5 mg L⁻¹ de fungicida Carbendazim 500 mg L⁻¹ e o pH foi ajustado a $5,8 \pm 2$ utilizando HCl ou NaOH. Depois de transcorridos sete dias, foi realizada a substituição do meio líquido de todos os tratamentos pelos mesmos constituintes, a fim de renovar a oxigenação e manter o pH ajustado, apenas sendo retirado o fitorregulador AIB dos substratos que o possuíam. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, sendo os tratamentos arranjos em um trifatorial 3 x 2 x 2 (três tipos de estacas x dois tipos de substratos x duas concentrações de AIB), totalizando 12 tratamentos, com três repetições cada tratamento e oito estacas por repetição.

Ao término do experimento (50 dias), foi determinado o enraizamento (%), o número de folhas, brotos novos e raízes, comprimento da maior raiz (cm), oxidação (%) e sobrevivência (%) das estacas.

Experimento III – As estacas de rizomas ficaram totalmente imersas por seis horas em água destilada com 0, 600 e 1200 mg L⁻¹ do fitorregulador AIB e então, dispostas horizontalmente em bandejas de polipropileno, com volume de 1600 mL (quatro estacas por bandeja), testando-se os substratos Plantmax®, areia e vermiculita, ambas com granulometria média. Os substratos foram autoclavados a 120°C, 1,5 atm durante 50 minutos duas vezes (intervalo de 24 horas entre as autoclavagens), sendo o substrato areia, lavado e peneirado, antes da autoclavagem. As unidades experimentais foram mantidas em sala de crescimento a 25 ± 2°C com fotoperíodo de 16 horas (R.F.A. de ~36 µmol m⁻² s⁻¹) e as estacas irrigadas com água destilada quatro vezes por semana. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, testando-se nove tratamentos arranjados em um bifatorial 3 x 3 (substratos e doses de AIB), com três repetições por tratamento e quatro estacas por repetição.

Aos 90 dias de cultivo foi determinado o enraizamento (%), número de brotos, folhas e raízes, altura (cm), comprimento da maior raiz (cm), massa fresca da folha, caule e sistema radicular (g), massa seca do caule e sistema radicular (g) e área foliar (cm²). A obtenção da massa seca e área foliar ocorreu conforme a metodologia descrita na micropropagação.

3.2.3 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), sendo transformados quando necessário. A análise de comparação de médias foi através do teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro, utilizando-se o software SOC (EMBRAPA, 1997).

3.3 Resultados e discussão

3.3.1 Experimento I – Micropropagação

O resumo da análise de variância (Tabela 1) aponta que para as variáveis raízes e oxidação houve interação entre os tipos de explantes e a ausência ou presença de fitorreguladores. Para as demais variáveis, não ocorreu interação, tendo efeito principal dos

dois fatores ou apenas de um deles. Diante disso, as análises complementares foram realizadas de modo a contemplar essas ocorrências.

Tabela 1- Resumo da análise de variância para o estabelecimento *in vitro* (E), número de brotos (B), número de folhas (F), número de raízes (R), altura (A), comprimento da raiz principal (CRP), massa fresca total (MFT) e oxidação (O) nos tipos de explante apical e nodal (TE) e ausência ou presença (2,0 + 0,2 mg L⁻¹) dos fitorreguladores benzilaminopurina e ácido naftaleno acético, respectivamente (F), utilizando-se quatro tratamentos, cada um composto por seis repetições, constituídas de 25 frascos cada. Santa Maria – RS (2012).

FV	GL	Quadrado Médio							
		E	B	F	R	A	CRP	MFT	O
TE	1	322,666 ^{ns}	2,232*	78,916*	0,010 ^{ns}	0,527 ^{ns}	0,021 ^{ns}	0,000 ^{ns}	352,666*
F	1	9282,666*	10,613*	350,829*	0,648*	23,206*	29,313*	0,064*	937,500*
TE x F	1	66,666 ^{ns}	0,135 ^{ns}	5,005 ^{ns}	0,047*	0,071 ^{ns}	0,987 ^{ns}	0,002 ^{ns}	32,666*
R	20	116,266	0,080	2,994	0,010	0,344	0,707	0,001	4,350
CV (%)		36,346	26,631	28,904	9,013	45,276	52,126	47,407	22,148

* - F significativo a 5% de probabilidade de erro, ns - F não significativo a 5% de probabilidade de erro, FV: Fonte de variação, R: Resíduo.

Na Tabela 2 são demonstradas as médias das variáveis de crescimento, na qual pode ser observada a porcentagem de plantas estabelecidas significativamente superior (49,33%) quando utilizada a combinação 2,0 mg L⁻¹ de BAP e 0,2 mg L⁻¹ de ANA em relação a obtenção de 10% de planta completa no meio sem a presença de fitorreguladores. Os explantes não influenciaram nesse percentual, apresentando 26 e 33,33% de estabelecimento, respectivamente em explantes apicais e nodais, não diferindo estatisticamente entre si. Houve um favorecimento do meio contendo a combinação dos fitorreguladores, no estabelecimento *in vitro* desta espécie, mostrando a insuficiência do balanço hormonal endógeno em proporcionar bons resultados na propagação *in vitro* de *S. chilensis*. Resultados similares foram encontrados por Flores et al. (1998), os quais constataram os percentuais mais satisfatórios de regeneração de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart., Celastraceae), utilizando BAP, independente do tipo de explante, sendo encontrado 42% de regeneração dos segmentos nodais e 37% dos apicais. Arrigoni-Blank et al. (2011) obtiveram 100% de

regeneração das plantas de *Pogostemon cablin* (Lamiaceae) com o uso de 1,0 mg L⁻¹ de cinetina e 0,5 a 1,0 mg L⁻¹ de AIA.

O segmento nodal apresentou médias superiores de brotos (1,37) e folhas (7,80), não diferindo nas demais variáveis de crescimento avaliadas, embora apresente números superiores em todas elas, com exceção para massa fresca total (Tabela 2). Diante disso, embora não tenha se destacado com unanimidade, o explante nodal apresentou resultados mais favoráveis para a propagação *in vitro* de *S. chilensis*. O crescimento das gemas axilares presentes nos segmentos nodais deve-se, provavelmente, à relação citocinina/auxina. Resultados similares foram encontrados por Pinto et al. (1994) estudando *kielmeyera coriácea* (Clusiaceae), os quais constataram que o segmento nodal foi o que apresentou a maior produção média de brotações, com a utilização de até 2,0 mg L⁻¹ de BAP, da mesma maneira que Flores et al. (2006) encontraram para a espécie *Pfaffia tuberosa* (Amaranthaceae) uma maior taxa de multiplicação *in vitro* a partir de segmentos nodais quando comparada à dos explantes apicais. A emissão inferior de brotos dos segmentos apicais em relação aos nodais ocorreu possivelmente em função da dominância da gema apical regulada pelo hormônio vegetal auxina, no segmento apical. Essa dominância do ápice torna difícil o desenvolvimento de novos ramos ou brotos das gemas laterais (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Tabela 2 – Plantas completas estabelecidas *in vitro* e variáveis de crescimento obtidas a partir de dois tipos de explantes, submetidos a ausência ou presença dos fitorreguladores benzilaminopurina (BAP) e ácido naftaleno acético (ANA), utilizando-se quatro tratamentos, cada um composto por seis repetições, constituídas de 25 frascos cada. Santa Maria – RS (2012).

Variáveis	Tipo de explante		Fitorreguladores mg L ⁻¹	
	Apical	Nodal	0,0 BAP + 0,0 ANA	2,0 BAP + 0,2 ANA
Plantas estabelecidas (%)	26,00 a*	33,33 a	10,00 b	49,33 a
Brotos (nº)	0,76 b	1,37 a	0,40 b	1,73 a
Folhas (nº)	4,17 b	7,80 a	2,16 b	9,81 a
Massa fresca total (g)	0,07 a	0,07 a	0,02 b	0,12 a
Comprimento da raiz principal (cm)	1,58 a	1,64 a	0,50 b	2,71 a
Altura (cm)	1,14 a	1,44 a	0,31 b	2,28 a

*Médias seguidas pela mesma letra para cada fator na linha não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

A combinação de 2,0 mg L⁻¹ de BAP e 0,2 mg L⁻¹ de ANA favoreceu o crescimento e desenvolvimento dos explantes desta espécie, diferindo da ausência de fitorregulador, em todas as variáveis avaliadas (Tabela 2). A ausência desses fitorreguladores no meio de cultura proporcionou insuficiente crescimento dos parâmetros avaliados, o qual ocorreu provavelmente devido às citocininas e auxinas inerentes ao próprio explante. Muitos estudos tem encontrado na citocinina Benzilaminopurina (BAP), elevada eficácia na indução e desenvolvimento de brotos (SOUZA et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2011; LI et al., 2012; LIMA et al., 2012), vários deles obtiveram bons resultados utilizando combinações entre BAP e ANA, como o de Li et al. (2012), os quais constataram que a citocinina BAP foi significativamente eficaz para a proliferação de *Solidago canadensis* L., com a exigência da razão citocinina: auxina alta favorável à indução de brotações a partir de segmentos nodais, sendo a combinação de 1,0 mg L⁻¹ BAP e 0,1 mg L⁻¹ de ANA acrescentada ao meio MS, a ideal para a multiplicação de mudas a partir de explantes nodais. Lima et al. (2012) também constatou que para a micropropagação da espécie *Orthophytum mucugense* (Bromeliaceae) o meio que proporcionou os melhores resultados foi MS^{1/2} suplementado com 2,22 mM de BAP e 0,65 mM de ANA.

Para a variável número de raízes, não houve diferença estatística entre os explantes apical e nodal cultivados em meio contendo ou não BAP e ANA (Tabela 3), porém, a combinação dos fitorreguladores (2,0 mg L⁻¹ BAP + 0,2 mg L⁻¹ ANA) contribuiu significativamente para que os explantes apical e nodal formassem números superiores de raízes, 2,56 e 2,10, respectivamente. O enraizamento adventício envolve a conjugação de auxinas endógenas e exógenas, por isso quando a espécie possui uma concentração interna adequada de ácido indol acético (AIA), a conjugação com fitorreguladores como ANA ou AIB, por determinados períodos, entre dez e vinte dias, aproximadamente, é suficiente para induzir a formação de raiz *in vitro* (SOUZA et al., 2011). Em vários estudos, a utilização de auxina foi fundamental na formação de raízes pelos explantes (RADMANN et al., 2002; BERTONI et al., 2006; SOUZA et al., 2011). Conforme Grattapaglia e Machado (1998), as auxinas podem ser adicionadas sozinhas ou em combinação com outro regulador de crescimento, sendo o tipo e a concentração empregada, os fatores que mais influenciam o processo. Para Souza e Pereira (2007) a associação de auxinas e citocininas pode favorecer o

enraizamento de algumas espécies. Segundo os autores, além dos fitorreguladores, fatores como genótipo da planta matriz, juvenildade e substâncias como carvão ativado acrescentadas aos meios de cultura estão relacionados ao enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*.

Tabela 3 – Número de raízes e porcentagem de oxidação em segmentos apicais e nodais de ramos aéreos de *Solidago chilensis*, cultivados em meio MS completo (Murashige e Skoog, 1962), acrescido ou não da combinação dos fitorreguladores BAP (benzilaminopurina) e ANA (ácido naftaleno acético). Os fatores constituíram quatro tratamentos, cada um com seis repetições, constituídas de 25 frascos cada. Santa Maria – RS (2012).

Tipo de explante	Fitorreguladores (mg L ⁻¹)	
	0,0 BAP + 0,0 ANA	2,0 BAP + 0,2 ANA
	Raízes (n°)	
Apical	0,12 aB*	2,56 aA
Nodal	0,61 aB	2,10 aA
	Oxidação (%)	
Apical	20,66 aA	5,83 a B
Nodal	10,66 bA	0,50 bB

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

O percentual de oxidação mais elevado ocorreu nos explantes apicais (20,66%) tanto na ausência como na presença dos fitorreguladores (Tabela 3). O fato de a oxidação ter sido mais elevada no explante apical possivelmente ocorreu por esse apresentar maior sensibilidade aos danos físicos durante o seccionamento dos explantes. O corte do explante com bisturi desencadeia a oxidação fenólica na cultura de tecidos *in vitro* (CID; TEIXEIRA, 2010b). É comum para algumas espécies que as células danificadas pelo corte ocasionem a liberação de compostos fenólicos, difundindo-se rapidamente pelo meio de cultura, sendo tóxicos ao explante (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

A oxidação fenólica dificulta o estabelecimento do cultivo *in vitro*, podendo comprometer ou inviabilizar o desenvolvimento do explante de várias espécies. Portanto, como maneira de diminuir essa oxidação nos explantes de *S. chilensis*, foi utilizado carvão ativado no meio de cultivo de todos os tratamentos (Figura 1), o qual é indicado como material adsorvente dos compostos fenólicos no meio de cultura (HARTMANN et al., 2002;

CID; TEIXEIRA, 2010b). Foi constatada uma redução significativa na taxa de oxidação nos tratamentos contendo os fitorreguladores BAP e ANA, sendo observado benefícios do balanço hormonal entre esses fitorreguladores ou possivelmente em combinação com outros fitohormônios endógenos e até mesmo com o carvão ativado e outras substâncias do meio de cultivo, ocasionando mecanismos atuantes no controle da oxidação.

O sucesso do estabelecimento de um protocolo eficiente para a micropropagação de plantas depende da sobrevivência e desempenho das mesmas, quando submetidas às condições *ex vitro*. Para que isso ocorra, é importante e preferível que as plantas estabelecidas *in vitro* estejam com satisfatória formação de parte aérea, elevado número de raízes e características fisiológicas favoráveis.



Figura 1 – Plantas de *Solidago chilensis* cultivadas em meio MS completo, suplementado com 0,0 + 0,0 mg L⁻¹ e 2,0 + 0,2 mg L⁻¹ de benzilaminopurina (BAP) e ácido naftaleno acético (ANA), respectivamente, 30 g L⁻¹ de sacarose, 6 g L⁻¹ de ágar e 1 g L⁻¹ de carvão ativado, e mantidas em sala de crescimento a 25 ± 2°C com fotoperíodo de 16 horas (R.F.A. de ~36 μmol m⁻² s⁻¹).

As plantas estabelecidas *in vitro* de *Solidago chilensis* foram transferidas para recipientes contendo substrato Plantmax® + vermiculita (granulometria média) na proporção 2:1, mantendo-se a origem. A parte superior inicialmente foi mantida fechada por copos de polietileno transparentes, sendo gradativamente abertos, expondo as plantas ao ambiente externo ou *ex vitro* (Figura 2 a e b). Após 120 dias de cultivo, observa-se na Tabela 4 que as mesmas apresentaram percentuais de sobrevivência de 12,5; 27,8; 26,3 e 37,2%, respectivamente nas plantas oriundas dos tratamentos 1, 2, 3 e 4, não diferindo entre si. Entretanto, as plantas estabelecidas *in vitro* a partir de segmentos nodais cultivados em meio

de cultura contendo 2,0 mg L⁻¹ BAP + 0,2 mg L⁻¹ ANA (T4) tiveram um percentual de sobrevivência três vezes maior do que as plantas oriundas de segmentos apicais e sem fitorreguladores (T1). Mesmo nas plantas de origem no T4, a sobrevivência pode ser considerada baixa, concordando com Grattapaglia e Machado (1998), os quais comentam que a aclimatização das plantas na micropropagação é a fase mais crítica e representa em alguns casos, um fator limitante desse processo, devido à baixa sobrevivência das espécies após esta transição das condições *in vitro* para *ex vitro*.

Tabela 4 - Médias das variáveis sobrevivência e crescimento das plantas obtidas *in vitro* e cultivadas em substrato Plantmax® + vermiculita na proporção 2:1, mantendo-se a origem das mesmas. Santa Maria – RS (2012).

Variáveis	T1	T2	T3	T4	CV (%)
Sobrevivência (%)	12,500 a	27,777 a	26,320 a	37,243 a	35,479
Brotos (nº)	0,250 a	0,250 a	0,315 a	0,481 a	82,710
Folhas (nº)	9,833 a	9,291 a	9,223 a	11,666 a	60,707
Comprimento da maior raiz (cm)	4,500 a	4,083 a	4,281 a	6,566 a	81,117
Altura (cm)	5,187 a	5,011 a	6,569 a	10,526 a	76,431
Área foliar (cm ²)	66,175 a	38,991 a	44,121 a	54,323 a	52,053
Massa fresca da parte aérea (g)	0,677 a	0,458 a	0,664 a	1,249 a	83,121
Massa fresca das raízes (g)	0,178 a	0,096 a	0,176 a	0,209 a	83,093
Massa seca das raízes (g)	0,009 a	0,008 a	0,020 a	1,383 a	21,036

*Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.
Tratamentos:

T1: segmentos apicais livres de BAP e ANA

T2: segmentos nodais livres de BAP e ANA

T3: segmentos apicais + 2,0 mg L⁻¹ BAP + 0,2 mg L⁻¹ ANA

T4: segmentos nodais + 2,0 mg L⁻¹ BAP + 0,2 mg L⁻¹ ANA

Na etapa *in vitro*, as plantas desenvolvem-se sob condições controladas, em ambientes fechados que dificultam as trocas gasosas, com baixa densidade de fluxo de fótons e em presença de açúcar como fonte de carbono e energia (POSPÍSILOVÁ et al., 1999). De acordo com Barboza et al. (2006), uma planta, embora aparentemente saudável *in vitro*, apresenta deficiências anatômicas que dificultam o controle da transpiração, induzindo a uma rápida

perda de água. O estresse hídrico das plantas é geralmente uma dificuldade frequente durante o processo de aclimatização. Silva et al. (2003b) também apontaram que fatores como o genótipo, estresse luminoso, tipo de substrato, qualidade das raízes formadas *in vitro*, estresse hídrico, alteração do metabolismo heterotrófico (*in vitro*) para autotrófico, infecção por patógenos, além das possíveis variações de temperatura influenciam no processo de aclimatização. Para Pasqual (2001) deve-se favorecer para as plantas *in vitro* a iniciação de um mecanismo mixotrófico, intermediário entre os mecanismos heterotróficos e autotróficos.

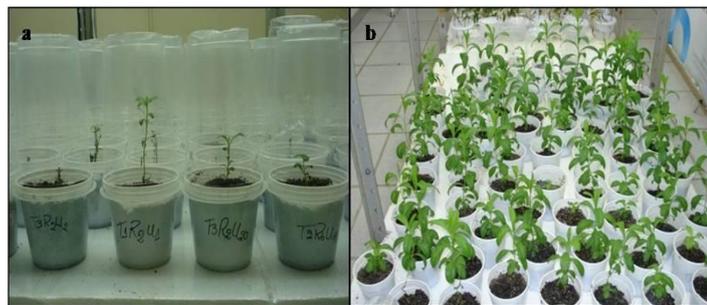


Figura 2 – Aclimatização de plantas micropropagadas de *Solidago chilensis*, oriundas de segmentos apicais e nodais cultivados em meio MS completo (Murashige e Skoog, 1962), acrescido ou não da combinação de fitorreguladores ($2,0 \text{ mg L}^{-1}$ BAP + $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ ANA), transferidas para substrato Plantmax® + vermiculita (granulometria média) na proporção 2:1, mantendo-se a origem dos tratamentos e cultivadas em sala de crescimento a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, com fotoperíodo de 16 horas (R.F.A. de $\sim 36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). a) Início do período de aclimatização (2ª semana); b) Final do período de aclimatização (12ª semana).

A espécie em estudo e o substrato usado na fase de aclimatização parecem ter papel importante na sobrevivência das plantas propagadas *in vitro*. Após quatro semanas de transplante, plantas de *Solidago canadensis* apresentaram 100% de sobrevivência em substrato composto por solo esterilizado, turfa e vermiculita na proporção de 1:1:1 (LI et al., 2012). Souza et al. (2007), em estudo com *Lychnophora pinaster* (Asteraceae), obtiveram 100% de sobrevivência das plantas cultivadas em solo nativo retirado do local de ocorrência da espécie; aproximadamente 80% sobreviveram em substrato contendo solo natural e Plantmax® (1:1) e não houve sobrevivência em substrato com apenas Plantmax®. Entretanto, para *Tournefortia cf paniculata* (Boraginaceae), a utilização de substrato comercial Plantmax® resultou em 100% de sobrevivência das plantas aclimatizadas (BERTOLUCCI et al., 2000).

Os tratamentos *in vitro* também podem refletir na capacidade das plantas suportarem as mudanças de ambiente. No presente estudo, os tratamentos testados *in vitro* não promoveram efeitos diferenciais nas avaliações de crescimento e desenvolvimento das plantas de *S. chilensis* regeneradas *in vitro* (Tabela 4). Embora as médias das variáveis não tenham diferido estatisticamente, observa-se que as plantas obtidas a partir de segmentos nodais cultivados em meio de cultura contendo $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ BAP + $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ ANA (T4) apresentaram os maiores valores dos parâmetros de crescimento da parte aérea e sistema radicular. Nesse tratamento, as médias mais altas foram 11,66 folhas, 10,52 cm de altura; 1,38 e 1,24 g de massa fresca da parte aérea e raízes, respectivamente e 0,20 g de massa seca das raízes.

O uso de citocinina e auxina no meio de cultura também favoreceu o maior número de raízes em plantas oriundas de segmento apical ou nodal cultivados *in vitro* (Tabela 3), o que possivelmente explique a maior porcentagem de sobrevivência destas plantas (embora não tenha diferido estatisticamente dos demais tratamentos), conforme discutido anteriormente. Alguns autores têm constatado que o êxito da fase de aclimatização está diretamente relacionado às plantas que apresentam raízes bem desenvolvidas *in vitro* (ANDRADE et al., 2000; GONÇALVES et al., 2010). Independente do tipo de explante (segmento apical ou nodal) e presença ou ausência no meio de cultura da combinação de citocinina e auxina, as plantas regeneradas não diferiram quanto à área foliar, ficando estes valores entre 38,99 a $66,18 \text{ cm}^2$ (Tabela 4).

3.3.2 Experimento II - Estaquia de ramos aéreos

Verificou-se pelo resumo da análise de variância (Tabela 5) que para o percentual de enraizamento, número de raízes, comprimento da raiz principal e folhas, houve interação tripla entre o substrato, fitorregulador e tipo de estaca, já para o número de brotos e percentual de sobrevivência houve interação entre o substrato e tipo de estaca. Diante disso, as análises complementares para essas variáveis foram realizadas de modo a contemplar as interações existentes. Para a variável oxidação, não ocorreu nenhuma interação, por isso, as análises foram realizadas para o efeito principal de cada fator.

Conforme a Tabela 6, dentre as porções do ramo utilizadas no estudo, os melhores resultados para o percentual de enraizamento, número de raízes e comprimento da maior raiz, foram das estacas medianas com 29,17%, 2,83 e 0,62 cm e basais com 25%, 1,54 e 0,50 cm,

respectivamente, submetidas ao substrato água e presença de 5,0 mg L⁻¹ de AIB, diferindo significativamente da estaca apical. O maior enraizamento de estacas oriundas das porções medianas e basais do ramo pode estar provavelmente, relacionado à concentração mais elevada de carboidratos presente nessas porções (NICOLOSO et al., 1999). No estudo de Maia et al. (2008), com a espécie *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (Lamiaceae) as estacas que apresentaram maior comprimento de raízes também foram as medianas (26,4 cm), superiores às basais (20,9 cm) e às apicais (22,7 cm). Porém, Momenté et al. (2001), em estudo com *S. chilensis*, obtiveram os resultados mais satisfatórios para o enraizamento e também parte aérea, com estacas apicais imersas por uma hora em solução aquosa de 250 ppm do fitorregulador AIB.

Tabela 5- Resumo da análise de variância para porcentagem de enraizamento (E), número de raízes (R), comprimento da raiz principal (CRP), número de brotos (B), número de folhas (F), porcentagem de oxidação (O) e porcentagem de sobrevivência (S) nos substratos água e MS 20% (S), 0,0 ou 5,0 mg L⁻¹ do fitorregulador ácido indol butírico (F) e tipo de estaca apical, mediana e basal (TE), totalizando 12 tratamentos, cada um composto por três repetições, constituídas de oito estacas cada. Santa Maria – RS (2012).

FV	GL	Quadrado Médio						
		E	R	CRP	B	F	O	S
S	1	24,026*	0,771*	0,109*	0,308*	2,070*	9,600*	11736,111*
F	1	15,488*	0,723*	0,092*	0,017 ^{ns}	0,857*	13,039*	850,694 ^{ns}
T	2	6,342*	0,234*	0,028*	0,095*	0,603*	137,506*	15742,187*
S x F	1	15,488*	0,723*	0,092*	0,017 ^{ns}	0,857*	4,975 ^{ns}	156,250 ^{ns}
S x T	2	6,342*	0,234*	0,028*	0,095*	0,603*	3,352 ^{ns}	3259,548*
F x T	2	3,938*	0,213*	0,023*	0,006 ^{ns}	0,214*	3,367 ^{ns}	264,756 ^{ns}
S x F x T	2	3,938*	0,213*	0,023*	0,006 ^{ns}	0,214*	4,471 ^{ns}	507,812 ^{ns}
Resíduo	24	3,938	0,042	0,004	0,014	0,048	1,702	203,993
CV (%)		48,767	24,089	8,449	15,093	23,210	28,314	34,278

* - F significativo a 5% de probabilidade de erro, ns - F não significativo a 5% de probabilidade de erro, FV: Fonte de variação.

Na Tabela 6 também pode ser observado que a porcentagem de enraizamento, número de raízes e comprimento da maior raiz apresentaram valores significativamente superiores na presença de 5,0 mg L⁻¹ do fitorregulador AIB em substrato água para estacas medianas e

basais. A ocorrência de um enraizamento mais satisfatório para esta espécie remete a necessidade de estímulos externos, no caso, o AIB, fitorregulador mais utilizado no enraizamento de estacas (HOFFMANN et al., 1996; DE KLERK et al., 1999; MOMENTÉ et al., 2001; BIASI, 2002). Embora tenha ocorrido a formação de raízes na ausência de fitorregulador (substrato água + estacas medianas) (Tabela 6), segundo De Klerk et al. (1999) a aplicação desse regulador aumenta o número de raízes por estacas, embora ocorra a regeneração de raízes sem a necessidade de auxina exógena, em algumas espécies. A concentração hormonal necessária varia para cada espécie e o tipo de fitorregulador apresenta resposta diferente devido às raízes serem muito sensíveis a essas substâncias (HARTMANN et al., 2002).

Em relação ao número de folhas, as estacas medianas e basais não diferiram entre si, com as médias de 4,00 e 2,45, respectivamente e sim da apical (0,00) no substrato água e ausência de AIB (Tabela 6). A formação de folhas nas estacas apresentou comportamento distinto ao enraizamento, pois a ausência de fitorregulador é que proporcionou números significativamente elevados de folhas nas estacas medianas e basais.

Tabela 6 – Porcentagem de enraizamento (E), número de raízes (R) comprimento da maior raiz em cm (CMR) e número de folhas (F) em estacas de ramos aéreos de *Solidago chilensis* para o substrato água na ausência ou presença de fitorregulador ácido indol butírico (AIB). Santa Maria – RS (2012).

Tipo de estaca	Água				Água			
	0,0 mg L ⁻¹ AIB				5,0 mg L ⁻¹ AIB			
	E	R	CMR	F	E	R	CMR	F
Apical	0,00 aA*	0,00 aA	0,00 aA	0,00 bA	0,00 bA	0,00 bA	0,00 bA	0,00 aA
Mediana	4,17 aB	0,04 aB	0,04 aB	2,45 aA	29,17 aA	2,83 aA	0,62 aA	0,16 aB
Basal	0,00 aB	0,00 aB	0,00 aB	4,00 aA	25,00 aA	1,54 aA	0,50 aA	0,87 aB

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna indicam comparação entre tipo de estaca no substrato com a ausência ou presença de fitorregulador, enquanto que letras maiúsculas na linha indicam comparação entre ausência e presença de fitorregulador dentro do substrato e tipo de estaca. Teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Foi verificado que as estacas quando submetidas ao substrato MS 20% na ausência ou presença de fitorregulador, não formaram raízes e novas folhas (Tabela 6), nem brotos (Tabela 7) mostrando-se inadequado para a estaquia desta espécie, sendo constatado que para

quaisquer das variáveis analisadas, a mesma respondeu positivamente ao substrato água. Isso remete a possibilidade de as substâncias presentes na solução nutritiva terem ocasionado toxidez aos tecidos caulinares. Em estudo com as espécies *Psychotria umbellata* e *leiocarpa* (Rubiaceae), Paranhos (2003) utilizou solução nutritiva MS 20% no enraizamento de estacas apicais, cultivadas em sala de crescimento em fotoperíodo de 16 horas, obtendo 40% de enraizamento na presença de 10 mg L⁻¹ de AIB e 53% de sobrevivência, indicando que as respostas dependem das espécies em estudo.

Na Tabela 7 pode-se constatar em relação a formação de brotos, que a estaca basal apresentou o número mais elevado (0,68), não diferindo da mediana (0,33) e sim da apical (0,00), no substrato água. Já os três tipos de estacas quando submetidos ao MS 20% não formaram brotações. Bona et al. (2005) em estudo com a espécie *Baccharis trimera* (Asteraceae) também obtiveram maior porcentagem de brotações nas estacas basais (88,3%) e mediana (84,9%). O menor número de brotos das estacas apicais pode ter ocorrido devido à maior relação auxina/citocinina no ápice dos ramos, promovendo a dominância apical em detrimento do crescimento de gemas axilares. Assim, a remoção do ápice caulinar por ocasião do corte das estacas, resultou no crescimento de uma ou mais gemas laterais, explicando a maior brotação nas estacas medianas e basais (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Tabela 7 - Médias do número de brotos e porcentagem de sobrevivência das estacas de *Solidago chilensis* para o tipo de estaca e cada um dos substratos. Santa Maria – RS (2012).

Tipo de estaca	Substrato			
	Água		MS 20%	
	Brotos	Sobrevivência	Brotos	Sobrevivência
Apical	0,00 b A*	0,00 c A	0,00 a A	0,00 c A
Mediana	0,33 ab A	81,25 b A	0,00 a A	37,50 a B
Basal	0,68 a A	97,91 a A	0,00 a A	33,33 b B

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Estacas basais enraizadas em água tiveram porcentagem de sobrevivência significativamente superior às medianas (97,91%) e inferior a essas em MS 20% (33,33%), sendo verificada necrose e conseqüente morte das estacas apicais. Conforme Nicoloso et al. (1999) a porção apical do ramo possui limitação de reserva de nutrientes orgânicos e

inorgânicos em seus tecidos, sendo esta uma causa do seu baixo índice de sobrevivência. Quando comparados os substratos água e solução nutritiva com 20% dos meios MS em função dos tipos de estacas, a água proporcionou porcentagem de sobrevivência superior para ambas as porções do ramo, medianas e basais. Esses resultados reforçam a constatação de que, dos substratos utilizados, o mais satisfatório foi a água. Porém, quando as estacas enraizadas foram transplantadas para substrato Plantmax® em casa de vegetação, não sobreviveram (dados não demonstrados).

O percentual de oxidação nas estacas foi mais elevado na água, ausência de fitorregulador e nas estacas apicais e medianas, não sendo constatada oxidação nas basais (Tabela 8). O fato das apicais e medianas oxidarem, possivelmente se deve à elevada fragilidade dos tecidos aos cortes e manuseio, provavelmente pela liberação de compostos fenólicos, dificultando a formação de raízes. Conforme Fachinello et al. (2005), os fenóis, ao entrarem em contato com o oxigênio, iniciam reações de oxidação nos tecidos, resultando em produtos tóxicos a esses.

Tabela 8 - Médias de oxidação (%) das estacas de *Solidago chilensis* nos substratos, ausência ou presença de fitorregulador ácido indol butírico (AIB) e tipo de estaca. Santa Maria – RS (2012).

Substrato		Fitorregulador		Tipo de estaca		
Água	MS 20%	0,0 mg L ⁻¹	5,0 mg L ⁻¹	Apical	Mediana	Basal
38,19 a*	23,61 b	38,88 a	22,91 b	47,91 a	44,79 a	0,00 b

*Médias seguidas pela mesma letra para cada fator não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Os números encontrados para a maioria das variáveis de crescimento estudadas foram muito baixos, demonstrando que a dificuldade de propagar vegetativamente a espécie por esse método pode ter ocorrido por diversos fatores, como por exemplo: substratos, doses de fitorregulador ou genótipo da planta. Conforme Lorenzi (2008), a propagação vegetativa por estacas de rizomas é um método que pode ser utilizado com eficiência, devido à possibilidade de estacas provindas da parte aérea da planta ser pouco responsivas ao enraizamento.

3.3.3 Experimento III. Estaquia de rizoma subterrâneo

Não ocorreu interação entre os tipos de substratos e as concentrações do fitorregulador AIB utilizados para a estaquia por rizomas de *S. chilensis*. A Tabela 9 mostra o efeito dos substratos na porcentagem de enraizamento e nos parâmetros de crescimento avaliados, sendo observado que o Plantmax® diferiu dos demais (areia e vermiculita) para todas as variáveis, exceto da areia em relação à porcentagem de enraizamento e número de brotos.

Tabela 9 – Médias das variáveis de crescimento em cada um dos substratos para a estaquia de rizomas da espécie *Solidago chilensis*. Santa Maria – RS (2012).

Variáveis	Substratos			CV(%)
	Plantmax®	Areia	Vermiculita	
Enraizamento (%)	62,037 a*	43,148 ab	33,730 b	45,270
Raízes (n°)	7,551 a	2,796 b	1,186 b	14,459
Brotações (n°)	0,694 a	0,611 a	0,305 b	34,178
Folhas (n°)	13,416 a	3,244 b	0,577 c	11,648
Altura (cm)	13,415 a	1,449 b	0,891 b	13,018
Comprimento da maior raiz (cm)	4,904 a	1,599 b	2,162 b	14,564
Massa fresca folha (g)	0,887 a	0,029 b	0,010 b	3,982
Massa fresca caule (g)	0,304 a	0,030 b	0,011 b	2,216
Massa fresca raiz (g)	0,071 a	0,007 b	0,016 b	1,027
Massa seca caule (g)	0,074 a	0,006 b	0,002 b	0,906
Massa seca raiz (g)	0,013 a	0,001 b	0,003 b	54,816
Área foliar (cm ²)	62,400 a	1,910 b	0,791 b	13,571

*Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Observa-se na Tabela 9 que a porcentagem de enraizamento das estacas foi de 62,03% no substrato Plantmax®, o qual não difere da areia (43,14%), e média expressivamente significativa de área foliar (62,40 cm²) para as estacas submetidas ao Plantmax®. Em relação ao número e massa seca de raízes, esse substrato também proporcionou médias significativamente elevadas, 7,55 e 0,01 g, respectivamente. O Plantmax® proporcionou, de maneira geral, o melhor desenvolvimento das estacas, seja em enraizamento ou parte aérea. A sua superioridade provavelmente ocorreu devido a esse substrato compor uma mistura de

diversos compostos, que combinados proporcionam melhores características físicas e químicas em relação aos compostos puros (KAMPF, 2000). Conforme Fachinello et al. (2005) o substrato é um dos fatores de maior influência na propagação por estaquia, especialmente naquelas espécies com maior dificuldade de formação de raízes, ele deve sustentar as estacas durante o enraizamento, mantendo sua base num ambiente úmido, escuro e suficientemente aerado. Correia et al. (1998) também em estudo com a espécie *S. chilensis*, constataram que o substrato solo do local de coleta e solo do local de coleta + areia (2:1) foram os que apresentaram as médias mais satisfatórias de número de raízes por estaca (6,00 e 4,14) e massa seca foliar (0,26 e 0,15 g), respectivamente, em relação ao substrato areia, também tendo destaque o solo do local de coleta para massa seca de raízes (0,09 g).

Fachinello et al. (2005) apontaram algumas vantagens e desvantagens dos substratos solo, areia e vermiculita, utilizados no presente estudo, sendo o solo adequado para estacas lenhosas, porém de fácil disseminação de doenças; a areia, adequada para estacas herbáceas, de baixo custo, porém possui pouca retenção de água e pode ser compactada e a vermiculita, adequada para estacas herbáceas, de baixo peso, elevada porosidade, porém de custo elevado.

Além do substrato, diversos são os fatores que influenciam o enraizamento de estacas, entre eles, o grau de lignificação dessas, a quantidade de reservas e a diferenciação dos tecidos. A capacidade de uma estaca emitir raízes ocorre em função de fatores endógenos e exógenos e da interação de tais fatores, principalmente, a translocação de substâncias localizadas nas gemas, onde está o centro de produção de substâncias hormonais, que são translocados via floema para as diversas regiões da estaca (FACHINELLO et al., 1995).

A utilização do fitorregulador AIB não proporcionou qualquer efeito na formação de raízes para a estaquia de rizomas de *Solidago chilensis*. Esse fato pode estar relacionado à concentração endógena de auxinas nas estacas estar em níveis favoráveis ao enraizamento, sendo desnecessária a aplicação do fitorregulador, o que torna a propagação mais simples e acessível. As concentrações de AIB utilizadas tiveram efeito apenas na massa fresca de raízes (Figura 3).

Conforme a figura 3, o maior valor para esta variável (0,05 g) ocorreu na ausência do fitorregulador, enquanto que as concentrações de 600 e 1200 mg L⁻¹ tiveram efeito fitotóxico, reduzindo a massa fresca das raízes, atingindo valores próximos de 0,01 g.

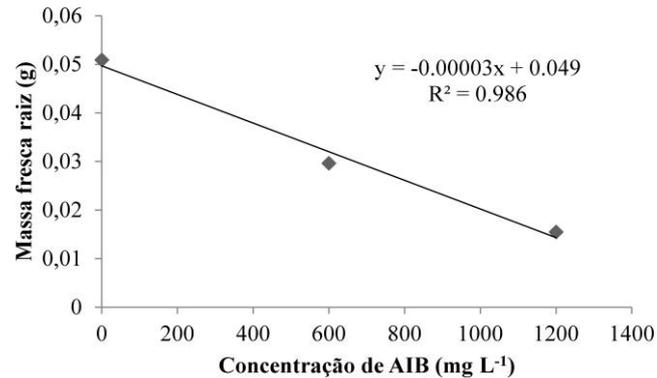


Figura 3 - Efeito das concentrações 0, 600 e 1200 mg L⁻¹ de ácido indol butírico (AIB) na massa fresca de raízes das estacas de rizomas de *Solidago chilensis*, cultivadas em sala de crescimento a 25 ± 2°C, com fotoperíodo de 16 horas (R.F.A. de ~36 μmol m⁻² s⁻¹).

3.4 Conclusões

1. A combinação 2,0 + 0,2 mg L⁻¹ de BAP e ANA, respectivamente, adicionada ao meio de cultura MS completo, com 1,0 mg L⁻¹ de carvão ativado, favorece a micropropagação de *S. chilensis*.

2. O segmento nodal apresenta maior número de brotos e folhas e menor percentual de oxidação em relação ao apical.

3. O segmento nodal e 2,0 + 0,2 mg L⁻¹ de BAP e ANA proporcionam o mais elevado percentual de sobrevivência das plantas estabelecidas *in vitro*.

4. O substrato água proporciona o máximo de enraizamento para a estaquia de ramos aéreos, além de apresentar maior formação de brotos, folhas, raízes e comprimento da raiz principal, sendo desnecessária a utilização de solução nutritiva MS 20%.

5. As estacas medianas e basais são vantajosas para a propagação vegetativa da espécie. O enraizamento ocorre na ausência ou presença de AIB, porém, é significativamente superior na presença deste fitorregulador.

6. O substrato Plantmax® é o mais indicado para a propagação por estacas de rizomas, sendo o fitorregulador AIB desnecessário.

CAPÍTULO IV

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL GENOTÓXICO DE *Solidago chilensis* NO CICLO CELULAR DE *Allium cepa* E ACÚMULO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

RESUMO

Este estudo teve como objetivo avaliar o potencial genotóxico dos extratos de folhas de *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae), oriundas de uma população (terreno baldio) e de três sistemas de cultivo (casa de vegetação, micropropagação e estaquia) sobre o ciclo celular de cebola (*Allium cepa* L., Amaryllidaceae). Extratos aquosos de folhas apicais dessas plantas foram preparados nas concentrações de 5 e 20 g L⁻¹, sendo utilizada água destilada como controle negativo e glifosato 20% como controle positivo, além do flavonoide quercetina (1 g L⁻¹) e metanol (100%), totalizando 13 tratamentos, cada um composto por cinco cebolas (repetições). As lâminas foram preparadas pela técnica de esmagamento, sendo observadas e avaliadas 5000 células por tratamento. Em seguida, foi realizada análise estatística usando o teste Qui-quadrado (χ^2). Foram quantificados polifenóis totais e flavonoides por espectrofotometria e ácido clorogênico, quercetina e rutina por Cromatografia Líquida de Alta eficiência (CLAE). Os extratos em ambas as concentrações não apresentaram potencial antiproliferativo, sendo detectado potencial genotóxico dos oriundos das plantas micropropagadas (5 e 20 g L⁻¹) e das cultivadas em casa de vegetação na dose de 5 g L⁻¹. O extrato da população de terreno baldio (20 g L⁻¹) não possui potencial antimutagênico. Polifenóis e flavonoides estão presentes em todos os extratos, sendo dos flavonoides identificados o ácido clorogênico e quercetina em maior concentração no extrato de terreno baldio, 441,4 e 95,7 mg g⁻¹, respectivamente, e rutina em concentração semelhante em todas os extratos (em média 46,9 mg g⁻¹), com exceção da não identificação de quercetina no extrato provindo das plantas micropropagadas.

Palavras-chave: Erva lanceta. Planta medicinal. Genotoxicidade. Alterações cromossômicas.

4.1 Introdução

É vasto o número de espécies vegetais que apresenta potencial terapêutico e de pessoas que fazem uso dessas propriedades medicinais. Dentre essas espécies, destacam-se as nativas do Brasil, um país que com a ampla diversidade vegetal que apresenta, ainda carece de estudos que informem sobre a citotoxicidade que essas plantas podem apresentar aos seus usuários, os quais muitas vezes as utilizam de maneira indiscriminada, sem qualquer restrição. Segundo Vicentini et al. (2001), chás ou infusões de plantas medicinais podem conter substâncias tóxicas com efeitos mutagênicos aos organismos.

A espécie medicinal *Solidago chilensis* Meyen, conhecida popularmente como erva lanceta ou arnica brasileira é originária da parte meridional da América do Sul, podendo ser encontrada na maior parte do território brasileiro, incluindo as regiões Sul e Sudeste. Apresenta características subarborescentes, de aproximadamente um metro de altura, com crescimento vigoroso em beira de estradas e terrenos baldios (LORENZI; MATOS, 2008). Na medicina popular prevalece seu uso externo no tratamento de ferimentos, contusões, escoriações e traumatismos (CORRÊA, 1998). Internamente, suas folhas podem ser utilizadas como estimulante gastrointestinal, cicatrizante e agente anti-inflamatório (ROQUE et al., 1983), além de serem utilizadas como antifúngica (FENNER et al., 2006). Em 2004, Facury Neto et al. comprovaram efeitos significativos no tratamento de feridas em ratos.

Estudos fitoquímicos demonstrando os metabólitos secundários presentes na parte aérea e radicular foram realizados para *S. chilensis* (TORRES et al., 1987, 1989; GUNTNER et al., 1999; DIAS, 2001; SCHMEDA-HIRSCHMANN et al., 2005; GRIZA, 2007). Esses metabólitos são compostos que, aparentemente, não têm função direta no crescimento e desenvolvimento das plantas, sendo muitos, utilizados como medicamentos, entre outras aplicações (TAIZ; ZIEGER, 2009). O acúmulo desses metabólitos é o resultado de complexas interações entre biossíntese, transporte, estocagem e degradação (WINK, 1990). Entretanto, a maioria dos mecanismos que regulam tanto a síntese quanto a estocagem e a degradação permanecem ainda desconhecidos (SIMÕES et al., 2010). Cada um desses processos é comandado por genes influenciados pelo estágio de desenvolvimento, hereditariedade e ambiente no qual as plantas estão se desenvolvendo (ROBBERS et al., 1996).

Segundo Gobbo-Neto e Lopes (2007) algumas condições ambientais que possivelmente alteram a produção e concentração dos metabólitos secundários são temperatura, sazonalidade, disponibilidade de água, radiação ultravioleta, nutrientes do solo,

altitude, composição atmosférica e fase de desenvolvimento das plantas. Sendo assim, uma mesma espécie provinda de diferentes populações ou sistemas de cultivo, pode apresentar diferenças na síntese e acúmulo dessas substâncias. Considerando esses fatores, muitas vezes, o uso indiscriminado de plantas pode não ser benéfico para o usuário, devido à possibilidade de muitos metabólitos serem tóxicos.

Um dos bioindicadores mais utilizados com eficácia para o estudo da genotoxicidade em extratos vegetais é o sistema teste *Allium cepa* (VICENTINI et al., 2001; TEIXEIRA et al., 2003; FACHINETTO et al., 2007; BAGATINI et al., 2009), sendo validado pelo Programa Internacional de Segurança Química (IPCS) e Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP) como um eficiente teste para análise e monitoramento *in situ* da genotoxicidade de substâncias ambientais (CABRERA; RODRIGUEZ, 1999; SILVA et al., 2004; LEME; MORALES, 2009). Esse sistema também pode ser benéfico para avaliar a atividade mutagênica de drogas específicas devido à sua sensibilidade e correlação com testes em mamíferos (FISKESJO, 1993; CHAUAN et al., 1999; CAMPAROTO et al., 2002; TEIXEIRA et al., 2003).

Diante do exposto, os objetivos dos estudos foram avaliar o potencial genotóxico e acúmulo de metabólitos secundários em extratos de folhas de plantas de *S. chilensis* Meyen (Asteraceae), oriundas de uma população de terreno baldio e de três formas de propagação (cultivo em casa de vegetação, micropropagação e propagação por estaquia).

4.2 Material e Métodos

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Citogenética Vegetal e Genotoxicidade pertencente ao Departamento de Biologia do Centro de Ciências Naturais e Exatas, Laboratório de Farmacognosia e Laboratório de Química Farmacêutica pertencentes ao Departamento de Farmácia Industrial do Centro de Ciências da Saúde, ambos da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria - RS.

4.2.1 Material vegetal

As folhas apicais utilizadas tiveram quatro distintas origens:

I (plantas de terreno baldio) - População de um terreno não sombreado (29°42'12,11''S e 53°44'18,28''O) localizado no bairro Camobi, em Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil, sendo que a coleta ocorreu no verão, ainda no período de desenvolvimento vegetativo da espécie. O solo desse terreno pertence à classe textural franco argiloso e apresentou pH ácido (4,3), 1,7% de matéria orgânica, 0,7 mg/dm³ de fósforo e 44 mg/dm³ de potássio.

II (plantas cultivadas em casa de vegetação) - Plantas provenientes desta mesma população foram retiradas em condições de senescência (inverno), após seu período de frutificação e levadas para serem cultivadas em casa de vegetação climatizada a 25 ± 2°C, localizada no *campus* da UFSM. As plantas foram cultivadas em potes de polietileno (3500 mL) contendo substrato Plantmax® + solo do local de origem (2:1), sob irrigação diária com solução nutritiva MS 20% a cada 15 dias (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e aplicação de 0,5 mg L⁻¹ de Fungicida Carbendazim 500 mg L⁻¹ a cada 20 dias, por um período de dois meses. Nos últimos seis meses de cultivo foi realizada uma poda e as folhas apicais das brotações jovens foram utilizadas como material vegetal.

III (plantas micropropagadas *in vitro*) - Plantas micropropagadas a partir de segmentos apicais e nodais, retirados das brotações jovens oriundas das mudas cultivadas em casa de vegetação citadas na origem II, foram aclimatizadas em copos plásticos (400 mL), contendo substrato Plantmax® + vermiculita (2:1) e mantidas em sala de crescimento a 25 ± 2°C, fotoperíodo de 16 horas (R.F.A. de ~36 μmol m⁻² s⁻¹), irrigação diária (água destilada) por um período de 120 dias.

IV (plantas propagadas por estaquia) - Estacas de rizomas foram coletadas em plantas da população do terreno baldio, citada na origem I, no verão, antes do período de florescimento. As estacas ficaram imersas por seis horas em três diferentes doses de ácido indol butírico (AIB): 0, 600 e 1200 mg L⁻¹. Após, foram transferidas para bandejas de polipropileno (1600 mL) contendo três diferentes substratos, Plantmax®, areia e vermiculita, mantidas durante 90 dias em sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas (R.F.A. de ~36 μmol m⁻² s⁻¹), temperatura de 25 ± 2°C, recebendo irrigação diária com água destilada.

4.2.2 Extratos aquosos e tratamentos

Folhas apicais de plantas provenientes das quatro origens foram desidratadas em temperatura ambiente por um período de 40 dias e então usadas para obtenção de extratos aquosos por infusão durante 10 minutos em água destilada à 100°C, nas concentrações de 5 e 20 g L⁻¹, sendo após, filtrados e deixados esfriar à temperatura ambiente (± 25°C).

Os bulbos de cebola foram postos para enraizar em água destilada durante quatro dias, até as raízes atingirem no mínimo 0,5 cm de comprimento, quando então foram expostas aos 13 tratamentos, com cinco repetições cada (uma cebola por repetição): T1- controle negativo (água destilada); T2 a T9 - extratos das folhas de plantas oriundas das quatro origens (I, II, III e IV) nas concentrações 5 g e 20 g L⁻¹; T10- flavonoide quercetina (1 g L⁻¹); T11- metanol (100%); T12- glifosato 20% + 24 horas em extrato da origem I (20 g L⁻¹); T13- controle positivo (glifosato 20%).

A utilização do flavonoide quercetina foi devido a esse metabólito secundário estar presente na constituição química da parte aérea desta espécie, a fim de verificar se o efeito dessa substância se assemelha aos extratos testados. A quercetina foi dissolvida em solvente metanol, por isso, também foi testado o efeito desse composto isoladamente. O tratamento 12 recebeu apenas o extrato da origem I (20 g L⁻¹) em função de ser o mais abundante em quantidade, tendo em vista a insuficiência dos demais. O tratamento controle (T1) permaneceu em água e os demais grupos de cebolas foram submetidos aos tratamentos por 24 horas. Após esse período, todos os bulbos permaneceram em água destilada por 24 horas, com exceção do T12, o qual foi submetido a 24 horas em extrato da origem I (20 g L⁻¹). Depois de transcorrido esse período, as raízes foram coletadas e fixadas em etanol: ácido acético na proporção 3:1 durante 24 horas e em seguida, armazenadas em etanol 70% sob refrigeração até a confecção das lâminas.

4.2.3 Análise do ciclo celular de *Allium cepa*

Cada tratamento foi composto por cinco repetições (cinco bulbos de cebola), sendo que cada cebola teve duas raízes avaliadas. Com aproximadamente 1 cm, as mesmas foram hidrolisadas em HCl 1N por 5 minutos, lavadas em água destilada e coradas com orceína acética 2% (GUERRA; SOUZA, 2002). A região meristemática foi esmagada com auxílio de um bastão de vidro e sobre o material colocou-se a lamínula. Para cada raiz foi preparada uma lâmina e em cada uma delas, 500 células foram contadas, totalizando 1000 células por bulbo e

5000 para cada um dos tratamentos. As contagens e avaliações foram feitas através de microscópio óptico com uma objetiva de 40X, sendo observada em cada célula a ocorrência de divisão, de alterações cromossômicas e calculado o percentual de índice mitótico,

$$IM = \frac{\text{total de células em divisão} \times 100}{\text{total de células}} \text{ (PIRES et al., 2001).}$$

A análise estatística para comparação entre os valores do IM e taxas de alterações cromossômicas foi realizada através do teste Qui-quadrado (χ^2), com 5% de probabilidade de erro, usando o programa BioEstat 5.0 (AYRES, 2007).

4.2.4 Quantificação de polifenóis totais e flavonoides por espectrofotometria e ácido clorogênico, quercetina e rutina por Cromatografia Líquida de Alta eficiência (CLAE)

O conteúdo de polifenóis totais dos extratos aquosos de folhas apicais secas das quatro origens (plantas de terreno baldio, plantas cultivadas em casa de vegetação, plantas micropropagadas *in vitro* e plantas propagadas por estaquia) na concentração de 5 mg mL⁻¹, foi avaliado através de método colorimétrico descrito por Chandra e Mejia (2004), o qual utiliza 1,0 mL do reagente folin ciocalteau 2N, sendo adicionado em cada amostra de 5 mg mL⁻¹. Após 5 minutos, foram acrescentados 2 mL de carbonato de cálcio 20% e depois de 10 minutos foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 730 nm, aparelho que verifica a absorvância das amostras e as compara com o branco (etanol absoluto) e o padrão (ácido gálico). O teor foi calculado utilizando uma curva padrão desenvolvida para ácido gálico nas concentrações 0,001; 0,01; 0,02 e 0,03 mg mL⁻¹ ($y=30,767x-0,0087$, $R=0,9992$) e o resultado foi expresso em miligramas de equivalente de ácido gálico por grama de amostra.

A quantificação de flavonoides seguiu o método descrito por Woisky e Salatino (1998), com o uso de 1 mL de cloreto de alumínio 2% e leitura em espectrofotômetro a 420 nm. Para o cálculo do teor de flavonoides foi utilizado o padrão quercetina nas concentrações 0,002; 0,006; 0,01; 0,014 e 0,018 mg mL⁻¹ ($y=40,175x+0,001$, $R=0,9998$) e os resultados foram expressos em miligrama de equivalentes de quercetina por grama de extrato.

O ácido clorogênico, a rutina e a quercetina foram quantificados em extratos aquosos das folhas apicais das quatro origens citadas anteriormente, na concentração de 5 mg mL⁻¹, segundo a metodologia de Huber et al. (2007), com modificações. Foi utilizado o sistema de

cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD, Shimadzu, Kyoto, Japan), coluna Phenomenex C-18 (250 mm x 4,6 mm), empacotada com partículas de 5µm de diâmetro, sendo a fase móvel constituída por água destilada e metanol (v/v), acidificados com 0,3% de ácido fórmico, com eluição em gradiente. O gradiente iniciou com 20:80 de MeOH:H₂O (acidificados), mudou para 45:55 em 5 minutos, e 48:52 nos 17 minutos, passando para 20:80 em 20 minutos, até o final da corrida, em 30 minutos, com gradiente linear e fluxo de 0,8 mL/min, com volume de injeção de 20 µL. Os picos foram identificados em comparação com o tempo de retenção da solução dos padrões, no comprimento de onda de 370 nm. As amostras foram testadas em triplicada. As curvas analíticas dos padrões ácido clorogênico (0,5; 1; 2; 3 e 4 mg mL⁻¹), quercetina (1,2; 2,5; 3 e 4 mg mL⁻¹) e rutina (0,75; 1; 1,25; 2,5 e 5 mg mL⁻¹) foram: $4799,255x + 1406,102$, $R=0,9983$, $y = 90997,588x - 41747,088$, $R= 0,9956$ e $y = 32761,794x + 7594,339$ e $R=0,9911$, respectivamente. O tempo de retenção do ácido clorogênico foi 4,9 minutos, da rutina 20 minutos e da quercetina foi 23 minutos.

A comparação de médias entre as amostras foi realizada através do Teste t de Student, no aplicativo Office Excel.

4.3 Resultados e discussão

A Tabela 1 mostra o número de células em intérfase, mitose (prófase, metáfase, anáfase e telófase) e índice mitótico (IM) das raízes de *Allium cepa* submetidas aos 13 tratamentos. Observa-se que o metanol 100% (T11) foi o que proporcionou o índice mitótico mais elevado, apresentando 4,96% das células em divisão, diferindo dos demais, que variaram de 1,28 a 3,34%. Pelo fato desse composto químico ser considerado tóxico à saúde humana, o mesmo pode ocasionar algum tipo de alteração no ciclo celular de qualquer organismo, seja ele animal ou vegetal. Assim, possivelmente a sua composição alterou o comportamento da divisão celular, ocasionando este aumento no número de divisões.

Os extratos oriundos de folhas de plantas micropropagadas *in vitro* (5 g L⁻¹) e de plantas cultivadas *ex vitro* em casa de vegetação (20 g L⁻¹) promoveram índice mitótico de 3,34 e 2,66%, respectivamente, não diferindo entre si. Estes resultados demonstram que não há um padrão específico na influência das concentrações dos extratos no índice mitótico, mesmo em baixas concentrações poderá ocorrer um aumento da divisão celular ou vice-versa, dependendo de cada espécie estudada, bem como das formas de propagação e sistemas de

cultivo destas. Trabalho realizado com *Pluchea sagittalis* (Asteraceae) também demonstrou que o IM não está relacionado com concentrações elevadas de extrato aquoso vegetal (ROSSATO et al., 2010). O menor IM encontrado foi no controle negativo (água destilada), com 1,28% de células em divisão, o qual não diferiu significativamente dos tratamentos T2 (terreno baldio - 5 g L⁻¹), T5 (plantas micropropagadas - 20 g L⁻¹), T6 (casa vegetação - 5 g L⁻¹), T8 (estaquia - 5 g L⁻¹) e T9 (estaquia - 20 g L⁻¹).

Tabela 1 – Número de células em intérfase, mitose (prófase, metáfase, anáfase e telófase) e índice mitótico das raízes de *Allium cepa* submetidas aos tratamentos. Santa Maria – RS (2012).

Tratamento	Mitose					IM %
	Intérfase	Prófase	Metáfase	Anáfase	Telófase	
	n°	n°	n°	n°	n°	
T1	4936	39	7	5	13	1,28 e*
T2	4907	50	21	6	16	1,86 de
T3	4888	67	16	9	20	2,24 cd
T4	4833	99	34	9	25	3,34 b
T5	4927	36	14	10	13	1,46 e
T6	4917	43	17	7	16	1,66 de
T7	4867	79	19	8	27	2,66 bc
T8	4904	49	18	12	17	1,92 de
T9	4930	56	7	2	5	1,40 e
T10	4879	83	16	11	11	2,42 cd
T11	4752	142	31	36	39	4,96 a
T12	4878	92	8	10	12	2,44 cd
T13	4892	73	19	4	12	2,16 cd

*Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste χ^2 a 5% de probabilidade de erro. IM: índice mitótico. Cada tratamento conteve cinco repetições (cinco bulbos de cebola). Cada repetição constou de duas lâminas com uma raiz de aproximadamente 5 mm de comprimento, com a região meristemática fixada com etanol: ácido acético na proporção 3:1, sendo em cada uma observadas 500 células em microscópio óptico com uma objetiva de 40X.

T1: água destilada;

T2: terreno baldio (5 g L⁻¹);

T3: terreno baldio (20 g L⁻¹);

T4: plantas micropropagadas (5 g L⁻¹);

T5: plantas micropropagadas (20 g L⁻¹);

T6: casa de vegetação (5 g L⁻¹);

T7: casa de vegetação (20 g L⁻¹);

T8: estaquia (5 g L⁻¹);

T9: estaquia (20 g L⁻¹);

T10: quercetina 1 g L⁻¹;

T11: metanol 100%;

T12: glifosato 20% + 24h terreno baldio (20 g L⁻¹);

T13: glifosato 20%.

A ausência de efeito antiproliferativo ou antimitótico, ou seja, redução significativa no índice mitótico em relação ao controle, encontrada nas duas concentrações dos extratos (5 e 20 g L⁻¹), discorda do encontrado por Bagatini et al. (2009) para esta espécie, no qual o extrato na maior concentração utilizada (14 g L⁻¹), de todas as populações testadas, demonstrou um efeito antiproliferativo nas células de *Allium cepa*, devido ao aumento significativo do IM do extrato, em relação ao controle negativo (água). A espécie medicinal *Achyrocline satureioides* (Asteraceae), que possui taninos e flavonoides em sua constituição, também indicou a presença de atividade antiproliferativa de seus extratos (5 e 20 g L⁻¹) sob as células de *Allium cepa* (FACHINETTO et al., 2007). Outros estudos realizados com as espécies *Baccharis trimera*, *B. articulata* e *Mikania glomerata*, pertencentes à Asteraceae, também encontraram uma redução significativa no índice mitótico dos extratos (15 e 75 g L⁻¹, 4 e 16 g L⁻¹) respectivamente, em relação ao controle negativo (água) (FACHINETTO; TEDESCO, 2009; DALLA NORA et al., 2010).

Em concordância com o presente estudo, Camparoto et al. (2002) constataram que as infusões das folhas de *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) e *Bauhinia candicans* (Fabaceae), apesar de apresentarem em sua constituição taninos e flavonoides, não apresentaram inibição da divisão celular, assim como Teixeira et al. (2003), em estudo com *Psidium guajava* L. (Myrtaceae) e *Achillea millefolium* L. (Asteraceae), os quais comentam que são plantas que também contêm taninos, podendo ser responsáveis pela inibição da divisão celular no teste de *A. cepa*, porém segundo esses autores, o efeito inibitório desse metabólito requer uma exposição contínua das células a essas substâncias.

Na Tabela 2 está demonstrada a porcentagem total de células com alterações cromossômicas ocorridas em função do número de divisões celulares, nas raízes de *Allium cepa*, submetidas a cada um dos tratamentos. Observa-se que ocorreu variação nesse número entre os tratamentos, sendo observado que, os que continham os extratos aquosos de folhas de plantas micropropagadas nas concentrações 5 e 20 g L⁻¹, T4 e T5 respectivamente, e T6 (folhas de plantas cultivadas em casa de vegetação - 5 g L⁻¹) apresentaram os maiores números de células com alterações cromossômicas, diferindo do controle negativo (água destilada), mostrando que essas infusões possuem efeito genotóxico, assim como o T10 (quercetina 1 g L⁻¹), T11 (metanol 100%), T12 (glifosato 20% + 24 horas plantas de terreno baldio - 20 g L⁻¹) e T13 (glifosato 20%). O tratamento 12 (glifosato 20% + 24h em extrato

oriundo de plantas de terreno baldio - 20 g L⁻¹) para testar o possível efeito antimutagênico da espécie, aumentou o número de alterações em relação ao glifosato 20% (controle positivo), embora esse número não tenha diferido significativamente, sendo observada ausência de recuperação das alterações cromossômicas ocasionadas pelo glifosato 20%.

Tabela 2 - Alterações cromossômicas (cromossomo desorganizado, cromossomo solto ou quebrado, cromossomo atrasado ou adiantado e ponte em anáfase) nas células meristemáticas de raiz de *Allium cepa* submetidas aos tratamentos. Santa Maria – RS (2012).

Tratamento	Total de Divisão	Cromossomo Desorganizado	Cromossomo solto ou quebrado	Cromossomo atrasado ou adiantado	Ponte em Anáfase	Total de alterações	
	nº	nº	nº	nº	nº	nº	%
T1	64	0	0	0	0	0	0,00 b*
T2	93	2	4	0	0	6	6,31 ab
T3	112	1	5	1	0	7	6,25 ab
T4	167	6	12	1	0	19	11,37 a
T5	73	0	7	1	0	8	10,95 a
T6	83	6	6	0	0	12	14,45 a
T7	133	5	3	0	0	8	6,01 ab
T8	96	2	2	0	1	5	5,20 ab
T9	70	1	2	0	0	3	4,28 ab
T10	121	4	8	1	0	13	10,74 a
T11	248	11	10	0	1	22	8,87 a
T12	122	14	0	0	1	15	12,29 a
T13	108	6	4	0	0	10	9,25 a

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste χ^2 a 5% de probabilidade de erro. Cada tratamento conteve cinco repetições (cinco bulbos de cebola). Cada repetição constou de duas lâminas com uma raiz de aproximadamente 5 mm de comprimento, com a região meristemática fixada com etanol e ácido acético, em proporção 3:1, sendo em cada uma observadas 500 células em microscópio óptico com uma objetiva de 40X.

T1: água destilada;

T2: terreno baldio (5 g L⁻¹);

T3: terreno baldio (20 g L⁻¹);

T4: plantas micropropagadas (5 g L⁻¹);

T5: plantas micropropagadas (20 g L⁻¹);

T6: casa de vegetação (5 g L⁻¹);

T7: casa de vegetação (20 g L⁻¹);

T8: estaquia (5 g L⁻¹);

T9: estaquia (20 g L⁻¹);

T10: quercetina 1 g L⁻¹;

T11: metanol 100%;

T12: glifosato 20% + 24h terreno baldio (20 g L⁻¹);

T13: glifosato 20%.

A ocorrência de genotoxicidade constatada nos extratos oriundos de plantas micropropagadas e de plantas cultivadas em casa de vegetação pode ser explicada através dos resultados obtidos na Tabela 3, a qual expressa o conteúdo dos metabólitos secundários polifenóis, flavonoides, ácido clorogênico, quercetina e rutina nos extratos das folhas das plantas oriundas da população de terreno baldio e das três formas de cultivo. De maneira geral, as quantidades dessas substâncias observadas nas folhas das plantas micropropagadas e cultivadas em casa de vegetação são semelhantes ao conteúdo encontrado nos demais extratos (plantas de terreno baldio e plantas de estaquia), sendo assim, provavelmente o potencial genotóxico tenha sido ocasionado por outros metabólitos não identificados nas amostras (Tabela 3), devido a características dos próprios ambientes de cultivo (sala de crescimento e casa de vegetação), os quais influenciam na síntese e acúmulo de metabólitos secundários. Segundo Duke (2000), espécies da família Asteraceae apresentam compostos tóxicos, como rutina, ácidos tanínicos, hidrociânicos, fórmicos e málicos, assim como, Ya-Qin et al. (2001) mencionaram que flavonoides têm demonstrado possuir atividade citotóxica.

Tabela 3 - Conteúdo de polifenóis, flavonoides, ácido clorogênico, quercetina e rutina em extratos aquosos de folhas de plantas de *Solidago chilensis* oriundas diferentes formas de propagação e cultivo. Santa Maria – RS (2012).

Amostras	Polifenóis (mg EAG/g amostra) ± DP	Flavonoides (mg EQ/g amostra) ± DP	Ác. clorogênico (mg Ác. Clorog./g amostra) ± DP	Quercetina (mg quer./g amostra) ± DP	Rutina (mg rut./g amostra) ± DP
I - Plantas de terreno baldio	0,16±0,0100 b	14,46±1,0000 a	441,40±0,0680 a	95,774±0,012 a	47,33±0,0004 a*
II- Plantas de casa de vegetação	0,24±0,0700 b	14,20±1,2200 a	88,90±0,0380 b	91,948±0,024 b	46,63±0,0004 a
III- Plantas micropropagadas <i>in vitro</i>	0,38±0,1100 b	2,03±0,1700 b	61,80±0,0010 c	Não identificado c	46,42±0,0001 a
IV- Plantas de estaquia	1,37±0,0200 a	1,66±0,4600 b	63,70±0,014 c	92,285±0,1890 b	47,23±0,0350 a

DP: Desvio Padrão; mg EAG/g amostra: miligrama de equivalente de ácido gálico por grama de amostra; mg EQ/g amostra: miligrama de equivalente de quercetina por grama de amostra; mg Ac. Clorog./g amostra: miligrama de ácido clorogênico por grama de amostra; mg quer./g amostra: miligrama de quercetina por grama de amostra. mg rut./g amostra: miligrama de rutina por grama de amostra. *Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem pelo Teste t de Student a 5% de probabilidade de erro.

Embora o metabolismo vegetal seja distinto ao dos animais, o sistema teste de *A. cepa* é um excelente parâmetro de análise citotóxica (FISKESJÖ, 1994). Segundo Vicentini et al. (2001) a observação da ocorrência de alterações cromossômicas no ciclo celular de *Allium cepa* tem sido usada como indício para prevenir a população humana sobre o consumo de determinado produto.

As alterações cromossômicas encontradas podem ser observadas na figura 1, com maior número de ocorrências as que apresentam cromossomos desorganizados (Figura 1b) e cromossomos soltos (Figura 1a), sendo essas encontradas em três das quatro fases da mitose: prófase, metáfase e anáfase (dados não demonstrados). Bagatini et al. (2009) estudando três populações de *Solidago microglossa* não encontraram qualquer tipo de alteração cromossômica nas células de raízes de *Allium cepa*, submetidas a infusões de folhas nas concentrações 1,75 e 14 g L⁻¹, sugerindo a ausência de efeitos mutagênicos. Resultados distintos para a mesma espécie possivelmente ocorreram em função das diferenças entre populações, sistemas de cultivo e concentrações. Dias (2001) em estudo fitoquímico da espécie *S. chilensis*, relatou que a variação sazonal, clima, solo e o período de coleta podem ser responsáveis pelas diferenças na composição química das plantas dessa espécie.

Considerando as quatro origens das plantas utilizadas neste estudo, sabe-se que apresentavam diferenças nas formas de propagação e cultivos, variando nos fatores ambientais como temperatura, radiação, umidade, entre outros. Conforme Hazarika (2003), as condições ambientais do cultivo *in vitro* e *ex vitro* como luminosidade (qualidade e quantidade), umidade relativa do ar, nutrientes e os tipos de substrato são características que diferenciam fisiológica e anatomicamente as plantas, fatores que podem ocasionar diferente produção e acúmulo de metabólitos secundários.

Na Tabela 3 pode ser observado que a quantidade de polifenóis nos extratos das folhas de plantas propagadas por estaquia foi a mais elevada (1,37 mg g⁻¹), diferindo estatisticamente das demais, plantas micropropagadas (0,38 mg g⁻¹), plantas cultivadas em casa de vegetação (0,24 mg g⁻¹) e plantas de terreno baldio (0,16 mg g⁻¹). Diferentemente dos polifenóis totais, para o conteúdo de flavonoides, os maiores acúmulos foram encontrados na amostra de plantas do terreno baldio e casa de vegetação, 14,46 e 14,20 mg g⁻¹, respectivamente, não diferindo entre si e sim das demais, as quais apresentaram o teor de 2,03 e 1,66 mg g⁻¹ para as plantas propagadas *in vitro* e por estaquia, respectivamente. Em concordância com o presente estudo, Tavano et al. (2009) constataram em *Matricaria recutita* L. (Asteraceae) um maior conteúdo de flavonoides nas plantas do campo, enquanto que as plantas micropropagadas *in vitro* acumularam maiores teores de fenóis.

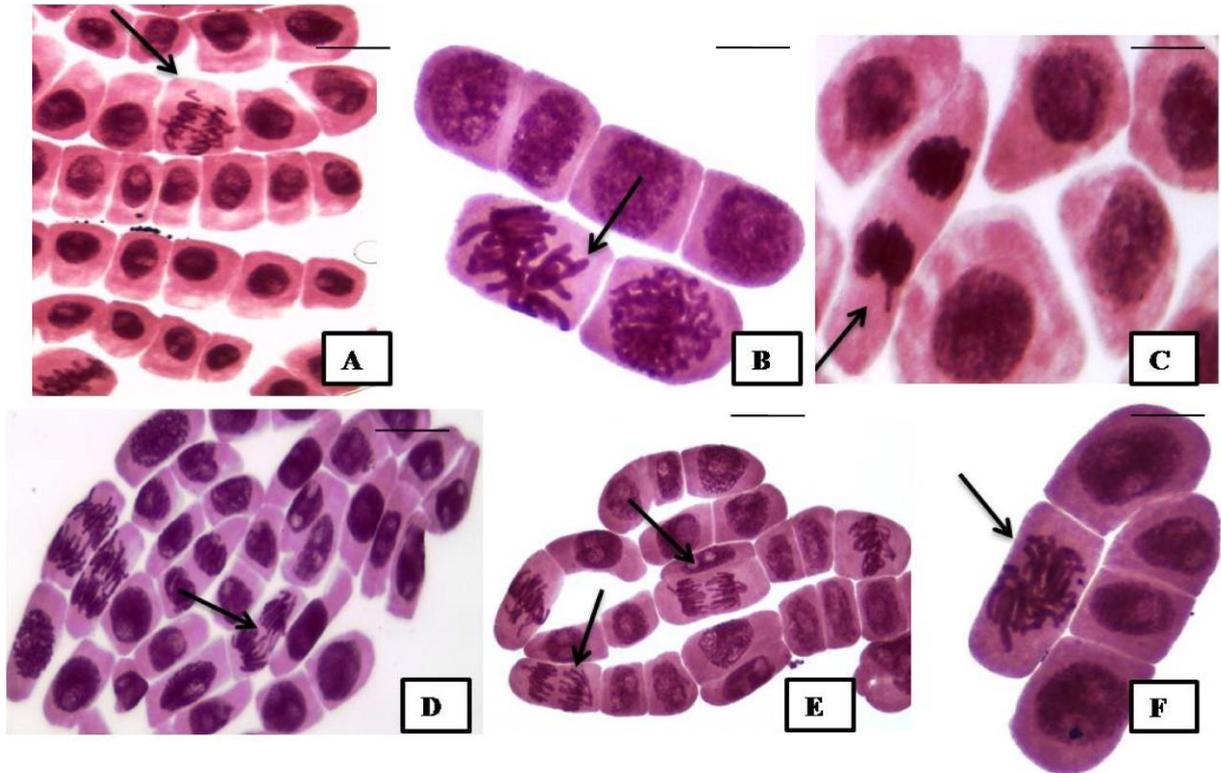


Figura 1 - Células meristemáticas de raízes de *Allium cepa* submetidas aos distintos tratamentos. A) Anáfase com cromossomo solto - T11: metanol (100%); B) Metáfase com cromossomos desorganizados - T13: glifosato (20%); C) Telófase com cromossomo adiantado - T3: plantas de terreno baldio (20 g L⁻¹); D) Anáfase com pontes - T8: plantas propagadas por estaquia (5 g L⁻¹); E) Anáfases com cromossomos atrasados e adiantados - T4: plantas micropropagadas (5 g L⁻¹); F) Prófase com quebras cromossômicas - T9: plantas propagadas por estaquia (20 g L⁻¹); escala 10 µm.

A biossíntese e o acúmulo de flavonoides estão relacionados, em condições naturais, a diversas funções nas plantas, dentre elas, a proteção contra a incidência de raios ultravioleta e visível, além da proteção contra insetos, fungos, vírus e bactérias, atuando como mecanismo de defesa contra estresses (SIMÕES et al., 2010). As plantas de terreno baldio e cultivadas casa de vegetação estavam mais expostas às intempéries e fatores estressantes, uma vez que as condições ambientais, tanto fatores abióticos quanto bióticos, não eram controladas, com exceção da temperatura na casa de vegetação. Isto pode ter favorecido o maior acúmulo destes compostos. Pasqua et al. (2003) constataram que para ocorrer a síntese de todos os compostos ativos em plantas de *Hypericum perforatum* L., (Clusiaceae) propagadas *in vitro*, a diferenciação de órgãos foi necessária e não apenas células indiferenciadas ou calos, além de as plantas terem que atingir um estágio avançado de crescimento. Isso se deve a diferença que pode existir na produção de metabólitos secundários nos distintos estágios de desenvolvimento das plantas. Conforme Simões et al. (2010), em alguns casos a produção

pode estar restrita a um estágio específico do desenvolvimento do vegetal ou a determinadas condições ambientais ou ecológicas.

Extratos aquosos de folhas de plantas oriundas das quatro origens foram analisadas em Cromatografia Líquida de Alta Performance (CLAE), sendo observados os flavonoides ácido clorogênico, quercetina e rutina (Tabela 3). O conteúdo de ácido clorogênico foi significativamente maior ($441,40 \text{ mg g}^{-1}$) na amostra I (plantas de terreno baldio), diferindo das demais. As amostras III e IV, extratos de plantas micropropagadas e propagadas por estaquia, respectivamente, obtiveram valores inferiores, $61,80$ e $63,70 \text{ mg g}^{-1}$, não diferindo entre si. A quantidade de quercetina na amostra I foi $95,77 \text{ mg g}^{-1}$, diferindo estatisticamente dos conteúdos nas amostras II e IV ($91,94$ e $92,28 \text{ mg g}^{-1}$, respectivamente), não sendo detectado acúmulo em plantas oriundas da micropropagação (amostra III). Em relação ao conteúdo de rutina, todas as amostras apresentaram esse flavonoide e as concentrações variaram entre $46,42$ a $47,33 \text{ mg g}^{-1}$, não apresentando diferenças significativas. Diante destes resultados, pode-se constatar que existe variação no conteúdo desses flavonoides em diferentes ambientes, porém essa variação não ocorre do mesmo modo para todos. Embora as plantas do terreno baldio tenham apresentado as maiores concentrações para os três flavonoides, o conteúdo de rutina, por exemplo, não diferiu entre as plantas das quatro origens e o de quercetina apresentou conteúdos semelhantes em todas as amostras, com exceção da III.

Este perfil cromatográfico de flavonoides revelou uma composição semelhante àqueles já encontrados em outras espécies do gênero *Solidago* (PIETTA et al., 1991; APÁTI et al., 2002; APÁTI et al., 2003) e da espécie em estudo (GUNTNER et al., 1999; GRIZA, 2007; SCHMEDA-HIRSCHMANN et al., 2005). Esses últimos determinaram, entre outros compostos, o conteúdo de rutina e ácido clorogênico em rizomas de plantas silvestres de *S. chilensis* e em plantas obtidas *in vitro*, sendo que a quantidade de ácido clorogênico e rutina nas plantas silvestres foi 27 e 17 mg g^{-1} , respectivamente, e em plantas *in vitro* não foi constatada a presença desses dois flavonoides.

Segundo Rout et al. (2000), o acúmulo de metabólitos secundários em culturas de tecidos vegetais depende de muitos fatores, incluindo a fonte de explantes, tipos e concentrações de reguladores de crescimento e níveis de sacarose. Thiem et al. (2001), compararam duas espécies de *Solidago* cultivadas *in vitro* e mostraram que os compostos glicosídeos fenólicos e flavonoides presentes nas plantas regeneradas *in vitro*, apresentaram um padrão semelhante ao observado nas plantas cultivadas à campo, com desvantagem apenas para calos. As plantas propagadas *in vitro* podem apresentar teores adequados de

determinados metabólitos secundários, conforme ocorreu para o conteúdo de rutina no presente estudo, sendo a micropropagação uma possível alternativa de cultivo para a extração de metabólitos secundários, evitando a intensa coleta de plantas em áreas naturais.

4.4 Conclusões

1. Os extratos aquosos das folhas de *S. chilensis* nas concentrações 5 e 20 g L⁻¹ possuem ausência de potencial antiproliferativo e o da população de terreno baldio (20 g L⁻¹) não recupera as alterações ocasionadas pelo controle positivo (glifosato 20%).

2. Plantas micropropagadas (5 e 20 g L⁻¹), cultivadas em casa de vegetação (5 g L⁻¹), o flavonoide quercetina (1g L⁻¹) e o solvente metanol (100%) apresentam potencial genotóxico.

3. Plantas coletadas em terreno baldio e cultivadas em casa de vegetação apresentam o conteúdo mais elevado de flavonoides, sendo as de terreno baldio as que possuem maior quantidade de ácido clorogênico e quercetina.

4. Plantas oriundas da técnica de estaquia possuem o mais elevado conteúdo de polifenóis.

5. O conteúdo de rutina é semelhante nas quatro origens, sendo a propagação *in vitro* uma alternativa para extração desse metabólito secundário.

6. É necessário que mais estudos sejam realizados para avaliar com maior precisão os riscos potenciais dos agentes genotóxicos, presentes nos extratos aquosos dessa espécie, à saúde humana.

CONCLUSÕES GERAIS

As sementes da espécie *S. chilensis* apresentam dormência, a qual foi superada a partir das interações que ocorreram entre populações, temperaturas, condições de luminosidade e estratificação através da embebição em água a $5 \pm 2^\circ\text{C}$. 36 horas em embebição proporciona a maior elevação da porcentagem e também da velocidade de germinação, favorecidas, de maneira geral, quando em fotoperíodo de 16 horas, em temperatura de 20°C ou superior a essa e em escuro contínuo, em 20°C ou inferior. A temperatura que proporciona, de maneira geral, a maior porcentagem de germinação das sementes é a de 20°C . A germinação prevalece em sementes oriundas de plantas de terreno baldio (habitat natural da espécie), germinando em fotoperíodo de 16 horas e também em escuro contínuo.

Na propagação *in vitro*, a adição dos fitorreguladores BAP e ANA ao meio de cultura MS 100%, favorece a micropropagação de *S. chilensis*, sendo o segmento nodal o que apresenta os melhores resultados de crescimento e combinado com os fitorreguladores proporciona o mais elevado percentual de sobrevivência das plantas estabelecidas *in vitro*. Dentre os métodos de propagação vegetativa por estaquia *ex vitro*, o método que utiliza rizomas subterrâneos é o que apresenta os melhores resultados tanto para o enraizamento, como para a parte aérea, destacando-se em relação às porções de ramos aéreos.

A avaliação do potencial genotóxico dos extratos de plantas de terreno baldio, cultivadas em casa de vegetação, micropropagadas e oriundas da estaquia de rizomas revela a presença de potencial genotóxico nos extratos das plantas micropropagadas (5 e 20 g L^{-1}) e cultivadas em casa de vegetação (5 g L^{-1}), ausência de potencial antiproliferativo dos extratos em ambas as concentrações, além da ausência de recuperação de alterações cromossômicas ocasionadas pelo glifosato 20%, do extrato das plantas de terreno baldio (20 g L^{-1}). A partir disso, é necessário que mais estudos sejam realizados para avaliar com maior precisão os riscos potenciais dos agentes genotóxicos, presentes nos extratos aquosos dessa espécie, à saúde humana. O conteúdo de metabólitos secundários avaliado nesses extratos, revela, de maneira geral, quantidades mais elevadas de flavonoides, ácido clorogênico e quercetina em plantas de terreno baldio e casa de vegetação e conteúdo semelhante de rutina nos extratos de todas as origens.

REFERÊNCIAS

ADEGAS, F. S.; VOLL, E.; PRETE, C. E. C. Embebição e germinação de sementes de picão-preto (*Bidens pilosa*). **Planta Daninha**, Viçosa, v. 21, n. 1, p. 21-25, 2003.

AGUSTÍ, M.; ALMELA, V. **Aplicación de fitorreguladores em citricultura**. Barcelona: Aedos, 1991. 269 p.

ALVARENGA, L. R.; CARVALHO, V. D. Uso de substâncias promotoras de enraizamento de estacas frutíferas. **Informe agropecuário**, Belo Horizonte, v. 9, n. 101, p. 47-55, 1983.

ANDERBERG, A. A. et al. Compositae. In: KUBITSKI, K. (Ed.). **The families and genera of vascular plants**. Berlin: Springer, 2007. p. 61-588.

ANDRADE, M. W. et al. Micropropagação de aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr.All). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n. 1, p. 174-180, 2000.

APÁTI P. et al. HPLC analysis of the flavonoids in pharmaceutical preparations from Canadian goldenrod (*Solidago canadensis*). **Chromatographia**, v. 56, n. 1, p. 65-8, 2002.

APÁTI, P. et al. Herbal remedies of *Solidago* correlation of phytochemical characteristics and antioxidative properties. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 32, n. 4-5, p. 1045-1053, aug. 2003.

ARRIGONI-BLANK, M. F.; SANTOS, A. V.; BLANK, A. F. Organogênese direta e aclimatização de plantas de patchouli. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 2, p. 145-150 abr./jun. 2011.

AYRES, M. **BioEstat 5.0**: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. 5. ed. Belém: Sociedade Civil Mamirauá, Brasília CNPq, 2007.

BAGATINI, M. D.; SILVA, A. C. F.; TEDESCO, S. B. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 17, n. 3, p. 444-447, jul./set. 2007.

BAGATINI, M. D. et al. Cytotoxic effects of infusions (tea) of *Solidago microglossa* DC. (Asteraceae) on the cell cycle of *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 19, n. 2b, p. 632-636, abr./jun. 2009.

BARBOZA, S. B. S. C. et al. Anatomia foliar de plantas micropropagadas de abacaxi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 2, p. 185-194, fev. 2006.

BARROSO, G. M. et al. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. Viçosa: Imprensa Universitária da UFV, v. 3, 1991. p. 237-314.

BASKIN, C. C.; BASKIN, J. M. **Seeds: Ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination**. San Diego, CA, USA: Academic Press, 1998.

BERTOLUCCI, S. K. V. et al. Micropropagação de *Tournefortia cf. paniculata* Cham. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 3, n. 1, p. 43-49, 2000.

BERTONI, B. W. et al. Micropropagação de *Calendula officinalis* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, n. 2, p. 48-54, 2006.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination**. v. II. Viability, dormancy and environmental control. Berlin: Springer-Verlag, 1982. 375 p.

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

BEWLEY, J. D. Seed germination and dormancy. **The Plant Cell**, v. 9, p. 1055-1066, July 1997.

BEZERRA, A. M. E. et al. Efeito da pré-embebição e aplicação de ácido giberélico na germinação de sementes de macela. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 28, n. 3, p.185-190, 2006.

BIASI, L. A. Reguladores de crescimento vegetal. In: WACHOWICZ, C. M.; CARVALHO, R. I. N. **Fisiologia vegetal: produção e pós-colheita**. Curitiba: Champagnat, 2002. 424 p.

BONA, C. M. de et al. Estaquia de três espécies de *Baccharis*, **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n.1, p. 223-226, jan./fev. 2005.

BRAGA, L. F. et al. Escarificação ácida, temperatura e luz no processo germinativo de sementes de *Senna alata* (L.) Roxb. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 12, n. 1, p.1-7, 2010.

BRATCHER, C. B.; DOLE, J. M.; COLE, J. C. Stratification improves seed germination of five native wildflower species. **HortScience**, v. 28, n. 9, p. 899-901, sept. 1993.

BREMER, K. **Asteraceae: Cladistics and classification**. Timber Press, Portland, 1994. 429 p.

BURKART, A. **Flora Ilustrada de Entre Rios (Argentina). Parte VI: Dicotiledôneas metaclamídeas (Generalidades; (Gamopétalas)**. Buenos Aires, Colección Científica Dell I.N.T.A., Tomo VI, V, 1979. p. 442-738.

CABRERA, A. L.. **Flora Ilustrada de Entre Rios**. Parte VI. Tomo VI, Buenos Aires: Inta, 1974.

CABRERA, G. L.; RODRIGUEZ, D. M. G. Genotoxicity of soil from farmland irrigated with wastewater using three plant bioassays. **Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 426, n. 2, p. 211-214, May 1999.

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: SPI/Embrapa-CNPq, v.1, 1998. p. 87-132.

CAMPAROTO, M. L. et al. Effects of *Maytenus ilicifolia* Mart. And *Bauhinia candicans* Benth infusions on onion roottip and rat bone-marrow cells. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v. 25, n. 1, p. 85-89, 2002.

CARDOSO, V. J. M. Germinação. In: KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal**. Ed. Guanabara Koogan. São Paulo – SP, 2004a. p. 385-407.

CARDOSO, V. J. M. Dormência: estabelecimento do processo. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (Orgs). **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004b. p. 95-108.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. Jaboticabal: FUNEP, 2000. 588 p.

CAVERS, P. B. Germination polymorphism in *Rumex crispus*. The effects of different storage conditions on germination responses of seeds collected from individual plants. **Canadian Journal of Botany**, v. 52, n. 3, p. 575-583, 1974.

CHANDRA, S.; DE MEJIA GONZALEZ, E. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 11, p. 3583-3589, June 2004.

CHAUHAN, L. K. S.; SAXENA, P. N.; GUPTA, S. K. Cytogenetic effects of cypermethrin and fenvalerate on the root meristem cells of *Allium cepa*. **Environmental and Experimental Botany**, v. 42, n. 3 p. 181-189, dec. 1999.

CHING, T. M. Metabolism of germinating seeds. In: T. T. Kozlowski, Ed. **Seed biology**, v. 2, New York: Academic Press, 1972.

CID, L. P. B.; TEIXEIRA, J. B. Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. In: CID, L. P. B. **Cultivo *in vitro* de plantas**. Brasília, DF, 2010a. p. 15-49.

CID, L. P. B.; TEIXEIRA, J. B. Oxidação fenólica, vitrificação e variação somaclonal. In: CID, L. P. B. **Cultivo *in vitro* de plantas**. Brasília, 2010b. p. 51- 66.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro, IBDF, v. 1, n. 6, 1978. 4324 p. (Reedição).

CORRÊA, A. D. R.; SIQUEIRA-BATISTA, L. E. M. **Plantas medicinais – do cultivo à terapêutica – 2 ed.** Editora Vozes. Petrópolis, 1998.

CORREIA, E.; CÂMARA, F. L. A.; MING, L. C. Propagação vegetativa de arnica-brasileira (*Solidago chilensis* Meyen) por estaca de rizoma. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 1, n. 1, p. 23-7, 1998.

CORREIA, E.; MING, L. C.; CÂMARA, F. L. A. Aspects of the sexual reproduction of the brazilian arnica (*Solidago chilensis* Meyen var. *megapotamica* (DC.) Cabrera–Asteraceae). In: II WOCMAP Congress Medicinal and Aromatic Plants, **Acta Horticulturae**, n. 66, v. 1, Argentina, p. 89-91, 1999.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1981. 1262 p.

DALLA NORA, G. et al. Antiproliferative and genotoxic effects of *Mikania glomerata* (Asteraceae). **Biocell**, v. 34, n. 3, p. 85-101, 2010.

DE KLERK, G. J.; VAN DER KRIEKEN, W.; DE JONG, J. The formation of adventitious roots: new concepts, new possibilities. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, v. 35, n. 3, p.189-199, May/June 1999.

DIAS, G. O. C. **Estudo fitoquímico da espécie vegetal *Solidago microglossa* D.C.** 2001. 56 f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2001.

DUKE, J. A. Toxins: their toxicity and distribution in plant genera. In: _____. **Handbook of medicinal herbs**. Boca Raton: CRC Press, 2000. p. 525-568.

EMBRAPA. SOC: Ambiente de software NTIA, versão 4.2.2: **Manual do usuário** – ferramental estatístico. Campinas, 1997. 258 p.

FACHINELLO, J. C. et al. **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado**. 2. ed. Pelotas: UFPel, 1995. 178 p.

FACHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. C. (Eds). **Propagação de plantas frutíferas**. Embrapa Informações Tecnológicas, Brasília, DF, 2005. 221 p.

FACHINETTO, M. et al. Efeito anti-proliferativo das infusões de *Achyrocline satureioides* DC (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 17, n. 1, p. 49-54, jan./mar. 2007.

FACHINETTO, J. M.; TEDESCO, S. B. Atividade antiproliferativa e mutagênica dos extratos aquosos de *Baccharis trimera* (Less.) A. P. de Candolle e *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. (Asteraceae) sobre o sistema teste de *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 11, n. 4, p. 360-367, 2009.

FACURY NETO, M. A. et al. Systemic use of *Solidago microglossa* DC in the cicatrization of open cutaneous wounds in rats. **The Brazilian Journal of Morphological Sciences**, São Paulo, v. 21, n. 4, p. 207-210, out. 2004.

FARIA, R. T. et al. Preservation of the Brazilian orchid *Cattleya walkeriana* Gardner using *in vitro* propagation. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v. 2, n. 3, p. 489-492, 2002.

FARMACOPÉIA DOS ESTADOS UNIDOS DO BRASIL. 1. ed. São Paulo: Cia Ed. Nacional, 1926. 1149 p.

- FENNER M. The effects of the parent environment on seed germinability. **Seed Science Research**, v. 1, n. 2, p. 75-84, June 1991.
- FENNER, R. et al. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 42, n. 3, p. 369-394, jul./set. 2006.
- FERREIRA, A. B. H. **Dicionário eletrônico da língua portuguesa**. Versão 4.0., 1994.
- FERREIRA, A. G. et al. Germinação de sementes de Asteraceae nativas do Rio Grande do Sul, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v.15, n. 2, p. 231-242, 2001.
- FERREIRA, E. G. B. de S. et al. Superação da dormência em sementes de crista de galo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 5, p. 808-813, Maio 2012.
- FISKESJÖ, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, Reino Unido, v.102, n. 1, p. 99-112, mar. 1985.
- FISKESJÖ, G. *Allium* Test II: Assessment of chemical's genotoxic potential by recording aberrations in chromosomes and cell divisions in root tips of *Allium cepa* L. **Environmental Toxicology and Water Quality**, v. 9, n. 3, p. 235-241, aug. 1994.
- FLORES, R. et al. Regeneração *in vitro* de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart.). **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 4, n. 3, p. 2001-2005, 1998.
- FLORES, R.; MALDANER, J.; NICOLOSO, F. T. Otimização da micropropagação de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 3, p. 845-851, mai./jun. 2006.
- FONSECA, P. G.; NUNES, U. R.; NUNES, S. C. P. Aspectos da germinação de sementes de assa-peixe (*Vernonia polyanthes* Less.), **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 4, p. 633-637, abr. 2012.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas Mediciniais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 374-381, mar./abr. 2007.
- GOMES, V.; FERNANDES, G. W. Germinação de aquênios de *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae). **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 16, n. 4, p. 421-427, 2002.

GONÇALVES, S. et al. High-frequency *in vitro* propagation of the endangered species *Tuberaria major*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 101, n. 3, p. 359-363, 2010.

GONÇALVES, E. G.; LORENZI, H. **Morfologia Vegetal: Organografia e Dicionário Ilustrado de Morfologia das Plantas Vasculares**. Ed. Plantarum, 2. ed. 2011. 140 p.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, v.1, 1998. p. 43-76.

GRIZA, F. T. **Análise do perfil fitoquímico e avaliação de efeitos biológicos de *Solidago chilensis* MEYEN**. 2007. 97 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Toxicologia Aplicada)-Universidade Luterana do Brasil, Canoas, 2007.

GUERRA, M.; SOUZA, M. J. **Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana**. Ribeirão Preto: FUNPEC, 2002. 191 p.

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

GUTTERMAN, Y. Flowering, seed development, and the influences during seed maturation on seed germination of annual weeds. In: DUKE, S. O. Ed. **Weed Physiology**, v. I. **Reproduction and Ecophysiology**, Boca Raton, FL, USA: CRC Press, p. 1-25, 1985.

GUTTERMAN, Y. Environmental factors and survival strategies of annual plant species in the Negev Desert, Israel. **Plant Species Biology**, v. 15, n. 2, p.113-125, 2000.

HARTMANN, H. T. et al. **Plant propagation: principles and practices**. 7. ed. New Jersey: Prentice Hall, 2002.

HAZARIKA, B. N. Acclimatization of tissue-cultured plants. **Current Science**, Stamford, v. 85, n. 12, p. 1704-1712, 2003.

HOFFMANN, A. et al. **Fruticultura comercial: propagação de plantas frutíferas**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1996. 319 p.

HUBER, L. S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; RODRIGUES, M. Otimização e validação de metodologia analítica para determinação de flavonóis e flavonas por CLAE em hortaliças. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 2, p. 142-151, 2007.

- IMBERT, E.; RONCE, O. Phenotypic plasticity for dispersal ability in the seed heteromorphic *Crepis sancta* (Asteraceae). **Oikos**, v. 93, n. 1, p. 126-134. 2001.
- IMBERT, E. Ecological consequences and ontogeny of seed heteromorphism. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, v. 5, n. 1, p. 13-36, 2002.
- JOSHI, M.; DHAR, U. *In vitro* propagation of *Saussurea obvallata* (DC.) Edgew—an endangered ethnoreligious medicinal herb of Himalaya. **Plant Cell Reports**, v. 21, n. 10, p. 933-939, June 2003.
- KAMPF, A. N. **Produção comercial de plantas ornamentais**. Guaíba: Agropecuária, 2000. 254 p.
- KITTO, S. L. Comercial Micropropagation. **Hortscience**, v. 32, n. 6, p. 1012-6, 1997.
- KLEIN, A.; FELIPPE, G. M. Efeito da luz na germinação de sementes de ervas invasoras. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 7, p. 955-966, 1991.
- LABOURIAU, L. G.; LABOURIAU, I. S. Physiological rate processes from the point of view of absolute reaction rate theory. **Ciencia e Cultura**, v. 49, p.177-189, 1997.
- LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research**, v. 682, n. 1, p. 71-81, July/aug. 2009.
- LEMOS, E. E. P. de. Organogênese. In: CID, L. P. B. **Cultivo *in vitro* de plantas**. Brasília, 2010. p. 103-127.
- LEVAN, A. The effect of colchicine on root mitosis in *Allium*. **Hereditas**, v. 24, n. 4, p. 471-486, 1938.
- LI, J. et al. Propagation of goldenrod (*Solidago canadensis* L.) from leaf and nodal explants. **Acta Societatis Botanicorum Poloniae**, v. 81, n. 1, p. 53-60, 2012.
- LIMA, C. O. de C. et al. Organogênese direta de *Orthophytum mucugense*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 2, p. 249-254, fev. 2012.
- LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil** – terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas. Instituto Plantarum, Nova Odessa, SP, 4. ed. 2008.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas**. 2. ed. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum, 2008. 544 p.

MACCHIA, M.; ANGELINI, L. G.; CECCARINI, L. Methods to overcome seed dormancy in *Echinacea angustifolia* DC. **Scientia Horticulturae**, v. 89, n. 4, p.317-324, July 2001.

MACEDO, M. C. et al. Biometria de frutos e sementes e germinação de *Magonia pubescens* ST. Hil (Sapindaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 31, n. 2, p. 202-211, 2009.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v. 2, n. 1, p. 176-177, 1962.

MAIA, S. S. S. et al. Enraizamento de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (Lamiaceae) em função da posição da estaca no ramo. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 3, n. 4, p. 317-320, 2008.

MELETTI, L. M. M. **Propagação de frutíferas tropicais**. Guaíba: Agropecuária, 2000. 239 p.

MERCIER, H. Auxinas. In: KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal**. Ed. Guanabara Koogan. São Paulo – SP, 2004. p. 181-211.

MOMENTÉ, V. G. et al. Enraizamento de estacas da arnica brasileira. In: 41º CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 19, n. 2, p. 245, 2001.

MONDIN, C. A. Riqueza genérica e dados biogeográficos das asteráceas brasileiras. In: Conferências Plenárias e Simpósios do 57º Congresso Nacional de Botânica. Os avanços da Botânica no início do século XXI: morfologia, fisiologia, taxonomia, ecologia e genética. 1. ed. 2006, Porto Alegre. **Anais...Porto Alegre: Pallotti**, 2006.

MORAIS, C. F. et al. Germinação *in vitro* de sementes de alcachofra. **Horticultura Brasileira**, v. 28, n.1, p. 64-69, jan./mar. 2010.

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

NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados no desempenho das plântulas. In: KRZYŻANOWSKI, F. C. et al. **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. p. 2.1-2.24

NICOLOSO, F. T.; FORTUNATO, P. R.; FOGAÇA, M. A. de F. Influência da posição da estaca no ramo sobre o enraizamento de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen em dois substratos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 29, n. 2, mai./Jun. 1999.

NOLDIN, V. F. et al. Composição química e atividades biológicas das folhas de *Cynara scolymus* L. (alcachofra) cultivada no Brasil. **Química nova**, São Paulo, v. 26, n. 3, p. 331-334, mai./jun. 2003.

OLIVEIRA, T. G. de. et al. Micropropagação de *Croton antisiphiliticus* Mart. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 10, p. 1712-1718, out. 2011.

PARANHOS, J. T. **Produção de alcalóides bioativos em *Psychotria umbellata* Vell. e *Psychotria leiocarpa* Cham. & Schlecht.** 2003. 151 f. Tese (Doutorado em Ciências)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

PASQUA, G. et al. Metabolites in cell suspension cultures, calli, and in vitro regenerated organs of *Hypericum perforatum* cv. Topas. **Plant Science**, v. 165, n. 5, p. 977-982, nov. 2003.

PASQUAL, M. **Meios de cultura**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 74 p.

PASQUAL, M. et al. **Fruticultura Comercial: Propagação de plantas frutíferas**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 137 p.

PIETTA, P. et al. High-performance liquid chromatographic analysis of flavonol glycosides of *Solidago virgaurea*. **Journal of Chromatography**, v. 558, n. 1, p. 296-301, sept. 1991.

PINTO, J. E. B. P. et al. Uso de diferentes explantes e concentrações de benzilaminopurina na multiplicação *in vitro* de brotos de *Kielmeyera coriacea*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 6, p. 867-873, 1994.

PIRES, N. M. et al. Efeito do extrato aquoso de leucena sobre o desenvolvimento, índice mitótico e atividade peroxidase em plântulas de milho. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13, n. 1, p. 55-65, 2001.

POSPÍSILOVÁ, J. et al. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. **Biologia Plantarum**, v. 42, n. 4, p.481-497, 1999.

QADERI, M. M.; CAVERS, P. B.; BERNARDS M. A. Pre- and Post-dispersal factors Regulate germination patterns and structural characteristics of scotch thistle (*Onopordum acantium*) cypselas. **New Phytologist**, v. 159, n. 1, p. 263-278, 2003.

RADMANN, E. B.; FACHINELLO, J. C.; PETERS, J. A. Efeito de auxinas e condições de cultivo no enraizamento *in vitro* de portaenxerto de macieira 'M-9'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 3, p. 624-628, dez. 2002.

RANK, J.; NIELSEN, M. H. Evaluation of the *Allium* anaphase-telophase test in relation to genotoxicity screening of industrial wastewater. **Mutation Research**, v. 312, n. 1, p. 17-24, feb. 1994.

REN, C.; BEWLEY, J. D. Seed development, testa structure and precocious germination of Chinese cabbage (*Brassica rapa* subsp. *pekinensis*). **Seed Science Research**, v. 8, n.3, p. 385-397, sept. 1998.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Pharmacognosy and pharmacobiotechnology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1996.

ROQUE, N. F. et al. Compostas medicinais do brasil. 2. Estudo químico de *Solidago microglossa*, *Mikania triangularis*, *M. diversifolia*, *M. smilacina*, *M. microlepis* e *Wedelia paludosa*. **Acta Amazônica**, v. 18, suplemento 1-2, p. 473-76, 1983.

ROSSATO, L. V. et al. Alterations in the mitotic index of *Allium cepa* induced by infusions of *Pluchea sagittalis* submitted to three different cultivation systems, **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 82, n. 4, p. 857-860, 2010.

ROUT, G. R.; SAMANTARAY, S.; DAS, P. *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants. **Biotechnology Advances**, v. 18, n. 2, p. 91-120, apr. 2000.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. et al. Secondary metabolite content in rhizomes, callus cultures and *in vitro* regenerated plantlets of *Solidago chilensis*. **Zeitschrift für Naturforschung**. v. 60, n. 1-2, p. 5-10, jan./feb. 2005.

SKOOG, F.; MILLER, C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. **Symposia of the Society for Experimental Biology**, v. 11, p. 118-131, 1957.

SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. **Genética toxicológica**. Porto Alegre, Alcance, 2003a. 422 p.

SILVA, A. B. et al. BAP e substratos na aclimatização de plântulas de gloxínia (*Sinningia speciosa* Lood. Hiern.) provenientes de cultura de tecidos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 2, p. 255-260, mar./abr. 2003b.

SILVA, C. R. et al. Absence of mutagenic and citotoxic potentiality of senna (*Cassia angustifolia* Vahl.) evaluated by microbiological tests. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, supl. 01, p. 1-3, 2004.

SIMÕES, M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Ed. da UFRGS, Florianópolis: Ed. da UFSC. 6. ed. 1 reimp, 2010. 1102 p.

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

SOUZA, A. V.; PINTO, J. E. B.; BERTOLUCCI, S. *In vitro* Propagation of *Lychnophora pinaster* (Asteraceae): a threatened endemic medicinal plant. **Hortscience**, Amsterdam, v. 42, n. 7, p. 1665-1669, dec. 2007.

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

SOUZA, L. F. B. et al. Genotoxic potential of aqueous extracts of *Artemisia verlotorum* on the cell cycle of *Allium cepa*. **International Journal of Environmental Studies**, v. 67, n. 6, p. 871-877, 2010.

SOUZA, A. V. et al. Micropropagação de *Dioscorea multiflora* Grised. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 1, p. 92-98, 2011.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819 p.

TAVANO, E. C. da R. et al. Conteúdos de compostos fenólicos e flavonóides em plantas de camomila (*Matricaria recutita* L. - Asteraceae) cultivadas *in vivo* e *in vitro*. **Naturalia**, Rio Claro, v. 32, p. 67-77, 2009.

TAYLORSON, R.; HENDRICKS, S. B. Interactions of light and a temperature shift on seed germination. **Plant Physiology**, v. 49, n. 2, p. 127-130, feb. 1972.

TEIXEIRA, R. O. et al. Assessment of two medicinal plants, *Psidium guajava* L. and *Achillea millefolium* L. in *in vivo* assays. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v. 26, n. 4, p. 551-555, dec. 2003.

THIEM, B. et al. Phenolic compounds in two *Solidago* L. species from *in vitro* culture, **Acta Poloniae Pharmaceutics - Drug Research**, v. 58 n. 4, p. 277-281, 2001.

TORRES, L. M. B.; AKISUE, M. K.; ROQUE, N. F. Quercitrin from *Solidago microglossa* DC, the Arnica of Brasil. **Revista de farmácia e bioquímica da USP**, São Paulo, v. 23, n. 1, p. 33-40, 1987.

TORRES, L. M. B.; AKISUE, M. K.; ROQUE, N. F. Diterpenes from roots of *Solidago microglossa*. **Revista Latinoamericana de Química**, v. 20, n. 2, p. 94-97, 1989.

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

VENABLE, D. L.; LEVIN, D. A. Morphological dispersal structures in relation to growth habit in the Compositae. **Plant Systematics and Evolution**, v.143, n. 1-2, p.1-16, 1983.

VICENTINI, V. E. P. et al. *Averrhoa carambola* L., *Syzygium cumini* (L.) Skeels and *Cissus sicyoides* L.: medicinal herbal tea effects on vegetal and test systems. **Acta Scientiarum**, v. 23, n. 2, p. 593-598, 2001.

VICTÓRIO, C. P.; LAGE, C. L. S.; SATO, A. Tissue culture techniques in the proliferation of shoots and roots of *Calendula officinalis*. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, n. 3, p. 539-545, July/sept. 2012.

WALCK, J. L.; BASKIN, J. M.; BASKIN, C. C. Increased sensitivity to green light during transition from conditional dormancy to nondormancy in seeds of three species of *Solidago* (Asteraceae). **Seed Science Research**, v. 10, n. 4, p. 495-499, dec. 2000.

WASSNER, D.; RAVETTA, D. Vegetative propagation of *Grindelia chiloensis* (Asteraceae). **Industrial Crops and Products**, v. 11, n.1, p. 7-10, jan. 2000.

WAREING, P. F.; PHILLIPS, I. D. J. Dormancy. In: WAREING, P. F.; PHILLIPS, I. D. J. **The control of growth and differentiation in plants**. Oxford: Pergamon Press, 1973. p. 223-254.

WEBER, E.; JAKOBS, G. Biological flora of central Europe: *Solidago gigantea* Aiton. **Flora**, v. 200, n. 2, p. 109-118, May 2005.

WEDLING, I.; GATTO, A.; PAIVA, H. N. **Substratos, adubação e irrigação na produção de mudas**. Viçosa: Aprenda Fácil, 2002. 166 p.

WENDLING, I.; PAIVA, H. N. de.; GONÇALVES, W. **Técnicas de produção de mudas de plantas ornamentais**. Viçosa, MG: Aprenda Fácil, v. 3, 2005. 223 p.

WINK, M. Physiology of secondary product formation in plants. In: CHARLWOOD, B. V.; RHODES, M. J. C. (ed.). **Secondary products from plant tissue culture**. Oxford: Clarendon, 1990.

WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**, v. 37, n. 2, p. 99-105, 1998.

YA-QIN, S. et al. Cytotoxic flavonoids with isoprenoids groups from *Morus mongolica*. **Journal of Natural Products**, v. 64, n. 2, p.181-188, feb. 2001.

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

ZHANG, L. et al. Factores influencing shoot regeneration from cotyledons of tetraploid *Isatis indigotica* F. **In vitro-Plant**, New York, v. 39, p. 459-462, 2003.

ZHAO, Y. T. et al. Relationship between physical characters, chemical composition, germination and cold-tolerance in soybean. **Chinese Journal of Botany**, China, v. 6, n. 1, p. 60-63, 1994.