



**UFAM**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
DOUTORADO EM BIOTECNOLOGIA**

**MICROPROPAGAÇÃO DE *Acmella oleracea* (L.) R. K. JANSEN E  
ESTABELECIMENTO DE MEIO DE CULTURA PARA A CONSERVAÇÃO  
DESTA ESPÉCIE EM DE BANCO DE GERMOPLASMA *IN VITRO*.**

**Milena Gaion Malosso**

**Bióloga**

**COARI – AM  
ABRIL DE 2007**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
DOUTORADO EM BIOTECNOLOGIA**

**MICROPROPAGAÇÃO DE *Acmella oleracea* (L.) R. K. JANSEN E  
ESTABELECIMENTO DE MEIO DE CULTURA PARA A CONSERVAÇÃO  
DESTA ESPÉCIE EM DE BANCO DE GERMOPLASMA *IN VITRO*.**

**Milena Gaion Malosso**

**Tese apresentada à Universidade Federal do Amazonas para  
obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia – Área de  
Concentração Agroflorestal.**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Eduardo Ossamu Nagao**

**COARI – AM  
ABRIL DE 2007**

## Ficha Catalográfica

(Catalogação na fonte realizada pela Biblioteca Central – UFAM)

Malosso, Milena Gaion

M257m Micropropagação de *Acmella oleracea* (L.) R. K. JANSEN e estabelecimento de meio de cultura para a conservação desta espécie em banco de germoplasma *in vitro* / Milena Gaion Malosso. – Manaus : UFAM, 2007.

101 f.; il. Color;

Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Amazonas, 2007.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Ossamu Nagao

1. Banco de Germoplasma 2. Plantas Medicinais 3.  
*Acmella Oleracea* 4. Micropropagação I. Título

CDU 577.21 (043.2)



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**  
**DOUTORADO EM BIOTECNOLOGIA**

MILENA GAION MALOSSO – MSc./UFAM

**MICROPROPAGAÇÃO DE *Acmella oleracea* (L.) R. K. JANSEN E  
ESTABELECIMENTO DE MEIO DE CULTURA PARA CONSERVAÇÃO DESTA  
ESPÉCIE EM BANCO DE GERMOPLASMA “*IN VITRO*”.**

Tese apresentada à Universidade Federal do Amazonas para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia – Área de Concentração: Agroflorestal.

Aprovada pela banca examinadora em 10 de abril de 2007.

Membros da Banca Examinadora

Prof. Dr. Eduardo Ossamu Nagao (UFAM) – Orientador

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Paula Cristina da Silva Ângelo (EMBRAPA)

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Bianca Waléria Bertoni (UNAERP)

Prof. Dr. Paulo de Tarso Barbosa Sampaio (INPA)

Prof. Dr. Ernesto de Oliveira Serra Pinto (UFAM)

MANAUS – AMAZONAS

ABRIL DE 2007

A Deus, pela oportunidade da jornada. Aos meus pais, **Neusa** e **José** Aparecido, por jamais duvidarem da minha vitória e às minhas irmãs, Tatiana e Camila, pelo incentivo, carinho e atenção dispensados.

\_\_\_\_\_ **OFEREÇO** \_\_\_\_\_

“Debulhar o trigo, recolher cada bago do trigo, forjar no trigo o milagre e se fartar de pão! Decepar a cana, recolher a garapa da cana, roubar da cana a doçura do mel e se lambuzar de mel! Afagar a terra, conhecer os desejos da terra e a propícia estão de fecundar o chão.”

(Milton Nascimento e Chico Buarque)

Á meus três “pais” de coração: **Prof. Dr. Eduardo Ossamu Nagao**, pela paciência e dedicação a mim dispensados, **Prof. Dr. José Odair Pereira**, por toda a atenção e auxílio a mim prestados e ao **Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho**, pela confiança e inúmeras oportunidades a mim concedidas.

\_\_\_\_\_ **DEDICO** \_\_\_\_\_

## AGRADEÇO

- Aos meus familiares, que sempre lutaram para que eu pudesse realizar este trabalho;
- A Universidade Federal do Amazonas, pela oportunidade do exercício científico e apoio para a realização deste trabalho;
- Ao Prof. Dr. Eduardo Ossamu Nagao, pela orientação e estímulo ao meu desenvolvimento acadêmico, profissional e pessoal;
- Ao Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho, por acreditar sempre;
- Ao Prof. Dr. José Odair Pereira, pelo profissionalismo e incentivo;
- Aos professores do Doutorado em Biotecnologia, por terem participação da minha formação;
- A amizade eterna de Ângela Neiva e Patrícia Tavares;
- Aos amigos e colegas do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, Aldecinei Bastos Siqueira, Carlos Frederico Nogueira, Eva Atroch, Salvador Rojas e Sônia Maria Araújo;
- Ao seu Valdemir Mello, pelo auxílio técnico;
- Aos amigos e colegas do Doutorado, do curso de Biotecnólogo e da Secretaria de Pós-graduação em Biotecnologia da UFAM pelo companheirismo;
- Aos velhos amigos, por compreenderem as infinitas horas de minha ausência e que, mesmo tão longe, continuam tão perto.
- A SUFRAMA, pelo fomento.

## SUMÁRIO

Abreviaturas.....	I
Lista de Tabelas.....	II
Lista de Figuras.....	III
Resumo.....	IV
Abstract.....	V
1. Introdução.....	01
2. Justificativa.....	04
3. Objetivo.....	06
4. Revisão de Literatura	
4.1. A Amazônia.....	07
4.2. Plantas Medicinais.....	10
4.3. Descrição Botânica de <i>Acmella oleracea</i> (L.) R. K. JANSEN.....	12
4.3.1. Classificação Biológica.....	12
4.3.2. Distribuição Geográfica de <i>Acmella oleracea</i> (L.) R. K. JANSEN....	13
4.3.3. A Família Compositae.....	15
4.3.4. Aspectos Morfológicos.....	16
4.3.5. Princípios Ativos e Atividades Biológicas.....	18
4.4. Micropropagação.....	19
4.4.1. Uma Visão Geral da Técnica.....	19
4.4.2. Os Meios de Cultura.....	25
4.5. Sistema de Imersão Temporária.....	30
4.6. Banco de Germoplasma.....	32
5. Material e Métodos	
5.1. Condições da Sala de Crescimento.....	39
5.2. Condições da Estufa de Banco de Germoplasma .....	39
5.3. Composição dos Meios de Cultura.....	39
5.4. Análise Estatística.....	40
5.5. Material Vegetal.....	41
5.6. Metodologia	
5.6.1. EXPERIMENTO 01: Determinação do Sistema Reprodutivo de <i>Acmella oleracea</i> (L.) R. K. JANSEN.....	41
5.6.2. EXPERIMENTO 02: Assepsia de Sementes de <i>Acmella oleracea</i> (L.) R. K. JANSEN.....	41
5.6.3. EXPERIMENTO 03: Assepsia de Segmentos Nodais de <i>Acmella</i> <i>oleracea</i> (L.) R. K. JANSEN.....	42
5.6.4. EXPERIMENTO 04: Efeito de diferentes concentrações e tipos de citocininas no número médio e na altura média das brotações de segmentos nodais de <i>Acmella oleracea</i> (L.) R. K. JANSEN.....	43
5.6.5. EXPERIMENTO 05: Efeito da posição da gema na haste quanto ao número médio e a altura média das brotações de <i>Acmella oleracea</i> (L.) R. K. JANSEN.....	43

5.6.6. EXPERIMENTO 06: Efeito das diluições dos meios basais no número médio e na altura média das brotações de <i>Acmella oleracea</i> (L.) R. K. JANSEN.....	44
5.6.7. EXPERIMENTO 07: Aclimação.....	44
5.6.8. EXPERIMENTO 08: Sistema de Imersão Temporária.....	45
5.6.9. EXPERIMENTO 09: Cultivo em meio de cultura semi-sólido em dois tipos de frasco.....	46
5.6.10. EXPERIMENTO 10: Cultivo em meio de cultura líquido.....	46
5.6.11. Estabelecimento de banco de germoplasma <i>in vitro</i> de <i>Acmella oleracea</i> (L.) R. K. JANSEN.....	46
6. Resultados e Discussão	
6.1. Determinação do Sistema Reprodutivo de <i>Acmella oleracea</i> (L.) R. K. JANSEN.....	47
6.2. Assepsia de Sementes e Segmentos Nodais de <i>Acmella oleracea</i> (L.) R. K. JANSEN.....	47
6.3. Efeito de diferentes concentrações e tipos de citocininas no número médio e na altura média das brotações de segmento nodal de <i>Acmella oleracea</i> (L.) R. K. JANSEN .....	50
6.4. Efeito da posição da gema no desenvolvimento <i>in vitro</i> de <i>Acmella oleracea</i> (L.) R. K. JANSEN.....	52
6.5. Efeito de diferentes diluições dos meios de cultura no desenvolvimento <i>in vitro</i> de <i>Acmella oleracea</i> (L.) R. K. JANSEN.....	56
6.6. Aclimação de <i>Acmella oleracea</i> (L.) R. K. JANEN em ambiente <i>ex vitro</i> .....	59
6.7. Avaliação de diferentes sistemas de cultivo <i>in vitro</i> de <i>Acmella oleracea</i> (L.) R. K. JANSEN.....	62
6.8. Estabelecimento do banco de germoplasma <i>in vitro</i> de <i>Acmella oleracea</i> (L.) R. K. JANSEN.....	65
7. Conclusão.....	68
8. Considerações Finais.....	69
9. Referências Bibliográficas.....	70

## Abreviaturas

2,4-D: Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético  
2ip: Isopenteniladenina  
AIA: Ácido 3-Indol-acético  
ANA: Ácido Naftalenoacético  
ANOA: Ácido beta-naftoxiacético  
ApCFA: Ácido p-clorofenoxiacético  
B5: Meio de Cultura de Gamborg (1968)  
BAP: 6-benzilaminopurina  
DMSO: Dimetil sulfoxido  
DNA: Ácido desoxirribonucléico  
EUA: Estados Unidos da América  
FAO: Food and Agriculture Organization  
GA<sub>3</sub>: Giberelina A<sub>3</sub>  
IBA: Ácido 3-indol-butírico  
KIN: 6-furfurilaminopurina ou cinetina  
MS: Meio de Cultura de Murashige & Skoog (1962)  
R.I.T.A.: Recipiente de Imersão Temporária Automatizado  
rpm: Rotação por minuto  
TDZ: Tiazuron ou N-fenil-N'-1,2,3-tiadiazol-5,1-uréia  
WP: Meio de cultura Woody Plant de Lloyd & McCown (1980)  
ZEA: Zeatina

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição dos meios de cultura basais MS de Murashige & Skoog (1962), B5 de Gamborg (1968) e WP de Lloyd & McCown (1980).....	47
Tabela 2: Desinfestação de segmentos nodais de <i>Acmella oleracea</i> .....	59
Tabela 3: Resumo do quadro de análise de variância para diferentes tipos e concentrações de citocininas no desenvolvimento <i>in vitro</i> de <i>Acmella oleracea</i> ....	62
Tabela 4: Efeito de diferentes tipos e concentrações de citocininas no desenvolvimento <i>in vitro</i> de <i>Acmella oleracea</i> .....	63
Tabela 5: Resumo do quadro de variância para diferentes posições da gema no desenvolvimento <i>in vitro</i> de explantes de <i>Acmella oleracea</i> .....	65
Tabela 6. Efeito das diferentes posições da gema no desenvolvimento <i>in vitro</i> de explantes de <i>Acmella oleracea</i> .....	65
Tabela 7: Resumo do quadro de análise de variância para diferentes diluições dos meios de cultura basais MS, B5 e WP e suas diluições no desenvolvimento <i>in vitro</i> de explantes de <i>Acmella oleracea</i> .....	68
Tabela 8: Efeito de diferentes diluições dos meios basais WP, MS e B5 no desenvolvimento <i>in vitro</i> de explantes de <i>Acmella oleracea</i> .....	68
Tabela 9: Resumo do quadro de análise de variância para porcentagem de explantes de <i>Acmella oleracea</i> (L.) R. K. JANSEN que sobreviveram à aclimação em diferentes tipos de substrato.....	71
Tabela 10: Porcentagem de explantes de <i>Acmella oleracea</i> (L.) R. K. JANSEN que sobreviveram à aclimação em diferentes tipos de substratos.....	71
Tabela 11: Resumo do quadro de análise de variância para co-cultivo e cultivo isolado no desenvolvimento <i>in vitro</i> de <i>Acmella oleracea</i> (L.) R. K. JANSEN.....	74
Tabela 12: Efeito de diferentes sistemas de cultivo no desenvolvimento <i>in vitro</i> de explantes de <i>Acmella oleracea</i> (L.) R. K. JANSEN.....	75
Tabela 13: Desenvolvimento das plântulas de <i>Acmella oleracea</i> no banco de germoplasma sob a ação de agentes retardadores de crescimento.....	75

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mapa de distribuição geográfica mundial de <i>Acmella oleracea</i> (L.) R. K. JANSEN.....	14
Figura 2: Mapa de distribuição geográfica de <i>Acmella oleracea</i> (L.) R. K. JANSEN na América do Sul.....	15
Figura 3: Aspectos morfológicos de <i>Acmella oleracea</i> (L.) R. K. JANSEN.....	17
Figura 4: Estrutura química do espilantol.....	20
Figura 5: Plântulas de <i>Acmella oleracea</i> (L.) R. K. JANSEN e a localização das gemas na haste.....	52
Figura 6: Sistema de Imersão Temporária Automatizado (R.I.T.A.) utilizado para subcultivar explantes de <i>Acmella oleracea</i> (L.) R. K. JANSEN.....	54
Figura 7: Desenvolvimento <i>in vitro</i> de <i>Acmella oleracea</i> (L.) R. K. JANSEN.....	67

*A Acemella oleracea* (L.) R. K. JANSEN é uma planta medicina da Amazônia pertencente à família Compositae e que é popularmente conhecida como jambu. O extrato de suas folhas possui o espilantol, que é uma *N*-isobutilamida com atividade anestésica e é utilizada popularmente no tratamento de males da boca e da garganta, bem como anestésico para dor-de-dente, além de possuir atividade larvicida contra *Aedes aegyptii*, podendo ser utilizado como importante ferramenta no controle da dengue. O objetivo deste trabalho foi desenvolver protocolos para a micropropagação e conservação desta espécie, verificar a capacidade de germinação de sementes de *A. oleracea*. Não houve germinação de sementes sob condições *in vitro* e *ex vitro*. Segmentos nodais advindos de plantas adultas mantidas em casa de vegetação foram submetidos a três concentrações de hipoclorito de cálcio e o tratamento com 0,25% deste agente desinfestante resultou em 32% de explantes vivos e axênicos, que serviram como fonte de explantes para três experimentos de multiplicação. O meio de cultura indicado foi o MS suplementado com 0,1 mg.L<sup>-1</sup> de cinetina, que proporcionou 100% de explantes com brotação, 93,33% de plantas enraizadas e ausência total de calos. Experimentos comprovaram que as gemas centrais da haste promovem 86,67% de explantes com brotação e brotos com 7,61 cm de altura, além de induzir 100% de plantas enraizadas, e que o substrato Plantmax<sup>®</sup> é o mais indicado para a aclimação, mantendo 78,81% de plantas vivas. Os sistema de imersão temporária (R.I.T.A.) não foi eficaz para otimizar o protocolo desta espécie, uma vez que 100% dos explantes submetidos à tratamentos em meio de cultura líquido oxidaram e morreram. O banco de germoplasma *in vitro* foi estabelecido em meio de cultura MS acrescido de 2% de sacarose e 4% de sorbitol, uma vez que nesta condição 100% de explantes mantiveram-se com brotação, vivos e enraizados, com maior número de brotos por gema (2,0 ± 0,3), ausência total de calos e a menor altura (5,5 ± 1,1). Este tratamento também induziu um excelente número de gemas por haste (7,0 ± 1,0), quando comparado com os demais tratamentos aplicados a esta espécie. Deste modo, esta espécie pode ser produzida em larga escala pelo protocolo de micropropagação aqui estabelecido, bem como conservada em laboratórios para a manutenção de sua variabilidade genética.

**Palavras-chave:** Multiplicação *in vitro*, planta medicinal, Amazônia, atividade anestésica, jambu.

**ABSTRACT**

*Acmella oleracea* (L.) R. K. JANSEN is an Amazonian medicinal plant popularly named jambu. The leaves extract contain Sphylantol, an *N*-isobutylamide with anesthetic activity and it is used by people to treat mouth and throat aches as well as toothaches anesthetic. It has larvicide activity against *Aedes aegyptii*, so could be used as an important tool in the control do dengue. The objective of this work was to develop *in vitro* protocols for micropropagation and conservation of this species, as well as to clarify the germination capacity of *A. oleracea*. Accordingly with results, nom germination was completed both under *in vitro* as *ex vitro* conditions. Nodal segments come from adult plants maintained in greenhouse, these plants were submitted to three concentrations of hypochlorite of calcium, wit 0.25%, 32% of explants were decontaminated and survived , wich were used to explants source for three multiplication experiments. The culture medium used was MS supplied with 0.1mg.L<sup>-1</sup> KIN, 100% of explants produced shoots, 93,33% produced roots and 0% produced callus. The experiments probed that central positions of bud promoted 86.67% shoots production in explants, these buds reach 7.61 cm height, this position also induce 100% root of plants. Moreover, the Plantmax<sup>®</sup> substratum was indicated to acclimation because it appeases 100% of survival plants. The temporary immersion system (R.I.T.A.) was not efficient to optimize this species protocol, since 100% of explants submitted in medium liquid treatments oxidized and dyed. *In vitro* germoplasm bank was established in MS medium supplied with sucrose 2% and sorbitol 4%, since this treatment induced 100% of explants with shoot and rooted and also produced a larger number of buds ( $2,0 \pm 0,3$ ) and none callus, it produce the less height of explants ( $5,5 \pm 1,1$ ), when was compared with other treatments that exhibit more than 50% of survival explants. This treatment also induced a great number of buds ( $7.0 \pm 1.0$ ), when was compared with the other treatments applied in this specie. Thus, this specie could be produced in large scale by the micropropagation protocol here established, as well as its genetic variability could be conserved *in vitro* conditions.

**Key-words:** *In vitro* multiplication, medicinal plant, Amazônia, anesthetic activity, jambu.

# **MICROPROPAGAÇÃO DE *Acmella oleracea* (L.) R. K. JANSEN E ESTABELECIMENTO DE MEIO DE CULTURA PARA CONSERVAÇÃO DESTA ESPÉCIE EM BANCO DE GERMOPLASMA “*IN VITRO*”.**

## **1. INTRODUÇÃO**

O Brasil possui uma superfície de 8.511.996 Km<sup>2</sup> que apresentam uma mistura de condições climáticas permitindo assim o desenvolvimento de uma grande diversidade de ambientes. Devido a esta imensa extensão territorial que abrange desde regiões equatoriais ao Norte, até áreas extratropicais ao Sul, diferenciadas climática e geomorfologicamente, o país conta com uma extraordinária diversidade, que está distribuída em biomas conhecidos como Amazônia, Pantanal, Mata Atlântica, Cerrado, Caatinga, Campos e Florestas Meridionais (HAVEN et al., 1996), contando com mais de 55.000 espécies catalogadas de um total estimado entre 350.000 e 550.000 (DIAS, 1996), o acelerado processo de devastação dos ecossistemas tropicais tem comprometido a preservação da flora brasileira.

Atualmente, todos esses ecossistemas correm sérios riscos de perda da diversidade biológica devido à destruição e fragmentação dos ecossistemas para urbanização, mineração e fronteiras agrícolas, aos estresses ambientais, a poluição, às mudanças climáticas globais e às políticas governamentais (BRANCO, 2001). Embora a Floresta Amazônica, juntamente com a Mata Atlântica e o Pantanal tenham recebido da Constituição Federal o título de patrimônio nacional (BRASIL, 1992), a conservação de sua biodiversidade é uma tarefa árdua e necessária.

Sabe-se hoje que a floresta Amazônica brasileira abriga uma flora riquíssima estimada aproximadamente entre 40 a 200 mil espécies e seu desaparecimento seria uma gigantesca tragédia, que poderia levar à extinção não apenas os demais

ecossistemas, mas também toda a vida do planeta Terra. Deste total, cerca de 10 mil espécies são consideradas medicinais (CASTRO et al., 2004).

Um estudo realizado por SATAKE (2000), sobre plantas medicinais da Amazônia Ocidental, relacionou 44.800 espécies de plantas, divididas em 145 famílias, que dominam este bioma e, 1.516 são usadas como medicinais. De acordo com CECHINEL FILHO & YUNES (1998), mais de 95% dessas espécies ainda não foram estudadas do ponto de vista fitoquímico e farmacológico e representam uma preocupação constante porque estão sob alta pressão antrópica.

No que se refere às ações de conservação de plantas medicinais, a adoção de técnicas biotecnológicas é de extrema importância, visto que estas são capazes de multiplicar e conservar plantas em laboratórios, de modo que torna-se desnecessário o uso de grandes áreas de solo para conservar a variabilidade genética de uma espécie vegetal (Serafini et al. 2001). Basicamente, existem duas formas de preservação permanente: conservação *ex vitro* e *in vitro*. A primeira é realizada no *habitat* natural da espécie, em áreas de preservação permanente e a segunda se faz com o estabelecimento de banco de germoplasma, onde os propágulos são cultivados em meio de cultura estéril (TORRES et al., 1998).

A conservação de plantas medicinais da Amazônia em banco de germoplasma é uma estratégia importante para garantir a sobrevivência das espécies endêmicas, bem como conservar a sua variabilidade genética, além de possibilitar a reintrodução dessas espécies em seu *habitat* natural.

Essas técnicas vêm se mostrando cada vez mais importantes para a sociedade moderna, uma vez que podem propiciar melhores condições de vida às populações humanas, através da geração de novos produtos ou na melhoria da qualidade dos que já estão disponíveis, tornando-os cada vez mais economicamente acessíveis ao

consumidor. Um exemplo de técnica de cultura de tecidos vegetal que vem barateando os custos de produção de fitofármacos, bem como os de produção de mudas “in vitro” em larga escala são os biorreatores do tipo R.I.T.A (ALVARD et al., 2003).

Portanto, o desenvolvimento de protocolos de micropropagação e de banco de germoplasma torna-se ferramenta importante em programas de conservação, principalmente quando a espécie em estudo, apesar de não domesticada, já apresenta uso potencial como fitoterápico.

## 2. JUSTIFICATIVA

Segundo RICKETTS et al. (2005), a floresta amazônica é considerada um “hotspot”, ou seja, área que tem uma enorme diversidade de espécies endêmicas e que apresenta grande parte do bioma modificado ou destruído.

A *Acmella oleracea* (L.) R. K. JANSEN é uma espécie que está exposta à erosão genética provocada pela coleta indiscriminada e pelos freqüentes desmatamentos provocados pelo homem nas áreas de ocorrência natural. Devido à sensação de formigamento, a população do Norte do Brasil utiliza as folhas desta planta no tratamento de males da boca e da garganta, bem como anestésico para dor-de-dente e o chá das folhas é utilizado para contra a anemia, escorbuto, dispesia, estimulante da atividade gástrica e no combate à tuberculose (LORENZI & MATOS, 2002). Além disso, esta espécie é freqüentemente utilizada na alimentação humana por ser uma fonte rica em cálcio, fósforo e ferro (REVILLA, 2001).

Já existem vários pedidos de patente registrados no Instituto Nacional de Propriedade Intelectual, tais como os processos número PI0100254-6 que visa a *A. oleracea* como fonte de espilantol, utilizado como anestésico na forma de pastilhas e o número JP7090294, registrado como refrescante bucal (HAMIGAKI, 1995). Essa espécie tem um grande potencial como fitoterápico, mas ainda não pode ser incluída em programas de produção em larga escala de fitomedicamentos, uma vez que ainda não há estudos fitotécnicos que permitam a rápida multiplicação desta espécie e, conseqüentemente, a produção de biomassa vegetal suficiente para uso como fonte sustentável de princípios ativos empregados pela indústria farmacêutica.

Considerando a gravidade desse problema, no momento em que toda a humanidade está preocupada em conservar a biodiversidade do planeta, a proposta de

estudar técnicas de propagação a partir de métodos biotecnológicos, objetivando a multiplicação de indivíduos representativos da diversidade desta espécie, é uma atitude concreta de preservação para a utilização dessa espécie medicinal da Amazônia brasileira.

### **3. OBJETIVO**

#### **2.1. OBJETIVO GERAL**

Desenvolver e otimizar diferentes métodos de propagação de *Acmella oleracea* (L.) R. K. JANSEN, sob condições *in vitro*, com vistas à conservação da espécie.

#### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

2.2.1. Desenvolver um protocolo de micropropagação para *Acmella oleracea*.

2.2.2. Desenvolver um protocolo de conservação em banco de germoplasma *in vitro* para *Acmella oleracea*.

2.2.3. Otimizar o protocolo de micropropagação de *Acmella oleracea* em biorreator do tipo R.I.T.A.

2.2.4. Comparar o desenvolvimento de plântulas de *Acmella oleracea* em sistema de imersão temporária com métodos convencionais de cultivo *in vitro* em meio de cultura semi-sólido e líquido.

## **4. REVISÃO DE LITERATURA**

### **4.1. A Amazônia**

Na floresta Amazônica interagem mais de 20% de todas as espécies vivas do planeta, sendo 20 mil espécies de vegetais superiores, 1.400 de peixes, 300 de mamíferos e 1.300 pássaros, além de milhares de espécies de insetos, outros invertebrados e microrganismos. Este bioma se destaca, com relação à biodiversidade que abriga por diversas razões: vasta extensão aliada à posição equatorial do país (compartilhando espécies com outros biomas); localização em área geologicamente antiga, o que produz uma variedade de condições de solo com limites bem demarcados entre si, levando a uma variedade de comunidades e espécies adaptadas a um ou outro tipo de solo (PRIMACK & RODRIGUES, 2005); sua heterogeneidade vegetal, com pelo menos 6 biotas bem distintas, ou seja, áreas compostas por animais e vegetais específicos desta região, e por conter a maior bacia hidrográfica do mundo. Esses elementos proporcionam a floresta Amazônica 57,14% de toda a flora mundial.

A floresta Amazônica é a maior floresta tropical do mundo, com área de 6,5 milhões de Km<sup>2</sup>, abrangendo 8 países, Brasil, Peru, Colômbia, Bolívia, Equador, Venezuela, Suriname, Guiana, Guiana Francesa, além da Guiana Francesa, ocupando quase metade da América do Sul. Cerca de 3,5 milhões de Km<sup>2</sup> desta floresta encontra-se em território brasileiro. Na Amazônia, também existem áreas de cerrado, campos e vegetação litorânea, perfazendo um total de 5,029 milhões de km<sup>2</sup> (FERREIRA & MARTINELLI, 1997), conhecido como Amazônia Legal.

Esta floresta apresenta três formações principais de relevo: ao Sul, localiza-se o planalto Central, ao norte o planalto das Guianas e, ao centro a planície sedimentar

Amazônica, todos com altitudes inferiores a 1.500 m. Na planície Amazônica destacam-se dois tipos de relevo: as várzeas, que por se estenderem ao longo dos rios estão sempre inundadas, e as terras firmes, que cobrem a maior parte da planície e constituem o domínio da grande floresta (NEIMAN, 1989).

Ainda segundo NEIMAN (1989), o sistema hídrico da região Amazônica é o mais importante do mundo. O rio Amazonas e seus mais de mil afluentes formam uma bacia que comporta 1/5 de toda a água doce em forma líquida do planeta. Nasce na geleira do Yarupa, no Peru, a uma altitude de 5.000 m, e possuindo 6.500 km de extensão, com largura de até 100 Km, o Amazonas é o maior rio do mundo em volume de água, e o segundo maior em extensão. Sua declividade no território brasileiro é de apenas 65 m e a profundidade pode atingir 100 m. Outras bacias importantes na região são do Tocantins-Araguaia e a do Orinoco. O clima é quente quase o ano inteiro, com uma temperatura média de 25° C, pouco flutuante ao longo das estações. A região mais úmida do país apresenta uma pluviosidade média de 2.000 a 4.000 mm ao ano. As chuvas ocorrem no inverno, que dura aproximadamente 150 dias.

A floresta amazônica é constituída em sua maioria por vegetação arbórea, trepadeiras lenhosas e uma grande flora de epífitas. As árvores alcançam freqüentemente de 40 a 60 m de altura, geralmente se ramificam somente próximo à altura da copa, suas raízes são normalmente superficiais e tabulares na base do tronco, fornecendo um suporte amplo e firme. As folhas são de tamanho médio, coreáceas, não-denteadas e não-lobadas, e verde-escuras, suas cascas são finas e lisas e suas flores geralmente são inconspícuas e esverdeadas ou de coloração esbranquiçada. Esta floresta forma vários estratos, onde as camadas inferiores são constituídas de plântulas das espécies mais altas, juntamente com um número relativamente pequeno de espécies de pouco crescimento. Contudo, o seu solo é pobre, uma vez que é ligeiramente ácido e

bastante arenoso, além de apresentar baixos teores de nutrientes tais como cálcio, fósforo, potássio e magnésio, entre outros e possuir altas concentrações de alumínio, que tende a ser tóxico (HAVEN et al., 1996), uma vez que determina a capacidade de troca catiônica, fundamental no metabolismo nutricional das plantas (JURANDYR & SANCHES, 1996).

A importância da floresta Amazônica para a humanidade não reside apenas no papel que desempenha para o equilíbrio ecológico mundial. A região é o berço de inúmeras civilizações indígenas e, além disso, constitui-se numa riquíssima fonte de matérias-primas alimentares, florestais, medicinais, energéticas e minerais (NEIMAN, 1989). Por isso, atualmente, cientistas do mundo inteiro, fazendeiros e mineradoras têm considerado esse bioma como área de excelência para o desenvolvimento de diferentes ramos de negócios e pesquisas.

A floresta Amazônica é um bioma complexo que precisa ser ainda muito estudado, do ponto de vista do solo, dos recursos hídricos, da fauna e flora e suas interações, bem como dos fatores climáticos para que propostas concretas de desenvolvimento sustentável sejam implantadas, garantindo a preservação desse ecossistema.

O trabalho de conservação de uma espécie, ou de um grupo delas, deve ser sempre abrangente e incluir o estudo do ecossistema em que elas estão inseridas para que o trabalho de proteção contra a erosão genética e/ou que evite sua extinção, seja de fato efetivo.

## **4.2. Plantas medicinais.**

A utilização de plantas como medicamentos pela humanidade é tão antiga quanto a história do próprio homem. O processo de evolução da “arte de curar” se deu de forma empírica, em processos de descobertas por tentativas, com erros e acertos (MORS, 1982). Nesse processo, os povos primitivos fizeram a identificação das espécies que curavam, as partes dos vegetais adequados ao uso medicinal, assim como a época mais indicada da colheita (LEVIS-STRAUSS, 1989). Após a identificação, vieram as técnicas de extrair sucos, secar folhas e raízes e triturar sementes, o que daria início a um corpo teórico do conhecimento que constituiria a medicina do homem primitivo. Esse processo foi lento e longo, no qual a intuição aliada a diferentes tipos de ensaios empíricos, vagarosamente, converteu a experiência do saber em memória coletiva, e esta foi repassada às gerações seguintes.

As plantas medicinais são importantes fontes de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelo para a síntese de um grande número de fármacos (NODARI & GUERRA, 1999). De acordo com a Organização Mundial da Saúde, entre 65 a 80% da população que vive nos países em desenvolvimento, tem carência de acesso à medicina moderna devido à pobreza e dependem essencialmente das plantas medicinais para suprir suas necessidades primárias de saúde (CALIXTO, 2000). Mais de 1 bilhão de pessoas no mundo (cerca de 20%) vivem em extrema pobreza e estão sofrendo e morrendo por falta de cuidados médicos básicos. Nos países em desenvolvimento, 12,2 milhões de crianças morrem principalmente devido a doenças facilmente evitáveis que poderiam ser curadas com poucos centavos utilizando plantas medicinais (PHILLIPSON, 1999).

O valor dos produtos naturais das plantas medicinais para a sociedade e para a economia mundial é imenso. Foi estimado por CALIXTO (2000), que o mercado europeu sozinho alcançou US\$ 7 bilhões em 1997 e que o consumo na Alemanha corresponde a cerca de 50% desse mercado, ou seja, cerca de US\$ 3,5 bilhões que representam mais ou menos US\$ 42,90 *per capita*. Este mercado é seguido pela França US\$ 1,8 bilhões, Itália US\$ 700 milhões, Reino Unido US\$ 400 milhões, Espanha US\$ 300 milhões e Inglaterra US\$ 100 milhões. Também foi estimado que o mercado de ervas medicinais no Japão e na Ásia alcançou US\$ 2,3 e US\$ 2,1 bilhões, respectivamente. Contudo, nenhum outro mercado de plantas medicinais cresceu tanto quanto o dos EUA, que não existia até poucos anos atrás e que alcançou cerca de US\$ 1,098 bilhão em 1995 (PHILIPSON, 1999). Para se ter uma idéia, estima-se que cada americano gasta US\$ 54,00 por ano comprando esses medicamentos. Essas cifras atraíram o interesse das maiores companhias farmacêuticas do mundo (BLUMENTHAL, 1999), que atualmente têm investido em estudos fitoquímicos, caracterização dos possíveis compostos bioativos, bem como farmacológicos, em testes de bioatividade, modos de ação e determinação dos sítios ativos dos compostos extraídos de plantas (BRISKIN, 2000).

Segundo FERREIRA (1998), no Brasil, em 1994, as vendas de medicamentos em farmácias somaram US\$ 3,831 milhões, dos quais US\$ 212 milhões, cerca de 5,5% daquele valor, corresponderam a produtos contendo exclusivamente princípios ativos de origem vegetal.

O desenvolvimento de uma única droga custa em torno de US\$ 300 milhões e apenas 1 em cada 10.000 compostos químicos estudados com potencial farmacológico chegam ao mercado. Apesar desses riscos, um único composto pode gerar aproximadamente US\$ 1 bilhão de lucro/ano quando colocado no mercado. Um

exemplo importante de investigação de novas drogas é o estudo realizado pelo Instituto Nacional do Câncer, nos EUA, onde foram avaliados, no período entre 1960 e 1982, cerca 114.000 extratos de plantas de 35.000 espécies vegetais com o objetivo de encontrar uma nova droga contra o Câncer. Nesse estudo foi descoberto o Taxol, substância atualmente mais utilizada no tratamento em pacientes com todos os tipos de câncer (NÚÑEZ & CANTERO, 2000).

Apenas 8% das espécies vegetais da flora brasileira foram estudadas em busca de compostos bioativos e 1.100 espécies vegetais avaliadas em suas propriedades medicinais (GARCIA et al., 1996).

### **4.3. Descrição Botânica de *Acmella oleracea* (L.) R. K. JANSEN.**

#### **4.3.1. Classificação Biológica**

Filo: Plantae

Divisão: Anthophyta

Classe: Dicotyledoneae

Ordem: Campanulales ou Synandreae

Família: Compositae

Tribo: Heliantheae

Subtribo: Ecliptinae

Gênero: *Acmella*

Espécie: *Acmella oleracea*

As sinónimas de *A. oleracea* são: *Spilanthes oleracea* L., *Cotula pyretharia* L., *Pyrethrum spilanthus* Medik., *Spilanthes acmella var oleracea* (L.) C. B. CLARK ex

HOOK. F., *Spilanthes fusca* MART (LORENZI & MATOS, 2002), *Bidens fervida* Lan, *Bidens fusca* Lan, *Isocarpa pyrethraia* (L.) Cass, *Spilanthes radicans* Schrad. Ex D. C., *Spilanthes oleracea*  $\beta$  *fusca* (Lam.) D. C. (HIND & BIGGS, 2003).

#### **4.3.2. Distribuição Geográfica de *Acmella oleracea* (L.) R. K. JANSEN**

De acordo com LEWIS et al. (1998), como observado na Figura 1, a *Acmella oleracea* é uma espécie encontrada em regiões tropicais próximas à Linha do Equador, onde grande populações são comumente encontradas na Tanzânia (1166 m, 01.08.24S 031.26.33E) e também na América do Sul (Figura 2), principalmente na Bolívia (200 m, 14.30S 066.37W), Equador (800 m, 1.51S 77.48W). Estes dados demonstram que esta planta não é nativa do Brasil, uma vez que aqui não são encontradas grandes populações selvagens desta espécie e, já que os indivíduos aqui presentes são encontrados apenas em residências e suas adjacências, pode-se assim, levantar a hipótese de que esta espécie tenha sido apenas domesticada no Brasil.

Figura 1. Mapa de distribuição geográfica de *Acmella oleracea* (L.) R. K. JANSEN.

FONTE: <http://www.mobot.org>.

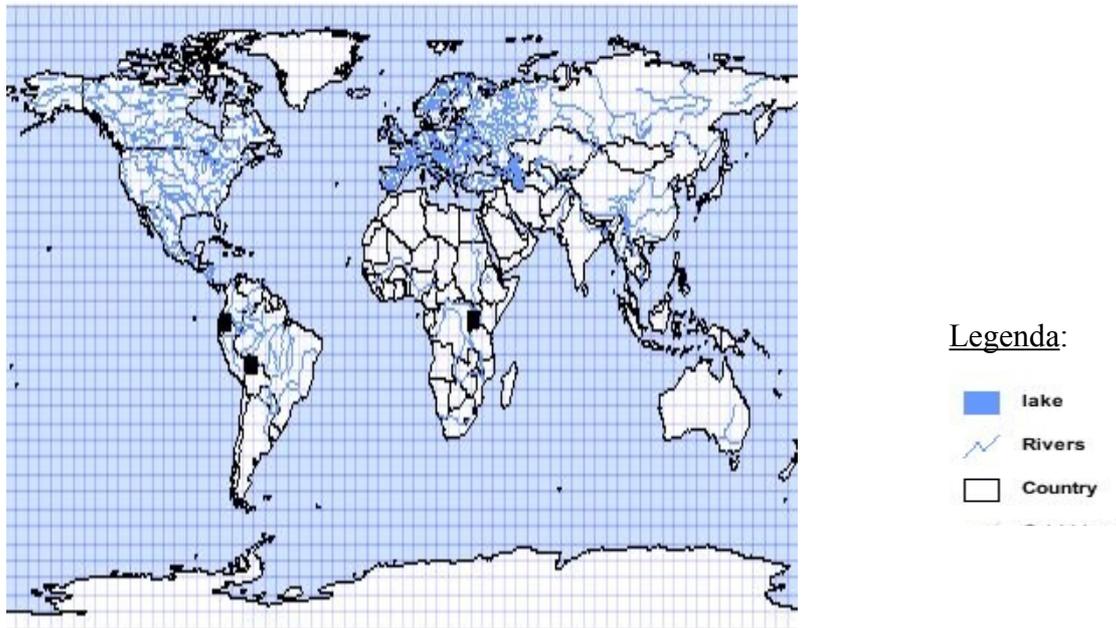


Figura 2. Mapa de distribuição geográfica de *Acmella oleracea* (L.) R. K. JANSEN na América do Sul.

FONTE: <http://www.mobot.org>.



### 4.3.3. A Família Compositae

A família Compositae compreende cerca de 920 gêneros, com aproximadamente 19.000 espécies (JOLY, 1993). Essa família é amplamente encontrada em regiões tropicais e subtropicais úmidas da América do Sul, geralmente localizadas na margem de rios. (RAMSEWAK et al., 1999). Atualmente, para estudos sistematizados, a família Compositae foi dividida em dezessete tribos, Heliantheae, Anthemideae, Astereae, Barnadesieae, Cardueae, Eupatorieae, Gnaphalineae, Helenieae, Inuleae, Lactuceae, Liabeae, Mutisieae, Plucheeae, Senecioneae, Tageteae, Vernonieae e Calenduleae. A última é uma pequena tribo representada somente por uma espécie cultivada, a *Calendula officinalis* L. e apenas a primeira ocorre no Brasil (DILLAN & ALVA, 2001).

Segundo HAW & KENG (2003), 42,4% das espécies vegetais pertencem à família Compositae e, entre elas, podemos citar: *Acanthospermum australe* (Loefl.) Kuntze, *Achillea millefolium* L., *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C., *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen, *Spilanthes oleracea* L., *Acmella uliginosa* (Sw) Cass, *Ageratum conyzoides* L., *Arctium minus* (Hill) Bernh., *Artemisia absinthium* L., *Artemisia annua* L., *Artemisia vulgaris* L., *Baccharis trimera* (Less.) D.C., *Bidens pilosa* L., *Calendula officinalis* L., *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert, *Chrysanthemum cinerariaefolium* (Trev.) Vis., *Cichorium intybus* L., *Cnicus benedictus* L., *Cynara scolymus* L., *Echinacea purpurea* (L.) Moench., *Eclipta alba* (L.) Hassk., *Egletes viscola* (L.) Less., *Elephantopus mollis* Kunth., *Emilia sanchifolia* (L.) DC., *Galinsoga parviflora* Cav., *Lactuca sativa* L., *Mikania cordifolia* (L. f.) Willd., *Mikania glomerata* Spreng., *Mikania hirsutissima* D.C., *Pluchea sagitalis* (Lam.) Cabrera,

*Silybum marianum* (L.) Gaertn., *Solidago chilensis* Meyen., *Sonchus oleraceus* L., *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni., *Tagetes minuta* L., *Tanacetum parthenium* (L.) Sch. Bip., *Tanacetum vulgare* L., *Taraxacum officinale* Weber *Trixis divaricata* (Kunth) Spreng, *Vernonia candensata* Baker. e *Vernonia polyanthes* Less (LORENZI & MATOS, 2002). A elevada porcentagem de espécies medicinais dentro da família Compositae revela a importância e prioridade de se estudar essas plantas.

#### 4.3.4. Aspecto Morfológico



Figura 3: Aspecto morfológico de *Acemella oleracea*.

Fonte: USDA United States Department of Agriculture and Natural Resources Conservation Service

A *Acemella oleracea* é uma espécie da Amazônia, principalmente da região do Pará e se multiplica tanto por sementes como por hastes enraizadas (REVILLA, 2001). É uma planta herbácea anual, perene, de 20 - 40 cm de altura, semi-ereta, quase rasteira, com caule cilíndrico, carnoso e de ramos decumbentes, geralmente sem raízes nos nós.

A raiz principal é pivotante, com abundantes ramificações laterais (LORENZI & MATOS, 2002).

As folhas são compostas, opostas, membráceas, pecioladas; pecíolos de 20 -60 mm de comprimento, achatados, com sulcos sobre a superfície, ligeiramente alados e pouco pilosos. O limbo é geralmente oval, com 53 - 106 mm de comprimento e 40 - 79 mm de largura, apresenta base truncada, atenuada na parte superior da folha e pêlos esparsos sobre ambas as superfícies, principalmente sobre a nervura central da folha; as folhas possuem glândulas pilóricas, são unisseriadas, de base multicelular, levemente protuberantes, marrom, com extremidade unicelular longa, delgada e branca. A borda do limbo é dentada e o ápice é agudo. Esta espécie é constituída por grupos foliares campanulados, com 3 - 7 mm de altura e 9 - 15 mm de diâmetro. Os folíolos são trisseriados, imbricados, verdes, lanceolados, com ápices de cor púrpura a vermelho, bordas completas, ciliadas e de ápices agudos. Esta espécie apresenta de 5 - 6 folíolos externos com 5,8 - 7,3 mm de comprimento e 5 - 6 folíolos internos com 5,5 - 6,5 mm de comprimento. Receptáculo é cônico, branco, áspero, com 8,3 - 21,5 mm de altura e 1,0 - 1,2 mm de diâmetro, paleáceo, com pálea de 5,3 - 6,2 mm de comprimento e 1 - 1,2 mm de largura, branca, com ápice de púrpuro a vermelho, com 0,5 mm, glabro, exceto na ponta; os pêlos são translúcidos, unisseriados, curtos, de base pálea em ângulo reto, pouco inclinado e ápice agudo (BAKER, 1884 a).

Ainda segundo BAKER (1884 a), as inflorescências são isoladas, com capítulos globosos axilares e terminais pedunculados. Os pedúnculos apresentam de 3,5 - 12,5 mm de comprimento, são abracteolados e ocos, de glabro a esparsamente piloso e os pêlos são aglandulados. Os capítulos apresentam de 10,5 - 23,5 mm de altura e 11 - 17 mm de diâmetro, são pedunculado, homogêneo, discóide.

As flores são pequenas, amareladas, com áreas púrpuras distintas na pálea do cálice, bem visível em capítulos imaturos, dipostas em capítulos globosos terminais que medem cerca de 1,0cm de diâmetro. São hermafroditas, numerosas (400 a 620) e férteis; o tubo da corola mede entre 2,7 - 3,3 mm de comprimento, é verde, glabro, reduzido em um tubo na base; o tubo mede de 0,5 - 0,7 mm de comprimento e 0,2 - 0,4 mm de diâmetro, tem abertura inflada de 2,2 - 2,6 mm de comprimento e 0,5 - 1,0 mm de diâmetro; os lóbulos da corola (4 – 5) medem de 0,5 - 0,6 mm de comprimento, são amarelos e de interior papiloso; as anteras são cilíndricas e localizadas dentro da abertura da corola; os filamentos são brancos, atados à base da abertura da corola, lisos, desprovidos de um colar evidente na antera; apresenta 5 anteras pretas; antera apical é suplementar e triangular, com ápice grosso, largo e longo; a antera basal é suplementar, curta e triangular. O pólen apresenta coloração variando entre alaranjado brilhante a amarelo pálido. A base do estilo possui um nó distinto e glabro; o estilo tem haste glabra, com três ramificações e os seus ápices são truncados e papilosos (BAKER, 1884 b).

O fruto é um aquênio pequeno, com 2,0 - 2,5 mm de comprimento e 0,9 - 1,1 mm de largura, com pericarpo cinza-escuro, quase preto, parcialmente envolvido por partes membráceas. Está resumido a duas nervuras marginais, que são longitudinalmente alongadas, ciliadas, completas, de faces setulíferas, com pares de sétulas descentralizadas e não divididas em ápices; o carpopódio é levemente ovalado, grosso, seco, de cor marrom-amarelado e com uma parte dorsal branca, grossa e alongada; os filetes são persistentes, com 02 pêlos desiguais e discretamente espinhento, que medem 2,0 - 2,5 mm de comprimento (HIND & BIGGS, 2003).

#### **4.3.5. Princípios Ativos e Atividades Biológicas**

A espécie *Acmella oleracea* é popularmente conhecida como “Jambu” e muito procurada na Amazônia, uma vez que suas flores são indicadas como anestésico para

males da garganta e suas folhas são utilizadas para curar dor de dente e de estômago (REVILLA, 2004). Embora não haja até o momento ensaios fitoquímicos e farmacológicos sistematizados com esta espécie, RAMSEWAK et al. (1999), detectaram a presença de Espilantol em *A. oleracea* e estudos têm mostrado que esse *N*-isobutilamida tem atividade anestésica e larvicida contra *Aedes aegyptii*, podendo ser utilizado como importante ferramenta no controle da dengue.

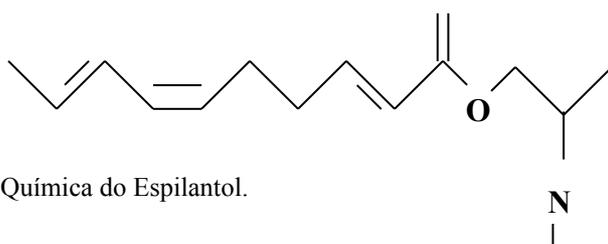


Figura 4: Estrutura Química do Espilantol.

#### 4.4. Micropropagação

##### 4.4.1. Uma visão geral da técnica.

Micropropagação é a propagação vegetativa *in vitro*, e recebe este nome devido ao tamanho dos propágulos utilizados. Esta é a aplicação mais prática da cultura de tecidos (FETT, 2005).

Segundo ENGELMANN (1991), a clonagem *in vitro* é particularmente útil para a conservação das espécies ameaçadas, para a propagação de espécies recalcitrantes, reprodução de espécies que se propagam vegetativamente e/ou de ciclo de vida longo.

A aplicação da micropropagação destaca-se nos trabalhos de hibridização e desenvolvimento de novos cultivares, na multiplicação segura de cultivares desejáveis, na propagação rápida com alto coeficiente de multiplicação e como técnica de multiplicação e conservação de patrimônio genético de plantas ameaçadas de extinção (PEREIRA et al., 2000).

Um dos quesitos para a aplicação bem-sucedida da tecnologia de propagação de plantas para a agricultura é a capacidade de regenerar mudas elite. Durante a década

passada, a demanda por estas plantas nativas em larga escala industrial motivou a busca de novas técnicas de micropropagação, que foram desenvolvidas para suprir as exigências do constante crescimento comercial. Assim, a realização da multiplicação *in vitro* de um grande número de clones de plantas com características melhoradas ganhou importância (BAIS et al., 2000).

A micropropagação pode ser realizada por meio da cultura de meristemas, da germinação de sementes *in vitro*, da proliferação de gemas apicais, axilares e adventícias. Além disto, também é possível produzir plântulas *in vitro* a partir da regeneração de calos e por embriogênese somática (KRIKORIAN, 1982).

Por ser um sistema com condições ambientais controladas e assépticas, a técnica de micropropagação tem-se mostrado de enorme importância prática devido à alta taxa de multiplicação, à redução do espaço para conservação e à eliminação de patógenos. Além disso, permite a fácil troca de acessos entre grupos que visam à pesquisa ou têm interesse comercial (ENGELMANN, 1991).

Segundo TORRES et al. (1998), na década de setenta, quando a micropropagação ganhou grande impulso, MURASHIGE (1974) apresentou o conceito de estádios de desenvolvimento no processo de propagação *in vitro*. Esse esquema padrão para sistemas de micropropagação divide-se em: estágio I, quando são feitas a seleção de explantes, desinfecção e cultura em meio nutritivo sob condições assépticas; estágio II, quando ocorre a multiplicação dos propágulos mediante sucessivas subculturas em meio próprio para a multiplicação e, estágio III, quando é feita a transferência das partes aéreas produzidas para meio de enraizamento e subsequente transplantio das plantas obtidas para substrato ou solo.

O sucesso de um protocolo de micropropagação depende de vários fatores como: estado fisiológico da planta matriz, coleta de explantes, esterilização dos meios de

cultura, condições de incubação, manipulação de subculturas e uso de reguladores de crescimento, meio de cultura, entre outros (GONZÁLES et al., 2004).

Para o estabelecimento de um protocolo de propagação *in vitro* de uma espécie, a assepsia é de fundamental importância, pois eliminará todos os patógenos que possam vir a comprometer a qualidade sanitária das plântulas assim produzidas.

Há grande dificuldade de se obter um tecido totalmente descontaminado nas etapas iniciais para algumas espécies, principalmente quando estas se encontram em condições naturais de campo. Nesse caso, pode ser necessária a aplicação de alguns pré-tratamentos com substâncias antimicrobianas na planta matriz (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Várias são as substâncias utilizadas para fazer a desinfestação dos explantes, sendo mais comum o uso de etanol e compostos a base de cloro, como os hipocloritos de sódio e de cálcio. Outros agentes desinfestantes usados incluem o cloreto de mercúrio, ácido clorídrico e peróxido de hidrogênio, além de ácidos ou bases concentradas e o mertiolate que também são indicados (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). O tipo de desinfestante a ser empregado na assepsia, bem como sua concentração e/ou o tempo de exposição à solução, podem variar muito dependendo do tipo de explante.

Outro aspecto importante a ser considerado no desenvolvimento do protocolo de micropropagação é o meio de cultura.

Os meios de cultura utilizados para o cultivo de tecidos de plantas fornecem as substâncias essenciais para o crescimento e controlam, em grande parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro*. As vias bioquímicas e metabólicas básicas que funcionam nas plantas que crescem sob condição *ex vitro* são conservadas nas células e tecidos cultivados *in vitro* e, por isso, os meios de cultura são elaborados a partir das exigências

das plantas inteiras, quanto aos nutrientes minerais. Entretanto, algumas modificações podem ser realizadas para atender as necessidades específicas da condição de cultivo *in vitro*.

De acordo com HARTMANN et al. (1997), vários compostos orgânicos são também adicionados ao meio de cultura para suprir as necessidades metabólicas, energéticas e estruturais das células, complementando assim as substâncias biossintetizadas por elas.

Os meios MS de MURASHIGE & SKOOG (1962), B5 de GAMBORG et al. (1968) e WP de LLOYD & MCCOWN (1980), são usados na cultura de tecidos da maioria das espécies. Algumas alterações na composição do meio de cultura básico, como diluições, podem ser feitas para a otimização de protocolos de micropropagação (GAMBORG et al., 1998). Porém, para a grande maioria das plantas estudadas, somente os sais utilizados nos meios de cultura não são capazes de induzir certas respostas fisiológicas, necessitando assim da adição de reguladores de crescimento vegetal no meio de cultura.

A composição e a concentração de reguladores de crescimento vegetal no meio de cultura de plantas são fatores determinantes no crescimento e no padrão de desenvolvimento na maioria dos sistemas de cultura de tecidos (SERAFINI et al., 2001).

Em geral, os meios de cultura de plantas contêm auxina e citocinina. Essas duas classes de reguladores de crescimento vegetal, dependendo das concentrações utilizadas, ajudam a manter o crescimento da célula e promovem a divisão celular, respectivamente. Os reguladores de crescimento celular vegetal mais comumente utilizados são as auxinas, como por exemplo, o AIA (ácido 3-indol-acético), o IBA (ácido 3-indol-butírico), o 2,4-D (ácido 2,4-Diclorofenoxiacético), o *ApCFA* (ácido *p*-

Clorofenoxiacético) e o ANA (ácido 1- Naftalenoacético), que são usados para a indução de calos e podem estimular a organogênese em situações especiais e as citocininas, como por exemplo, a KIN (6-furfurilaminopurina, também conhecida como cinetina), o BAP (6-Benzilaminopurina), o 2ip (N-Isopentenilaminopurina) e a Zea (Zeatina), são incluídos no meio de cultura para induzir a multiplicação rápida dos brotos axilares/adventícios ou meristemas. Uma outra classe de reguladores de crescimento vegetal, as Giberelinas, como o GA<sub>3</sub> (Giberelina A<sub>3</sub>), também pode ser utilizada com a finalidade de promover o crescimento dos brotos quando adicionada ao meio de indução (DIXON & GONZALES, 1994).

No desenvolvimento de protocolo de micropropagação, o estabelecimento de rizogênese *in vitro* é fator de extrema importância. De modo geral, o desenvolvimento de raízes também está relacionado com a presença de reguladores de crescimento vegetal. O enraizamento *in vitro* caracteriza-se pela formação de raízes adventícias nas partes aéreas provenientes da multiplicação, permitindo, assim, a posterior transferência para condições *ex vitro* (DAVIS et al., 1988).

As raízes são os órgãos responsáveis pela fixação da planta e pela absorção de água e de nutrientes do solo. Muitas vezes, há a necessidade de usar metodologias complexas para estabelecer o enraizamento *in vitro*.

Vários fatores intrínsecos aos explantes interferem na capacidade regenerativa das raízes. Dentre estes, pode-se destacar a importância do tamanho do explante (KERBAUY, 1998). Partes aéreas bem estabelecidas, em geral, favorecem o desenvolvimento do sistema radicular. GRATTAPAGLIA & MACHADO (1998), também comentam sobre a importância das partes aéreas no sucesso do enraizamento. Segundo esses autores, partes aéreas pouco desenvolvidas não enraízam bem e necessitam da fase intermediária de alongamento.

De acordo com GRATTAPAGLIA & MACHADO (1998), a rizogênese ocorre de uma a três semanas após a inoculação e pode ser dividida em indução, iniciação e alongamento das raízes. Enquanto as duas primeiras fases respondem ou dependem de auxina, o crescimento das raízes é inibido pela presença da mesma. A dificuldade num sistema de micropropagação está em determinar uma condição *in vitro* em que todas essas fases possam ocorrer normalmente e, de preferência, sem necessitar de manipulação adicional de uma fase para a outra.

Após a descoberta de que o AIA induz a formação de raízes adventícias, várias pesquisas foram feitas para verificar se outras auxinas que ocorrem naturalmente em plantas também promovem o enraizamento. Então, compostos com estruturas similares ou não ao AIA foram testados e as respostas obtidas não foram satisfatórias. Atualmente, é de consenso comum que o AIA é a principal, se não a única, auxina encontrada naturalmente em plantas, ocorrendo tanto na forma livre como na forma conjugada. Porém, alguns testes realizados com substâncias análogas ao AIA tiveram sucesso e, em 1935, foi relatado que duas auxinas sintéticas, o IBA e o ANA, promoviam altas taxas de enraizamento (DUDLEY, 1998).

Tipos e concentrações de auxinas são as variáveis que, em geral, mais influenciam no enraizamento. A adição de outros reguladores de crescimento vegetal é desnecessária ou mesmo prejudicial (GRATTAPAGLIA et al., 1987). Contudo, diversas auxinas, sozinhas ou em combinação, podem ser utilizadas no enraizamento e as suas concentrações variam de acordo com a espécie e o clone (TORRES et al., 1998).

Estes dados confirmam as afirmações de DUDLEY (1998), que relata que o IBA e o ANA são as principais auxinas usadas comercialmente para induzir enraizamento em plantas, seguidas por um menor uso de AIA e outros compostos fenólicos como o

2,4-D. A preferência pelo IBA e pelo ANA é ilustrada pelo grande número de formulações comerciais para enraizamento que contém uma ou as duas auxinas.

Outras auxinas sintéticas, como o 2,4-D, Picloram, ácido  $\beta$ -naftoxiacético (ANOA) e ácido p-clorofenoxiacético (ApCFA) estimulam a produção de calos, não sendo comuns em trabalhos de enraizamento (TORRES et al., 1998). HU & WANG (1983), verificaram que 86% dos meios de cultura para enraizamento continham auxina, e que o ANA pareceu ser a auxina mais eficaz para estimular o enraizamento *in vitro*. Ela aparece em 53% dos meios de cultura contra 29% para o IBA, 11% para o AIA, 3,6% para o 2,4-D e 3,6% para outras auxinas. As concentrações mais frequentes para o enraizamento estão na faixa de 0,1 a 1,0 mg/L.

#### **4.4.2. Os meios de Cultura:**

Os meios de cultura devem suprir tecidos e órgãos cultivados *in vitro* com nutrientes necessários ao crescimento do vegetal. Basicamente, o meio de cultura fornece não só macronutriente, mas também um carboidrato (geralmente a sacarose) para substituir o carbono que a planta normalmente fixa da atmosfera pela fotossíntese. Para propiciar um crescimento maior, normalmente incluem-se certos componentes orgânicos como vitaminas, aminoácidos e reguladores de crescimento (TORRES et al. 1998).

Como exemplificado na tabela 1, os meios de cultura são constituídos, geralmente, por água, que o componente utilizado em maior quantidade na preparação de meios de cultura. Por ser uma fonte de impurezas, tanto química, tais como íons de flúor e cloro entre outros, como biológicas, por fungos e bactérias, esta deve ser destilada ou ionizada para não afetar o crescimento das culturas (ROJAS et al., 2004).

Os meios de cultura também são constituídos por macronutrientes, que são fornecidos ao meio de cultura na forma de sais. Cálcio, Magnésio e Potássio são absorvidos pelas células vegetais como cátions ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{K}^+$ ); Nitrogênio na forma de amônia ( $\text{NH}_4^+$ ) ou Nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ); Fósforo como íons fosfato ( $\text{HPO}_4^{2-}$  e  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) e enxofre como íon sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ). Os sais usados para fornecer macronutrientes também podem fornecer íons dos elementos Sódio (Na) e Cloro (Cl), mas como células vegetais toleram altas concentrações de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ , pouca importância é dada a estes íons. A absorção de nutrientes pelo explante é influenciada pela concentração de outros elementos, pH, temperatura e condições bioquímicas e fisiológicas dos tecidos (TORRES et al, 1998).

O Nitrogênio, que dependendo da forma como é disponibilizado no meio de cultura influencia sensivelmente tanto o crescimento como a morfogênese em culturas *in vitro*. Praticamente, todos os meios de cultura fornecem N disponível na forma de íons nitrato. Porém, uma vez dentro da célula, o nitrato tem que ser reduzido para amônio antes de ser biossinteticamente utilizado. O nitrato de amônia ( $\text{NH}_4^+$ ), quando fornecido sozinho ao meio, causa problemas de toxicidade. Por isso, ele é usado de forma combinada como o ( $\text{NO}_3$ ). Os íons amônio do meio de cultura são utilizados para produzir os aminoácidos e outros compostos contendo nitrogênio (PASQUAL et al, 1997). Um suprimento de nitrogênio reduzido no meio de cultura é benéfico para a formação da parede celular e a atividade de reguladores de crescimento (MIRASHIGE. & SKOOG, 1974).

O Fósforo, nos meios de cultura, este é fornecido como fosfato de sódio solúvel ou fosfato de potássio mono e di-hidrogenado. O  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ . Altas concentrações de fosfato dissolvido podem diminuir o crescimento do explante, possivelmente porque o cálcio e alguns microelementos são precipitados da solução ou sua absorção é reduzida. A taxa de

incorporação de íons fosfato depende do genótipo, o qual é usualmente constante e proporcional à taxa de crescimento da cultura (PASQUAL et al, 1997).

O Potássio, cujos íons são transportados rapidamente através das membranas das células e duas de suas principais funções são regular o pH e o equilíbrio osmótico dentro das células. Estes íons têm um papel similar em tecidos cultivados *in vitro*. A deficiência de potássio no meio de cultura pode induzir à hiperidricidade (ZIMMERMAN, 1998).

O Enxofre, que nas plantas é absorvido principalmente como  $\text{SO}_4^{2-}$ , que é fonte usual do elemento em meio de cultura. Sua absorção é relacionada à assimilação do nitrogênio e, independentemente do pH (PASQUAL et al, 1997).

O Cálcio, na forma do íon  $\text{Ca}^{2+}$  está envolvido na morfogênese *in vitro* e é necessário para muitas das respostas induzidas por substâncias do crescimento em plantas, principalmente auxinas e citocininas (YUE et al., 1993).

Os meios de cultura atuais utilizam os microelementos do meio B5 de GAMBORG et al. (1968) ou misturas mais concentradas nos meios de cultura MS de MURASHIGE & SKOOG (1962). Os principais microelementos encontrados nos meios de cultura são o Manganês, o Zinco, o Boro, o Cobre, o Molibdênio, o Cobalto, o Iodo, o Silício, o Alumínio, o Níquel, o Ferro e seus Quelalatos, o Cloro e o Sódio (TORRES et al., 1998).

O Manganês (Mn) é um dos mais importantes microelementos e tem sido incluído na maioria dos meios de cultura. Este microelemento parece estar relacionado à produção de brotos axilares em plantas (TORRES, 1989). Já o Zinco parece estar relacionado com a produção de auxina pelas plantas. Estudos realizados por LEITE (1995) sugerem que este é um componente de uma enzima relacionada com a síntese do precursor do AIA, o triptofano. Segundo PASQUAL et al., (1997), o Boro é encontrado

no solo sob a forma de ácido bórico e este é o composto usado como fonte do elemento em cultura de tecidos. Este micronutriente promove a destruição da auxina natural e aumenta sua translocação. A sua deficiência no meio de cultura promove sistema radicular reduzido e redução na síntese de citocinina.

Ainda segundo PASQUAL et al (1997), o cobre é adicionado ao meio de cultura na forma de sulfato, o molibdênio na forma de molibdato e, embora metade dos meios de cultura publicados recentemente possuam Cobalto em sua formulação, não há uma evidência clara de sua necessidade para a morfogênese ou crescimento da planta. De acordo com o mesmo autor, o Silício geralmente não é adicionado ao meio de cultura, porém, sua adição pode aumentar o crescimento de algumas plantas. Quanto ao Alumínio e ao Níquel, não foram demonstrados os efeitos benéficos da adição destes metais ao meio de cultura.

Segundo TORRES et al. (1998), o ferro é um micronutriente essencial para os vegetais e pode ser absorvido por estes na forma de íons ferrosos ( $\text{Fe}^{2+}$ ) ou férricos ( $\text{Fe}^{3+}$ ). SERAFINI et al. (2001), relatou que o sulfato ferroso e tartarato ou citrato férrico têm sido usados como fontes deste elemento e que o ácido cítrico e tartárico podem agir como agentes quelantes, porém, não são eficientes em manter o Fe em solução, tornando-os sujeitos à precipitação como fosfato de ferro. De acordo com PASQUAL et al. (1997), tem sido demonstrado que culturas de algumas espécies crescem mais rapidamente se íons  $\text{Fe}^{3+}$  a partir de  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ , forem quelatados com EDTA (Etileno-diamino-tetracético), mais do que se forem adicionados ao meio como compostos puros. Agentes quelantes como o EDTA, em baixas concentrações, exercem efeitos sobre o crescimento de plantas, similares àqueles produzidos pelas auxinas. Estes efeitos são atribuídos à: 1) Agentes quelantes agem como sinérgicos às auxinas por reterem o cálcio

da parede celular e 2) às atividades biológicas da auxina AIA pode estar relacionada à uma habilidade para íons quelados (GEORGE, 1993).

O cloro apresenta pouca influência do ponto de vista nutricional e concentrações muito elevadas deste sal no meio de cultura podem causar amarelecimento em folhas e enfraquecimento de hastes, podendo levar alguns tecidos à morte (YUE et al., 1993). Já o Sódio, mesmo quando não adicionado ao meio de cultura, neste é encontrado em pequenas quantidades, pois é originado à partir de outros elementos aí adicionados para fornecer micronutrientes (PASQUAL et al., 1997).

Suplementos micro-orgânicos como vitaminas e aminoácidos são componentes comumente adicionados aos meios de cultura. As vitaminas aumentam o crescimento e sobrevivência de plantas quando adicionados ao meio de cultura, uma vez que estas substâncias orgânicas se esgotam rapidamente da célula e, para que a planta possa sobreviver *in vitro*, é necessária a adição das mesmas ao meio de cultura (ROJAS et al., 2004). As principais vitaminas incorporadas aos meios de cultura vegetal são a tiamina (Vitamina B<sub>1</sub>), ácido nicotínico (niacina), piridoxina (vitamina B<sub>6</sub>) e mio-inositol (SERAFINI et al., 2001).

O mio-inositol é um dos nove estereoisômeros de inositol e tem importância biológica no crescimento do vegetal, devido a sua capacidade de induzir a formação de pectina e hemicelulose, necessárias nas paredes celulares (LEHNINGER et al., 2006). A tiamina é um co-fator essencial no metabolismo do carboidrato e é diretamente envolvido na biossíntese de alguns aminoácidos (DAVIS et al., 1988).

Já os aminoácidos podem ser adicionados ao meio de cultura para suprir necessidades dos tecidos quando a disponibilidade de nitrogênio é baixa. Porém, para a maioria das culturas a adição destes compostos é desnecessária, desde que a proporção de íons nitro e amônio seja correta (PASQUAL et al., 1997).

#### 4.5. Sistemas de Imersão Temporária

De acordo com PÉREZ et al. (1998), a micropropagação é uma técnica relativamente recente e com grande potencial, mas que depende de desenvolvimento de novas técnicas de automação dos processos e do melhoramento dos sistemas de aclimação de plantas. Muitas espécies, com relevância do ponto de vista econômico, têm protocolo de micropropagação desenvolvido e contam com empresas, caracterizadas como biofábricas, empenhadas na execução desses protocolos que permitem a sua produção em larga escala (AITKEN- CHRISTIE & DAVIES, 1988).

Com o objetivo de produzir plantas em grande escala para satisfazer as necessidades industriais e a alta demanda no mercado, espécies como: orquídeas (*Ionopsis ochlereuca*), abacaxi (*Ananas comosus* L. cv. Perola), café (*Coffea arabica* cv Catuai vermelho 81), mamão (*Carica papaya* L. cv Tainug) e álamo (*Populus tremula* X *P. Alba*) tiveram um protocolo de micropropagação estabelecido em sistema automatizado (CID et al., 2002).

Os métodos convencionais de micropropagação de plantas em meios de cultura semi-sólidos envolvem algumas etapas, tais como transferir constantemente os explantes para meio de cultura fresco e repicagem das plântulas, entre outros, o que encarece os custos laboratoriais e demanda mão-de-obra especializada. Várias técnicas de cultura em meio líquido têm sido, então, desenvolvidas para reduzir os custos laboratoriais, estimular as taxas de crescimento e de multiplicação dos explantes e aumentar a absorção uniforme de gradientes nutricionais (ETIENNE et al., 1997).

Experimentos realizados por HARRIS & MASON (1983), com raízes de cenoura imersas em meio líquido não apresentavam crescimento satisfatório e os autores concluíram que o motivo estava relacionado com a deficiência de oxigenação do

meio de cultura. Visando a contornar esse problema, construíram um sistema de imersão temporária automatizado denominado “Auxophyton”, que movimentava os frascos de cultura de forma rotacional, de tal modo que, em determinado momento, os segmentos de raiz eram expostos ao ar e, no momento seguinte, submersos no meio líquido, conseguindo com isso, um aumento de matéria fresca de 38,1 mg/L em meio de cultura gelificado para 98,6 mg/L em de meio de cultura líquido, neste sistema.

Existem algumas desvantagens no uso permanente de meio de cultura líquido, mesmo estando sob agitação, nas culturas *in vitro* tais como a asfixia, que pode levar à necrose do tecido e o estresse hídrico por enxarcamento do explante, podendo causar sérios distúrbios fisiológicos, afetando, assim, o crescimento e desenvolvimento do material em cultivo. Por isso, vários trabalhos foram desenvolvidos com base no sistema de imersão temporária dos explantes no meio de cultura, no sentido de reduzir as desvantagens do cultivo em meio de cultura líquido (TEISSON, 1997).

Para um grande número de espécies, o meio de cultura líquido em sistema de imersão temporária tem se mostrado mais vantajoso em termos de produtividade e crescimento das brotações do que o meio de cultura semi-sólido (SKIDMORE et al., 1988).

ALVARD et al. (1993) desenvolveram um sistema de cultivo em meio de cultura líquido denominado de imersão temporária (R.I.T.A. - Recipiente de Imersão Temporária Automatizado). Este sistema é constituído de três frascos com dois compartimentos, um superior e um inferior, conectados entre si por mangueiras de silicone. O meio de cultura é colocado no compartimento inferior e o material a ser cultivado, no superior. O meio de cultura passa do compartimento inferior para o superior através da injeção de ar no compartimento inferior. Quando o meio de cultura passa para o compartimento superior, ocorre borbulhamento e aeração do meio em

contato com o material em cultivo. O ar é expelido através de um orifício na tampa do compartimento superior. Após um período pré-estabelecido, a pressão do ar no compartimento inferior é aliviada, o que, por gravidade, faz com que o meio de cultura retorne ao compartimento inferior, permanecendo aí até que o ciclo recomece.

O Laboratório Biotrop, situado em Montpellier (TEISSON, 1997), aproveitou a idéia de ALVARD et al. (1993), e desenvolveu comercialmente um frasco plástico apropriado para cultura em sistema de imersão temporária (R.I.T.A), que atualmente, tem sido utilizado por biofábricas na produção de vários cultivares como banana, citros, café, abacaxi e cana-de-açúcar, micropropagados com sucesso tanto por organogênese como por embriogênese.

Durante estudos de desenvolvimento de protocolo de micropropagação para Ipeca (*Psychotria ipecacuanha*), BATISTINI et al. (2002), observaram que o sistema de imersão temporária permitiu a obtenção de melhor índice de brotação e maior altura do explante quando comparados com sistemas de cultivo em meio de cultura semi-sólido.

#### **4.6. Banco de Germoplasma**

O Brasil é considerado um dos países detentores de megabiodiversidade. Porém o ritmo atual de extinção de plantas está entre 50 e 100 vezes maior que o observado há algumas décadas. Mantido o ritmo atual, até o ano 2015, pode-se perder até 8% de todas as espécies vivas presentes nas florestas tropicais (NODARI & GUERRA, 2000).

Estudos de ecologia relacionados com a área de distribuição geográfica e com o *habitat* preferencial são necessários para preservar espécies raras ou ameaçadas de extinção. Além disso, a conservação genética de uma população requer estudos sobre a

variação genética das espécies e suas propriedades adaptativas em relação ao ambiente em que estão inseridas (BARNES et al., 1998).

No estudo da genética evolutiva, o conhecimento da estrutura genética das populações oferece evidências da atuação dos diversos fatores ambientais sobre a dinâmica das populações, dando subsídios para compreensão dos fenômenos que contribuíram e contribuem para a evolução das espécies (JAIN, 1979). A variabilidade genética dentro da espécie é que possibilita a adaptação às mudanças ambientais.

As populações contêm variabilidade genética que surgem através de mutação ao acaso e recombinação e evoluem por mudanças nas frequências gênicas ocasionadas pela deriva genética aleatória, pelo fluxo gênico e especialmente pela seleção natural. A evolução dos seres vivos compreende a variação individual dentro de uma população, a distribuição e frequência dos indivíduos variantes nas diferentes populações dentro da espécie e a divergência ou especiação progressiva das populações como consequência do somatório de mecanismos de isolamento (FUTUYAMA, 1992).

A preservação da variabilidade genética das plantas é uma necessidade e um grande desafio para a pesquisa, considerando a complexidade e o grande potencial das plantas para seu uso na alimentação, medicina, ornamentação entre outras utilidades, muitas das quais subestimadas.

As ações antrópicas, como a fragmentação dos ecossistemas, os estresses ambientais pela poluição e as mudanças climáticas, são apontadas, de maneira global, como as principais causas da perda da diversidade genética (KAGEYAMA & GANDARA, 1998). Além destes fatores, a exploração dos recursos naturais de forma excessiva e não planejada por meio da expansão agrícola, das queimadas, exploração madeireira, construção de estradas e hidroelétricas, além do extrativismo, têm levado à perda de recursos vegetais (VIEIRA, 2002).

Uma das formas de conter o acelerado ritmo de extinção de espécies vegetais potencialmente úteis ou de interesse econômico imediato é a conservação em bancos de germoplasma. Atualmente, a maioria das espécies endêmicas do Brasil, seja para fins medicinais, aromáticas ou alimentícias ainda necessita de estudos básicos (taxonomia, genética, fisiologia e biologia reprodutiva) e não se encontra inserida em bancos de germoplasma, predominando a existência de algumas coleções com grande número de espécies e baixa representatividade da variabilidade intraespecífica.

A conservação de germoplasma, além de preservar a espécie, permite o acesso ao material genético para a caracterização, a domesticação, o desenvolvimento de novas variedades e a prospecção de genes, revertendo em benefícios para toda sociedade.

Esta conservação pode ser *in situ*, *on farm* e *ex situ*. Na conservação *in situ*, os indivíduos são conservados em seus centros de origem, áreas geralmente tombadas como reservas, o que nem sempre garante a salvaguarda da variabilidade genética, pois existe sempre a possibilidade de extração e coleta destes indivíduos. Na conservação *on farm*, são plantados indivíduos de uma espécie de interesse, sem necessariamente garantir a variabilidade genética dos indivíduos. Este tipo de conservação é oneroso, pois nas grandes áreas que são utilizadas incidem altas taxas e impostos, além da necessidade de compra de material como adubos e pesticidas em grande quantidade. Já na conservação *ex situ*, uma amostra da variabilidade de determinada espécie é conservada em condições artificiais, fora do *habitat* natural da espécie. Convencionalmente, o germoplasma é mantido na forma de sementes ou propágulos vegetativos. Estes últimos podem ser conservados *in vitro*, em nitrogênio líquido, em câmaras frias ou salas de crescimento com baixas temperaturas (SANTOS, 2001).

Coleções *in vitro*, em geral, são conservadas em bancos de germoplasma sob condições especiais protegidas de eventuais perdas, garantindo a sua utilização a curto,

médio e longo prazo. Materiais introduzidos nesses bancos têm sido coletados nos centros de origem das culturas ou nas regiões onde se desenvolvem raças locais (TOWILL, 2000).

O crescimento *in vitro*, durante o período de conservação, pode ser limitado por vários fatores físicos e químicos, tais como a redução da temperatura e/ou intensidade luminosa, a diluição dos elementos nutritivos no meio de cultura e pelo uso de agentes químicos e osmóticos, capazes de inibir o crescimento do material em cultivo (VILLALOBOS & ENGELMAN, 1995).

Na conservação *in vitro*, os acessos são mantidos a temperatura entre 12 a 20°C, de tal maneira a reduzir o crescimento e o número de subcultivos por ano (WITHERS & WILLIAMS, 1998). Para a redução do metabolismo das plantas, têm-se utilizado como estratégia as modificações das condições físicas com a temperatura ou químicas como o meio de cultura incluindo nutrientes orgânicos e inorgânicos, reguladores osmóticos ou inibidores de crescimento (ROCA et al., 1991).

Segundo VILLALOBOS & ENGELMAN (1995), a conservação *in vitro* de germoplasma de banana e batata entre outros, a médio prazo, tem sido realizada com sucesso. Esses autores sugerem que procedimentos de criopreservação devam ser indicados quando o objetivo é o armazenamento a longo prazo. Ainda, segundo os mesmos autores, desde 1960 houve um crescimento significativo do número de coleções *in vitro* para preservação de plantas e subsequente melhoramento genético. De acordo com a FAO (Food and Agriculture Organization), no ano de 1994 havia 4.410.000 acessos conservados *in vitro*, sendo 50% do total conservado por países industrializados, 38% por países em desenvolvimento e 12% por grupos independentes (ANAON, 1994).

Antes do início dos procedimentos de rotina para a conservação de germoplasma a médio prazo, várias questões precisam ser analisadas. Os acessos devem ser avaliados quanto à variabilidade genética, pois o procedimento de conservação *in vitro* é oneroso, tornando impraticável manter amostras geneticamente similares ou muito próximas, além disso, é de grande importância um conhecimento mínimo da biologia, da fisiologia e do ambiente de origem da espécie, o que, de modo geral, pode auxiliar na determinação de condições adequadas da conservação *in vitro* a médio prazo (LATA, 1991), evitando, assim, a perda de diversidade genética.

Na conservação a curto e médio prazos, o material armazenado é subcultivado em intervalos regulares de no mínimo seis meses. Frequentemente, os períodos entre as subculturas devem ser os mais longos possíveis para diminuir a manipulação das plântulas e reduzir o risco de contaminação. É necessário mencionar que esta técnica é passível de erros técnicos e mudanças no genótipo devido à instabilidade genética apresentada por eventuais acessos. O objetivo do armazenamento do germoplasma a curto e médio prazos é definir condições experimentais para favorecer um crescimento mínimo sem alteração da estabilidade genética. (VILLALOBOS & ENGELMAN, 1995).

Plantas mantidas em banco de germoplasma têm baixa taxa de divisão celular, o que tende a diminuir a frequência de mutações que ocorrem durante a duplicação do DNA na fase mitótica do ciclo celular (HENSHAW, 1982). Contudo, o risco de tais mutações não pode ser totalmente excluído e as condições limitantes de crescimento podem introduzir um novo perigo: o inevitável estresse fisiológico. É importante que os procedimentos aplicados para minimizar o crescimento também sejam capazes de manter o máximo da viabilidade da cultura (ROCA, 1983).

Nos últimos anos, as técnicas de cultura *in vitro* para conservação a médio prazo em banco de germoplasma foram amplamente desenvolvidas e aplicadas em mais de 1.000 espécies, das quais muitas são tropicais, tais como palmeira, côco, cacau e café (LATA, 1991).

Segundo BERTRAND-DESBRUNAIS & CHARRIER (1989), explantes de *Coffea arabica* sobreviveram por mais de 1 ano em bancos com temperatura de 27°C, porém explantes de *Coffea racemosa* tiveram que ser transferidos para meios de cultura fresco após 6 meses. Culturas de Taro (*Colocasia esculenta*, Araceae) toleraram 3 anos de armazenamento a 9°C (ZANDIVORT & STARISTSKY, 1986), plântulas de mandioca foram armazenadas em temperatura maiores que 20°C por cerca de 1 ano (ROCA et al., 1989).

O Departamento de Genética da ESALQ/USP dispõe de uma coleção *in vitro* de *Passiflora*, na qual há cerca de 20 espécies silvestres, que servem como fonte de acessos comercial, além do maracujá azedo (VIEIRA, 2002).

Além da conservação a curto e médio prazo existe a conservação a longo prazo que está baseada na redução e controle das funções bioquímicas dos explantes, incluindo a divisão celular. Isto acontece quando o material é colocado em temperaturas ultrabaixas, usualmente com o auxílio de nitrogênio líquido (-196° C). Quando congelado, o germoplasma pode ser armazenado e mantido por tempo indefinido, sua estabilidade genética é garantida e essa técnica é conhecida como criopreservação (ASHWOOD-SMITH & FRIEDMANN, 1979).

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os experimentos “in vitro” foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus - AM.

### 5.1. COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA

Os meios MS, B5 e WP são constituídos pelos sais e concentrações mencionados na tabela a seguir:

Tabela 1: Composição dos meios basais MS de Murashige & Skoog (1962), B5 de Gamborg et al. (1968) e WP de Lloyd & McCown (1980).

Concentração dos Componentes para 1 Litro de Meio de Cultura			
Componentes	Meio MS	Meio B5	Meio WP
Macronutrientes (mg/L)			
Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	-	-	556
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1,650	-	400
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	134	-
KNO <sub>3</sub>	1,900	2,500	2,500
CaCl <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	440	150	96
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370	250	300
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	-	170
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	-	150	-
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	-	-	990
Micronutrientes (mg/L)			
MaSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	22,3	-	-
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	-	10	22,3
ZnSO <sub>4</sub> .7.H <sub>2</sub> O	8,6	2,0	8,6
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	3,0	6,2
KI	0,83	0,75	0,83
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,25	0,25	-
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025	0,025	0,025
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025	0,025	-
FeEDTA (mg/L)			
Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	37,3	-	37,7
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27,8	-	27,8
Vitaminas e Aminoácidos (mg/L)			
Ácido nicotínico	0,5	1,0	0,5
Piridoxina.HCl	0,5	1,0	0,5
Tiamina.HCl	0,1	1,0	1,0
Glicina	2,0	-	2,0
Mio-inositol (mg/L)			
Mio-inositol	100	100	100

Os meios de cultura MS, B5 e WP (Woody Plant) foram suplementados com reguladores de crescimento vegetal especificados em cada experimento, acrescido de 30,0 g/L de sacarose e o pH foi acertado para 6,0. Os meios de cultura semi-sólidos foram solidificados com 10,0 g/L de Agar-agar. Com exceção dos experimentos com meio de cultura líquido, onde foram utilizados béqueres de 1 L e frascos do tipo R.I.T.A, a grande maioria dos experimentos foi realizada em tubos de ensaio com 11,5cm de altura, 2,5 cm de diâmetro, com 10,0mL de meio de cultura, vedados com tampa plástica ou, então, foram utilizados frascos de vidro com 8,5 cm de altura 5,5 cm de diâmetro com 30,0mL de meio de cultura.

## **5.2. CONDIÇÕES DA SALA DE CRESCIMENTO**

Temperatura de  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ,  $60 \pm 5\%$  de umidade relativa e 16 horas de fotoperíodo com intensidade luminosa de  $2.0 \times 10^7 \mu\text{E} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-2}$ , provenientes de duas lâmpadas fluorescentes brancas frias (GE.85W).

## **5.3. CONDIÇÕES DA ESTUFA DE BANCO DE GERMOPLASMA**

Temperatura de aproximadamente  $18 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , umidade relativa de aproximadamente  $60 \pm 5\%$  e com fotoperíodo de 16 horas sob aproximadamente  $2.0 \times 10^7 \mu\text{E} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-2}$ , provenientes de duas lâmpadas fluorescentes brancas frias (GE.85W).

## **5.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

O delineamento experimental adotado em todos os experimentos citados acima foi o inteiramente casualizado e para a comparação das médias dos tratamentos utilizou-se o teste de Tukey ao nível de 5%.

Em todos os experimentos serão utilizados três repetições com dez explantes cada deste trabalho foram utilizados 30 explantes por tratamento, divididos em três blocos casualizados de 10 explantes.

## **5.5. MATERIAL VEGETAL**

O material vegetal utilizado para a pesquisa foi obtido na Feira Municipal do Japiim I, Manaus (AM). A exsicata dessa espécie foi depositada no herbário da Universidade Federal do Amazonas.

## 5.6. METODOLOGIA

EXPERIMENTO 01: Determinação do Sistema Reprodutivo de *Acmella oleracea*.

O sistema reprodutivo da *A. oleracea* foi determinado pela relação pólen/óvulo (P/O), segundo metodologia desenvolvida por CRUDEN (1977). Para essa determinação foram coletados botões florais em estágio próximo à antese, com grãos de pólen completamente formados. Foram utilizados 30 botões.

Os botões foram coletados no mês de junho de 2006 e permaneceram em etanol 70%, em refrigerador, até a análise. Foi utilizado microscópio estereoscópico para a determinação do número de óvulos e, a seguir, foi retirada uma antera e esta foi esmagada sobre lâmina de microscopia, sendo adicionado o corante Tetrazolium e água para finalizar a montagem da lâmina. Todos os grãos de pólen de cada antera foram contados com auxílio de microscópio Marca Nikon, utilizando aumento 100x. A relação P/O foi estabelecida utilizando-se a expressão:

$$P/O = \frac{(\text{número de grãos de pólen em uma antera}) \times (\text{número de anteras por flor})}{(\text{número total de óvulos})}$$

EXPERIMENTO 2: Assepsia de sementes de *Acmella oleracea*.

Sementes coletadas de plantas matrizes mantidas na casa de vegetação da Universidade Federal do Amazonas, Manaus AM, foram utilizadas como fontes de explantes para este experimento.

O processo de assepsia foi iniciado com a imersão das sementes em solução de Benomil 1% (m/v) por 1 hora sob agitação constante a 100 rpm. Em seguida, as sementes foram imersas em álcool 70% durante 1 minuto e depois mergulhadas em solução de hipoclorito de cálcio 0,5% (m/v) por 30 minutos, também sob agitação. Posteriormente ao processo de assepsia, as sementes foram lavadas com água destilada estéril e então, inoculadas em tubos de ensaio contendo meio de cultura MS basal.

As sementes foram mantidas em sala de crescimento e 10 dias após a inoculação foram avaliadas quanto à presença e/ou ausência de microrganismos e a taxa de germinação foi avaliada com 60 dias.

#### EXPERIMENTO 03: Assepsia de segmentos nodais de *Acmella oleracea*.

Neste experimento foram utilizadas plantas adultas de *Acmella oleracea* compradas na Feira Municipal do Japiim I, Manaus (AM). Essas matrizes foram transferidas para sacos plásticos com capacidade de 2L contendo terra. Essas plantas permaneceram na casa de vegetação do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da UFAM.

##### Assepsia 1:

Explantos do tipo gema axilar com aproximadamente 1,0 cm de altura foram separados das plantas, lavados com detergente neutro ODD<sup>®</sup> e enxaguados em água corrente. Posteriormente foram imersos em solução de Benomil 1% (m/v) e mantidos sob agitação orbital constante a 100 rpm por 1 hora. Em seguida foram mergulhados em solução de álcool 70% por 1 minuto e imersos, respectivamente, em solução de hipoclorito de cálcio 0,10%, 0,25% e 0,50% (m/v) sob agitação por 30 minutos. Após esse procedimento, os explantes foram inoculados em tubos de ensaio contendo meio de cultura MS basal, acrescido de 30,0g/L de sacarose.

##### Assepsia 2:

Durante 1 semana, as plantas foram borrifadas em dias alternados com solução de Benomil 1% (m/v) e com solução de Hipoclorito de Cálcio 0,5% (m/v). Após esse período, as gemas foram separadas da planta, individualizadas e submetidas às mesmas etapas da assepsia descrita acima.

Assepsia 3:

Durante 1 semana, as plantas foram borrifadas em dias alternados com solução de Benomil 1% (m/v) e com solução contendo 10,0 mg/L de cada um dos seguintes antibióticos: amoxicilina, cloranfenicol e ampicilina. Após esse período, as gemas foram desinfestadas conforme descrito para a assepsia 1.

Ao término de cada etapa de desinfestação, tanto para as assepsias 1, 2 e 3, os explantes foram lavados três vezes com água destilada estéril e inoculados em meio de cultura MS basal, acrescido de 30,0g/L de sacarose e mantidos em condições de sala de crescimento. A contaminação dos explantes foi avaliada durante 30 dias, sendo que os dados foram coletados a cada 3 dias.

Para os experimentos de assepsia 1, 2 e 3, foram coletados vários explantes por planta.

EXPERIMENTO 04: Efeito de diferentes concentrações e tipos de citocininas no número médio e na altura média das brotações de segmento nodal de *Acmella oleracea*.

Segmentos nodais retirados de plântulas de *A. oleracea* axênicas crescidas *in vitro* foram inoculados em meio de cultura MS suplementado com BAP, KIN e TDZ nas concentrações de 0,0; 0,1; 1,0; 3,0 e 5,0 mg/L. Após 30 dias de crescimento nesses meios de cultura, os explantes foram avaliados quanto ao número médio e a altura média de brotações.

EXPERIMENTO 05: Posição da gema na haste quanto ao número médio e altura média das brotações de *Acmella oleracea*.

Plântulas de *A. oleracea* obtidas a partir explantes desenvolvidos “*in vitro*” em meio de cultura MS foram utilizadas neste experimento.

Gemas localizadas em diferentes posições no caule foram seccionadas e inoculadas em meio de cultura MS suplementado com 0,1mg/L de KIN, como mostra a figura 5:

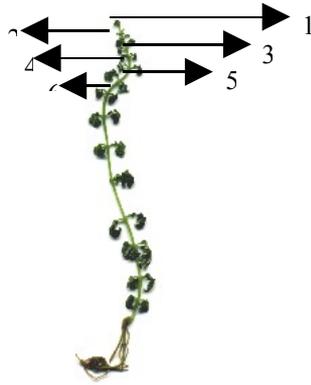


Figura 5: Plântulas de *Acmeilla oleracea* e a localização das gemas.

Fonte: Milena G. Malosso

Os explantes foram mantidos nesse meio de cultura por 30 dias e então avaliados quanto ao número médio e a altura média das brotações.

EXPERIMENTO 06: Diluição dos meios basais no número médio e na altura média das brotações de *Acmeilla oleracea*.

Explantes obtidos a partir de plântulas crescidas *in vitro* em meio de cultura MS foram inoculados em meio de cultura WP, MS e B5 nas concentrações originais, bem como em suas concentrações diluídas pela metade e pela quarta parte, todos suplementados com 0,1 mg/L de KIN. Após 30 dias, os explantes foram avaliados quanto ao número médio e altura média de brotações.

EXPERIMENTO 07: Aclimação

Plântulas enraizadas com parte aérea de aproximadamente 12,0 cm de altura foram plantadas em caixilhos contendo três tipos diferentes de substrato: Plantmax<sup>®</sup>, terra e areia. Estas plântulas foram mantidas cobertas por um frasco de vidro transparente durante 30 dias, na casa de vegetação do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), quando, então, os vidros foram retirados.

Após 45, 60 e 75 dias do plantio, as plântulas foram avaliadas quanto a sua sobrevivência ou não em ambiente *ex vitro*.

Neste experimento, foram utilizadas 10 plantas por substrato, divididas em 3 blocos casualizados que continham 10 plantas cada um.

#### EXPERIMENTO 08: Sistema de Imersão Temporária.

Segmentos nodais coletados de plântulas cultivadas *in vitro* por dois anos, mantidas em sala de crescimento, foram inoculados em meio de cultura MS suplementados com 0,1 mg/L de KIN.

Frascos plásticos do tipo R.I.T.A., apropriados para cultura em sistema de imersão temporária, com capacidade de 500 mL, foram utilizados neste experimento.

Três frascos do tipo R.I.T.A. contendo 300 mL de meio de cultura e 50 explantes por frasco foram ligados entre si com vidros em forma de Y através de mangueiras de silicone que, por sua vez, foram conectadas a uma bomba de vácuo.

O aparelho digital reverso acionava a bomba de vácuo de modo que, de 8 em 8 horas, o meio de cultura líquido era impulsionado para a parte superior do frasco, onde se localizavam os explantes, que ficaram totalmente submersos durante um período de 5 minutos (Figura 6).

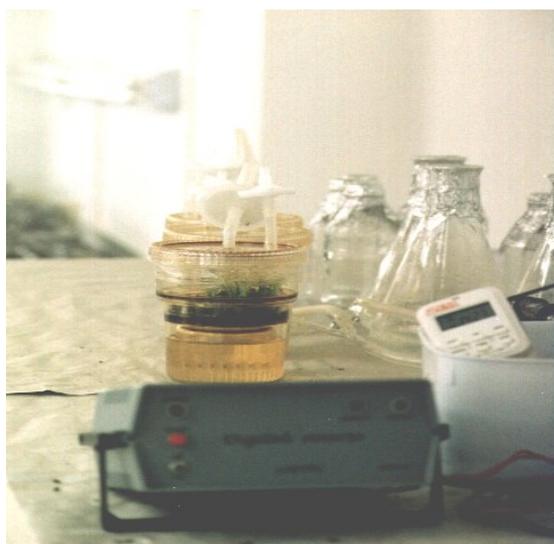


Figura 6: Sistema de Imersão Temporária Automatizado (R.I.T.A.) utilizado para subcultivar explantes de *Acmeia oleracea*.

Fonte: Milena G. Malosso.

EXPERIMENTO 09: Cultivo em meio de cultura semi-sólido em dois tipos de frascos.

Para este experimento, o meio de cultura MS suplementado com 0,1mg/L de KIN foi adicionado em potes de vidro com 8,5 cm de altura por 5,5 cm de diâmetro contendo 6 explantes e tubos de ensaio de vidro com 11,5 cm de altura e 2,5 cm de diâmetro contendo 1 explante. Foram utilizados 150 frascos por tratamento.

EXPERIMENTO 10: Cultivo em meio líquido.

Foram utilizados três frascos do tipo Erlenmeyers de 1.000 mL, contendo 300 mL de meio de cultura WP suplementado com 0,1mg/L de KIN, onde foram inoculados 50 explantes por frasco. Os explantes foram mantidos sob agitação orbital constante a 100rpm.

Os experimentos 8, 9 e 10 foram conduzidos por um período de 90 dias e então avaliados quanto ao número médio e altura média do broto, taxa de sobrevivência e presença ou ausência de calos e de raízes.

EXPERIMENTO 11: Estabelecimento de banco de germoplasma *in vitro* de *Acmella oleracea*.

Plântulas de 1cm de altura, mantidas em sala de crescimento, foram utilizadas como fonte de explantes par este experimento. Os frascos utilizados foram tubos de ensaio e os meios de cultura estão descritos a seguir:

- MS + 2% sacarose;
- MS/2 + 2% sacarose;
- MS/4 + 2% sacarose;
- MS + 2% sacarose + 4% sorbitol;
- MS/2 + 2% sacarose + 4% sorbitol;
- MS + 2% sacarose + 4% sorbitol + 2,0 mg/L Pantotenato de calcio;

- MS/2 + 2% sacarose + 4% sorbitol + 2,0 mg/L Pantotenato de cálcio;
- MS + 2% sacarose + 3% manitol + 2,0 mg/L Pantotenato de cálcio;
- MS/2 + 2% sacarose + 3% manitol + 2,0 mg/L Pantotenato de cálcio;

Esse experimento foi conduzido em estufa com ambiente de banco de germoplasma e as plântulas foram mantidas no mesmo meio de cultura por seis meses.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### **EXPERIMENTO 01: Determinação do Sistema reprodutivo de *Acmella oleracea*.**

Nas determinações do número de grão de pólen foram observados em média  $34,56 \pm 4,0$  óvulos e  $10.567 \pm 2.353$  polens por flor. A determinação da relação número de pólen/número de óvulo (P/O) foi de  $305 \pm 41$  e o log de P/O foi de  $2,48 \pm 0,06$ , portanto, essa espécie se enquadra na faixa que compreende espécies com autogamia facultativa (P/O  $168,5 \pm 22,1$  a  $796,6 \pm 87,4$  e o log P/O  $2,15 \pm 0,06$  a  $2,84 \pm 0,5$ ), de acordo com os resultados de CRUDEN (1977).

O conhecimento do sistema reprodutivo de uma espécie é de crucial importância para a determinação do tipo de explante a ser utilizado no processo de micropropagação.

### **EXPERIMENTOS 02 e 03: Assepsia de sementes e segmentos nodais de *Acmella oleracea*.**

Para se estabelecer um protocolo de cultivo *in vitro* de uma espécie, a fase de assepsia que antecede os experimentos de multiplicação é de fundamental importância,

pois é nessa fase que se elimina todo e qualquer tipo de patógeno que possa vir a comprometer a qualidade fitossanitária das plântulas produzidas *in vitro* (HARTMANN et al., 1997).

O experimento de assepsia realizado com semente de *Acmella oleracea* foi ineficiente obtendo-se 100% de sementes mortas, demonstrando que este tipo de explantes é muito sensível aos processos de assepsia e, por isso não devem ser utilizados como fonte de explantes para a técnica de micropropagação .

Embora, nos experimentos de assepsia de segmentos nodais de *A. oleracea*, tenha-se obtido uma boa taxa de desinfestação (8% de fungos e 11% de bactérias) com o tratamento com 0,50% (m/v) de hipoclorito de cálcio, 100% destes explantes morreram (Tabela 2). Este fato pode ser explicado pela relação entre o tamanho do explante e a ação do agente desinfestante, uma vez que os tecidos pequenos são muito susceptíveis à degeneração dos tecidos causados pelo hipoclorito de cálcio (TORRES et al.,1998). Com este experimento, também verificou-se que houve 100% de contaminação por bactérias no tratamento com 0,10% (m/v) de hipoclorito de cálcio, indicando que concentrações muito baixas desta substância não são eficazes para a desinfestação destes explantes.

O tratamento com 0,25% (m/v) de hipoclorito de cálcio proporcionou 32% de explantes axênicos e vivos (Tabela 2). Mesmo esta taxa de desinfestação parecendo baixa quando comparada com outras plantas medicinais amazônicas já micropropagadas, esta espécie possui uma taxa de multiplicação alta e rápida, de modo que, após um mês de inoculação *in vitro*, uma única plântula é capaz de dar origem a 12 novos seguimentos nodais em média, o que torna possível a proposta de desenvolver um protocolo de micropropagação *in vitro* para este vegetal.

O tratamento de plântulas matrizes em casa de vegetação se mostrou ineficaz tanto com a utilização de hipoclorito de cálcio, como com a de antibióticos, já que, após o término dos 7 dias de tratamento, todas as plantas morreram por desidratação intensa e queimaduras químicas.

As contaminações que ocorrem freqüentemente em culturas de tecidos vegetais podem ter várias origens: a ineficiência da técnica, o descuido do manipulador, microorganismos exógenos resistentes aos agentes químicos utilizados no processo de descontaminação e a presença de microorganismos endofíticos. Microorganismos endofíticos são principalmente fungos e bactérias que vivem no interior das plantas, habitando partes aéreas ou radiculares sem causar dano aparente a seus hospedeiros, assim, se diferenciam dos microorganismos fitopatogênicos que causam doenças às plantas (AZEVEDO, 1998).

Em alguns casos, a interação entre a planta e o microorganismo endofítico é tão intensa, que o estabelecimento da micropropagação sem a contaminação é impossível. Nesses casos, torna-se importante fazer um estudo risco/benefício para optar pelo desenvolvimento *in vitro* ou não. GRATTAPAGLIA & MACHADO (1998), relataram que quando um microorganismo é identificado e não é patogênico, a micropropagação não axênica pode ser conduzida, e citam exemplo de micropropagação de *Actinidia chinensis* (Kiwi), que foi estabelecida apesar da presença de *Aerococcus sp* e *Bacillus fastidiosus*, considerada contaminação endógena. No entanto, os autores advertem que essa prática pode disseminar microorganismos para culturas susceptíveis.

É importante ressaltar que, os dados deste experimento foram obtidos com plantas compradas nos meses de estiagem e não foi possível repetir estes resultados com plantas coletadas na época de chuva, provavelmente devido ao grande acúmulo de microorganismos nas superfícies foliares carregados pelas águas das chuvas.

Tabela 2: Desinfestação de Segmentos Nodais de *Acmella oleracea*. Manaus – AM, 2006.

TRATAMENT O	EXPLANTE S MORTOS (%)	EXPLANTE S VIVOS (%)	CONTAMINAÇÃ O POR FUNGOS (%)	CONTAMINAÇÃ O POR BACTÉRIAS (%)
0,10% Hip Ca	82	12	18	100
0,25% Hip Ca	68	32	13	55
0,50% Hip Ca	100	0	8	11

**EXPERIMENTO 03: Efeito de diferentes concentrações e tipos de citocininas no número médio e na altura média das brotações de segmento nodal de *Acmella oleracea*.**

O quadro de análise de variância para diferentes tipos e concentrações de citocininas no desenvolvimento *in vitro* de explantes de *Acmella oleracea* (Tabela 3) mostra que houve diferença estatística significativa ao nível de 5% tanto para o fator citocinina como para o fator concentração em todas as características analisadas.

Através dos experimentos realizados com diferentes concentrações das citocinina TDZ, BAP e KIN (Tabela 4), fica indicado, para a multiplicação *in vitro* de *Acmella oleracea*, o tratamento com 0,1 mg/L de KIN, uma vez que este proporcionou a maior taxa de explantes com brotações (100%), bem como o maior número de gemas por haste (4,70) e maior altura do broto (1,65cm), além de não ter induzidos calos, quando comparado com os demais tratamentos.

A presença de calos é uma característica indesejada durante a fase de multiplicação *in vitro* de uma espécie, porque estes podem impedir a conexão das raízes à base caulinar da plântula (DAVIS, 1988), prejudicando o processo de aclimação, ou até mesmo impossibilitando-o, uma vez que, geralmente, plântulas sem raízes não

sobrevivem em substratos por não possuírem o órgão que as tornam capazes de absorver água e nutrientes, o que, conseqüentemente, as levaria a óbito.

Embora o tratamento aqui indicado mostre uma menor porcentagem de enraizamento de explantes (93,33%), quando comparado com os do meio MS (100%) e MS acrescido de 1,0mg/L de KIN (100%), esta característica analisada não apresenta diferença estatística significativa (Tabelas 4) entre estes tratamentos.

O TDZ, também conhecido como Thidiazuron, tem sido indicado como um dos compostos mais ativos biologicamente na regulação do crescimento de plantas cultivadas *in vitro*. De acordo com LU (1993), este composto é mais ativo que as citocininas BAP e ZEA para a maioria das espécies vegetais cultivadas *in vitro*. No entanto, com relação à *A. oleracea*, o TDZ, juntamente com o BAP, mostraram-se menos efetivos na taxa de multiplicação desta espécie (Tabela 4).

Assim como nos resultados obtidos com *A. oleracea*, SALGADO et al. (2001), ao estudar Crisântemo (*Dendranthema morifolium*) e SOUZA et al. (2004), em seus estudos com abacaxi (*Ananas comosus*), observaram que tais plantas também não responderam eficazmente aos tratamentos com TDZ. Porém, segundo ALVES et al. (2004), este regulador de crescimento vegetal induziu grandes porcentagens de brotos em Eucalipto (*Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*).

LAMEIRA et al. (1994) e ANDRADE et al. (2000), verificaram que baixas concentrações de BAP promoveram maior número de brotos, respectivamente, em Ipeca (*Cephaelis ipecacuanha*) e Aroeira (*Myracrodrum urundeuva*). Contudo, segundo GUERRA et al. (1999), altas concentrações de BAP propiciaram melhores resultados na multiplicação de brotos de abacaxizeiro. Já SABÀ et al. (2002), notaram que baixas concentrações de cinetina foram mais efetivas para o brotamento *in vitro* de jaborandi (*Polycarpus microphyllus*). Nos trabalhos de micropropagação realizados com figo

(*Ficus carica*), a efetividade de altas concentrações de cinetina foi constatada na brotação de explantes *in vitro* (FRÁGUAS et al., 2004).

É interessante ressaltar que os reguladores de crescimento vegetal e suas concentrações adequadas para proporcionar a maior quantidade de brotos variam de acordo com o genótipo da planta considerada e devem ser determinados para cada espécie.

Segundo SERAFINI et al. (2001), os tratamentos acrescidos de pequenas concentrações de citocininas, além de menos onerosos, apresentam ainda menor probabilidade de indução de variação somaclonal, que é uma característica imprópria para um protocolo de micropropagação, processo este que produz clones elite de uma determinada espécie e, alterações genéticas nestes indivíduos podem levar à perda justamente da característica desejada.

Tabela 3: Quadro de análise de variância para diferentes tipos e concentrações de citocininas no desenvolvimento *in vitro* de explantes de *Acmella oleracea*. Manaus – AM, 2006.

Causas da Variação	G. L.	Q. M.					
		Porcentagem de explantes com brotação	Número de brotos por gema	Número de gemas por haste	Altura do broto (cm)	Presença de calos (%)	Presença de raiz (%)
Citocinina	2	2202,22**	41,02**	48,09**	11,78**	2906,67**	130,59**
Concentração	4	761,11**	6,06**	6,63**	1,62**	9606,78**	213,19**
Cit. X Conc.	8	424,44**	6,37**	5,78**	1,42**	4492,78**	33,47**
Resíduo	30	120,00	0,05	0,25	0,24	117,78	64,44
Média Geral		88,89	1,51	3,31	3,32	53,33	37,78
C. V.		12,32%	15,22%	14,92%	14,92%	19,61%	21,25%

<sup>ns</sup>, \* e \*\* não significativo e significativo a 1% e 5%, respectivamente.

Tabela 4: Efeito de diferentes tipos e concentrações de citocininas no desenvolvimento *in vitro* de explantes de *Acmella oleracea*. Manaus – AM, 2006.

Reguladores de Crescimento Vegetal	Explantes com Brotação (%)	Número de Brotos por Gema(*)	Número de Gemas por Haste(**)	Taxa de Multiplicação (*) x (**)	Altura do Broto (cm)	Presença de Calos (%)	Presença de Raiz (%)
<b>BAP (mg/L)</b>							
0	100,00 a	1,20 c	4,03 a	4,80	2,12 a	-	100,00 a
0,1	100,00 a	2,33 a	3,87 a	5,15	1,35 b	100,00 a	43,33 b
1,0	63,00 b	1,63 b	3,13 a	5,10	0,66 c	20,00 b	-
3,0	100,00 a	1,97 ab	3,77 a	7,39	0,96 c	100,00 a	-
5,0	100,00 a	1,67 b	3,20 a	5,34	0,85 c	6,67 bc	-
<b>TDZ (mg/L)</b>							
0,1	66,33 a	0,77 a	1,37 a	1,05	0,48 a	83,33 a	-
1,0	63,33 a	1,13 a	2,27 a	2,57	0,54 a	93,33 a	-
3,0	66,67 a	1,17 a	1,70 a	1,99	0,36 a	86,67 a	-
5,0	83,33 a	1,10 a	2,27 a	2,50	0,35 a	93,33 a	-
<b>KIN (mg/L)</b>							
0,1	100,00 a	1,47 a	4,70 a	6,09	1,65 a	-	93,33 a
1,0	100,00 a	1,97 a	4,33 ab	8,53	1,33 ab	100,00 a	100,00 a
3,0	93,33 a	2,00 a	4,63 b	9,26	0,88 bc	70,00 b	20,00 b
5,0	100,00 a	1,87 a	3,47 b	8,66	0,75 c	73,33 b	10,00 b

Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente, entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

(\*) x (\*\*): Taxa de multiplicação obtida pelo do número de brotos por gema multiplicado pelo número gema por haste (Oliveira & Silva, 1997).

#### **EXPERIMENTO 05: Efeito da posição da gema no desenvolvimento *in vitro* de**

*Acmella oleracea*.

O quadro de análise de variância para gemas coletadas em diferentes posições na haste (Tabela 5) mostra que houve diferença estatística significativa ao nível de 5% para o fator posição do explante para as características porcentagem de explantes com brotação e presença de raiz.

Diferentes posições da gema na haste foram avaliadas quanto à capacidade de regenerar novas brotações e verificou-se que as gemas de posição intermediária (3) induziram uma maior porcentagem de explantes com brotação (86,67) e maior taxa de enraizamento (100%), quando comparada com as demais gemas, embora não haja diferença estatística entre explantes da posição 2 e 3 (Tabela 6). Esse dado é importante porque nem todas as gemas da haste são potencialmente úteis, e não devem ser usadas indistintamente no processo de repicagem, pois não fornecerão explantes uniformes quanto ao desenvolvimento *in vitro*.

A posição da gema na haste em plântulas cultivadas *in vitro* ou no caule de plantas mantidas sob condição *ex vitro* pode interferir no desenvolvimento *in vitro*, quando estas gemas são utilizadas como fonte de explante (PEREIRA et al., 2005). Isso ocorre porque elas podem acumular níveis diferentes de reguladores de crescimento vegetal endógenos em diferentes posições da haste e podem, portanto, promover respostas diversas (FERRI, 1985).

Em culturas *in vitro* de *Maytenus ilicifolia* foi constatado que as gemas basais promoveram maior porcentagem de brotações e menor incidência de calos (PEREIRA et al., 1995). Os mesmos resultados foram obtidos em culturas de macieira “Marubakaido” por PEREIRA & FORTES (2001). Porém, em estudos realizados com laranja pêra por SILVA et al. (2005), verificou-se que os explantes de posição apical e mediana induzem maior taxa de multiplicação para esta espécie e, com os trabalhos realizados por REIS et al. (2004), observou-se que não há diferença da posição dos explantes para a multiplicação de Ipeca.

Tabela 5: Quadro de análise de variância para diferentes posições da gema no desenvolvimento *in vitro* de explantes de *Acmella oleracea*. Manaus – AM, 2006.

Causas da Variação	G. L.	Q. M.					
		Porcentagem de explantes com brotação	Número de brotos por gema	Número de gemas por haste	Altura do broto (cm)	Presença de calos <sup>(a)</sup> (%)	Presença de raiz (%)
Posição	5	863,33**	0,03 <sup>ns</sup>	0,42 <sup>ns</sup>	1,28 <sup>ns</sup>	-	818,89**
Resíduo	12	27,77	0,08	0,33	2,67	-	16,67
Média Geral		71,66	1,34	4,71	6,86	-	69,44
C. V.		7,35%	20,88%	12,14%	23,82%	-	5,88%

<sup>ns</sup>, \* e \*\* não significativo e significativo a 1% e 5%, respectivamente.

<sup>(a)</sup> Neste quadro não foi feita a análise de variância da presença de calos, porque apenas uma posição (1) induziu esta característica.

Tabela 6: Efeito das diferentes posições da gema no desenvolvimento *in vitro* de explantes de *Acmella oleracea*. Manaus – AM, 2006.

Posição da Gema	% de Explantes com Brotação	Número de brotos por gema	Número de gemas por haste	Altura do broto (cm)	Presença de calos (%) <sup>(a)</sup>	Presença de raiz (%)
1	80,00 ab	1,22 a	4,32 a	5,96 a	20,00	66,67 b
2	83,33 ab	1,41 a	4,40 a	7,00 a	-	83,33 a
3	86,67 a	1,35 a	4,50 a	7,61 a	-	100,00 a
4	70,00 b	1,24 a	5,28 a	6,17 a	-	70,00 b
5	70,00 b	1,33 a	4,95 a	7,26 a	-	70,00 b
6	40,00 c	1,50 a	4,83 a	7,19 a	-	40,00 c

Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente, entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

<sup>(a)</sup> Nesta tabela não foi feito o teste de Tukey da presença de calos, porque apenas uma posição (1) induziu esta característica.

## **EXPERIMENTO 06: Efeito de diferentes diluições dos meios de cultura no desenvolvimento *in vitro* de *Acmella oleracea*.**

O meio de cultura, os sais utilizados, as concentrações de micro e macronutrientes também interferem diretamente no desenvolvimento de explantes cultivados *in vitro*. Explantes de *A. oleracea* foram cultivados em meios de cultura basais MS, B5 e WP e foram avaliados quanto a porcentagem de brotação, taxa de multiplicação, altura do broto e presença ou ausência de raiz.

O quadro de análise de variância para diferentes diluições dos meios de cultura MS, MS/2, MS/4, B5, B5/2, B5/4, WP, WP/2 e WP/4 mostra que houve diferença estatística significativa ao nível de 5% para os fatores meio e diluição para as características porcentagem de explantes com brotação, número de gemas por haste, altura do broto e presença de raiz (Tabela 7).

De acordo com a Tabela 8, as diluições pela metade dos meios WP e B5, bem como pela quarta parte do meio WP promoveram as menores taxas de multiplicação desta espécie e as três concentrações destes dois meios de cultura induziram as menores alturas de broto (0,44 e 0,55cm, respectivamente), quando comparadas com o meio de cultura MS e suas diluições. O mesmo ocorreu com o meio MS/4 (2,44cm). Para a característica presença de raiz, os meios de cultura MS e B5 e B5/4 na concentração original foram considerados os mais adequados para o desenvolvimento *in vitro* de *Acmella oleracea*, resultando em 100% de explantes com brotação. Deste modo, fica indicado para a multiplicação *in vitro* desta espécie o meio de cultura MS na concentração basal, pois este tratamento induziu 100% de explantes com brotação e enraizados, maior número de brotos por gema (1,43) e maior taxa de multiplicação (5,96) quando comparado com os demais tratamentos.

Embora não tenha havido diferença estatística significativa a nível de 5% entre os meios de cultura MS basal e MS/2, os explantes cultivados em meio de cultura MS basal permaneceram vigorosos por cerca de três meses sem a necessidade de subcultivos enquanto que os mantidos em meio MS/2 precisam ser repicados a cada 30 dias, uma vez que começam a murchar e apresentar amarelecimento, que são características fisiológicas típicas de plantas submetidas a estresse nutricional (DUARTE et al., 2003). Desta forma, o meio de cultura MS, diminui grandemente os custos do protocolo, tanto por evitar a necessidade de subseqüentes subcultivos, quanto por produzir 100% de plântulas enraizadas, o que elimina a etapa de enraizamento *in vitro*.

Os meios de cultura MS, B5 e WP são usados para cultura de tecidos da maioria das espécies cultivadas *in vitro*. Os meios nutritivos utilizados para a cultura de tecidos de plantas fornecem as substâncias essenciais para o crescimento e controlam, em grande parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro*. As vias bioquímicas e metabólicas básicas que funcionam nas plantas que crescem sob condição *ex vitro* são conservadas nas células e tecidos cultivados *in vitro* e, por isso, os meios nutritivos se baseiam nas exigências das plantas inteiras. Todavia, algumas alterações na composição do meio básico, como diluições, podem ser feitas para a otimização de protocolos de micropropagação (TORRES et al., 1998).

Tabela 7: Quadro de análise de variância para diferentes diluições dos meios de cultura basais, MS, B5 e WP e suas diluições, no desenvolvimento *in vitro* de explantes de *Acmella oleracea*. Manaus – AM, 2006.

Causas da Variação	G. L.	Q. M.				
		Porcentagem de explantes com brotação	Número de brotos por gema	Número de gemas por haste	Altura do broto (cm)	Presença de raiz (%)
Meio	2	1544,44**	00,05 <sup>ns</sup>	18,25**	26,65**	17043,70**
Diluição	2	0844,44**	00,04 <sup>ns</sup>	00,45**	01,02**	01848,14**
Meio x Diluição	4	0688,89**	00,03 <sup>ns</sup>	00,14**	00,88**	00792,59**
Resíduo	18	0018,52	00,02	00,08	00,19	00192,59
Média Geral		0088,89	01,15	02,50	01,45	00068,52
C. V.		00)4,84%	11,49%	11,38%	29,96%	00020,25%

<sup>ns</sup>, \* e \*\* não significativo e significativo a 1% e 5%, respectivamente.

Tabela 8: Efeito de diferentes diluições dos meios basais WP, MS e B5 no desenvolvimento *in vitro* de explantes de *Acmella oleracea*. Manaus – AM, 2006.

Meio de Cultura	% de Explantes com Brotação	Número de brotos por gema(*)	Número de gemas por haste(**)	Taxa de Multiplicação (*) x (**)	Altura do broto (cm)	Presença de calos (%)	Presença de raiz (%)
MS	100,00 a	1,43 a	4,17 a	5,96	4,36 a	-	100,00 a
MS/2	100,00 a	1,07 a	4,13 a	4,42	3,49 ab	-	93,33 a
MS/4	100,00 a	1,20 a	4,13 a	4,96	2,44 b	-	93,33 a
B5	100,00 a	1,10 a	2,30 b	2,53	0,55 c	-	100,00 a
B5/2	76,60 b	1,10 a	1,70 bc	1,87	0,50 c	-	76,67 ab
B5/4	100,00 a	1,07 a	1,47 c	1,57	0,47 c	-	100,00 a
WP	100,00 a	1,10 a	1,83 bc	2,01	0,44 c	-	53,33 b
WP/2	70,00 b	1,13 a	1,47 c	1,66	0,41 c	-	-
WP/4	53,30 c	1,13 a	1,36 c	1,81	0,35 c	-	-

Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente, entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

(\*) x (\*\*): Taxa de multiplicação obtida pelo do número de brotos por gema multiplicado pelo número gema por haste (Oliveira & Silva, 1997).

## EXPERIMENTO 07: Aclimação de *Acmella oleracea* em ambiente *ex vitro*.

A aclimação é um processo crítico, pois a plântula passa de um ambiente onde há baixa transpiração para outro que exige maior transpiração, podendo ocorrer estresse hídrico. Além disso, há outras adaptações importantes como a passagem de um estado heterotrófico para um autotrófico e a alteração de um ambiente asséptico para outro sujeito ao ataque de microorganismos saprófitos e, eventualmente patogênicos (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1990).

A Tabela 9 indica que há diferença estatística significativa ao nível de 5% tanto entre os tipos de substrato como no período de aclimação. Já a tabela 10 mostra que não houve variação do número de plântulas aclimatadas tanto em substrato Plantmax<sup>®</sup> (71,88%) como no substrato areia (56,25%), após 75 dias de aclimação (Tabela 10), e que também pode-se verificar uma queda de 84,38% para 62,50% no número de plantas aclimatadas no substrato terra após este mesmo período. Nesta mesma tabela, também pode-se observar que a quantidade de plantas aclimatadas é proporcional à quantidade de nutrientes disponível no solo, bem como da capacidade do substrato em armazenar água.

Para a aclimação das plântulas de *A. oleracea* fica indicado o substrato Plantimax<sup>®</sup>, que proporcionou melhor índice de sobrevivência após 75 dias de plantio. Mesmo após este período de aclimação, as plantas sobreviventes continuaram verdes e vigorosas. O enraizamento *in vitro* para muitas espécies pode ser uma opção, entretanto para outras é um procedimento obrigatório uma vez que apresentam elevadas taxas de mortalidade quando estão isentas deste órgão (PREECE & IMEL, 1991).

Segundo HANNWEG et al. (1996), a umidade e a presença de raiz são parâmetros importantes para a aclimação.

Um dos fatores que influenciou no elevado índice de mortalidade das plantas enraizadas está relacionado à contaminação por fungo que ocorreu na casa de vegetação. Essa contaminação foi observada nos três substratos utilizados e comprometeu a fitossanidade das plântulas. Quando os frascos de vidro, depositados sobre as plântulas com função de manter a umidade, foram retirados, observou-se grande incidência de fungos nos substratos. Os próximos experimentos de aclimação deverão ser realizados a partir de substrato estéril e também em condições de estufa com irrigação pulverizada, o que é mais indicada ao processo de aclimação. Uma revisão feita por ROUT et al. (2000), relata que a maioria das plantas micropropagadas aclimatadas em estufas apresentam altas taxas de sobrevivência.

Além disso, recomendamos testar a pulverização de substâncias antimicrobianas sobre as plântulas durante o processo de aclimação. Esse procedimento tem sido utilizado com sucesso na aclimação de outras espécies (BERTONI et al., 2000).

Existem ainda outros métodos que podem auxiliar na aclimação de plântulas cultivadas *in vitro*. MAO et al. (1995), aclimataram *Clerodendrum colebrookianum*, realizando uma fase intermediária de aclimação, em que as plântulas permaneceram dentro de frascos destampados contendo meio de cultura, por duas semanas em sala de crescimento, antes de serem conduzidas para aclimação em estufas.

Para SÃO JOSÉ et al. (1998), o comprometimento do desenvolvimento de plantas aclimatadas está relacionado principalmente ao substrato, cujos nutrientes são limitantes e/ou esgotados em pouco tempo. O substrato Plantmax® tem sido considerado adequado para o procedimento de aclimação devido aos seus constituintes químicos,

principalmente pela presença de fósforo, visto que este nutriente estimula o crescimento da parte aérea da planta (SIMÕES, 2003), ou ainda às características físicas que apresentam maior porosidade total, o que dá a este substrato maior capacidade de retenção de água e aeração (SILVA et al., 2001).

MENDONÇA et al. (2003), observaram que o Plantmax<sup>®</sup> foi o melhor substrato para a aclimação da variedade *Sunrise solo* de mamona. O mesmo resultado foi obtido por MACIEL et al. (2000), durante o processo de aclimação de violetas (*Saintpaulia ionantha*) e por PEREIRA et al. (2000), na aclimação de *Pothomorphe umbellata*.

Tabela 09: Resumo do quadro de análise de variância para porcentagem de explantes de *Acmella oleracea* que sobreviveram a aclimação em diferentes tipos de substratos. Manaus – AM, 2006.

CAUSAS DA VARIAÇÃO	G. L.	Q. M
		Sobrevivência à Aclimação
Substrato	02	108.981 <sup>**</sup>
Dias	02	15.557 <sup>**</sup>
Substrato x Dias	04	15.557 <sup>**</sup>
Resíduo	18	27.856
Média Geral		22.69
Coeficiente de Variação		23,26%

<sup>ns</sup>, \* e <sup>\*\*</sup> não significativo e significativo a 1% e 5%, respectivamente.

Tabela 10: Porcentagem de explantes de *Acmella oleracea* que sobreviveram a aclimação em diferentes tipos de substratos. Manaus – AM, 2006.

Tempo de Aclimação (Dias)	Plantimax <sup>®*</sup> (%)	Terra <sup>*</sup> (%)	Areia <sup>*</sup> (%)
45	71,88 a A	84,38 a A	56,25 a B
60	71,88 a AB	81,25 a A	56,25 a B
75	71,88 a A	62,50 b B	56,25 a C

Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente, entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

\*Letras minúsculas representam análise entre linhas e maiúsculas entre colunas.

## **EXPERIMENTOS 08, 09 E 10: Avaliação de diferentes sistemas de cultivo *in vitro* de *Acmella oleracea*.**

A eficiência do sistema R.I.T.A. foi avaliada com explantes de *A. oleracea*, num experimento amplo, que comparou o cultivo isolado de explantes (um explante por frasco) em meio de cultura semi-sólido, ou em co-cultivo (seis explantes por frasco) e também em meio de cultura líquido sob agitação com a mesma densidade de explantes introduzidos no sistema R.I.T.A. (50 explantes por frasco).

A Tabela 11 mostra que houve diferença significativa ao nível de 5% para as características número de brotos por gema, número de gemas por haste e altura do broto para os diferentes sistemas de cultivo testados.

Os explantes inoculados em meio líquido que ficaram permanentemente em contato como o meio de cultura, oxidaram e necrosaram totalmente após 15 dias de cultivo, o que pode ser explicado pelo estresse hidrodinâmico. Esse estresse consiste no contato contínuo entre o explante e o meio de cultura (Malosso et al., 2004). Embora os frascos tenham sido colocados sob agitação orbital constante (100 rpm), o que permite boa aeração, os explantes de *Acmella oleracea* não resistiram a um ambiente de extrema e permanente umidade.

O cultivo de vários explantes juntos num mesmo frasco, por 90 dias, seja em co-cultivo em meio sólido ou líquido (R.I.T.A.) promoveu altas porcentagem de explantes com contaminação por leveduras endofíticas (100%), e também a morte muitos explantes, o que mostra que tanto o co-cultivo quanto o cultivo em meio de cultura líquido, seja sob agitação constante ou em sistema de imersão temporária, não são indicados para esta espécie.

O sistema de imersão temporária promoveu excelente desenvolvimento dos explantes com índice de brotação de 100% até 15 dias de cultivo, quando então, uma bactéria endofítica contaminou todo o sistema, levando os explantes à morte. Portanto, para os próximos experimentos com esta espécie em biorreatores, é necessária a realização de antibiograma e de ensaios com antibióticos para o estabelecimento de um protocolo otimizado desta planta neste tipo de sistema.

A tabela 12 mostra que o cultivo isolado em meio de cultura sólido foi mais eficiente para o desenvolvimento de *A. oleracea*, pois promoveu maior porcentagem de explantes com brotação (89,33), maiores número de brotos por gema (2,45) número de gemas por haste (14,07), além da maior altura do broto (15,93). Embora a taxa de enraizamento no sistema de cultivo isolado seja menor que no de co-cultivo, não existe diferença estatística significativa ao nível de 5% para esta característica (Tabelas 11 e 12).

O Sistema de Imersão Temporária Automatizado (R.I.T.A), além de apresentar a vantagem de permitir a automatização do protocolo, ainda é mais econômico, uma vez que não utiliza o agente solidificante que, dependendo da marca, como no caso do Phytigel<sup>®</sup>, pode representar uma redução de 79% do custo do meio de cultura, além de utilizar menor espaço em sala de crescimento e de banco de germoplasma.

Os explantes cultivados em meio de cultura semi-sólidos, em sistema de cultivo isolado, conservaram-se verdes e vigorosos apesar de permanecerem por 90 dias no mesmo meio de cultura. Isso demonstra a baixa exigência nutricional da *A. oleracea*, característica comum das plantas ciliares amazônicas.

PEREIRA et al. (1999), realizaram experimentos de co-cultivo com diferentes espécies de plantas medicinais e verificaram que o cultivo de 3 explantes de Ipeca em um mesmo frasco não diferiu significativamente do cultivo de um explante isolado, quanto ao

número de brotos. Por outro lado, em trabalho realizado por PEREIRA et al. (2000a), com batata, observou-se que o cultivo de vários explantes no mesmo frasco favoreceu tanto a proliferação quanto o tamanho das brotações. Em cultura *in vitro* de aspargo, o aumento da densidade do inóculo propiciou o crescimento e o desenvolvimento dos explantes. Segundo PEREIRA et al. (2000b), para melhor compreender esses resultados que diferem entre si, é necessário ampliar os estudos sobre exigências nutricionais e associá-los ao volume do meio nutritivo e o número de explantes.

GRATAPPAGLIA & MACHADO (1998), observaram que a área superficial da interface do meio nutritivo como explante, a atmosfera e o volume de ar disponível para uma plântula cultivada *in vitro* são influenciados pelo tipo de frasco e a quantidade de meio utilizado, interferindo diretamente no desenvolvimento e crescimento de culturas axênicas.

Tabela 11: Quadro de análise de variância para co-cultivo e cultivo isolado no desenvolvimento de explantes *in vitro* de *Acmella oleracea*. Manaus – AM, 2006.

Causas da Variação	G. L.	Q. M.				
		Porcentagem de explantes com brotação	Número de brotos por gema	Número de gemas por haste	Altura do broto (cm)	Presença de raiz (%)
Tipo de Cultivo	1	120,67 <sup>ns</sup>	3,154 <sup>**</sup>	161,30 <sup>**</sup>	260,04 <sup>**</sup>	170,67 <sup>ns</sup>
Resíduo	5	293,33	0,07	5,84	0,43	44,67
Média Geral		85,00	1,73	8,89	9,34	94,67
C. V.		10,08%	15,49%	27,18%	7,05%	7,06%

<sup>ns</sup>, \* e \*\* não significativo e significativo a 1% e 5%, respectivamente.

Tabela 12: Efeito das diferentes sistemas de cultivo no desenvolvimento *in vitro* de explantes de *Acmella oleracea*<sup>(a)</sup>. Manaus – AM, 2006.

Tipo de Cultivo	Explantes com Brotação (%)	Número de brotos por gema	Número de gemas por haste	Altura do broto (cm)	Presença de raiz (%)
Cultivo Isolado	89,33 a	2,45 a	14,07 a	15,93 a	89,33 a
Co-Cultivo	80,67 a	1,00 b	3,70 b	2,75 b	100,00 a
Meio Líquido	-	-	-	-	-
R. I. T. A.	-	-	-	-	-

Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente, entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

<sup>(a)</sup> Nesta tabela não foi feito o teste de Tukey da presença de calos, porque nenhum sistema de cultivo induziu esta característica.

### EXPERIMENTO 11: Estabelecimento do banco de germoplasma *in vitro* de *Acmella oleracea*.

Tabela 13. Desenvolvimento das plântulas no banco de germoplasma sob a ação de agentes retardadores de crescimento. Manaus – AM, 2006.

Tratamentos	Explantes com brotação (%)	Nº de brotos por gema	Nº de gemas Por Haste	Altura do broto (cm)	Presença de calos (%)	Presença de raiz (%)	Plantas sobreviventes (%)
MS+ 2% sacarose	93,33 ± 5,8	3,5 ± 0,3	8,5 ± 1,7	12,4 ± 2,1	-	100,00 ± 0,0	40,0 ± 10,0
MS/2 + 2% sacarose	100,00 ± 0,0	1,9 ± 0,5	9,2 ± 0,6	15,5 ± 1,0	13,3 ± 11,5	100,00 ± 0,0	86,7 ± 11,5
MS/4 + 2% sacarose	100,00 ± 0,0	1,6 ± 0,6	8,0 ± 0,5	14,9 ± 1,0	23,3 ± 20,8	100,00 ± 0,0	60,0 ± 30,0
MS + 2% sacarose + 4% sorbitol	100,00 ± 0,0	2,0 ± 0,3	7,0 ± 1,0	5,5 ± 1,1	-	100,00 ± 0,0	100,00 ± 0,0
MS/2 + 2% sacarose + 4% sorbitol	100,00 ± 0,0	1,8 ± 0,2	9,5 ± 0,6	9,5 ± 1,7	66,7 ± 15,3	96,7 ± 5,8	50,0 ± 26,5
MS + 2% sacarose + 4% sorbitol + 2,0 mg/L Pantotenato Ca	43,33 ± 11,5	1,0 ± 0,0	3,7 ± 0,8	1,7 ± 1,1	3,3 ± 5,8	44,3 ± 11,5	3,7 ± 5,8
MS/2 + 2% sacarose + 4% sorbitol + 2,0 mg/L Pantotenato Ca.	73,33 ± 15,3	1,0 ± 0,0	1,7 ± 0,7	0,4 ± 0,1	-	56,7 ± 20,8	-
MS + 2% sacarose + 3% manitol + 2,0 mg/L Pantotenato Ca	36,67 ± 15,3	1,0 ± 0,0	1,4 ± 0,3	0,3 ± 0,1	-	-	-
MS/2 + 2% sacarose + 3% manitol + 2,0 mg/L Pantotenato Ca	50,00 ± 10,0	1,0 ± 0,0	1,2 ± 0,3	0,2 ± 0,1	-	16,7 ± 15,2	-

A conservação de recursos genéticos em bancos de germoplasma tem sido desenvolvida a partir de várias técnicas como a criopreservação e a manutenção de explantes *in vitro* por um médio período de tempo. Agentes osmóticos como o manitol e o sorbitol têm sido utilizados com a finalidade de alterar a disponibilidade de trocas gasosas, proteger as membranas celulares das baixas temperaturas e reduzir a hiperhidricidade, evitando a vitrificação (ENGELMAN, 1991; KADOTA, 2001).

Para a conservação de *A. oleracea* em banco de germoplasma *in vitro*, fica indicado o tratamento com MS acrescido de 2% de sacarose e 4% de sorbitol, uma vez que este apresentou 100% de explantes com brotação, vivos e enraizados e maior número de brotos por gema ( $2,0 \pm 0,3$ ), além de ausência total de calos e a menor altura do explante ( $5,5 \pm 1,1$ ), quando comparado com os tratamentos que apresentaram mais de 50% de explantes vivos. Este tratamento também induziu um excelente número de gemas por haste ( $7,0 \pm 1,0$ ), quando comparado com os demais tratamentos, visto que, esta técnica objetivou a menor taxa de multiplicação *in vitro* (Tabela 11). As diluições pela metade e pela quarta parte dos sais do meio de cultura MS acrescidos apenas de sacarose evitaram o estresse nutricional nesta espécie. Isto pode ser observado devido ao de que, quanto maior a diluição do meio de cultura, maior é a taxa de sobrevivência, menor é a taxa de multiplicação, além de induzir raízes em 100% dos explantes, porém, estes meios originaram calos. Além disso, com este experimento também pode-se verificar que a associação de manitol ao pantotenato de cálcio não deve ser adicionado em meios de cultura para banco de germoplasma, uma vez que todos os explantes expostos à sua presença morreram, indicando que estes protetores de membrana são tóxico para esta espécie.

A Tabela 11 ainda mostra que o sorbitol auxiliou na proteção dos tecidos das plântulas quanto às condições de baixa temperatura do banco de germoplasma (18°C).

O meio de cultura mais adequado ao estabelecimento de banco de germoplasma *in vitro* é aquele que garante maior sobrevivência e, ao mesmo tempo, menor índice de crescimento, pois além de possibilitar que o material fique maior tempo sem subcultivo permite que seja regenerado e multiplicado posteriormente por via sexual.

FREITAS et al. (2001), SEGOVIA et al. (2003), e GÓMEZ et al. (1997), ao utilizarem o pantotenato de cálcio em bancos de germoplasma de alho (*Allium sativum* L.), batata (*Solanum quitoense*) e batata (*Solanum tuberosum* L.), respectivamente, relataram que este sal auxiliou na sobrevivência dos explantes expostos às baixas temperaturas (18° C).

LEMOS et al. (2002), observaram que explantes de cana-de-açúcar sobreviveram melhor em baixas temperaturas em meios de cultura contendo sorbitol e dextrose, quando comparados com aqueles que continham apenas sacarose.

O pantotenato de cálcio e o manitol não apresentaram um efeito protetor ao estresse promovido pelo frio, nos explante de *A. oleracea*. Há relatos de efeitos nocivos do manitol em internós de *Annona muricata* cultivados *in vitro* (LEMOS & BAKER, 1998).

## 7. CONCLUSÃO

- ✓ A informação sobre o sistema reprodutivo de *Acmella oleracea* baseados na razão pólen/óvulo (P/O) auxiliará em futuros estudos sobre a biologia floral, que é uma etapa fundamental em pesquisas de ecologia de polinização.
- ✓ Os resultados obtidos com os experimentos de germinação de sementes de *A. oleracea* apontam a necessidade de estudos aprofundados relacionados sensibilidade das sementes aos agentes químicos desinfestantes.
- ✓ É economicamente viável a produção de *A. oleracea* via micropropagação e o protocolo aqui estabelecido pode ser utilizado para propagar esta espécie em larga escala.
- ✓ A fase de enraizamento *in vitro* de *A. oleracea* é desnecessário, diminuindo assim os custos do protocolo de micropropagação.
- ✓ O cultivo isolado em meio de cultura semi-sólido é indicado para produzir plântulas *in vitro* de *A. oleracea* em larga escala.
- ✓ É perfeitamente possível a conservação em banco de germoplasma *in vitro* de *Acmella oleracea*.

## 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estabelecimento do protocolo de micropropagação de *Acmella oleracea* apresentados neste trabalho viabiliza a produção em larga escala de uma espécie medicinal e olerícola da Amazônia exposta à erosão genética. Representa uma ação concreta de preservação desta espécie, uma vez que os resultados apresentados nesta tese permitirem a conservação *in vitro* em banco de germoplasma.

A partir da metodologia desenvolvida neste trabalho, centenas ou milhares de indivíduos poderão retornar às áreas de ocorrência natural ou seguir para campos de cultivo, viabilizando a produção de fitoterápicos e atendendo a demanda da indústria farmacêutica brasileira, sem comprometer a biodiversidade nacional.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AITKEN-CHRISTIE, J.; DAVIES, H. E. Development of a semi-automated micropropagation system. **Acta Horticulturae**, v. 230, p 81 – 87, 1988.

ALVARD, D.; COTE, F.; TEISSON, C. Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. Plant cell, tissue and organ culture. Nerterlands, v. 32, p. 55-60, 1993. In: TEIXEIRA, J. B. Biorreatores para células, tecidos e órgãos vegetais: Produção de mudas em larga escala, **EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia**. Disponível em: <<http://www.biotecnologia.com.br/bio24/6.html>>. Acesso em: 14 jun. 2003.

ALVES, E. C. S.; XAVIER, A., OTONI, W. C. Organogênese de explante foliar de clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. **Pesq. Agropec. Bras.** v. 39, n. 5, p. 421 – 430, 2004.

ANAON, R. Survey of exting data in *ex situ*.. Collections of plant genetic resources for food and agriculture. **Food and Agriculture Organization**, Roma, 1994.

ANDRADE, M. W.; LUZ, J. M. Q.; LACERDA, A. R.; MELO, P. D. A. Micropropagação de Aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All). **Cienc. Agrotec.**, v. 24, n. 1, p. 174 – 180, 2000.

ASHWOOD-SMITH, M. J.; FRIEDMANN, G. N. Letal and chromosomal effects of freezing, thawing, storage time and X-irradiation on mammalian cells preserved at –190° C in dimethylsulphoxide. **Cryobiology**, v. 16. p. 132 – 140. 1979.

AZEVEDO, J. L. Microbiologia de microorganismos endofíticos. In: MELO, I. S. de; AZEVEDO, J. L. de (ed.). **Ecologia microbiana**. Jaguariúna/ EMBRAPA-CNPMA, 488 p. 1998.

BAIS, H. P.; GEORGE, J.; RAVISHANKAR, G. A. *In vitro* propagation of *Decalepis Hamiltonii* Wight & Arn., an endangered Shrub, through axillary bud cultures. **Current Science**, v. 79, n. 4. p. 408 – 410, 2000.

BAKER, J. G (a). *Spilanthes*. **Flora Brasiliensis**, vol. 6, n.3, p. 231-235, 1884. In: HIND, N.; BIGGS, N. *Acmella oleracea* : Compositae. **Curtis's Botanical Magazine**, vol. 20, n. 01, pág. 31 – 39, 2003.

BAKER. J. G. (b). De uso Compositarum brasiliensium. Compositae IV. Helianthoideae, Helenioideae, Anthemideae, Senecionideae, Cynaroideae, Lingulatae, Mutisiaceae. *Flora Brasiliensis*, vol. 6, n.3, p. 409 a 412, 1884. In: HIND, N.; BIGGS, N. *Acmella oleracea* : Compositae. **Curtis's Botanical Magazine**, vol. 20, n. 01, pág. 31 – 39, 2003.

BARNES, B. V.; ZAK, D. R.; DENTON, S. R.; SPURR, S. H. *Forest Ecology*. New York. **J. Wiley & Sons**, 1998. 753 p.

BATISTINI, A. P.; MORO, J. R.; FRANÇA, S. C.; PEREIRA, A. M. S. Avaliação de diferentes sistemas de cultivo “*in vitro*” para a micropropagação de *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes. **Revista Brasileira de Plantas medicinais**, Botucatu. v. 5, n. 1, p.27-35, 2002.

BERTONI, B. W.; PEREIRA, A. M. S.; MORAES, R. M.; FRANCA, S. C. Micropropagation of *Salix humboldtiana* Hild. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v. 2, n. 2. p. 17 – 21, 2000.

BERTRAND-DESBRUMAIS, A.; CHARRIER, A. Conservation des ressources génétiques cafeières. In: Proc. Coll. Intl. ASIC, Paip, Colômbia. P.438-446, 1989. In: LATA, H. *In vitro* conservation of tropical plant germoplasm, a review. **Euphytica, Netherlands journal of plant breeding**, Mississippi. v . 57, p. 227 - 243, 1991.

BLUMENTHAL, M. GAVAARD, D. Study estimates consumers spende US\$ 5.1 billion on herbal products? **Herbal Gram**. v. 45. p. 68, 1999.

BRANCO, S. M. **O meio ambiente em debate**. Editora Moderna, São Paulo, 2001. 96p, *Coleção Polêmica*.

BRASIL, Ministério da agricultura e Reforma Agrária. Regras para a análise de sementes. **Brasília: SNDA/DNDV/CLAV**, 1992. 365p.

BRINSKIN, Donald P. Medicinal plants and Phytomedicines. **Journal of Clinical Investigation**. v. 124, p. 507 – 514, 2000.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 33 n. 2, p. 179 - 189, 2000.

CASTRO, H. G.; FERREIRA, F. A., SILVA, D. J. H.; MOSQUIM, P. R. **Contribuição ao estudo das plantas medicinais: Metabólitos Secundários**. Viçosa : Editora Suprema, 2004, 113 p.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.

CID, P. B.; CRUZ, A. R. R.; TEIXEIRA, J. M. Biorreatores de imersão permanente. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 25, p. 50 - 53, 2002.

CRUDEN, R. W. Pollen-ovule ratios: **A conservative indicator of breeding systems in flowering plants**. Department of Botany, University of Iowa, Iowa city, 1976. p. 32 -46.

DAVIS, T. D.; HAISSIG, B. E.; SANKHLA, N. Adventitious root formation in cuttings. **Discovery Press** : Oregon, 1988, 315 p.

DIAS, B. F. S. A implementação da conservação sobre biodiversidade biológica no Brasil: desafios e oportunidades. Campinas, **André Tosello**. 1996, 10p.

DILLAN, M. O.; ALVA, A. S. Tribal classification and diversity in the Asteraceae of Peru. **Arnaldoa**, v. 8, n. 2, p. 25 – 44, 2001.

DIXON, R. A; GONZALES, R. A. Plant cell culture, a practical approach. New York, **Oxford University Press**, 1994. 230p. Volume único. Bibliografia: p. 1 – 25.

DUARTE, M. L. R.; STEIN, R. L .B.; NUNES, A. M. L. **Doenças de plantas no trópico úmido brasileiro**. Volume 2, EMBRAPA : Brasília, 306 p., 2003.

DUDLEY, T. R. **Adventitious root formation in Cuttings**. Advances in Plant Science Series, v. 2, 315p, 1998. Bibliografia p. 132 – 149.

ENGELMAN, F. *In vitro* conservation of tropical plant Germoplasma: a Review. **Euphytica**, vol. 57, p. 227 – 243, 1991.

ETIENE, H.; LARTAUD, M.; MICHAUX-FERRIÈRE, N.; CARRON, M. P.; BERTHOULY, M; TEISSON, C. Improvement of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis* (Mull. Arg.) using the temporary immersion technique. **In vitro Cell Development Plant Biology**. v. 33, p. 81 - 87, 1997.

FERREIRA, S. H. Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil. Rio de Janeiro: **Academia Brasileira de Ciências**, 1998.

FERREIRA, G. M. L. & MARTINELLI, M. **Moderno Atlas Geográfico**. Editora Moderna : São Paulo, 1997, 56 p.

FERRI, M. G. **Fisiologia Vegetal**. Editora EPTU : São Paulo. Volume 2, 401p, 1985.

FETT, M. S. Como produzir mudas de Eucalipto clonado? **Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas**. SENAI : Piracicaba, 5 p, 2005. Acesso em 13/07/2006, Disponível em <<http://sbrt.ibict.br/upload/sbrt1352.pdf>>.

FRÁGUAS, C. B.; PASQUAL, M.; PEREIRA, A. R. Multiplicação *in vitro* de *Ficus carica* L.: Efeito da cinetina e do Ácido Giberélico. **Cienc. Agrotec.**, v. 28, n. 1, p. 49 – 55, 2004.

FREITAS, R.; FONSECA, J. B.; SOARES, R. T. R. N.; ROSTAGNO, H. S.; SOARES, P. R. Utilização do alhos (*Allium sativum* L.) como promotor do crescimento de frangos de corte. *Revista brasileira de zootecnia*. v. 3, n. 3, p. 761 – 765, 2001.

FUTUYAMA, D. J. **Biologia Evolutiva**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1992, 631p.

GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean roots cells. **Experimental Cell Research**, v. 50, p. 151-158, 1968. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L.; BUSO, J. A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: **EMBRAPA**, 1998. v. 2, 864p.

GARCIA, E. S.; SILVA, A. C. P.; GILBERT, B.; CORRÊA, C. B. V.; CAVALHEIRO, M. V. S.; SANTOS, R. R.; TAMASINI, T. **Fitoterápicos**. Campinas, André Tosello, 1996. 17p.

GEORGE, E. F. Plant propagation by tissue culture – Part 1: The technology. 2nd Ed. Edington, England : Exegetics, 1993, 574 p. (a)

GÓMEZ, L. M.; JARAMILO, E.; JARAMELLO, S.; SIOL, R. H. Regeneracion de plantas de papa (*solanum tuberosum* L.) a partir de tejido foliar em lâs variedades diacol capiro y parda pastusa. **Revista Papa**, Colômbia. n. 17, 6 p, 1997.

GONZÁLES, S. R.; LOZANO, J. G.; ROJAS, M. A. Propagación asexual de plantas: Conceptos basicos y experiencias con especies Amazónicas. **Pronatta** : Colombia. 2004, 55 p.

GRATTAPAGLIA, D.; ASSIS, T.F.L. CALDAS, L. S. Efeito residual de BAP (6-benzilaminopurina) e NAA (Ácido naftaleno acético) na multiplicação e enraizamento in vitro de Eucalyptus. In: **Simpósio Nacional de cultura de tecidos vegetais**. Brasília, DF. Resumos, Brasília, 1987, p. 8.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: **Cultura de tecido e transformação genética de Plantas**. TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J.A. Brasília: EMBRAPA-SP/EMBRAPA-CNPH, 1998. v. 1 e 2, 648p.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. L.; CALDAS, L. S. eds. Técnicas e aplicações da Cultura de Tecidos de Plantas. Brasília: **ABCTP/EMBRAPA – CNPH**, 1990. p. 89 – 164.

GUERRA, P. G.; VESCO, L. L. D.; PESCADOR, R.; SCHUELTER, A.; NODAR, R. O. Estabelecimento de um protocolo regenerativo para a micropropagação do abacaxizeiro. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 34, n. 9, p. 1557 – 1563, 1999.

HAMIGAKI, LION. Pedido de registro de patente nº PI0100254-6 em 04/04/1995. Acessado em <<http://www.inpi.gov.br>> em 01/07/2006.

HANNWEG, K.; WATT, M. P.; BERJAK, P. A simple method for micropropagation of *Bowiea volubilis* from inflorescence explantes. Disponível em <<http://ejournal.sinica.edu.tw/bbas/content/1996/bot373-08html>>. Acesso em: jan. 2002.

HARRIS, R. E. & MANSON, E. B. B. Two machines for *in vitro* propagation of plants in liquid medium. Canadian. Journal of Plant Science, vol. 63, p. 301-316, 1983. In: TEIXEIRA, J. B. Biorreatores para células, tecidos e órgãos vegetais: Produção de mudas em larga escala. Disponível em: <<http://www.biotecnologia.com.br/bio24/6html>>. Acesso em: jun. 2003.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JR, F. T. D.; GENEVE, R. L. **Plant propagation: Principles and Practice**. Prentice Hall Internacional INC : New Jersey, 779 p, 1997.

HAVEN, P. H.; EVERT, R. f.; EICHHOORN, S. E. Biologia Vegetal. **Editora Guanabara Koogan**, Rio de Janeiro, 1996. Volume único, p. 612 – 637.

HAW, A. B.; KENG, C. L. Micropropagation of *Spilanthes acmella* L., a bio-insecticide plant, through proliferation of multiple shoots. **Appl. Hort.**, v. 5, n.2, p. 65 – 68, 2003.

HENSHAW, G. G. Tissue culture methods and germoplasm storage. In: Proceedings of the 5<sup>th</sup> international congress on plant tissue culture. Ed. Fujiwara. Tokyo Japan: Abe Photo Printing Co. LTd. P. 789-792, 1982. In: VILLASLOBOS, V. M.; ENGELMANN, F. *Ex situ* conservation of plant germoplasm using biotechnology. **Word Journal of Microbiology & Biotechnology**. V. 11, p. 375 - 382, 1995.

HIND, N.; BIGGS, N. *Acmella oleracea* : Compositae. **Curtis's Botanical Magazine**, vol. 20, n. 01, pág. 31 – 39, 2003.

HU, C. Y.; WANG, P. J. Meristem, shoot tip and bud culture. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. V.; UAMADA, Y.: Handbook of plant cell culture: techniques for propagation and breeding. New York, Macmillan, 1983, p.117-227. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: **EMBRAPA**, 1998. v.2, 864p.

JAIN, S. K.: Estimation of outcrossing rates: some alternative procedures. **Crop Science**. v. 19, p. 19 - 23, 1979.

JANSEN, R. K. Systematics of *Spilanthes* (Compositae : Heliantheae). **Systematic Botany**, vol. 6, p. 231 – 257. Retirado de < <http://plants.usda.gov> >, em 07 de julho de 2006.

JOLY, A. B. **Botânica: Introdução à taxonomia vegetal**. São Paulo: Companhia Nacional LTDA, 1993, 777 p.

JURANDYR, L.; SANCHES R. (org.). **Geografia do Brasil**. São Paulo: EDUSP, 1996. v. 3, 546p. Bibliografia: p.126 - 207.

KADOTA, M.; IMIZU, K.; HIRANO, T. Double-phase *in vitro* culture using sorbitol increases shoot proliferation and reduces hyperhydricity in Japanese pear. **Scientia Horticulturae**, v. 89, p. 207 - 215, 2001.

KAGEYAMA, P. Y.; GANDARA, F. B. Conseqüências genéticas da fragmentação sobre populações de espécies arbóreas. **Série Técnica IPEF**. v. 12, n. 32, p. 65-70, 1998.

KERBAUY, G. Cultura de raízes e regeneração de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A.: **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, 1998. v. 2, 864p.

KRIKORIAN, A. D. Cloning higher plants from aseptically cultured tissues and cell. **Biology Revision**. v. 57, p. 151 - 218, 1982.

LAMEIRA, O.A.; COSTA, M.P.; PINTO, J.E.B.P. The efficiency of shoot and plantlet formation of *Cephaelis ipecacuanha* after three subcultures *in vitro*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 24, n. 3, p. 523-526, 1994.

LATA, H. *In vitro* conservation of tropical plant germoplasma, a review. **Euphytica**, **Netherlands journal of plant breeding**, Mississippi. v. 57, p. 227 - 243, 1991.

LEITE, G. B. 1995. Efeito de reguladores de crescimento, substrato, sacarose e intensidade luminosa na micropropagação de pereira (*Pyrus communis* L.) cv. Bartlett e do clone OH x F97. Pelotas, UFPEL, 50p.

LEMOS, E. E. P.; BAKER, D. Shoot regeneration in response to carbon source on internodal explants of *Annona muricata* L. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht. v. 25, p. 105 – 112, 1998.

LEMOS, E. E. P.; FERREIRA, M. S.; ALENCAR, L. M. C.; ALBUQUERQUE, M. M.; RA MALHO NETO, C. E. Conservação *in vitro* de germoplasma de cana-de-açúcar. *Pesquisa agropecuária brasileira*, Brasília. v. 37, n. 10, p. 1359 – 1364, 2002.

LEHNINGER, A.; COX, N.; KAY Y. **Princípios de Bioquímica**. 4ª. Ed., Editora Sarvier : Rio de Janeiro, 1232 p, 2006.

LEVIS-STRAUSS, C. A ciência do concreto. In: **O pensamento selvagem**. Campinas, Papirus Editora, 1989. p. 15-50.

LEWIS, W. H.; ELVIN-LEWIS, M.; KENNELLY, E. J.; GNERRE, M. C. **Mapas de distribuição geográfica de *Acmella oleracea* (L.) R. K. JANSEN.**, 1988. Retirado de < [http://www.mobot1.mobot.org/website/map\\_post.asp](http://www.mobot1.mobot.org/website/map_post.asp) >, em 14 de outubro de 2006.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A.; **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas.** Nova Odessa : Instituto plantarum de estudos da Flora LTDA, 2002, 512p.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Combd. Pro. Intl. Plant Prop. Soc., (SO)**, v. 30, p. 421 - 427, 1980.

LU, C. Y. The use of thidiazuron in tissue culture. **Vitro cell development biology.** v. 29, n. 2, p. 92 - 96, 1993.

MACIEL, A. L. R.; SILVA, A. B.; PASQUAL, M. Aclimação de plantas de violeta (*Saintpaulia ionantha* wendl) obtidas *in vitro*: efeitos do substrato. **Ciências Agrotecnológicas.** v. 24, n. 1, p. 9 – 12, 2000.

MALOSSO, M. G.; BATISTININ, A. P.; BERTONI, B. W.; FRANÇA, S. C.; PEREIRA, A. M. S. Otimização do protocolo de micropropagação de *Jacaranda decurrens* CHAM. em biorreatores do tipo R. I. T. A. Livro de Resumos do VIII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil. Editora do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia : Amazonas, 2004. 555 p.

MAO, A. H.; WETTEN, A., FAY, M.; CALIGARI, P. D. S. *In vitro* propagation of *Clerodendrum colebrookianum* Walp; a potential natural anti-hypertension medicinal plant. **Plant Cell Reports**. v. 14, p. 493 – 496, 1995.

MENDONÇA, V.; ARAÚJO NETO, S. E. A.; RAMOS, J. D.; PIO, R.; GONTIJO, T. C. A. Diferentes substratos e recipientes na formação de mudas de mamona (*Sunrise solo*). **Revista Brasileira de fruticultura**. v. 25, m. 1, 2003.

MORS, W. B. Plantas Medicinais. **Ciência Hoje**. v. 1, n. 3, p. 51 - 54, 1982.

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

NAIR, M. G.; RAMSEWAK, R. S.; ERICKSON, A. J. Bioactive N-isobutylamides from the flower buds of *Spilanthes acmella*. **Phytochemistry**, v. 51, 729 – 732 p., 1999.

NEIMAN, Z. Era verde? Ecossistemas Brasileiros Ameaçados. **Editora Atual** : São Paulo, 1989, 103 p.

NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. Biodiversidade: Aspectos biológicos, Geográficos, Legais e Éticos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. 1ª Edição, Florianópolis/Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e Editora da Universidade Federal de Santa Catarina, 1999, p. 11-24.

NÚÑEZ, C.; CANTERO, J. J. Las plantas medicinales del sur de la provincia de Cordoba. **Editorial de la Fundación Universidad Nacional de Río Cuarto**, 2000.

Capítulo: Las plantas medicinales y el hombre. 6p. Bibliografía: p. 18 e 19.

OLIVEIRA, R. P. & SILVA, S. O. Avaliação da micropropagação comercial em bananeira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 32, n. 4, p. 415 – 420, 1997.

PASQUAL, M.; RAMOS, J. D.; HOFFMANN, A.; CARVALHO, G. R. Meios de Cultura. Editora da UFLA : Lavras, 127 p, 1997.

PEREIRA, A. M. S.; BERTONI, B. W.; CÂMARA, F. L. A.; DUARTE, I. B.; QUEIROZ, M. E. C.; LEITE, V. G. M.; MORAES, R. M. CARVALHO, D.; FRANÇA, S. C. Co-cultivation of plant cells as a technique for the elicitation of secondary metabolite production. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands. v. 60, p. 165 -167, 2000 b.

PEREIRA A. M. S.; BERTONI, B. W.; GLÓRIA, B. A.; ARAÚJO, A. R. B.; JANUÁRIO, A. H.; LOURENÇAO, M. V. & FRANÇA, S. C. Micropropagation of *Pothomorphe umbellata* via direct organogenesis from leaf explants. **Plant cell, tissue and organ culture**. v. 60, p. 47 – 53, 2000.

PEREIRA, A. M. S.; BERTONI, B. W.; PEREIRA, P. S.; JANUÁRIO, A. H.; FRANÇA, S.C.; LANCHONETE, V. L.; QUEIROZ, R. H. C.; CERDEIRA, R. M. M. The effect of *in vitro* co-cultivation of *Cephaelis ipecacuanha*, *Eclipta Alba* and *Oryza*

*sativa* on plant development and yield of emetine, wedeloctane and demethylwedelolactona. **Acta Horticulturae S. I.**, v. 502, p. 307 - 3111, 1999.

PEREIRA, A. M. S. ; MORO, J. R. ; CERDEIRA, R. M. M. ; FRANÇA, S. C. . Effect of phytohormones and physiological characteristics of the explants on micropropagation of *Maytenus ilicifolia*. **Plant, cell, tissue & organ culture**. vol. 42, n. 3, p. 295-297, 1995.

PEREIRA, J. E. S.; FRANÇA, R. B.; DANTAS, A. D. M.; FORTES, G. R. L. Influência do número de gemas, presença ou ausência de folhas e posição do explante na multiplicação *in vitro* de batata. **Hortic. Bras.** Vol. 23, n. 1, 2005.

PEREIRA, J. E. S.; FORTES, G. R. L. Multiplicação e aclimação da macieira influenciada pelo tipo de explante e pelo tempo de permanência em meio de cultura de enraizamento. **Revista Brasileira de Fruticultura**. vol. 23, n. 2, p. 417 – 420, 2001.

PEREIRA, J. E. S.; FORTES, G. R. de L.; SILVEIRA, A. O. Efeito da densidade de inoculação na multiplicação “*in vitro*” da batata. **Horticultura brasileira, S.I.** v. 18, p. 180 - 182, 2000 a.

PÉREZ, P. A. O.; GONZÁLES, E. A. J.; PEÑALVER, D. A. Aumento de la eficiencia en la micropropagación. In PÉREZ PRONCE, J. N. Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Cuba: **Instituto de Biotecnología de plantas**, 1998. p. 179 – 191.

PHILIPSON, J. D. New drugs from nature – I could be Yew. **Phytoteraphy Research**. v. 13, p. 2 - 8, 1999.

PREECE, J.E.; IMEL, M. R. Plant regeneration from leaf explant of *Rhododendron* P. J. M. Hybrids. **Scientia horticultrae**, v. 48, n 1-2, p. 159 - 170, 1991.

PRIMACK, R. B. & RODRIGUES E. **Biologia da Conservação**. Editora Planta : Londrina, 2005, 327 p.

RAMSEWAK, R. S.; ERICKSON, A. J.; NAIR, M. G. Bioactive *N*-isobutiylamides from the flower buds of *Spilanthes acmella*. **Phytochemistry**. vol 51, p. 728 – 732, 1999.

REIS, E. S.; PEREIRA-PINTO, J. E. B.; CORREA, R. M.; BERTOLUCCI, S., K., V.; LAMEIRA, O. A. Tamanhos e posições de explantes e volumes de meio de cultivos na multiplicação de Ipeca (*Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stocks) *in vitro*. **Cienc. Agrotec**. vol. 28, n. 3, p. 703 – 709, 2004.

REVILLA, J. Cultivando a saúde em hortas caseiras e medicinais. **Editora SEBRAE/INPA** : Manaus, 101 p, 2004.

REVILLA, J. **Plantas da Amazônia: Oportunidades Econômicas sustentáveis**. Manaus : INPA, 405p, 2001.

RICKETTS, T. H.; DINERSTEIN, E.; BOUCHER, T.; BROOKS, T. M.; BUTCHART, S. H. M.; HOFFMANN, M.; LAMOREUX, J. F.; MORRISON, J.; PARR, M.; PILGRIM, J. S.; RODRIGUES, A. S. L.; SCHREST, W.; WALLACE, G. E.; BERLIN, K.; BIELBY, J.; BUGESS, N. D.; CHURCH, D. R.; COX, N.; KNOX, D.; LOUCKS, G.; LUCK, G. W.; MASTER, L. L.; MOORE, R.; NAIDOO, R.; RIDGELY, R.; SCHATZ, G. E.; SHIRE, G.; STRAND, H.; WETTENGEL, W.; WIKRAMANAYAKE, E. Pinpointing and preventing imminent extinctions. **PNAS**, v. 102, n. 51, p. 18497 – 18501, 2005.

ROCA, W. M. El Cultivo de Tejidos Vegetales para la Conservación y el Intercambio Internacional sobre Métodos de cultivo de Tejidos Vegetales Y sus aplicaciones en Agricultura. Tucuman, Argentina. Universidade de Tucuman, 1983. In: VILLASLOBOS, V. M.; ENGELMANN, F. Ex situ conservation of plant germoplasm using biotechnology. **Word Journal of Microbiology & Biotechnology**. v. 11, p. 375 - 382, 1995.

ROJAS, S.; GARCIA, J.; ALARCON, M. Propagación vegetativa, conceptos básicos y experiencias con especies amazônicas. **Corpoica**. 56 p, 2004.

ROUT, G. R.; SAMANTARAY, S.; DAS, P. *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants. **Biotechnology advances**. v. 18, p. 91 – 120, 2000.

SABÁ, R. T.; LAMEIRA, O. A.; LUZ, J. M. P.; GOMES, A. P. R.; INECCO, R. Micropropagação de Jaborandi. **Hortic. bras.**, v. 20, n. 1, p. 106 – 109, 2002.

SALGADO, S. M. L.; CUNHA, R. L.; NIELLA, G. R.; TEIXEIRA, R.; PASQUAL, M. Efeito da utilização do TDZ e do Benomil na micropropagação do crisântemo (*Dendranthema morifolium*). **Cienc. Agrotec.** v. 25, n. 2, p 274-280, 2001.

SANTOS, I. R. I. Criopreservação de Germoplasma Vegetal. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento.** v. 20, p. 60 – 65, 2001.

SÃO JOSÉ, A. R.; SOUZA, I. V. B.; DUARTE FILHO, J.; LEITE, M. J. N. Formação de mudas de maracujazeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, SP. v. 25, n. 1, p. 127 – 130, 1998.

SATAKE, M. Medicinal Plant in the Andes and the Amazon. **Foods Food Ingredients J. Japan**, n. 200, p. 103-114, 2000.

SEGOVIA, V.; SANCHEZ, I.; MEIJA, A.; ROCA, W. M.; LENTINI, Z.; Micropropagación y regeneración de lulo (*Solanum quitoense*) por organogénesis. Informativo. CIAT, 2003

SERAFINI, L.A.; BARROS, N. A.; AZEVEDO, J. L. Biotecnologia na agricultura e na agroindústria. **Agrishow : Guaíba**, 2001, 463 p.

SILVA, R. P.; COSTA, M. A. P. C.; SOUZA, A. S.; ALMEIDA, W. A. B. Regeneração de plantas de laranja pêra via organogênese *in vitro*. **Revista de Pesquisa Agropecuária Brasileira.** v. 40, n. 12, p. 1153 – 1159, 2005.

SILVA, R. P.; PEIXOTO, J. R.; JUNQUEIRA, N. T. V. Influência de diversos substratos no desenvolvimento de mudas de maracujazeiro-azedo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* DEG), 2001. In: MENDONÇA, V.; ARAÚJO NETO, S. E.; RAMOS, J. D.; PIO, R.; GONTIJO, T. C. A. Diferentes substratos e recipientes na formação de mudas de mamona (*Sunrise solo*). **Revista Brasileiro de Fruticultura, Jaboticabal**, SP. v. 25, n.1, p. 127 – 130, 2003.

SIMÕES S. **Mudas**. Piracicaba : FEALQ, 1998, 760p.

SKIDMORE, D. I.; SIMON, A. J.; Bedis, I. *In vitro* culture of shoots of *Pinus caribaea* on a liquid medium. **Plant cell, tissue and organ culture**, Netherlands, v. 14, p. 129 - 136, 1988.

SOUZA, J. C.; ROCHA, M. V.; ALVES, G. C.; CACAU, J. B.; CORREIA, D.; CARVALHO JÚNIOR, A. T. Efeito das citocininas thidiazuron e benzilaminopurina na multiplicação de gemas *in vitro* de abacaxizeiro (*Ananas comosus* cv. Cayenne Champac). **Relatório Técnico**. EMBRAPA. 6 p. 2004.

TEISSON, C.; ALVARD, D. A new concept of plant *in vitro* cultivation liquid medium: Temporary immersion. **Current issues in plant molecular and cellular biology**, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 1998. p. 105-110.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, 1998. v. 1, 509 p.

TORRES, K. C. **Tissue culture techniques for horticultural crops**. New York : Chapman & Hall, 1989, 285 p.

TOWILL, L. E. Germoplasm preservation. In: TRIGIANO, R. N. and GRAY, D. J.: *Plant tissue culture concepts and laboratory exercises*. 2000. 2ª Edição, **CRC Press**, Boca Raton, p. 337-353.

VIEIRA, R.F. Conservação de recursos genéticos de plantas medicinais e aromáticas brasileiras: um desafio para o futuro. **Acta Horticulturae**. V. 569, p. 61 - 68, 2002.

VILLALOBOS, V. M.; ENGELMANN, F.: Ex situ conservation of plant germoplasm using biotechnology. **Word Jornal of Microbiology& Biotecnology**. v. 11, p. 375 - 382, 1995.

WITHERS, L. A.; WILLIAMS, J. T. Conservação *in vitro* de Recursos Genéticos de Plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: **Embrapa-SP/Embrapa-CNPQ**. v. 1, p. 297 - 330, 1998.

YUE, D.; GOSSELIN, A.; DESJARDINS, Y. Re-examination of the photosynthetic capacity of *in vitro* cultured strawberry plantlets. **Journal of American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 118, n. 3, p. 419 -424, 1993.

ZANDIVORT, E. A.; STARITSKY, G. *In vitro* genebanks of tropical aroids – Research of storage conditions. In: SIMERS, D. A.; GENGENBACH, B. G.; BIESBOER, D. D. HACKETT, W. P.; GREEN, C. E. (Eds) Abst. 6<sup>th</sup> Intl. Cong. Plant Tissue and Cell Culture, Minneapolis, 426p., 1986. In: LATA, H. *In vitro* conservation of tropical plant germoplasm, a review. **Euphytica, Netherlands journal of plant breeding**, Mississippi. v. 57, p. 227 - 243, 1991.

ZIMMERMAN, R. H. Micropropagation of woody plants: post tissue culture aspects. **Acta Horticulturae**, Maryland, n 227, p. 489 – 499, 1988.