

**Universidade Federal de Minas Gerais**  
**Instituto de Ciências Agrárias**  
Campus Regional Montes Claros

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

AGRONOMIA



**ALOÍZIO PELINSON PEREIRA GOMES**

**ASSEPSIA E GERMINAÇÃO IN VITRO DE ARNICA**

*(Lychnophora salicifolia Mart.)*

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Instituto de  
Ciências Agrárias da Universidade  
Federal de Minas Gerais, como  
requisito parcial, para a obtenção  
do título de Bacharel em  
Agronomia.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Claudineia  
Ferreira Nunes

Montes Claros

2021

Dedico aos meus pais, José  
Aloisio Gomes e Rosane  
Pereira Gomes.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pela minha existência.

A Professora Dra. Claudineia Ferreira Nunes, pela oportunidade e pela paciência no acompanhamento do presente trabalho.

Aos meus pais José Aloisio Gomes e Rosane Pereira Gomes, a minha irmã Cristiane Duarte e a minha namorada Jéssica Leite Batista, que foram as pessoas que me incentivaram sempre.

Aos amigos Gleidson Rocha dos Reis e Élcio Inácio Mota, que passaram por situações semelhantes à minha, aliviando os momentos de solidão, distância da família e de pessoas amadas.

## RESUMO

O cultivo *in vitro* é considerado uma ferramenta importante para a propagação de espécies nativas, porém, definir padrões de assepsia e condições favoráveis para a fase inicial *in vitro* é uma tarefa difícil e que requer estudos. Nesse sentido, o objetivo do trabalho foi definir um protocolo para o estabelecimento e germinação de aquênios de *Lychnophora salicifolia* Mart. e avaliar o seu potencial *in vitro*. Os aquênios foram coletados de cerca de 30 indivíduos nos meses de outubro e novembro do ano de 2019, na região da Comunidade Rural Lagoa de Freitas, distante 30 Km de Montes Claros, MG. Foram realizados os seguintes experimentos: (1) concentrações de hipoclorito de sódio (2%, 4% e 6%) e meios de cultura (Simples e ¼ MS), em dois ambientes (BOD e estufa), conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em ensaio fatorial 3 x 2 x 2, sendo 60 aquênios por tratamento, totalizando 720 aquênios. (2) meios de cultura (Simples e ¼ MS) combinados com concentrações de sacarose (30, 45 e 60 g L<sup>-1</sup>), conduzido em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 3, com 60 repetições por tratamento, totalizando 360 aquênios. As avaliações foram realizadas diariamente após o estabelecimento e foram finalizadas após 60 dias, com verificação de contaminação e germinação dos aquênios. Aquênios de *L. salicifolia* não são influenciados por ambiente com luz natural ou artificial no que se refere a contaminação e germinação. As concentrações de hipoclorito de sódio testadas não promovem uma assepsia eficiente nos aquênios de *L. salicifolia*. O estabelecimento de aquênios de *L. salicifolia* não é

influenciado por meio de cultura, seja meio simples ou ¼ MS. Para as condições estudadas não foi possível avaliar o potencial *in vitro* dos aquênios de *L. salicifolia*

**Palavras-chave:** Arnica. Espécie Nativa. Estabelecimento *in vitro*. Contaminação.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1 Medição de temperaturas máximas e mínimas fora e dentro da estufa no viveiro de produção de mudas...20
- FIGURA 2 Imagem da planta *Lychnophora salicifolia* na área de coleta destacando sua arquitetura (A), destaque da floração e potencial ornamental (B), aquênios com a cavidade embrionária preenchida pela semente e aquênio com ausência de semente (C), estufa montada para a avaliação da luz natural no cultivo *in vitro* (D), Aquênio em fase de germinação (E) e plântula de *Lychnophora salicifolia* (F).....23
- FIGURA 3 Meios de cultura 1/4 MS e simples na germinação de aquênios de *Lychnophora salicifolia* Mart em BOD.....26
- FIGURA 4 Doses de hipoclorito de sódio na porcentagem de contaminação e na germinação de aquênios de *Lychnophora salicifolia* Mart em BOD.....28
- FIGURA 5 Doses de sacarose na porcentagem de contaminação e na germinação de aquênios de *Lychnophora salicifolia* Mart em BOD.....30
- FIGURA 6 Influência da sacarose e do meio de cultivo na porcentagem de germinação de aquênios de *Lychnophora salicifolia* Mart.....30

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Ambiente natural (Luz Natural) e luz artificial (BOD) - na porcentagem de contaminação de aquênios de <i>Lychnophora salicifolia</i> Mart.....	25
TABELA 2	Meios de cultura 1/4 MS e simples na porcentagem de - contaminação de aquênios de <i>Lychnophora salicifolia</i> Mart.....	25
TABELA 3	Meios de cultura e concentração de sacarose na porcentagem de contaminação de aquênios de <i>Lychnophora salicifolia</i> Mart em BOD.....	29

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>9</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>11</b>
2.1 Cerrado e a flora dos Campos Sujos.....	11
2.2 Asteraceae.....	12
2.3 <i>Lychnophora salicifolia</i> .....	13
2.4 Cultivo <i>in vitro</i> : Uma alternativa para a propagação das <i>Lychnophoras</i> .....	15
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>18</b>
3.1 Área de estudos.....;;	18
3.2. Material vegetal.....	18
3.3 Assepsia e Germinação.....	19
3.3.1 Experimento 1: Assepsia.....	19
3.3.2 Experimento 2: Meios de cultura e Sacarose.....	21
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>24</b>
<b>5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>34</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>35</b>

## 1. INTRODUÇÃO:

A espécie *Lychnophora salicifolia* Mart. é uma planta endêmica do Brasil, da fitofisionomia do Cerrado, conhecida como Arnica, pertencente à família Asteraceae, tribo Vernonieae (GOUVEA *et al.*, 2014). É uma espécie popular no uso como analgésico e anti-inflamatório (GOUVEA, 2013). A *L. salicifolia* compõem a flora dos campos sujos do Cerrado e pode ser considerada uma planta com possibilidades para seu cultivo e para o uso no paisagismo na região do norte de Minas Gerais, devido ao seu potencial ornamental.

As espécies nativas despertam interesse de paisagistas, sendo essa considerada uma tendência o seu uso (KLINK; MACHADO, 2005), por serem adaptadas ao clima e pela economia com despesas de manutenção e irrigação (HEIDEN *et al.*, 2006). Como exemplo temos a *Lychnophora salicifolia*, pela sua arquitetura, beleza de suas flores e principalmente pela sua rusticidade. Além de poder favorecer o embelezamento de áreas verdes nas cidades, também permite a valorização da biodiversidade local ajudando na conservação das espécies nativas. Segundo Goebel *et al.* (2019), pode ser criado um vínculo entre as ruas que cortam uma cidade com as áreas naturais do entorno, contribuindo com a proteção da fauna e flora ao se utilizar espécies nativas com a finalidade de ornamentação urbana.

Estudos mostram que as plantas do gênero *Lychnophora* possui reprodução sexual complexa devido à existência de sementes sem embriões ou aquênios vazios ou malformados, além da baixa viabilidade de aquênios (SOUZA *et al.*, 2007), podendo a propagação

*in vitro* ser uma alternativa para o estabelecimento de mudas dessa espécie. A germinação *in vitro* pode ser utilizada para promover a propagação de várias espécies, sendo realizada em condições controladas e em meio de cultura capaz de fornecer nutrientes adequados para o estabelecimento das plântulas, além de ser uma técnica aplicada para espécies com dificuldades de propagação convencional.

Ainda pouco se conhece a respeito do estabelecimento e germinação em condições laboratoriais da espécie, justificando assim a execução do trabalho proposto. Sendo assim, é de nosso interesse a definição de um protocolo para o estabelecimento e germinação de aquênios da *L. salicifolia*, com o intuito de promover seu cultivo em condições laboratoriais, mas com a expectativa de em um futuro breve produzir mudas micropropagadas, oriundas de plântulas *in vitro*, possibilitando assim, o aproveitamento econômico da espécie.

No entanto, é importante destacar que para o sucesso da germinação *in vitro*, o primeiro passo é a definição de protocolo de assepsia. Essa prática pode ser fundamental para a promoção da germinação, além da atenção com a condição de cultivo como luz, natural ou artificial, meios de cultura e concentrações de sacarose.

Diante disso, o objetivo do trabalho foi definir um protocolo para o estabelecimento e germinação de aquênios de *Lychnophora salicifolia* Mart. e avaliar o potencial *in vitro* dessa espécie.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO:

### 2.1. Cerrado e a flora dos Campos Sujos:

Ocupando dentro do território brasileiro aproximadamente 23% com uma área de 2.000.000 km<sup>2</sup>, o Cerrado é considerado um dos maiores biomas nacionais (FRANCO *et al.*, 2017). Localizado na porção central do território brasileiro, onde já ocorreram grandes alterações em aspectos ambientais, nas características naturais da paisagem e dos avanços tecnológicos da agricultura (ROCHA, 2012).

Esse bioma contém uma biodiversidade considerável no planeta, considerada como um dos 34 *hotspots* por ser uma das savanas mais ameaçadas (GANEM *et al.*, 2013). Possui altos níveis de endemismo (KLINK; MACHADO, 2005), contendo cerca de 4.400 espécies endêmicas entre as 11.000 espécies vegetais caracterizadas pelas folhas grossas, cascas espessas, ramos retorcidos, troncos tortuosos e porte baixo, apresentando tanto campos abertos quanto florestas densas, apresentando associações intermediárias em uma diversidade de formas fisionômicas (MEDEIROS, 2011).

O endemismo desse bioma ocorre de forma específica devido à necessidade de adaptação à diferentes formações, em uma transição entre cerrado de altitude e campos rupestres (RODELA, 1998). O tipo de planta que abita essa região suporta elevada irradiância e ventos fortes (SILVEIRA *et al.*, 2016), são resistentes à seca e toleram dessecação (CONCEIÇÃO *et al.*, 2007).

Nas fisionomias extremas do Cerrado estão o cerradão e o

campo limpo, e entre eles estão os ecótonos conhecidos como campo sujo e campo cerrado e cerrado *sensu stricto* (COUTINHO, 1978). A característica fisionômica de campo sujo é uma cobertura herbácea densa onde habitam plantas subarbustivas, arbustivas e arbóreas de porte pequeno em populações menores (TANNUS; ASSIS, 2004). O campo sujo é um ecótono composto de elementos tanto florestais quanto campestres (COUTINHO, 2002).

Esses ambientes também possuem um grande valor paisagístico (MARTINELLI, 1996). O Cerrado é dotado de uma beleza natural rustica, possuindo muitas espécies que apresentam potencial ornamental, mas que não são utilizadas no paisagismo, por serem plantas desconhecidas pela população, mas que são excelentes para o cultivo em regiões como o norte de Minas que sofre com a falta de chuvas. Entretanto, vem aumentando atividades como mineração e plantações de eucalipto nessas áreas em Minas Gerais (VASCONCELOS, 2014).

## 2.2. Asteraceae:

Segundo Andenberg *et al.* (2007), Asteraceae é uma família representativa de plantas que compreendem aproximadamente de 1.600 gêneros e 23.000 espécies. As plantas da família Asteraceae são muito encontradas em regiões pedregosas, considerando-se uma importante família do bioma Cerrado (BFG, 2015), e conhecidas por sua importância econômica, medicinal e ornamental (AMORIM; BAUTISTA, 2016), caracterizadas por pequenas flores dispostas em

um receptáculo com inflorescência em capítulo racemoso e rodeada por brácteas e pela presença de aquênios com pappus (FUNK *et al.*, 2009).

Várias espécies do gênero *Lychnophora* possuem ampla distribuição no país e são conhecidas por serem empregadas em medicamentos para doenças inflamatórias (BASTOS *et al.*, 1987). São muito conhecidas em relação à composição química presente, havendo muita atividade biológica favorável para o desenvolvimento de fármacos (ZOMLEFER, 1994).

A arnica da serra (*Lychnophora ericoides*) sofre com extrativismo desde o século XVIII, por apresentar eficácia terapêutica, e suas populações diminuíram muito (BASTOS *et al.*, 1987). A arnica (*Lychnophora pinaster* Mart), se encontra ameaçada devido a seu extrativismo associado a queimadas, fazendo com que a espécie se torne uma planta vulnerável (SBB, 1992). Devido à dificuldade de ocorrer enraizamento e reprodução sexuada, é alvo de exploração extrativa de forma excessiva das plantas silvestres (SOUZA *et al.*, 2007).

### 2.3. *Lychnophora salicifolia*:

A arnica (*Lychnophora salicifolia* Mart.) é uma espécie nativa, de importância ecológica e medicinal. Gouvea *et al.*, (2014) relatam que suas folhas são utilizadas para aromatizar cachaça. Muitas espécies vegetais do Cerrado, entre elas a *L. salicifolia*, possuem um grande potencial ornamental, mas não são utilizadas no paisagismo, por serem plantas desconhecidas pela população, mas que são excelentes para o cultivo em regiões como o norte de Minas que sofre com a falta de

chuvas. Segundo Cavalcante *et al.* (2017), isso fortalece as identidades regionais e incentiva a conservação *ex situ*.

A floração de *Lychnophoras* (FIGURA 1B) ocorrem de agosto a outubro e a dispersão dos frutos entre os meses de dezembro a fevereiro (SEMIR, 1991). Devido à existência de aquênios sem sementes (FIGURA 1C) e à baixa viabilidade de aquênios, a reprodução sexual de *Lychnophoras* é complexa, o enraizamento é muito difícil e a planta tolera apenas serem transplantadas para solo nativo, com pouca taxa de sobrevivência em outros tipos de substratos. De acordo com Haridasan (2000), algumas questões devem ser esclarecidas quanto à aptidão das espécies nativas do cerrado quando submetidas à maior disponibilidade de nutrientes, devido à sua adaptação em solos de baixa fertilidade.

A propagação *in vitro* pode ser uma alternativa para superar a baixa germinação de aquênios (SOUZA *et al.*, 2007). A *L. salicifolia* apresenta problemas como maturação irregular dos aquênios, que podem ser caracterizados como cheios, vazios e malformados. Existe um grande potencial nas técnicas de germinação *in vitro*, visando a propagação em maior escala da espécie, possibilitando a conservação com o seu cultivo *in vitro* estabelecido. Sendo assim, se torna importante para a conservação das espécies do Cerrado e para o conhecimento sobre a biologia reprodutiva (PEREIRA *et al.*, 2005).

#### 2.4. Cultivo *in vitro*: uma alternativa para a propagação das *Lychnophoras*:

O cultivo *in vitro* é uma alternativa para se obter mudas de *L. salicifolia*, pois em condições laboratoriais é possível oferecer condições físicas e químicas com o intuito de superar algumas dificuldades na propagação *ex situ*, na tentativa de promover o crescimento da cultura em questão e obter mudas com características satisfatórias.

Devido ao fato de que existe a possibilidade de crescimento de microrganismos no meio de cultivo, é muito importante que se realize a desinfestação superficial, com a utilização de hipoclorito de sódio (NaOCl) em uma concentração entre 0,5 a 3%, conforme as condições o explante se encontra, e um tempo de imersão no álcool entre 10 a 30 minutos. Para se manter a esterilidade é muito importante manter as condições assépticas na manipulação do material (LAMEIRA *et al.*, 2000).

O processo de propagação *in vitro* encontra dificuldades muitas vezes na contaminação do material na fase inicial do cultivo, e no estabelecimento. Pasqual *et al.* (2012) reforçam o uso de desinfestação química do material vegetal, utilizando compostos como álcool, hipoclorito de sódio, fungicidas, ácido sulfúrico e outras formas. O tempo de exposição do material vegetal ao produto desinfestante também influencia no processo de limpeza e de redução ou eliminação dos organismos contaminantes (FERREIRA *et al.*, 2009). Gonzaga *et al.* (2021) observaram que o uso de hipoclorito de sódio em

*Lychnophora pohlii* na concentração de 5% reduziu em 63% a contaminação do material vegetal. Por outro lado, Cavalcante *et al.* (2018) reforçam que o uso de desinfestação de material vegetal deve ser estudado a fim de se obter uma concentração e tempo de imersão que não seja tóxica para o embrião e diminua a germinação.

Para cada espécie a germinação ocorre por meio de processos fisiológicos dependentes de alguns fatores ambientais (NASSIF *et al.*, 2004), tais como temperatura, luminosidade e umidade, que podem atuar separados ou combinados, influenciando no tempo de germinação (BASKIN; BASKIN, 1988).

Algumas pesquisas afirmam que a utilização de luz natural pode aproximar cultivo *in vitro* padrão do sistema fotoautotrófico, tornando possível que plantas cultivadas *in vitro* ampliem sua taxa fotossintética devido à maior densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (KODYM; ZAPATA-ARIAS, 1998; KOZAI *et al.*, 1997).

Praticada por alguns pesquisadores, nos possibilita contemplar os resultados da aplicação do cultivo de plântulas *in vitro* em ambiente de luz natural, ao invés da luz artificial. A luz natural pode ser favorável quanto às modificações anatômicas e fisiológicas, observadas no crescimento de plantas *in vitro*, buscando melhoramento dos atributos fisiológicos em virtude do ambiente de cultivo ser similar ao natural, propiciando a adaptação das plantas quando transplantadas para condições *ex vitro* (BORGES *et al.*, 2016).

As despesas com iluminação em sala de crescimento em laboratórios de cultura de tecidos é um outro fator que também deve ser levado em consideração, por ser um dos maiores custos com a produção

de mudas, sendo superado somente pelas despesas com a mão de obra (ERIG; SCHUCH, 2005). Tornando o custo de produção menor ao substituir a luz artificial de salas de crescimento pela aplicação de luz natural (DIGNART *et al.*, 2009).

Outro fator que influencia no crescimento *in vitro* de plântulas é o uso de sacarose. A sacarose é fonte de carboidratos e auxilia nos mecanismos de crescimento e desenvolvimento das plântulas, como a fotossíntese e respiração (TEIXEIRA *et al.*, 2005). Roni *et al.* (2018) estudaram o efeito da concentração de sacarose em cultivo *in vitro* de *Eustoma gradifolium*, e verificaram que na maior concentração de sacarose 3% no meio ½ MS houve maior velocidade de germinação. O uso de meios de cultura com menor força (½ MS e ¼ MS) proporcionam a plântula efeito positivo, isso porque em meios com força total a concentração de sais pode alterar o potencial osmótico do meio de cultivo (CLAEYS *et al.*, 2014). Souza *et al.* (2007) estudaram o cultivo *in vitro* de *Lychnophora pinaster* Mart. e o meio ¼ MS obteve maior porcentagem de germinação (68%).

De forma geral, o estabelecimento de protocolos de germinação *in vitro* de plantas é de grande importância para conhecer a melhor forma e planejamento de produção de mudas da espécie em estudo.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS:

#### 3.1. Área de estudo:

O experimento foi conduzido no Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, localizado em Montes Claros. O clima da região, de acordo com a classificação de Köppen é Aw, definido como clima tropical e com temperatura média anual de 22.7 °C (CLIMATE-DATA.ORG, 2019)

#### 3.2. Material vegetal:

As inflorescências contendo os aquênios foram coletadas de cerca de 30 indivíduos nos meses de outubro e novembro do ano de 2019, após o início do período de chuva, na região da Comunidade Rural Lagoa de Freitas-MG, que fica cerca de 30 km de Montes Claros, coordenadas 16°52'43.0"S 44°09'10.1"W e altitude de 946 m. No Herbário Norte Mineiro no Instituto de Ciências Agrárias (ICA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) os aquênios foram individualizados das inflorescências e descartados os que apresentavam aparência de queimados, chochos ou danificados e a exsicata da planta matriz foi incorporada ao Herbário Norte Mineiro sob o número MCCA 3273.

O material selecionado foi agrupado em uma amostra composta e armazenada em saco de papel kraft em temperatura ambiente até o início dos experimentos. O primeiro experimento foi implantado para

testar protocolo de assepsia e cultivo *in vitro* em meio de cultura com  $\frac{1}{4}$  dos sais do MS e meio simples e dois ambientes (câmara BOD e estufa). O outro experimento foi realizado para testar meio de cultura e concentração de sacarose para a germinação dos aquênios, como se segue abaixo.

### 3.3. Assepsia e Germinação:

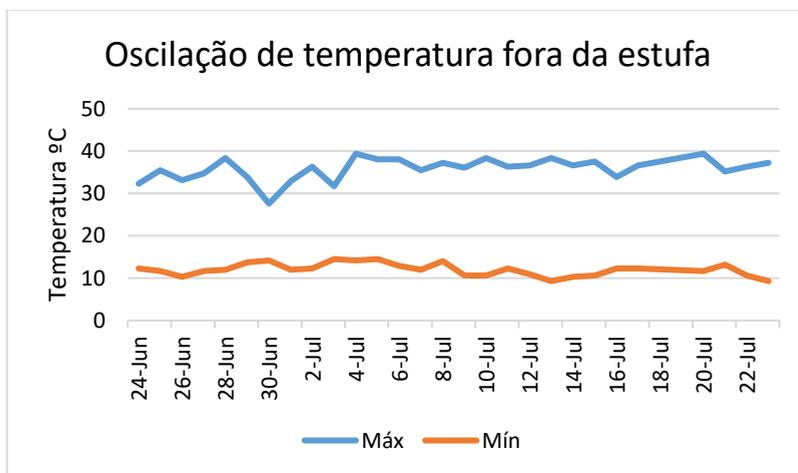
#### 3.3.1. Experimento 1 – Assepsia:

O experimento para testar protocolo de assepsia foi realizado em ambiente externo (estufa com o uso de luz natural) e em laboratório com o uso de câmara de germinação do tipo BOD com temperatura de 25°C e fotoperíodo de 16 horas. Foram aplicados os seguintes tratamentos: concentrações de hipoclorito de sódio (2,0%, 4,0% e 6,0%) e meios de cultura (Simples e  $\frac{1}{4}$  MS). O meio considerado Simples foi constituído de água+ágar+sacarose 3% e o meio  $\frac{1}{4}$  MS, correspondendo a 25% ( $\frac{1}{4}$ ) das concentrações salinas do meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962). Essa concentração foi escolhida pois proporcionou resultados satisfatórios para *Lychnophora pinaster* (SOUZA *et al.*, 2007).

Uma porção de 500 aquênios foram lavados em água corrente por 30 minutos e separados pelo teste densimétrico, conforme método proposto por Hammerton *et al.* (1989). Os aquênios selecionados foram imersos em solução de 1% do fungicida Derosal® plus por 15 minutos, em agitação (CASTRO *et al.*, 2016), seguido de tríplice lavagem em água destilada e depois imersos em álcool 70% (v/v) por 1 minuto.

Posteriormente foram distribuídos nos tratamentos, as diferentes concentrações de hipoclorito, contendo duas gotas de Tween-20, por um tempo de 15 minutos. Água destilada e autoclavada foi utilizada para a tríplice lavagem dos aquênios, para posterior inoculação individual em tubo de ensaio contendo 2 mL de meio de cultura e respectivos tratamentos.

A estufa utilizada no ambiente externo para avaliação da influência da luz natural foi instalada no viveiro de produção de mudas. Os tubos foram colocados em bancadas no interior do viveiro, utilizando o recurso da luz natural para o cultivo *in vitro*. Durante o experimento foram registradas temperaturas máximas e mínimas diárias e a média do dia, feita pelo padrão do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) (FIGURA 1).



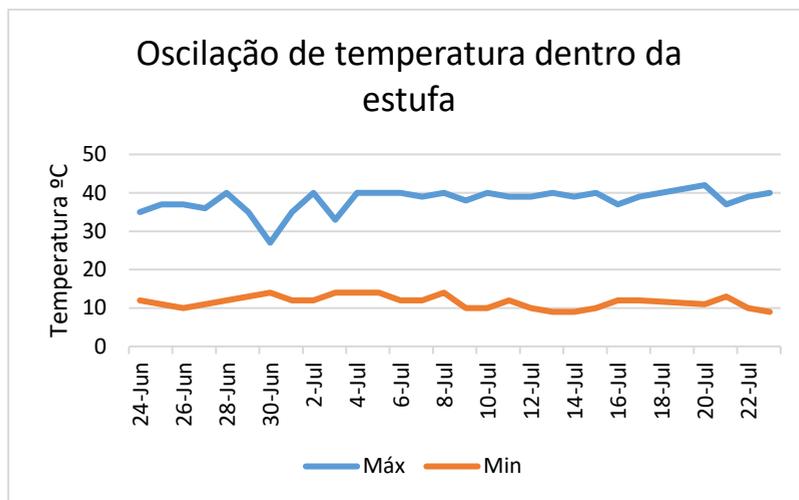


FIGURA 1. Medição de temperaturas máximas e mínimas fora e dentro da estufa no viveiro de produção de mudas. Fonte: Do autor, 2021.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em ensaio fatorial  $3 \times 2 \times 2$ , sendo cada tratamento constituído por 60 aquênios (repetições), um aquênio por tubo de ensaio, totalizando 720 aquênios. As avaliações foram realizadas diariamente após o estabelecimento e foram finalizadas após 60 dias, feita por meio da observação visual para a contagem da presença ou ausência de contaminantes, fungos ou bactérias, número de aquênios germinados e porcentagem de germinação.

### 3.2.2. Experimento 2 - Meios de cultura e Sacarose:

Após ter sido feito o experimento com assepsia, os resultados foram utilizados para montar outro experimento para conferir uma melhor germinação, utilizando a melhor concentração de hipoclorito de

sódio para a desinfestação. O experimento foi conduzido em BOD na temperatura de 30°C, avaliando meios de cultura (simples e 1/4MS) e concentrações de sacarose.

Na avaliação da influência dos meios de cultura e concentração de sacarose, o experimento foi realizado constituído pelos seguintes tratamentos: meios de cultura (Simples e ¼ MS) combinados com concentrações de sacarose (30, 45 e 60 g L<sup>-1</sup>). Ao meio de cultivo foi acrescido 6 g.L<sup>-1</sup> de ágar, com pH 5,8 antes da autoclavagem. Os aquênios foram inoculados individualmente em tubo de ensaio contendo 2 mL de meio de cultura e foram mantidos em câmara de germinação do tipo BOD, com temperatura de 25°C e fotoperíodo de 16h.

O delineamento estatístico utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 3, com 60 repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por um tubo de ensaio, totalizando 360 aquênios. As avaliações foram realizadas diariamente após o estabelecimento e foram finalizadas após 60 dias, feita por meio da observação visual para a contagem da presença ou ausência de contaminantes, fungos ou bactérias, número de aquênios germinados e porcentagem de germinação. Considerando germinados os aquênios que apresentaram protrusão da radícula.

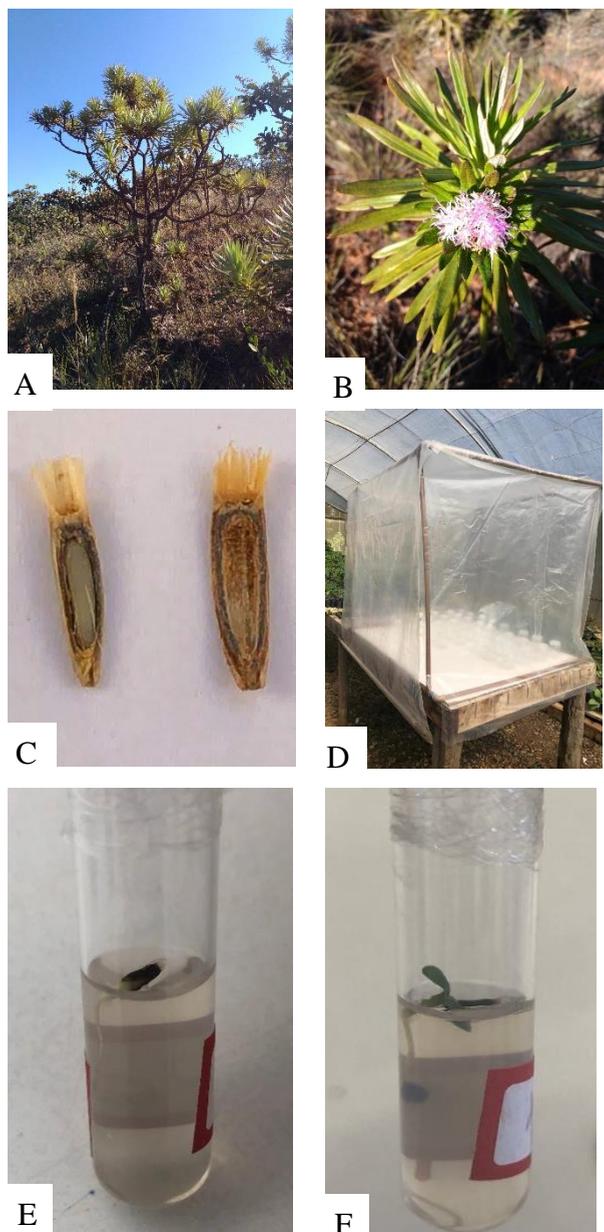


FIGURA 2. Imagem da planta *Lychnophora salicifolia* na área de coleta destacando sua arquitetura (A), destaque da floração e potencial ornamental (B), aquênios com a cavidade embrionária preenchida pela semente e aquênio com ausência de semente (C), estufa montada para

a avaliação da luz natural no cultivo *in vitro* (D), Aquênio em fase de germinação (E) e plântula de *Lychnophora salicifolia* (F). Fonte: Do autor, 2021.

Os resultados foram submetidos à análise de variância. Em seguida, de acordo com a significância ( $p \leq 0,05$ ), para o fator qualitativo foi utilizado o teste Tukey utilizando o Software R (R CORE TEAM, 2020), com o pacote ExpDes.pt (FERREIRA; CAVALCANTI; NOGUEIRA, 2013).

#### **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO:**

Não houve interação ( $p > 0,05$ ) entre os fatores ambiente (BOD e luz natural), meio de cultura (simples e  $\frac{1}{4}$  MS) e desinfestação com hipoclorito (2, 4 e 6%). Também não foi verificado efeito isolado para nenhum dos fatores ( $p > 0,05$ ). Provavelmente os aquênios de *L. salicifolia* possuem dormência de suas sementes (MELO *et al.*, 2014; PEREIRA *et al.*, 2005). Em espécies medicinais e recém domesticadas a maturidade fisiológica desuniforme e deiscência das sementes são mecanismos de dispersão de sementes, contudo podem ocasionar em perdas quantitativas e qualitativas de sementes. Por isso, a colheita antecipada dessas sementes e armazenamento pode favorecer a finalização da maturidade fisiológica e evitar que essas sementes se deterioreem no campo (CARVALHO; NAKAGAWA, 2012).

A luz artificial não diferiu estatisticamente da luz no ambiente natural na contaminação de aquênios (TABELA 1) e a média foi de

20.42% de aquênios contaminados.

TABELA 1. Ambiente natural (Luz Natural) e luz artificial (BOD) na porcentagem de contaminação de aquênios de *Lychnophora salicifolia* Mart.

Ambiente	Contaminação
BOD	21.67 a
Luz Natural	19.19 a
CV (%)	46.31

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey ( $p < 0,05$ ). Fonte: Do autor, 2021.

Mesma porcentagem média também foi observado quando foi utilizado os tratamentos com o meio simples e com  $\frac{1}{4}$  de MS na contaminação dos aquênios de *L. salicifolia* (TABELA 2). Esses resultados indicam que as sementes de *L. salicifolia* possuem maior quantidade de microrganismos endofíticos e epifíticos na semente que aumentam o número de contaminação de plantas *in vitro*, fato esse confirmado por Pereira *et al.* (2005).

TABELA 2. Meios de cultura  $\frac{1}{4}$  MS e simples na porcentagem de contaminação de aquênios de *Lychnophora salicifolia* Mart.

Meio de Cultura	Contaminação
$\frac{1}{4}$ MS	18.64 a
Simple	22.22 a
CV (%)	46.31

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey ( $p < 0,05$ ). Fonte: Do autor, 2021.

A germinação dos aquênios de *L. salicifolia* foi inferior a 5% independente dos fatores luz natural e BOD, sendo que quando na luz

natural não houve germinação dos aquênios. O que indica a necessidade de estudos com a espécie de *L. salicifolia* para obtenção de métodos que auxiliem na quebra de dormência das sementes. Os meios de cultura 1/4 MS e simples também não influenciaram na maior germinação dos aquênios (FIGURA 3).

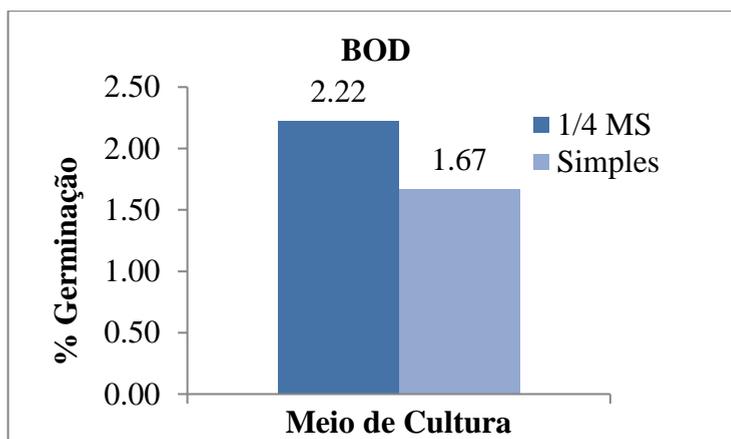


FIGURA 3. Meios de cultura 1/4 MS e simples na germinação de aquênios de *Lychnophora salicifolia* Mart em BOD. \*Resultados descritivos devido à baixa porcentagem de germinação dos aquênios. Fonte: Do autor, 2021

A baixa germinação da espécie pode ser explicada pela formação do embrião e quantidade de sementes vazias. Em *Lychnophora ericoides* Pereira *et al.* (2005) verificaram apenas 30% de embriões nas sementes. Aliado a pouca presença de embriões nas sementes os autores também observaram que menos de 50% dos embriões são capazes de se desenvolver. Esses resultados indicam que a espécie possui desuniformidade na maturidade do embrião (BRYANT, 1989). Sendo necessário novos estudos que comparem a

colheita e armazenamento das sementes.

A dormência dos aquênios também pode afetar na germinação das sementes. Especialmente em espécies não domesticadas como o *L. salicifolia* que possuem a dormência das suas sementes como estratégia de sobrevivência e perpetuação da espécie (MELO *et al.*, 2014; MARCOS FILHO, 2005). Melo *et al.* (2009) estudaram a germinação de aquênios de arnica (*Lychnophora pinaster* Mart.) e identificaram que o armazenamento promove o acréscimo do percentual de germinação, em especial dos aquênios com papus interno presente por ocasião da coleta.

As doses de hipoclorito de sódio reduziram a contaminação dos aquênios de forma crescente mas não influenciaram estatisticamente na assepsia dos aquênios (FIGURA 4). Apesar da concentração de 4% possuir menor número de contaminações essa não diferenciou das concentrações de 2 e 6%. Sabe-se que a desinfestação de sementes é procedimento usual por permitir controle sanitário das mesmas.

Gonzaga *et al.* (2021) indicam que para a família da Asteraceae propagada *in vitro* a desinfestação de sementes é de extrema importância, contudo a família Asteraceae possui maior contaminação de materiais. Logo o uso de desinfestantes é preconizado como compostos esterelizantes como o álcool, hipoclorito de sódio, fungicidas, ácido sulfúrico e outros (PASQUAL *et al.*, 2012).

A germinação dos aquênios de *L. salicifolia* aumentou com o incremento de hipoclorito de sódio na assepsia dos aquênios, mas esse efeito não foi significativo. Na concentração de 4% de hipoclorito usado foi verificado maior germinação (24%) (FIGURA 4).

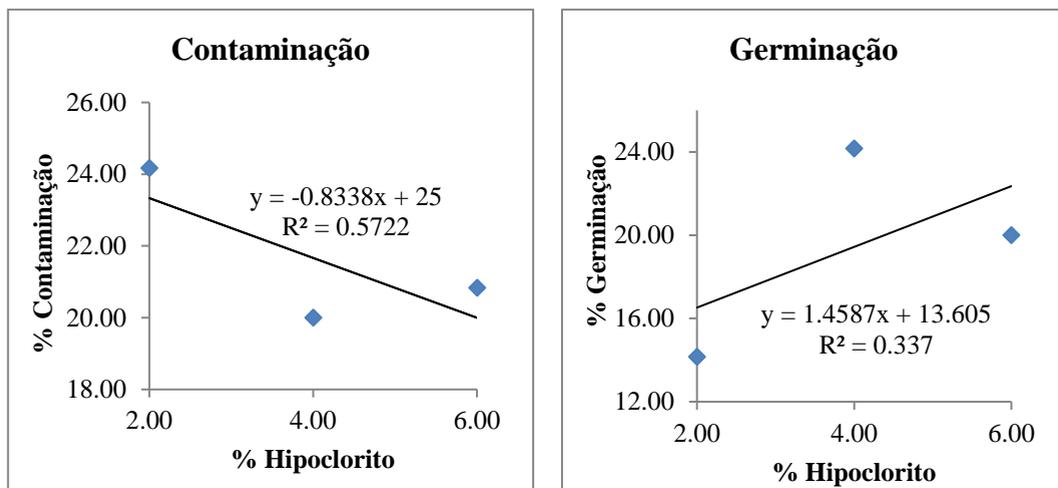


FIGURA 4. Doses de hipoclorito de sódio na porcentagem de contaminação e na germinação de aquênios de *Lychnophora salicifolia* Mart em BOD. Fonte: Do autor, 2021

Esses resultados indicam que novos estudos com concentrações devem ser realizados para que se obtenha maiores germinações de aquênios. Na concentração de 5% de hipoclorito de sódio, Gonzaga *et al.* (2021) observaram menor contaminação de sementes de *Lychnophora pohlii* com 63% de contaminação. Mas os mesmos autores concluíram que o uso de ácido sulfúrico por 20 minutos obteve maior eficiência na diminuição da contaminação e germinação das sementes de *L. pohlii*.

Com relação ao experimento conduzido em BOD com concentrações de sacarose no meio simples e ¼ do MS (TABELA 3) não foi verificada interação ( $p > 0.05$ ) entre os fatores. Também não foi observado efeito significativo para os fatores isolados para a contaminação dos aquênios. Os meios de cultura 1/4 MS e simples não influenciaram na menor contaminação dos aquênios em BOD

(TABELA 3).

TABELA 3. Meios de cultura e concentração de sacarose na porcentagem de contaminação de aquênios de *Lychnophora salicifolia* Mart em BOD.

Meio de cultura	Contaminação
¼ MS	12.18 a
Simplex	12.22 a
CV (%)	83.69

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey ( $p < 0.05$ ).

Fonte: Do autor, 2021.

É comum o uso do meio MS com metade dos sais do que normalmente é indicado. Apesar de não ser observado diferença com o meio simples e ¼ MS, a utilização de meio com menos força possui baixo potencial osmótico que auxilia as mudas durante a fase de germinação. Por outro lado, Roni *et al.* (2018) não verificaram diferença entre o meio MS e ½ MS na propagação e crescimento de *Eustoma grandiflorum* e observaram maior germinação quando acrescentaram 3% de sacarose ao meio de cultura.

As concentrações de sacarose nos meios de cultura aumentaram a contaminação dos aquênios de *L. salicifolia* (FIGURA 5). Com contaminação de 17% dos aquênios na maior concentração de sacarose ( $60 \text{ g L}^{-1}$ ). A germinação dos aquênios com a utilização de sacarose no meio de cultura também foi inferior a 6%, apesar do incremento na germinação com as doses crescentes de sacarose (FIGURA 5 e 6).

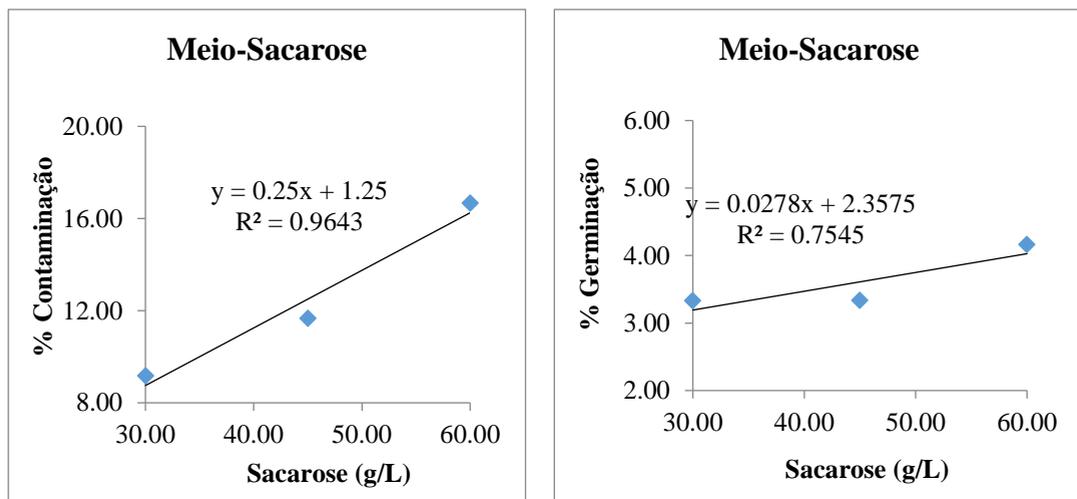


FIGURA 5. Doses de sacarose na porcentagem de contaminação e na germinação de aquênios de *Lychnophora salicifolia* Mart em BOD.  
Fonte: Do autor, 2021.

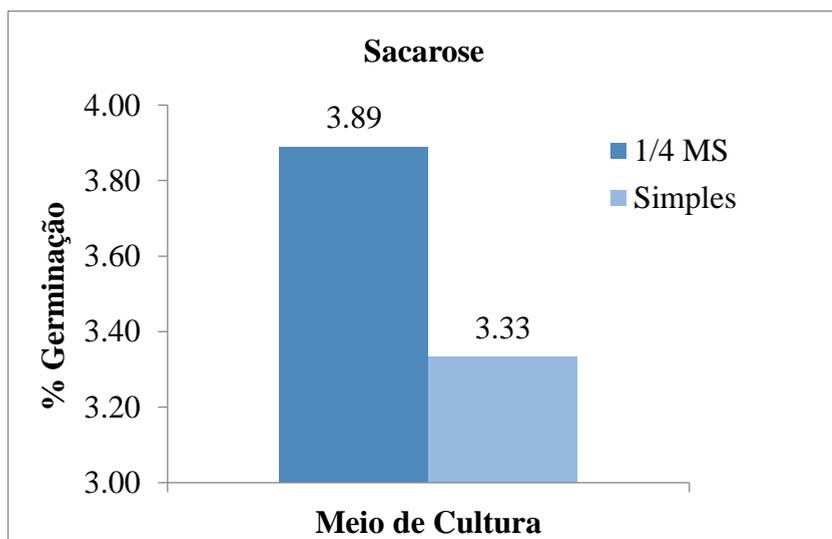


FIGURA 6. Influência da sacarose e do meio de cultivo na porcentagem de germinação de aquênios de *Lychnophora salicifolia* Mart.

A sacarose nos meios de cultura é indicada para que ocorra regulação do crescimento e desenvolvimento das plântulas, desde a germinação até o surgimento da plântula. É então importante fonte de carboidrato para regulação da fotossíntese e respiração (RONI *et al.*, 2018; TEIXEIRA *et al.*, 2005). Devido à baixa influência das doses de sacarose na germinação dos aquênios a utilização de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose podem ser indicadas na composição do meio de cultura *in vitro*. Contudo, novas pesquisas com outras concentrações de sacarose devem ser estudadas para a obtenção da quantidade ideal desse carboidrato.

É relevante ressaltar que a maturação dos aquênios da espécie estudada ocorre de maneira desuniforme na planta, podendo no momento da coleta colher aquênios cheios, malformados ou vazios, o que, provavelmente, contribuiu para os resultados de mínima de germinação. Melo *et al.* (2014) também relataram essa relação de maturidade dos aquênios de *Lychnophora pinaster* com baixas taxas de germinação.

Esses resultados reforçam que a espécie de *L. salicifolia* possui maior diversidade de microrganismos nas sementes que aumentam a contaminação *in vitro*. O que indica a necessidade de estudos que visem obter composto que atue efetivamente no controle da contaminação dos aquênios. Sementes que possuem maior contaminação podem causar perdas no armazenamento, bem como perdas no campo (AMBRICO *et al.*, 2017).

No experimento que foi instalado no viveiro de produção de mudas para a caracterização do ambiente de luz natural, foram feitas

medições de temperatura fora e dentro da estufa durante a realização do trabalho, sendo constatada uma grande oscilação, sendo que no ambiente externo houve uma média de temperatura máxima de 35,8°C, e uma média de temperatura mínima de 12,2°C, obtendo uma variação térmica em torno de 23,6°C. Já no interior da estufa houve uma média de temperatura máxima de 37,9°C e mínima de 11,6°C, com uma amplitude térmica em torno de 26,3°C. A constatação de grandes oscilações de temperatura durante todo o experimento pode ter sido um fator que dificultou ou até mesmo impediu a germinação do material que estava nesse ambiente.

Gonzaga *et al.* (2021) em estudo com a família Asteraceae enfatizam que a germinação de sementes da família é influenciada pelas condições ambientais do local de crescimento da espécie e maturidade dos aquênios. É sabido que em cultivos agrícolas a dormência em menor grau é favorável porque evita a germinação precoce ou o brotamento antes da colheita. Mas plantas que possuem alto nível de dormência resulta em baixo stand (TUAN, 2019). Alguns métodos de quebra de dormência podem ser utilizados. Em aquênios de *L. salicifolia* outros estudos são necessários para elucidar a dormência presente nas sementes e qual o método correto na desinfestação e quebra de dormência das sementes que resultará em maior germinação e estabelecimento da plântula.

Mesmo que os resultados não tenham sido satisfatórios quanto à desinfestação e germinação de aquênios de *L. salicifolia*, os mesmos poderão servir para próximas etapas em estudos posteriores com *Lychnophoras* no cultivo *in vitro*, após ter sido constatado que não

houve uma relação entre os diferentes ambientes e entre os meios de cultivo com as concentrações de hipoclorito de sódio e com as concentrações de sacarose utilizadas no presente trabalho, e também por ter sido verificada uma possível dormência existente nas sementes da espécie, que precisa ser estudada e superada em futuros trabalhos. Devido ao fato de que não houve diferença significativa nos tratamentos utilizados, após um melhor esclarecimento quanto ao tipo de dormência presente nas sementes, novos métodos menos onerosos poderão ser testados.

## 5. CONCLUSÃO:

Aquênios de *Lychnophora salicifolia* não são influenciados por ambiente com luz natural ou artificial no que se refere a contaminação e germinação.

As concentrações de hipoclorito de sódio testadas não promoveram uma assepsia eficiente nos aquênios de *Lychnophora salicifolia*.

O estabelecimento de aquênios de *Lychnophora salicifolia* não é influenciado por meio de cultura, seja meio simples ou ¼ MS.

Para as condições estudadas não foi possível avaliar o potencial *in vitro* dos aquênios de *Lychnophora salicifolia*.

**REFERÊNCIAS:**

AMBRICO, P. F., SIMEK, M., MORANO, M., ANGELINI, R. M. M., MINAFRA, A., TROTTI, P., AMBRICO, M., PRUKNER, V., FARETRA, F. Reduction of microbial contamination and improvement of germination of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) seeds via surface dielectric barrier discharge. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 50, n. 30, p. 305401, 2017.

ANDENBERG, A.A.; BALDWIN, B.G.; BAYER, R.G.; BREITWIESER, J.; JEFFREY, C.; DILLON, M.O.; ELDEÑAS, P.; FUNK, V.; GARCIA-JACAS, N.; HIND, D.J.N.; KARIS, P.O.; LACK, H.W.; NESON, G.; NORDENSTAM, B.; OBERPRIELER, CH.; PANERO, J.L.; PUTTOCK, C.; ROBINSON, H.; STUESSY, T.F.; SUSANNA, A.; URTUBEY, E.; VOGT, R.; WARD, J. & WATSON, L.E. In: J.W. Kadereit & C. Jeffrey (eds.). Flowering Plants Eudicots Asterales, Vol. VIII. The Families and Genera of Vascular Plants, K. Kubitzki (ed.). Springer – Verlag. Pg. 61- 588. 2007.

AMORIM, V. O.; BAUTISTA, H. P. Asteraceae da Ecorregião Raso da Catarina, Bahia, Brasil. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 67, n. 3, p. 785-794, 2016.

BASKIN, J. M; BASKIN, C. C. Germination ecophysiology of herbaceous plant species in a temperate region. **American Journal of Botany**, v. 75, p. 286-305, 1988.

BASTOS, M.; CERQUEIRA, S.; SOUSA, J. T.; JUNIOR, R. A.; Peixoto, A. B. F. Ação analgésica do extrato bruto aquoso liofilizado do caule e folhas da *Lychnophora ericoides* Mart. (arnica). *Ciência e Cultura* 39 (5/6), 551-553, 1987.

BFG. Growing know ledge: an overview of seed plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**. 2015.

BORGES, DI; DE OLIVEIRA, MC; DOS SANTOS PENONI, E., PEREIRA DE PÁDUA, TR; TAVARES BRAGA, F .; PASQUAL, M. Micropropagação de crisântemo (*Dendranthema grandiflora* Tzevele cv. Rage) sob luz natural e artificial em diferentes concentrações do meio de cultivo. *Plant Cell Cult. Micropropagation*, Lavras, v.7, n.1, p. 9-16, 2016. Disponível em: <http://177.105.2.193/index.php/plantcellculturemicropropagation/article/view/65>. Acesso em: 31 jan. 2021.

BRYANT, J. A. **Fisiologia da semente**. São Paulo: EPU, 86p., 1989.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 5 ed. Jaboticabal: FUNEP, 590 p., 2012.

CASTRO, A. C. M.; GUERRA, C. A.; TITON, M. Influência do ácido sulfúrico associado com fungicida sobre a germinação e a contaminação *in vitro* de *Lychnophora pohlii* Sch. Bip. **Revista UniVap**, v.22, n.4, 2016.

CAVALCANTE, M. Z. B., DUTRA, D. F. S., SILVA, H. L. C., COTTING, J. C., SILVA, S. D. P., SIQUEIRA FILHO, J. Ornamental potential of Caatinga Biom species. **Comunicata Scientiae**, v. 8, n. 1, p. 43-58. 2017.

CAVALCANTE, V. R.; BORIN, L.; MORAES, C. P. Germinação e crescimento *in vitro* de *Epidendrum secundum* Jacq.(Orchidaceae) em diferentes meios de cultivo e períodos de exposição a agentes desinfestantes seminais. Iheringia. **Série Botânica.**, v. 73, n. 2, p. 196-207, 2018.

CLAEYS, H.; VAN LANDEGHEM, S.; DUBOIS, M.; MALEUX, K.; INZÉ, D. What is stress? Dose-response effects in commonly used *in vitro* stress assays. **Plant Physiol.** v. 165, n. 2, p. 519–527, 2014.

CLIMATE-DATA.ORG. Clima: Montes Claros. Disponível em: <<https://pt.climatedata.org/america-do-sul/brasil/minas-gerais/montes-claros-2886/>> Acesso em: 13 out. 2019.

CONCEIÇÃO, A. A.; PIRANI, J. R.; MEIRELLES, S. T. Floristics, sctructure and soil of insular vegetation in four quartzite-sandstone

outcrops of “Chapada Diamantina”, northeast Brazil. **Brazilian Journal of Botany**. v. 30, p. 641–655. 2007.

COUTINHO, L. M. O conceito de Cerrado. **Revista Brasileira de Botânica** 1, v. 1, p. 17-23, 1978.

COUTINHO, L. M. O bioma do cerrado. In **Eugen Warming e o cerrado brasileiro: um século depois** (A.L. Klein, ed.). Editora da Unesp, São Paulo, p.77-91, 2002.

DIGNART, S. L.; CASTRO, E. M. de; PASQUAL, M.; FERRONATO, A.; BRAGA, F. T.; PAIVA, R. Luz natural e concentrações de sacarose no cultivo *in vitro* de *Cattleya walkeriana*. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 33, n. 3, p. 780-787, maio/jun. 2009.

ERIG, A.C.; SCHUCH, M.W. Micropropagação fotoautotrófica e o uso da luz natural. **Ciência Rural**, v.35, p.961-965, 2005.

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

FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI, P. P.; NOGUEIRA, D. A. E. **ExpDes.pt**: Experimental Designs package. R package (Português). version 1.1.2, 2013.

FRANCO, J. L. A.; GANEM, R. S.; BARRETO, C. **Devastação e Conservação no Bioma Cerrado: Duas Dinâmicas de Fronteira.** Expedições: Teoria da História e Historiografia. v. 7, p. 56-83, 2017. Disponível em: <[https://www.researchgate.net/publication/316917707\\_DEVASTACAO\\_NO\\_CONSERVACAO\\_NO\\_BIOMA\\_CERRADO\\_DUAS\\_DINAMICAS\\_DE\\_FRONTIEIRA](https://www.researchgate.net/publication/316917707_DEVASTACAO_NO_CONSERVACAO_NO_BIOMA_CERRADO_DUAS_DINAMICAS_DE_FRONTIEIRA)>. Acesso em: Janeiro de 2021.

FUNK, V. A.; SUSANNA, A.; STUSSEY, T. F.; BAYERR, R. J. **Systematics, evolution and biogeography of Compositae.** IAPT. Vienna. 965p. 2009.

GANEM, R. S.; DRUMMOND, J. A.; FRANCO, J. L. A. F. **Conservação da Biodiversidade no Bioma Cerrado: Conflitos e Oportunidades.** In: SILVA, S. D. *et al.* Sociedade e Natureza no Oeste do Brasil. Goiânia: PUC-Goiás. p. 331-361, 2013.

GOEBEL, O., SILVEIRA, D., DECHOUM, M. S., CASTELLANI, T. T. Guia sobre plantas nativas ornamentais de restinga. Florianópolis, ed. 1ª, p. 33, 2019.

GONZAGA, A. P. D., MIRANDA, N. A., TITON, M., MACHADO, E. L. M., ALMEIDA, H. S., LEÃO, B. M. Desinfestação e germinação *in vitro* de *Lychnophora pohlii*. **Advances in Forestry Science**, v. 8, n.1, p. 1253-1259, 2021.

GOUVEA, D. R.; RIBEIRO, A. B. B.; THORMANN, U.; LOPES, N. P.; BUTTERWECK, V. Evaluation of Intestinal Permeability of Vicenin-2 and Lychnopholic Acid from *Lychnophora salicifolia* (Brazilian Arnica) Using Caco-2 Cells. *J. Nat. Prod.*, v. 77, p. 464–471, 2014.

GOUVEA, D. R. Estudos in vitro e in vivo do metabolismo dos compostos majoritários presentes no extrato das folhas de *Lychnophora salicifolia* Mart. (Asteracea: Vernoniae). Ribeirão Preto, 128p., 2013.

HAMMERTON, R. D.; SMITH, M. T.; VAN STANDEN, J. Factors influencing seed variability and germination in *Hypoxis hemerocallidea* Fisch & Meyer. **Seed Science and Technology**, v. 17, n. 3, p. 613-624, 1989.

HARIDASAN, M. Nutrição mineral de plantas nativas do Cerrado. *R. Bras. Fisiol. Veg.*, 12(1): p. 54-64, 2000.

HEIDEN, G.; BARBIERI, R.L.; STUMPF, E.T. Considerações sobre o uso de plantas ornamentais nativas. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 12, p. 1-7, 2006.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. Conservation of Brazilian Cerrado. **Conservation Biology**, v.19, p.707-713, 2005.

KODYM, A.; ZAPATA-ARIAS, F. J. Natural light as alternative light source for the *in vitro* culture of banana (*Musa acuminata*) cv. Grande Naine. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.55, p. 141-145, 1998.

KOZAI, T.; KUBOTA, C.; JEONG, B. R. Environmental control for the large-scale production of plants through *in vitro* techniques. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.51, p.49-56, 1997.

LAMEIRA, O. A.; LEMOS, O. F.; MENEZES, I. C.; PINTO, J. E. B. P. **Cultura de tecidos** (manual). Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 41p., 2000.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 495p., 2005.

MARTINELLI, G. **Campos de altitude**. Rio de Janeiro: Index. 1996.

MEDEIROS, J. D. **Guia de campo: Vegetação do Cerrado 500 espécies**. Brasília: MMA/SBF, 532p. 2011.

MELO, P. R. B., OLIVEIRA, J. A., CARVALHO, M. L. M., GUIMARÃES, R. M., CARVALHO, B. O. Aplicação do teste de raios x no estudo da morfologia interna e da qualidade fisiológica de aquênios de arnica (*Lychnophora pinaster* Mart.). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n. 2, p.146-154, 2009.

MELO, P. R. B., OLIVEIRA, J. A., GUIMARÃES, R. M., PEREIRA, C. E., PINTO, J. E. B. P. Germinação de aquênios de *Lychnophora pinaster* em função de estádios de maturação, temperatura e luz. **Científica**, Jaboticabal, v.42, n.4, p. 404-410, 2014.

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

NASSIF, S. M. L.; VIEIRA, I. G.; FERNANDES, G. D. **Fatores externos (ambientais) que influenciam na germinação de sementes**. Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais, 2004. Disponível em:<<https://www.ipef.br/tecsementes/germinacao.asp>>. Acesso em: fev de 2021.

PASQUAL, M., DUTRA, L. F., ARAUJO, A. G., PEREIRA, A. R. Prevenção de contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas. In: SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E (ed) **Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, p. 61-161, 2012.

PEREIRA, A.M. S.; BERTONI, B. W.; FONSECA, V. S.; AMARANTE, M. F. C.; LOPES, N. P.; PARON, M. E.; FRANÇA, S. C. Micropropagação e conservação de *Lychnophora ericoides* Mart.:

uma espécie medicinal do cerrado brasileiro. *Revista Fitos*. Vol.1 N°02, 2005.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. 2013. Disponível em: <<http://www.r-project.org>>. Acesso em: 15 Mai 2020.

ROCHA, J. C. S. Dinâmica de ocupação no bioma Cerrado: Caracterização dos desmatamentos e análise das frentes de expansão. *UFG/Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos*. v. 83, p. 16-17, 2012.

RODELA, L. G. Cerrados de altitude e campos rupestres do Parque Estadual do Ibitipoca, sudeste de Minas Gerais: Distribuição e florística por subfisionomias da vegetação. **Revista do Departamento de Geografia**, n. 12, p. 163-189, 1998.

RONI, M. Z. K., ISLAM, M. S., SHIMASAKI, K. *In vitro* seed germination and tracking the seedling growth of eustoma. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, v. 46, n. 3, p. 224-242, 2018.

SEMIR, J. **Revisão taxonômica de *Lychnophora* Mart.** (Vernoniaceae: Compositae). Universidade de Campinas, Campinas, PhD Dissertação. 1991.

SILVEIRA, F. A. O., NEGREIROS, D., BARBOSA, N. P. U., BUISSON, E., CARMO, F. F., CARSTENSEN, D. W., CONSEIÇÃO, A. A., CORNELISSEN, T. G., ECHTERNACHT, L., FERNANDES, G. W., GARCIA, Q. S., GUERRA, T. J., JACOBI, C. M., FILHO, J. P. L., STRADIC, S., MORELLATO, L. P. C., NEVES, F. S., OLIVEIRA, R. S., SCHAEFER, C. E., VIANA, P. L., LAMBERS, H. Ecology and evolution of plant diversity in the endangered campo rupestre: a neglected conservation priority. **Plant Soil**, v. 403, p. 129–152, 2016.

SOCIEDADE BOTÂNICA DO BRASIL. **Centuria Plantarum Brasiliensium extinctionis minitata**. Brasília, DF, 167 p., 1992.

SOUZA, A. V.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V. *In vitro* Propagation of *Lychnophora pinaster* (Asteraceae): A Threatened Endemic Medicinal Plant. **Hortscience**, v. 42, n. 7, p. 1665–1669, 2007.

TANNUS, J. L. S.; ASSIS, M. A. Composição de espécies vasculares de campo sujo e campo úmido em área de cerrado, Itirapina – SP, Brasil. **Revista Brasil. Bot.**, v.27, n.3, p.489-506, 2004.

TEIXEIRA, R. T., KNORPP, C., GLIMELIUS, K. Modified sucrose, starch, and ATP levels in two alloplasmic male-sterile lines of *B. napus*. **J Exp Bot.** v. 56, n. 414, p.1245–1253, 2005.

TUAN, P. A., SUN, M., NGUYEN, T. N., PARQUE, S., AYELE, B. T. Molecular mechanisms of seed germination. In **Sprouted Grains** (pp. 1-24). AACCC International Press, 2019.

VASCONCELOS, V. V. Campos de altitude, campos rupestres e aplicação da lei da Mata Atlântica: Estudo prospectivo para o Estado de Minas Gerais. **Bol. Geogr**, v. 32, n. 2, p. 110-133, 2014.

ZOMLEFER, W. B. **Guide to flowering plant families**, Chapel Hill & London: Carolina, USA, 1994.