

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**GERMINAÇÃO E CULTIVO *IN VITRO* DE *Calendula
officinalis* L.**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Caroline Borges Bevilacqua

Santa Maria, RS, Brasil

2009

**GERMINAÇÃO E CULTIVO *IN VITRO* DE *Calendula*
officinalis L.**

por

Caroline Borges Bevilacqua

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Agronomia.**

Orientadora: Prof^a Dr^a Lia Rejane Silveira Reiniger

Santa Maria, RS, Brasil

2009

B571g Bevilacqua, Caroline Borges.
Germinação e cultivo in vitro de *Calendula officinalis* L. / elaborada
por Caroline Borges Bevilacqua ; orientadora Lia Rejane Silveira Reiniger.
- Santa Maria, RS, 2009.

74 f. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria. Centro
de Ciências Rurais. Programa de Pós-Graduação em Agronomia.

1. Agronomia 2. *Calendula officinalis* 3. Cultura de tecidos 4.
Fitorreguladores I. Reiniger, Lia Rejane Silveira . II. Título.

CDU: 633

635.9

Denise Barbosa dos Santos
CRB10 / 1456

© 2009

Todos os direitos autorais reservados a Caroline Borges Bevilacqua. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita com autorização por escrito do autor.

Endereço: Rua Heitor Campos, n. 30 apto.101, Bairro Medianeira, Santa Maria, RS, 97060-290

Fone (0xx)55 32231959 ou (0xx)55 99745574; End. Eletr: carolinebevi@gmail.com

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Agronomia**

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

GERMINAÇÃO E CULTIVO *IN VITRO* DE *Calendula officinalis* L.

elaborada por
Caroline Borges Bevilacqua

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Agronomia

COMISSÃO EXAMINADORA:

Lia Rejane Silveira Reiniger, Dr^a. - UFSM
(Presidente/Orientadora)

Jana Koefender, Dr^a. - UNICRUZ

Rogério Antônio Bellé, Dr. - UFSM

Santa Maria, 27 de fevereiro de 2009.

Aos meus pais Paulo Cezar Bevilacqua
e Marta Lúcia Bevilacqua, manas
Letícia e Amanda Borges Bevilacqua e
Vinicius Scher de Oliveira, com amor.

Dedico...

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me guiado.

Aos meus pais, Paulo Cezar Bevilacqua e Marta Lúcia Bevilacqua, pelo carinho, amor e apoio.

As manas Letícia e Amanda Bevilacqua, pela compreensão.

Ao Vinicius Scher de Oliveira pela compreensão, amor e incentivo.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação pela oportunidade de realização do mestrado.

À Dr^a Jana Koefender pela doação das sementes de calêndula utilizadas nos experimentos.

À Dr^a Lia Rejane Silveira Reiniger, minha prezada orientadora, pelo apoio. Por me conceder a oportunidade de progredir, não só com relação à ciência, mas também me tornar uma pessoa independente, capaz de tomar decisões e muito mais autoconfiante.

À Dr^a Marlove Fátima Brião Muniz, por disponibilizar seu laboratório para análises fundamentais aos meus experimentos. E ao auxílio de Daniele Pedroso, sua orientada.

Ao Dr Rogério Antônio Bellé por conceder espaço para o cultivo de calêndula na casa de vegetação do Departamento de Fitotecnia-UFSM.

À colega Joana Hanauer pelo auxílio nos experimentos, pela amizade e companheirismo.

Ao colega Diego Golle pelo auxílio, pelas trocas de idéias e informações, se tornando um grande amigo.

Aos colegas de laboratório, Daniel, Felipe, Aline e Gisele pela amizade e prestarem ajuda quando necessário.

Ao Laboratório de Cultura de Tecidos do Núcleo de Biotecnologia, por disponibilizar a realização efetiva dos experimentos.

E a todos que, também, contribuíram para que eu concluísse mais essa grande etapa em minha vida.

RESUMO

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

GERMINAÇÃO E CULTIVO *IN VITRO* DE *Calendula officinalis* L.

Autora: Caroline Borges Bevilacqua

Orientadora: Lia Rejane Silveira Reiniger

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 27 fevereiro de 2009.

Constituíram objetivos desse trabalho: desenvolver um protocolo de desinfestação superficial de sementes, através da imersão das sementes em solução de etanol a 70%, por 30 s., seguido de diferentes tempos de imersão em solução de hipoclorito de sódio a 2,5% (0, 10, 20 e 30 min) acrescida de uma gota de detergente comercial; selecionar uma metodologia para a superação da barreira para a germinação de sementes de calêndula *in vitro*; utilizando-se diferentes métodos de superação dessa barreira (imersão em Ácido Sulfúrico absoluto durante 5 min; imersão em Ácido Clorídrico absoluto durante 5 min; retirada do tegumento e embebição das sementes em água destilada, durante 12 h; embebição das sementes em água destilada, durante 12 h; controle). Além de testar concentrações de fitorreguladores (ausência de fitorreguladores; 0,01 mg L⁻¹ de ANA; 0,5 mg L⁻¹ de BAP; 1 mg L⁻¹ de BAP; 1,5 mg L⁻¹ de BAP, em esquema bifatorial) que induzam à formação de calos em segmentos foliares oriundos de cultivo *in vitro* e *ex vitro* de calêndula; avaliar o potencial de regeneração no cultivo *in vitro* a partir de sementes de calêndula utilizando diferentes concentrações de fitorreguladores (ausência de fitorreguladores; 0,5 μ mol de ANA; 2 μ mol de BAP; 3 μ mol de BAP; 4 μ mol de BAP; 5 μ mol de BAP; 6 μ mol de BAP; 7 μ mol de BAP, em esquema bifatorial) e avaliar a influência do tempo de cultivo e das diferentes concentrações de fitorreguladores (ausência de fitorreguladores; 2 μ mol de BAP e 0,5 μ mol de ANA; 5 μ mol de BAP e 0,5 μ mol de ANA; 6 μ mol de BAP e 0,5 μ mol de ANA; 7 μ mol de BAP e 0,5 μ mol de ANA; contendo calos velhos; contendo calos jovens, em esquema bifatorial) na regeneração e no tipo de calo formado. Foi verificado que a imersão em solução de hipoclorito de sódio a 2,5% por 30 min aliada à remoção do tegumento promovem a germinação *in vitro* de sementes de calêndula efetuando uma desinfestação superficial satisfatória das sementes utilizadas; não há necessidade de suplementação com citocininas para promover a rizogênese em calêndula; é necessária a adição de BAP ao meio nutritivo para ocorrer a calogênese em segmentos foliares oriundos de cultivo *in vitro* e em sementes, devendo ser maior a concentração desse fitorregulador se o cultivo for efetuado na presença de ANA; no caso de calogênese em segmentos foliares advindos de cultivo *ex vitro*, não é necessário aumentar a concentração de BAP na presença de ANA; para a regeneração de partes aéreas a partir de sementes não é necessária a suplementação de BAP nem de ANA; para a regeneração de raízes a partir de sementes não é necessária a presença de BAP nem de ANA, contudo com a adição de ANA torna-se necessária a suplementação com BAP; a calogênese é favorecida pela utilização de BAP; calos mais intumescidos foram verificados na presença de fitorreguladores; calos, na presença de ANA e de BAP, induzem à formação de calos esponjosos e de calos verdes; calos jovens são mais eficientes para regenerar partes aéreas.

Palavras-chave: *Calendula officinalis*; cultura de tecidos; fitorreguladores.

ABSTRACT

MASTER thesis
Post-Graduation Program in Agronomy
Universidade Federal de Santa Maria – RS, Brazil

GERMINATION AND IN VITRO CULTURE OF *Calendula officinalis* L.

Author: Caroline Borges Bevilacqua

Advisor: Lia Rejane Silveira Reiniger

Location and date of Defense: Santa Maria, february, 27th, 2009.

The objective this present study was developed a protocol of surface disinfection of marigold seeds; through immersion of seeds in etanol solution 70%, for 30 s. followed by different times of immersion in 2,5% sodium hypochlorite solution (0, 10, 20 e 30 min) plus one drop of detergent commercial; selected a methodology by break barriers to germination of marigold seeds of calendula *in vitro* (immersion in sulfuric acid absolute during 5 min; immersion in cloridric acid absolute during 5 min; removal of tegument and imbibition of seeds in water destilled, during 12 h; imbibition of seeds in water destilled, during 12 h; control). Beyond tested growth regulators concentrations (absence of growth regulators; 0,01 mg L⁻¹ of ANA; 0,5 mg L⁻¹ of BAP; 1 mg L⁻¹ of BAP; 1,5 mg L⁻¹ of BAP, in a factorial model) what induce the induction of calli in leaf segments from *ex vitro* and *in vitro* culture; evaluate the regeneration potential *in vitro* culture from marigold seeds in presence and absence of growth regulators (absence of growth regulators; 0,5 μ mol of ANA; 2 μ mol of BAP; 3 μ mol of BAP; 4 μ mol of BAP; 5 μ mol of BAP; 6 μ mol of BAP; 7 μ mol of BAP, in a factorial model); evaluate the influences of *in vitro* culture time in calli regeneration formed under growth regulators concentrations and different concentration of growth regulators (absence of growth regulators; 2 μ mol of BAP and 0,5 μ mol of ANA; 5 μ mol of BAP and 0,5 μ mol of ANA; 6 μ mol of BAP and 0,5 μ mol of ANA; 7 μ mol de BAP and 0,5 μ mol of ANA; containing old calli; containing young calli, in a factorial model) in regeneration and type formed. Verified was that the immersion in 2,5% sodium hypochlorite solution for 30 min coupled with the removal of tegument promoted the *in vitro* germination of marigold seeds and making a surface disinfection satisfactory of seeds; not is necessary of supplementation with cytokinins to promote the rhizogenesis in marigold; is necessary the addition of BAP the nutrient medium to occur calogenesis in leaf segments from the *in vitro* culture and in seeds, need to be great concentration that growth regulator if the culture is made in the ANA presence; for calogenesis in leaf segments coming of *ex vitro* culture, not is necessary increase the BAP concentration in ANA presence; for regeneration of aerial parts from seeds not is necessary the BAP supplementation or ANA; for regeneration of roots from seeds not is necessary BAP presence or ANA, however with ANA addition become necessary BAP supplementation; the calogenesis is favored the use of BAP; calli more tumid were verified in growth regulators presence; young calli in ANA and BAP absence and presence induced formation of spongy calli and of green calli; young calli are more efficient to regenerate aerial parts.

Key-words: marigold; tissue culture, growth regulators.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Médias de germinação *in vitro* de sementes de calêndula utilizando-se diferentes métodos de superação da barreira. Santa Maria, UFSM, 2009.....42

TABELA 2 - Teste de médias para a variável intumescimento de calos nas diferentes concentrações de BAP. Santa Maria, UFSM, 2009.....47

TABELA 3 - Médias das notas atribuídas aos tipos de calo formados a partir de calos jovens e velhos em diferentes concentrações de BAP. Santa Maria, UFSM, 2009..... 56

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A - Análise de Variância para a variável contaminação fúngica em sementes de calêndula utilizando-se diferentes tempos de imersão em solução de NaOCl a 2,5%. Santa Maria, UFSM, 2009.....	63
APÊNDICE B - Análise de Variância para a variável contaminação bacteriana em sementes de calêndula utilizando-se diferentes tempos de imersão em solução de NaOCl a 2,5%. Santa Maria, UFSM, 2009.....	64
APÊNDICE C - Análise de Variância para a variável germinação <i>in vitro</i> de sementes de calêndula utilizando-se diferentes tempos de imersão em solução de NaOCl a 2,5%. Santa Maria, UFSM, 2009.....	65
APÊNDICE D - Análise de Variância para a variável contaminação fúngica <i>in vitro</i> de sementes de calêndula utilizando-se diferentes tempos de imersão em solução de NaOCl a 2,5%. Santa Maria, UFSM, 2009.....	66
APÊNDICE E - Análise de Variância para a variável contaminação bacteriana <i>in vitro</i> de sementes de calêndula utilizando-se diferentes tempos de imersão em solução de NaOCl a 2,5%. Santa Maria, UFSM, 2009.....	67
APÊNDICE F – Análise de Variância para a variável germinação <i>in vitro</i> de sementes de calêndula utilizando-se diferentes métodos de superação da barreira para a germinação <i>in vitro</i> de calêndula. Santa Maria, UFSM, 2009.....	68
APÊNDICE G – Análise de Variância para a variável rizogênese <i>in vitro</i> de segmentos foliares de calêndula utilizando-se diferentes tratamentos com fitoreguladores. Santa Maria, UFSM, 2009.....	69
APÊNDICE H – Análise de Variância para a variável calogênese <i>in vitro</i> de segmentos foliares de calêndula utilizando-se diferentes tratamentos com fitoreguladores. Santa Maria, UFSM, 2009.....	70
APÊNDICE I – Análise de Variância para a variável calogênese <i>in vitro</i> de segmentos foliares de calêndula utilizando-se diferentes tratamentos com fitoreguladores. Santa Maria, UFSM, 2009.....	71

APÊNDICE J – Análise de Variância para a variável intumescimento <i>in vitro</i> de segmentos foliares de calêndula utilizando-se diferentes tratamentos com fitorreguladores. Santa Maria, UFSM, 2009.....	72
APÊNDICE K – Análise de Variância para a variável calogênese <i>in vitro</i> de segmentos foliares de calêndula utilizando-se diferentes tratamentos com fitorreguladores. Santa Maria, UFSM, 2009.....	73
APÊNDICE L – Análise de Variância para a variável calogênese <i>in vitro</i> de calêndula utilizando-se diferentes tratamentos com fitorreguladores. Santa Maria, UFSM, 2009.....	74
APÊNDICE M – Análise de Variância para a variável rizogênese <i>in vitro</i> de calêndula utilizando-se diferentes tratamentos com fitorreguladores. Santa Maria, UFSM, 2009.....	75
APÊNDICE N – Análise de Variância para a variável tipo de calo de calêndula utilizando-se diferentes tratamentos com fitorreguladores e tempos de cultivo <i>in vitro</i> . Santa Maria, UFSM, 2009.....	76

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1 <i>Calendula officinalis</i> L.	14
2.2 A calêndula na região Sul do Brasil	15
2.3 O cultivo <i>in vitro</i>	16
2.4 Meios nutritivos.....	17
2.5 Reguladores de crescimento	18
3 MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1 Análise germinativa e sanitária.....	21
3.2 Experimentos.....	22
3.2.1 Experimento I - Desinfestação superficial e germinação <i>in vitro</i> das sementes de calêndula.	22
3.2.2 Experimento II - Desinfestação superficial e germinação <i>in vitro</i> das sementes de calêndula utilizando a retirada do tegumento da semente.	23
3.2.3 Experimento III - Seleção do método de superação da barreira à germinação <i>in vitro</i> de calêndula.	24
3.2.4 Experimento IV - Calogênese e regeneração <i>in vitro</i> de calêndula a partir de segmentos foliares.	25
3.2.5 Experimento V - Calogênese e regeneração de calêndula a partir de segmentos foliares oriundos de meio nutritivo contendo Iprodione.....	26
3.2.6 Experimento VI - Calogênese e regeneração <i>in vitro</i> de calêndula a partir de segmentos foliares oriundos de cultivo <i>ex vitro</i>	28
3.2.7 Experimento VII - Regeneração <i>in vitro</i> a partir de sementes de calêndula.	29

3.2.8 Experimento VIII - Regeneração de calos oriundos de diferentes tempos de cultivo.....	31
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1 Análise germinativa e sanitária.....	34
4.2 Experimentos.....	36
4.2.1 Experimento I - Desinfestação superficial e germinação <i>in vitro</i> das sementes de calêndula.....	36
4.2.2 Experimento II - Desinfestação superficial e germinação <i>in vitro</i> das sementes de calêndula utilizando a retirada do tegumento da semente	38
4.2.3 Experimento III - Seleção do método de superação da barreira à germinação <i>in vitro</i> de calêndula	42
4.2.4 Experimento IV - Calogênese e regeneração <i>in vitro</i> de calêndula a partir de segmentos foliares	43
4.2.5 Experimento V - Calogênese e regeneração de calêndula a partir de segmentos foliares oriundos de meio nutritivo contendo Iprodione.....	45
4.2.6 Experimento VI - Calogênese e regeneração <i>in vitro</i> de calêndula a partir de segmentos foliares oriundos de cultivo <i>ex vitro</i>	48
4.2.7 Experimento VII - Regeneração <i>in vitro</i> a partir de sementes de calêndula	50
4.2.8 Experimento VIII - Regeneração de calos oriundos de diferentes tempos de cultivo	54
5 CONCLUSÕES	57
REFERÊNCIAS.....	58
APÊNDICES	63

1 INTRODUÇÃO

A calêndula (*Calendula officinalis* L.) pertence à família Asteraceae e é originária da Europa. Essa planta tem importância comercial, pois pode ser utilizada na indústria cosmética, alimentícia, farmacêutica e como ornamental. O Sul do Brasil é um território com potencial a ser explorado para o plantio dessa espécie, em função da semelhança com as condições ambientais do mediterrâneo, seu local de origem.

Recentemente, o interesse pelo cultivo de calêndula tem aumentado, principalmente devido as suas propriedades fitoterápicas e cosméticas. Na indústria cosmética, é utilizada na fabricação de cremes, sabonetes, xampus, dentre outros. Como fitoterápico, pode ser empregada como antiinflamatório, cicatrizante, antibacteriano e antialérgico.

As populações de calêndula apresentam, naturalmente, uma grande variabilidade genética a ser explorada. A propagação *in vitro* pode auxiliar nas pesquisas relacionadas à investigação dessa variabilidade. O aumento no teor dos princípios ativos e a manutenção de suas concentrações nas gerações seguintes, através de subcultivos, são perspectivas de utilização das plantas formadas. A manutenção das concentrações desse fitocomplexo só será possível através de plantas consideradas estáveis.

Dentre as técnicas de cultura de tecidos, a calogênese pode ser utilizada para a regeneração de plantas genotipicamente diferentes das plantas doadoras dos explantes, que apresentem características mais adequadas aos interesses das indústrias de fármacos e cosméticos.

O interesse na calogênese de plantas medicinais também está na possibilidade de, através da formação e posterior regeneração dos calos, serem produzidas plantas que reúnam características desejadas. Além disso, poderá permitir seu amplo cultivo, evitar o extrativismo e ampliar o leque de possibilidades de culturas rotativas.

Para contribuir com as pesquisas que investigam os componentes bioquímicos presentes nas folhas de calêndula é importante que sejam estudados métodos de cultivo mais assépticos e padronizados. Também é necessário evitar a

ocorrência de cruzamentos indesejados, já que a calêndula é uma planta alógama. Para tanto, o cultivo *in vitro* é o método mais aplicável e de maior probabilidade de gerar resultados satisfatórios.

Constitui objetivo geral, deste trabalho, analisar o potencial de *Calendula officinalis* para cultivo *in vitro*, de maneira a contribuir no estudo de técnicas de propagação que produzam matéria-prima de alta qualidade sanitária e padronizada.

São objetivos específicos:

- caracterizar a qualidade fisiológica e sanitária de um lote de sementes de calêndula;
- desenvolver um protocolo de desinfestação superficial de sementes de calêndula;
- estabelecer uma metodologia para a germinação *in vitro* de sementes de calêndula;
- selecionar uma metodologia para a superação da barreira à germinação *in vitro* de sementes de calêndula;
- testar concentrações de fitorreguladores que induzam à formação de calos em segmentos foliares oriundos de cultivo *in vitro* e *ex vitro* de calêndula;
- avaliar o potencial de regeneração no cultivo *in vitro* a partir de sementes de calêndula na presença e na ausência de fitorreguladores;
- avaliar a influência do tempo de cultivo e das diferentes concentrações de fitorreguladores na regeneração e no tipo de calo formado.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Calendula officinalis* L.

Calendula officinalis, a calêndula, maravilha ou malmequer, pertence à família Asteraceae. É originária da Europa, mas difundiu-se por todo o mundo, sendo empregada em preparados fitoterápicos e cosméticos (BERTONI et al., 2006).

Essa planta se desenvolve em solos bem drenados e em clima temperado e frio. Seu extrato pode ser utilizado para colorir manteiga, queijo, sorvete, tinta para colorir cabelos e lã, sendo o pó das pétalas, secas ou frescas, utilizado como substituto do açafrão. Os óleos provenientes dessa planta são utilizados na indústria cosmética para a produção de sabonetes, perfumes, dentre outros. Como alimento, aumenta a coloração em peixes ornamentais. Além disso, é muito utilizada como planta ornamental (BARKLEY, 2007).

Dentre os usos medicinais apresenta ação como antiinflamatório, bactericida, antitumoral, diurético, analgésico, cicatrizante de feridas e erupções cutâneas (PARENTE et al., 2002). Tanto folhas quanto flores podem ser usadas para fins terapêuticos (VIEIRA; HEREDIA; AMORIM, 2000), atuando na cicatrização da pele e no tratamento de abscessos gástricos e inflamações glandulares e vasculares (SILVEIRA; VILLELA; TILLMANN, 2002a.).

Empresas nacionais e internacionais fazem uso de materiais vegetais para produzir medicamentos. Devido a essa demanda existente e, portanto, em função do crescente interesse pelas plantas medicinais é necessário investir em pesquisas a fim de manter ou de melhorar a qualidade da matéria-prima dessas drogas (SILVA et al., 2004), sendo esse interesse também observado para a calêndula (SILVEIRA; VILLELA; TILLMANN, 2002).

Além disso, Kalvatchev, Walder e Garzaro (1997) obtiveram bons resultados utilizando extrato orgânico de flores secas de calêndula para verificar a inativação *in vitro* do vírus da imunodeficiência humana no seu tipo 1 (HIV-1), ao aumentar a “citoproteção” sem aumentar a citotoxicidade, em concentrações inferiores a 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Esses autores reforçam a necessidade de testes adicionais para entender o

mecanismo de ação e descobrir qual o princípio ativo envolvido, citando que talvez os flavonóides tenham papel importante nesse processo. Os flavonóides são metabólitos secundários abundantemente presentes em calêndula (SILVA; GONÇALVES; RODRIGUES, 2004).

2.2 A calêndula na região Sul do Brasil

No Brasil, espécies exóticas têm sido cultivadas em grandes áreas. A calêndula, em particular, tem sido amplamente cultivada, em escala comercial, na região Sul do país, devido às condições ambientais e culturais, sendo, utilizadas as sementes para a sua propagação (PACHECO et al., 2007). As sementes de calêndula apresentam-se contidas em frutos secos, os aquênios. As flores liguladas dessa planta são capazes de produzir os frutos, já as flores tubuladas são estéreis (SILVEIRA; VILLELA; TILLMANN, 2002a.).

No cultivo de calêndula na região noroeste do Paraná, Gazim (2007), verificou que a composição química se assemelha àquela presente no seu habitat natural, a região francesa de Massif Central. Essa similaridade evidencia a sua adaptação, qualidade nos constituintes e, portanto, alto potencial de cultivo na região Sul do Brasil.

As plantas de calêndula caracterizam-se pela grande variabilidade, produzindo flores heterogêneas em cores e tamanhos (variando de 3 a 9 cm) e produzindo fitoquímicos também variáveis. Essas variações comprometem tanto a qualidade quanto a padronização dessa matéria prima de fitoterápicos e cosméticos (BERTONI et al., 2006). A variabilidade é visível pelas diferentes sementes produzidas, com relação à forma e tamanho dos aquênios produzidos (SILVEIRA; VILLELA; TILLMANN, 2002a.).

Outra forma de se perceber a variabilidade genética é através dos diferentes números de capítulos florais, que têm como origem dessa diferença o tipo de diásporo do qual se originou. Além disso, o número de capítulos florais também é influenciado pelas cores dos capítulos das plantas matrizes (VIEIRA et al., 2006).

2.3 O cultivo *in vitro*

O cultivo *in vitro* de calêndula é uma técnica alternativa de propagação para a obtenção de matéria-prima de alta qualidade e uniforme para uso na indústria cosmética e farmacêutica.

A aplicação mais prática comprovada e de maior impacto da cultura de tecidos é a micropropagação. Para a micropropagação existe um sistema básico, composto inicialmente de uma seleção de explantes, da desinfestação desses e sua cultura em meio nutritivo sob condições assépticas. Após esse estágio, ocorre a multiplicação dos micropropágulos através de subcultivos em meio específico para multiplicação. O estágio final é a transferência das partes aéreas produzidas, através do meio de multiplicação, para o meio de enraizamento, finalizando com o transplântio para um substrato ou solo (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Uma das maneiras de multiplicar um explante é via indução de gemas adventícias por organogênese direta ou indireta. Essas gemas são denominadas adventícias por serem induzidas em regiões nas quais, naturalmente, não se formariam. A forma indireta refere-se à fase de calogênese, ou seja, ocorre a formação de calos a qual antecede a regeneração das gemas adventícias. Às vezes, a desdiferenciação para existir precisa de organogênese indireta, como, por exemplo, quando se utilizam folhas como explantes (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

O que torna uma planta capaz de se regenerar *in vitro* é a capacidade fisiológica da planta-matriz que age sob controle de fatores endógenos, ou seja, o fato de uma planta poder se regenerar não está associado, somente, ao seu genótipo. O tamanho de explante também influencia na taxa de contaminação por microrganismos: quanto maior o explante maior a chance de contaminação, porém maiores são as chances de sobrevivência e crescimento do explante. Além disso, a desinfestação, assim como o estado fisiológico na planta matriz, é um fator de extrema importância. Para tanto se utilizam, geralmente, etanol e compostos à base de cloro como, hipoclorito de sódio, bicloreto de mercúrio e ácido clorídrico, dentre outros. Nesses compostos adicionam-se gotas de detergente, a fim de otimizar o contato com os explantes a serem inoculados (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). A superfície do explante deve sofrer um processo no qual se objetiva a eliminação

bacteriana e fúngica. Esse processo, denominado desinfestação, é necessário para evitar que microrganismos entrem em competição por nutrientes. Além disso, a regeneração do explante pode ser prejudicada pela produção de toxinas desses microrganismos contaminantes. As concentrações de hipoclorito de sódio mais utilizadas para a desinfestação dos explantes variam de 0,5% a 1%, durante 5 a 20 minutos, sucedidas de lavagens em água destilada autoclavada. Essas variações dependem do tipo e idade dos tecidos (ANDRADE, 2002). Durante a desinfestação ou no próprio meio nutritivo pode ser utilizado fungicida (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

2.4 Meios nutritivos

Há muitos anos, pesquisas relacionadas à cultura de tecidos vêm sendo feitas testando-se diferentes meios nutritivos a fim de se obter sucesso na micropropagação de plantas (TORRES; CALDAS; FERREIRA, 1998). Um meio de cultura é composto, basicamente, de macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, suplementos de ferro, fontes de carbono e/ ou fitormônios, além de outros aditivos como aminoácidos, componentes nitrogenados, água e ágar (DODDS; ROBERTS, 1995). Para a obtenção de meios solidificados, o ágar (polissacarídeo extraído de algas marinhas) é o reagente mais utilizado. Um dos componentes do meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), é o mio-inositol, empregado para estimular o crescimento *in vitro*, sendo que sua concentração mais utilizada é de 100 mg L⁻¹ (CALDAS; HARIDASAN; FERREIRA, 1998). Como a água é o componente de maior quantidade no meio nutritivo e uma fonte potencial de impurezas, podendo afetar o crescimento *in vitro*, deve ser purificada (CALDAS; HARIDASAN; FERREIRA, 1998).

Como muitos explantes não apresentam estruturas necessárias à fotossíntese e/ou não encontram condições adequadas de CO₂, uma fonte artificial de carboidratos torna se necessária. A sacarose é o carboidrato mais utilizado nos meios nutritivos por, na maioria das espécies, suportar altas taxas de crescimento (CALDAS; HARIDASAN; FERREIRA, 1998).

Essas substâncias são fundamentais ao crescimento dos explantes, permitindo também o controle do padrão de desenvolvimento *in vitro*.

2.5 Reguladores de crescimento

Os reguladores de crescimento ou fitorreguladores são substâncias sintetizadas em laboratório, que alteram os padrões de desenvolvimento da planta, assim como suas análogas, as sintetizadas endogenamente na planta (TERMIGNONI, 2005).

A composição e a concentração de fitorreguladores presentes nos meios nutritivos podem determinar o crescimento e o padrão de desenvolvimento (CALDAS; HARIDASAN; FERREIRA, 1998). Além disso, a determinação do crescimento e do padrão de desenvolvimento pode depender da sensibilidade do explante ao fitorregulador, sendo dependente do tipo de tecido utilizado como explante, das condições fisiológicas e de seu estado de desenvolvimento (HINOJOSA, 2000).

Os reguladores de crescimento mais utilizados *in vitro* são as auxinas e as citocininas. Podem ser utilizadas na formação de raiz, de parte aérea e de calo em cultura de tecidos (SKOOG; MILLER, 1957). Para diferentes espécies, a formação de calos, segundo Yeoman (1970), pode não depender de auxina e citocinina, assim como, pode depender de auxina ou apenas de citocinina ou, ainda, depender de ambas as classes de reguladores de crescimento. Portanto, alguns tecidos dependem totalmente desses reguladores de crescimento e outros tecidos endogenamente são suficientes nesses reguladores (CALDAS; HARIDASAN; FERREIRA, 1998).

Quantidades excessivas de auxina podem ajudar na regeneração a partir de tecidos não meristemáticos, pois estimulam a formação de calo (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Altas concentrações de citocinina podem ser tóxicas e levar à vitrificação (LESHEM et al., 1988).

A auxina produzida naturalmente no ápice é transportada pelo caule em direção basípeta. Sua distribuição, além de depender do tipo de tecido utilizado, das condições fisiológicas e do estado de desenvolvimento, sua concentração na planta

não é uniforme. Sua concentração endógena ocorre em ordem decrescente do ápice caulinar, gemas de crescimento, sementes em formação, folhas novas, folhas maduras, ápices radiculares, grãos de pólen e câmbio (HINOJOSA, 2000). Essa classe de fitorreguladores é utilizada, primeiramente, para a indução de calos e no enraizamento. Já na fase de regeneração ou indução de gemas adventícias, ou seja, na fase de organogênese, a importância de auxinas é menos relevante que a de citocininas (HINOJOSA, 2000).

Na cultura de tecidos, a utilização de auxinas dependerá dos objetivos da pesquisa e da espécie em questão. No caso de indução de calos, os fitorreguladores que podem ser usados são o ácido naftalenoacético (ANA), o ácido diclorofenoxiacético (2,4-D), o Picloram e o Thidiazuron (TDZ). ANA é uma auxina sintética, assim como o 2,4-D, o ácido indolpropirônico (AIP) e o ácido 2, metil 4-clorofenoxiacético (MCPA) (HINOJOSA, 2000). Esses fitorreguladores podem iniciar a divisão celular, além de controlar os processos de crescimento e alongação de células (NOGUEIRA et al., 2007). Para tanto, é necessário que se analise o balanço hormonal, ou seja, o gradiente que gera um equilíbrio entre as citocininas e as auxinas, exógenas e endógenas, e afeta o controle do desenvolvimento, podendo estimular a proliferação celular (NOGUEIRA, 2006).

Nem todos os tecidos têm a capacidade de sintetizar citocininas, que são produzidas, naturalmente, em geral, em embriões, frutos, folhas jovens e ápices radiculares (CID, 2000). Em geral, os fitormônios naturais, são mais suscetíveis à degradação pela citocinina oxidase. Por outro lado, um alto suprimento exógeno, uma citocinina sintética, como 6-Benzilaminopurina (BAP), pode incrementar a atividade desta enzima e, com isso, impedir a divisão celular ou a brotação (CID, 2000).

Citocininas podem causar hiperhidricidade, também conhecida como vitrificação, do material regenerado, como ocorre com TDZ. Tanto citocininas naturais quanto sintéticas poderão dificultar o enraizamento dos brotos regenerados se permanecerem por muito tempo em contato (CID, 2000).

As citocininas são muito utilizadas em diversas técnicas de cultura de tecidos, como organogênese, cultura de protoplastos, suspensão celular e embriogênese somática. São fundamentais na etapa de regeneração dos calos ou na multibrotação de gemas axilares ou apicais de plantas lenhosas ou herbáceas (CID, 2000).

Ao se retirar da planta um fragmento de órgão ou tecido, este perde sua identidade e, ao ser utilizado como explante, passa a constituir um novo sistema, pois reconhece as novas condições às quais foi submetido. O balanço dos fitorreguladores presentes nas condições atuais de cultivo *in vitro*, assim como os nutrientes do meio e a origem do explante, são fatores importantes para que ocorra a diferenciação do explante utilizado em um novo sistema, o calo (TERMIGNONI, 2005).

O novo sistema denominado calo não é um sistema desorganizado, pois apresenta uma estrutura própria com gradientes nutricionais derivados da sua interação com o meio de cultivo *in vitro*. Esse novo sistema pode ser mais facilmente gerado, com mais chances de regeneração e com um tamanho maior através da utilização de tecidos como meristemas, folha jovem e região vascular da raiz. Assim para a regeneração do calo ser mais eficiente deve-se utilizar um calo compacto e verde, ou contendo regiões verdes e também é sugerido que seja oriundo de tecidos cultivados sob luz e ou oriundo de tecidos com balanço favorecendo as citocininas exógenas (TERMIGNONI, 2005).

As condições de cultura, englobando, dentre outros fatores, o balanço de reguladores de crescimento, assim como o tipo de órgão doador do tecido, sua idade e posição na planta matriz e fatores relacionados à planta-mãe, como o genótipo, o grau de ploidia, a idade e as condições nas quais foi cultivada, influenciam no padrão de diferenciação de um calo. A interação entre as condições de cultivo e as condições do tecido explantado pode gerar vários tipos de calo, sendo o fator de maior relevância dessa interação, o balanço hormonal (TERMIGNONI, 2005).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

A análise sanitária e da germinação foram realizadas no Laboratório de Fitopatologia, localizado no Departamento de Defesa Fitossanitária, Centro de Ciências Rurais (CCR), prédio 42 da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, Rio Grande do Sul.

Os experimentos relacionados ao cultivo *in vitro* foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, localizado no Núcleo de Biotecnologia e Melhoramento, Departamento de Fitotecnia, prédio 77, CCR, UFSM.

As sementes de *Calendula officinalis* analisadas são originárias da Holanda, sendo comercializadas pela empresa Isla de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, em lata hermeticamente fechada. O número do lote utilizado foi 21013-HZ, peso líquido de 50 g, sem a presença de defensivos. O referido lote foi analisado em 09/2006 apresentando validade até 09/2008, tendo 92% de germinação e 99,2% de pureza, de acordo com as informações contidas no recipiente. Após a abertura da lata, as sementes foram mantidas em câmara seca e fria a aproximadamente 18°C, localizada no Laboratório de Análise de Sementes de Produção, Departamento de Fitotecnia, UFSM.

No cultivo *in vitro* as unidades experimentais (UE) foram acondicionadas na sala de crescimento sob temperatura de 25°C $\pm$ 3°C, fotoperíodo de 16 h, intensidade luminosa de 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ obtida por lâmpadas fluorescentes brancas frias.

3.1 Análise germinativa e sanitária

Para a realização dessa análise foram utilizadas caixas Gerbox (11 cm X 11 cm X 4 cm), as quais foram previamente desinfestadas com álcool a 70% e hipoclorito de sódio (NaOCl) comercial (2,5% de cloro ativo). As sementes foram colocadas nessas caixas Gerbox, sobre três folhas papel filtro autoclavado, umedecidas com água destilada autoclavada, as quais, após fechadas, foram

inseridas em sacos plásticos para manter a umidade presente no interior da caixa. Em seguida, foram encaminhadas à câmara de crescimento onde permaneceram durante 15 dias. A câmara de crescimento proporcionou um fotoperíodo de 16 h através de lâmpadas fluorescentes brancas frias e temperatura controlada de $25^{\circ}\text{C} \pm 3$. Foram utilizadas oito repetições, sendo cada repetição composta de 24 sementes, em cada caixa.

Aos sete dias de cultivo realizou-se a contagem de sementes germinadas. Foram consideradas como germinadas as plântulas normais, isto é, aquelas que demonstram potencial em desenvolver-se e originar descendentes, sob boas condições de umidade, temperatura e luminosidade (BRASIL, 1992).

Posteriormente, aos 14 dias foram avaliadas as sementes que não germinaram, classificadas como firmes ou mortas. Igualmente, foi avaliada a porcentagem de plântulas normais “fortes” e “fracas”, sendo consideradas normais “fortes” as que se apresentaram sadias e bem desenvolvidas (NAKAGAWA, 1999).

A porcentagem de germinação foi calculada com base no número de plântulas normais, que, assim como os demais resultados, foram expressos em porcentagem média. Para a análise sanitária utilizaram-se sementes provenientes da análise de germinação, sendo que as avaliações sanitárias foram realizadas com o auxílio de microscópio estereoscópio e, quando necessário, utilizou-se microscópio óptico.

3.2 Experimentos

3.2.1 Experimento I - Desinfestação superficial e germinação *in vitro* das sementes de calêndula

Primeiramente, efetuou-se a imersão das sementes em solução de etanol a 70%, por 30 s. Logo em seguida, de acordo com o tratamento, foram utilizados diferentes tempos de imersão em solução de hipoclorito de sódio a 2,5% (0, 10, 20 e 30 min) acrescida de uma gota de detergente comercial. Para remover o excesso

de resíduos dos agentes desinfetantes foram realizados três enxagues com água estéril.

Imediatamente após a desinfestação, os explantes, em número de três, foram inoculados em frascos, com capacidade de 150 ml, contendo 30 ml de meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), previamente autoclavado por 15 min a 121°C e a 1,5 atm, acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose e 7 g L⁻¹ de ágar. A inoculação das sementes foi realizada em câmara de fluxo laminar, com o auxílio de pinças, lamparina e álcool para flambagem.

Foram avaliadas, após 15 dias de cultivo, as variáveis contaminação (fúngica e bacteriana) e germinação *in vitro*, sendo utilizados 20 frascos por tratamento, sendo cinco repetições com quatro frascos de três sementes cada, em delineamento inteiramente casualizado.

Os dados percentuais foram transformados para arcosseno de $\sqrt{x + 0,5 / 100}$ e submetidos à Análise de Variância e Análise de Regressão Polinomial, com o auxílio do programa SANEST (ZONTA; MACHADO, 1987).

3.2.2 Experimento II - Desinfestação superficial e germinação *in vitro* das sementes de calêndula utilizando a retirada do tegumento da semente

Os procedimentos e tratamentos utilizados foram os mesmos do experimento I, ou seja, primeiramente, efetuou-se a imersão das sementes em solução de etanol a 70%, por 30 s. Logo em seguida, de acordo com o tratamento, foram utilizados diferentes tempos de imersão em solução de hipoclorito de sódio a 2,5% (0, 10, 20 e 30 min) acrescida de uma gota de detergente comercial, sucedido por três enxagues com água estéril. Entretanto, de maneira diferente do que foi efetuado no experimento I, neste houve a remoção do tegumento das sementes sob condições assépticas.

As sementes foram inoculadas em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) reduzido à ¼ da concentração de sais e diminuída à metade a concentração de sacarose (15 g L⁻¹) e 7 g L⁻¹ de ágar, previamente autoclavado por 15 min a 121°C e

a 1,5 atm. A inoculação das sementes foi realizada em câmara de fluxo laminar, com o auxílio de pinças, lamparina e álcool para flambagem.

Foram avaliadas, após 15 dias de cultivo, as variáveis contaminação (fúngica e bacteriana) e germinação *in vitro*, sendo utilizados 20 frascos por tratamento, sendo cinco repetições com quatro frascos de três sementes cada, em delineamento inteiramente casualizado.

Os dados percentuais foram transformados para arcoseno de $\sqrt{x + 0,5/100}$ e submetidos à Análise de Variância e Análise de Regressão Polinomial, com o auxílio do programa SANEST (ZONTA; MACHADO, 1987).

3.2.3 Experimento III – Seleção do método de superação da barreira à germinação *in vitro* de calêndula

Primeiramente, efetuou-se a imersão das sementes em solução de etanol a 70%, por 30 s, sucedida da imersão em solução de hipoclorito de sódio a 2,5%, durante 30 minutos, acrescida de uma gota de detergente comercial.

Foram mantidas as condições de cultivo do Experimento II, ou seja, as sementes foram inoculadas em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) reduzido à $\frac{1}{4}$ da concentração de sais e diminuída à metade a concentração de sacarose (15 g L⁻¹), além de 7 g L⁻¹ de ágar, previamente autoclavado por 15 min a 121°C e a 1,5 atm. A inoculação das sementes foi realizada em câmara de fluxo laminar, com o auxílio de pinças, lamparina e álcool para flambagem.

Após efetuados esses procedimentos, as sementes foram submetidas aos seguintes tratamentos para superar a barreira para a germinação *in vitro* de calêndula:

tratamento 1 – imersão em Ácido Sulfúrico absoluto durante 5 min;

tratamento 2 – imersão em Ácido Clorídrico absoluto durante 5 min;

tratamento 3 – retirada do tegumento e embebição das sementes em água destilada, durante 12 h;

tratamento 4 – embebição das sementes em água destilada, durante 12 h;

tratamento 5 – controle, sementes que não sofreram nenhum tratamento de superação da barreira à germinação.

O Experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, contendo cinco repetições, sendo cada repetição composta por cinco frascos, contendo três sementes, ou seja, 15 sementes por repetição. Foi avaliada a porcentagem de germinação *in vitro* após sete dias de cultivo.

Os dados percentuais foram transformados para arcosseno de $\sqrt{x + 0,5/100}$, submetidos à Análise de Variância e as médias, comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro, com o auxílio do programa SANEST (ZONTA; MACHADO, 1987).

3.2.4 Experimento IV – Calogênese e regeneração *in vitro* de calêndula a partir de segmentos foliares

Os explantes utilizados foram retirados das plântulas originadas do Experimento III, sendo o tamanho do segmento foliar,,utilizado para a inoculação, de 2 cm por 1 cm.

Foram mantidas as condições de cultivo do Experimento II, ou seja, as sementes foram inoculadas em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) reduzido à ¼ da concentração de sais e diminuída à metade a concentração de sacarose (15 g L⁻¹), além de 7 g L⁻¹ de ágar, previamente autoclavado por 15 min a 121°C e a 1,5 atm. A inoculação dos explantes foi realizada em câmara de fluxo laminar, com o auxílio de pinças, lamparina e álcool para flambagem.

Os tratamentos foram os seguintes:

tratamento 1: ausência de fitorreguladores;

tratamento 2: 0,01 mg L⁻¹ de ANA;

tratamento 3: 0,5 mg L⁻¹ de BAP;

tratamento 4: 0,5 mg L⁻¹ de BAP e 0,01 mg L⁻¹ de ANA;

tratamento 5: 1 mg L⁻¹ de BAP;

tratamento 6: 1 mg L⁻¹ de BAP e 0,01 mg L⁻¹ de ANA;

tratamento 7: 1,5 mg L⁻¹ de BAP;

tratamento 8: 1,5 mg L⁻¹ de BAP e 0,01 mg L⁻¹ de ANA.

Foram avaliadas, ao final de 30 dias, as variáveis: formação de calo, formação de raiz, formação de parte aérea e regeneração a partir de calo.

O Experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, esquema bifatorial (BAP x ANA), contendo cinco repetições por tratamento, sendo cada repetição composta de dois frascos contendo três sementes cada, ou seja, seis sementes por repetição.

Os dados percentuais foram transformados para arcoseno de $\sqrt{x + 0,5/100}$ e submetidos à Análise de Variância e Análise de Regressão Polinomial, com o auxílio do programa SANEST (ZONTA; MACHADO, 1987).

3.2.5 Experimento V - Calogênese e regeneração de calêndula a partir de segmentos foliares oriundos de meio nutritivo contendo Iprodione

Primeiramente, efetuou-se a imersão das sementes em solução de etanol a 70%, por 30 s, sucedida da imersão em solução de hipoclorito de sódio a 2,5%, durante 30 min, acrescida de uma gota de detergente comercial e posterior remoção do tegumento das sementes, sob condições assépticas. Foram mantidas as condições de cultivo do Experimento II, ou seja, as sementes e, posteriormente, os segmentos foliares foram inoculados em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) reduzido à ¼ da concentração de sais e diminuída à metade a concentração de sacarose (15 g L⁻¹), além de 7 g L⁻¹ de ágar, previamente autoclavado por 15 min a 121°C e a 1,5 atm. A inoculação das sementes, assim como dos segmentos foliares, foi realizada em câmara de fluxo laminar, com o auxílio de pinças, lamparina e álcool para flambagem.

As sementes inoculadas permaneceram durante 30 dias na sala de cultivo, até atingirem tamanho suficiente (2 cm por 1 cm) para o isolamento de segmentos

foliares como explante. Foi adicionado ao meio nutritivo o fungicida Iprodione a 50 mg L⁻¹.

O Experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, esquema bifatorial (BAP x ANA), contendo cinco repetições por tratamento, sendo cada repetição composta de dois frascos contendo três sementes cada, ou seja, seis sementes por repetição.

Os tratamentos foram os mesmos do Experimento IV, ou seja:

tratamento 1: ausência de fitorreguladores;

tratamento 2: 0,01 mg L⁻¹ de ANA;

tratamento 3: 0,5 mg L⁻¹ de BAP;

tratamento 4: 0,5 mg L⁻¹ de BAP e 0,01 mg L⁻¹ de ANA;

tratamento 5: 1 mg L⁻¹ de BAP;

tratamento 6: 1 mg L⁻¹ de BAP e 0,01 mg L⁻¹ de ANA;

tratamento 7: 1,5 mg L⁻¹ de BAP;

tratamento 8: 1,5 mg L⁻¹ de BAP e 0,01 mg L⁻¹ de ANA.

Foram avaliadas, ao final de 30 dias, as variáveis: germinação *in vitro*, formação de calo, nível de intumescimento dos calos (intumescidos ou pouco intumescidos), formação de raiz, formação de parte aérea e regeneração a partir de calo.

Os dados percentuais foram transformados para arcoseno de $\sqrt{x + 0,5/100}$ e submetidos à Análise de Variância e Análise de Regressão Polinomial, com o auxílio do programa SANEST (ZONTA; MACHADO, 1987). Para a variável intumescimento dos calos, os dados percentuais foram transformados para arcoseno de $\sqrt{x + 0,5/100}$, submetidos à Análise de Variância e as médias, comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro, com o auxílio do programa SANEST (ZONTA; MACHADO, 1987).

Para fins de avaliação, na variável intumescimento foram atribuídas notas de acordo com o nível de intumescimento, sendo adotada para calos intumescidos a maior nota (100,0000) e para calos menos intumescidos a menor nota (33,3333) (FIGURA 1).

Tamanho (aproximado)		
	8 mm	15 mm
		
Nota		
0	33,3333	100,0000

FIGURA 1 – Ilustração do tamanho aproximado dos calos e suas respectivas notas de acordo com o nível de intumescimento considerado. Santa Maria, UFSM, 2009.

3.2.6 Experimento VI – Calogênese e regeneração *in vitro* de calêndula a partir de segmentos foliares oriundos de cultivo *ex vitro*

Para avaliar explantes oriundos de cultivo *ex vitro*, sementes de calêndula foram semeadas no final do mês de março de 2008 e permaneceram por 90 dias na casa de vegetação do Departamento de Fitotecnia, UFSM. As sementes foram semeadas em vasos plásticos com capacidade para 3 Kg contendo o substrato Plantmax^R.

No final de maio de 2008, foram aplicados 1,5 g L⁻¹ de Iprodione nas folhas das plantas. Após sete dias fez-se uma segunda aplicação e, na semana seguinte, ocorreu o isolamento e a inoculação *in vitro* dos segmentos foliares, os quais apresentaram tamanho aproximado de 2 cm por 1 cm.

Para a desinfestação superficial das folhas empregou-se a imersão em solução de etanol a 70% por 1 min e, logo em seguida, imersão em solução de hipoclorito de sódio a 0,5% por 5 min, acrescida de uma gota de detergente. Para retirar o excesso de resíduos dos agentes desinfetantes foram realizados três enxágües com água estéril.

Imediatamente após a desinfestação, os explantes, em número de três, foram inoculados em frascos, com capacidade de 150 ml, contendo 30 ml de $\frac{1}{4}$ de meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), previamente autoclavado por 15 min a 121°C e a 1,5 atm, acrescido de 15 g L⁻¹ de sacarose e 7 g L⁻¹ de ágar. A inoculação dos explantes foi realizada em câmara de fluxo laminar, com o auxílio de pinças, lamparina e álcool para flambagem. Os segmentos foliares permaneceram durante 30 dias na sala de cultivo.

O Experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, esquema bifatorial (BAP x ANA), contendo 10 repetições por tratamento, sendo cada repetição composta de dois frascos contendo três sementes cada. Os tratamentos foram os mesmos do Experimento IV, ou seja:

tratamento 1: ausência de fitorreguladores;

tratamento 2: 0,01 mg L⁻¹ de ANA;

tratamento 3: 0,5 mg L⁻¹ de BAP;

tratamento 4: 0,5 mg L⁻¹ de BAP e 0,01 mg L⁻¹ de ANA;

tratamento 5: 1 mg L⁻¹ de BAP;

tratamento 6: 1 mg L⁻¹ de BAP e 0,01 mg L⁻¹ de ANA;

tratamento 7: 1,5 mg L⁻¹ de BAP;

tratamento 8: 1,5 mg L⁻¹ de BAP e 0,01 mg L⁻¹ de ANA.

Foram avaliadas, ao final de 30 dias, as variáveis: formação de calo, formação de raiz, formação de parte aérea e regeneração a partir de calo.

Os dados percentuais foram transformados para arcoseno de $\sqrt{x + 0,5/100}$ e submetidos à Análise de Variância e Análise de Regressão Polinomial, com o auxílio do programa SANEST (ZONTA; MACHADO, 1987).

3.2.7 Experimento VII - Regeneração *in vitro* a partir de sementes de calêndula

Para a desinfestação superficial das sementes foi empregada imersão em solução de etanol a 70%, por 30 s, e, logo em seguida, imersão em solução de

hipoclorito de sódio a 2,5% por 30 min, acrescida de uma gota de detergente. Para retirar o excesso de resíduos do agente desinfetante foram realizados três enxágües com água estéril.

Imediatamente após a desinfestação, foi realizada a inoculação dos explantes. Foram mantidas as condições de cultivo do Experimento II, ou seja, as sementes foram inoculadas em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) reduzido à $\frac{1}{4}$ da concentração de sais e diminuída à metade a concentração de sacarose (15 g L^{-1}), além de 7 g L^{-1} de ágar, previamente autoclavado por 15 min a 121°C e a 1,5 atm. A inoculação das sementes foi realizada em câmara de fluxo laminar, com o auxílio de pinças, lamparina e álcool para flambagem.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, esquema bifatorial (BAP X ANA), contendo cinco repetições por tratamento, sendo cada repetição composta de um frasco contendo três sementes. Os tratamentos foram os seguintes:

tratamento 1: ausência de fitorreguladores;

tratamento 2: $0,5 \mu\text{mol}$ de ANA;

tratamento 3: $2 \mu\text{mol}$ de BAP;

tratamento 4: $2 \mu\text{mol}$ de BAP e $0,5 \mu\text{mol}$ de ANA;

tratamento 5: $3 \mu\text{mol}$ de BAP;

tratamento 6: $3 \mu\text{mol}$ de BAP e $0,5 \mu\text{mol}$ de ANA;

tratamento 7: $4 \mu\text{mol}$ de BAP;

tratamento 8: $4 \mu\text{mol}$ de BAP e $0,5 \mu\text{mol}$ de ANA;

tratamento 9: $5 \mu\text{mol}$ de BAP;

tratamento 10: $5 \mu\text{mol}$ de BAP e $0,5 \mu\text{mol}$ de ANA;

tratamento 11: $6 \mu\text{mol}$ de BAP;

tratamento 12: $6 \mu\text{mol}$ de BAP e $0,5 \mu\text{mol}$ de ANA;

tratamento 13: $7 \mu\text{mol}$ de BAP;

tratamento 14: $7 \mu\text{mol}$ de BAP e $0,5 \mu\text{mol}$ de ANA.

Foram avaliadas, ao final de 30 dias, as variáveis: germinação *in vitro*, formação de calo, formação de raiz, formação de parte aérea e regeneração a partir de calo.

Os dados percentuais foram transformados para arcosseno de $\sqrt{x + 0,5/100}$ e submetidos à Análise de Variância e Análise de Regressão Polinomial, com o auxílio do programa SANEST (ZONTA; MACHADO, 1987).

3.2.8 Experimento VIII – Regeneração de calos oriundos de diferentes tempos de cultivo

Os calos provenientes do Experimento VII foram adicionados àqueles formados no Experimento V para a realização deste ensaio. Depois de formados, os calos foram subcultivados e inoculados em meio nutritivo contendo $\frac{1}{4}$ de meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), acrescido de 15 g L^{-1} de sacarose, 7 g L^{-1} de ágar e $1,5 \text{ g L}^{-1}$ de carvão ativado, previamente autoclavado por 15 min a 121°C e a 1,5 atm. Os calos provenientes dos Experimentos V e VII foram mantidos nesse meio durante 15 dias. O carvão ativado foi empregado para efetuar a retenção de concentrações excessivas de fitorreguladores e compostos tóxicos (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Os calos pertencentes ao Experimento V foram oriundos dos tratamentos, **T6** (1 mg L^{-1} de BAP e $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA), **T7** ($1,5 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP e 0 mg L^{-1} de ANA) e **T8** ($1,5 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP e $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA). Nesses tratamentos houve a presença de calos verdes e marrom-claros. Do Experimento VII, foram oriundos dos tratamentos **T3** ($2 \mu\text{mol}$ de BAP), **T4** ($2 \mu\text{mol}$ de BAP e $0,5 \mu\text{mol}$ de ANA), **T5** ($3 \mu\text{mol}$ de BAP), **T6** ($3 \mu\text{mol}$ de BAP e $0,5 \mu\text{mol}$ de ANA), **T9** ($5 \mu\text{mol}$ de BAP), **T10** ($5 \mu\text{mol}$ de BAP e $0,5 \mu\text{mol}$ de ANA), **T12** ($6 \mu\text{mol}$ de BAP e $0,5 \mu\text{mol}$ de ANA) e **T14** ($7 \mu\text{mol}$ de BAP e $0,5 \mu\text{mol}$ de ANA).

Os calos foram agrupados em duas classes: **calos velhos (provenientes do Experimento V)**, com aproximadamente 135 dias de formação, e **calos jovens (oriundos do Experimento VII)**, com 30 dias de formação. A alocação (dos calos jovens e dos calos velhos) aos tratamentos foi aleatória.

Na transferência dos explantes manteve-se o número de três por frasco, o qual possuía capacidade de 150 ml, contendo 30 ml de $\frac{1}{4}$ de meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), previamente autoclavado por 15 min a 121°C e a 1,5 atm, acrescido de 15 g L⁻¹ de sacarose e 7 g L⁻¹ de ágar, ao qual foram adicionados fitorreguladores nas concentrações a seguir discriminadas:

tratamento 1: ausência de fitorreguladores em meio contendo calos novos;

tratamento 2: ausência de fitorreguladores em meio contendo calos velhos;

tratamento 3: 2 μ ml de BAP e 0,5 μ ml de ANA em meio contendo calos novos;

tratamento 4: 2 μ ml de BAP e 0,5 μ ml de ANA em meio contendo calos velhos;

tratamento 5: 5 μ ml de BAP e 0,5 μ ml de ANA em meio contendo calos novos;

tratamento 6: 5 μ ml de BAP e 0,5 μ ml de ANA em meio contendo calos velhos;

tratamento 7: 6 μ ml de BAP e 0,5 μ ml de ANA em meio contendo calos novos;

tratamento 8: 6 μ ml de BAP e 0,5 μ ml de ANA em meio contendo calos velhos;

tratamento 9: 7 μ ml de BAP e 0,5 μ ml de ANA em meio contendo calos novos.

tratamento 10: 7 μ ml de BAP e 0,5 μ ml de ANA em meio contendo calos velhos.

Foram avaliadas a presença de neorganogênese (regeneração) e a existência de relação entre essa regeneração, concentrações de fitorreguladores e tempo de cultivo *in vitro* dos calos de calêndula. Também foi analisada a influência desses fatores no tipo de calo que foi induzido. A avaliação foi realizada ao final de 30 dias de cultivo *in vitro*.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, esquema bifatorial (BAP X tempo de cultivo do calo), contendo cinco repetições por tratamento, sendo cada repetição composta de um frasco contendo três calos.

Para a variável tipo de calo foram atribuídas notas de acordo com a característica do calo formado, sendo conferida, para calos esponjosos e friáveis, a maior nota (100,0000), seguida de calos verdes e rígidos (66,6666) e calos pequenos (33,3333) (FIGURA 2).

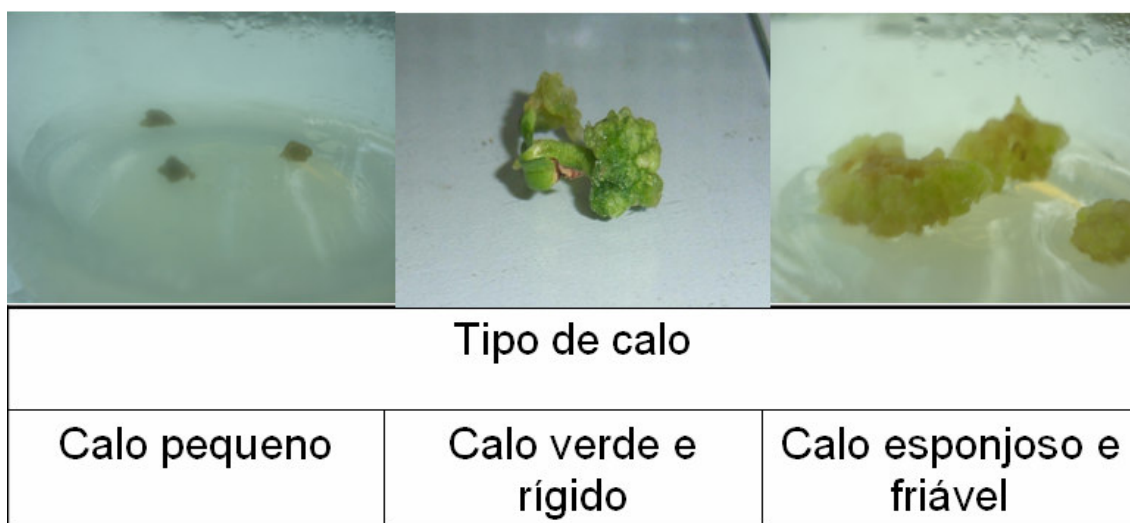


FIGURA 2 – Ilustração dos tipos de calo avaliados. Santa Maria, UFSM, 2009.

Os dados percentuais foram transformados para arcoseno de $\sqrt{x + 0,5/100}$, submetidos à Análise de Variância e as médias, comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro, com o auxílio do programa SANEST (ZONTA; MACHADO, 1987).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise germinativa e sanitária

Apenas 10% das sementes germinaram, sugerindo a existência de fatores impedindo a germinação, sendo obtido um valor muito inferior ao descrito no rótulo da embalagem das sementes (92%).

Na avaliação de vários métodos de análise da qualidade fisiológica em diferentes lotes de sementes de calêndula, Silveira, Villela e Tillman (2002a) observaram divergência entre os valores da porcentagem de germinação indicada nos rótulos de latas hermeticamente fechadas e os valores percentuais observados no ensaio de germinação. Para estes autores, a maior taxa de germinação (86%) ocorreu 36 dias após a antese, depois de ter ocorrido a maturidade fisiológica de sementes de calêndula, considerada acontecer entre 28 e 32 dias após a antese. Ainda segundo estes autores, isso estaria relacionado à dormência, uma característica de Asteraceae. No presente estudo, no entanto, a dormência pode ser descartada como fator causal da reduzida germinação, devido à baixa porcentagem de sementes firmes (7%) observadas. Assim, a provável responsável pela baixa porcentagem de germinação foi a presença de microrganismos. .

Das sementes germinadas, 10% delas formaram plântulas normais (outros 7,5%, plântulas anormais), das quais 71,66% foram plântulas normais fortes e 28,33% normais fracas.

O comprimento médio da radícula das plântulas foi de 3,48 cm e o comprimento médio do hipocótilo foi de 2,48 cm, obtendo-se uma relação raiz/parte aérea de 1,40.

O comprimento da radícula como parâmetro de avaliação do vigor das sementes foi considerado uma forma eficaz de distinguir diferentes lotes de aveia-preta. Ao serem avaliados os lotes, foi observado que a relação raiz/parte aérea foi maior (a relação raiz/parte aérea mais alta foi de 1,042) nos lotes com alto vigor (SCHUCH et al., 1999). No presente estudo, essa relação apresentou-se alta, o que sugere um alto vigor das plântulas germinadas. Em outro trabalho, no entanto, o

comprimento das plântulas de diferentes lotes de calêndula não foi um parâmetro eficiente para diferenciá-los de acordo com sua qualidade fisiológica. A emissão de raiz primária, o índice de velocidade de emergência e os testes de primeira contagem da germinação foram responsáveis pela distinção entre os lotes de sementes de calêndula em níveis de vigor (SILVEIRA; VILLELA; TILLMANN, 2002a).

Aos 14 dias foram observados 7% de sementes firmes e 75,5% de sementes mortas. Há que se mencionar, contudo, que este elevado percentual de sementes mortas não condiz com a germinação observada nos experimentos conduzidos *in vitro*, com a retirada do tegumento, ou sob substrato na casa de vegetação. Provavelmente, a concentração de compostos fenólicos no papel filtro e no meio de cultura abaixo e ao redor das sementes associado à presença de microrganismos sejam responsáveis por este resultado. Esta hipótese é sustentada pela identificação de quatro gêneros fúngicos nas sementes analisadas, com predominância de indivíduos do gênero *Alternaria*, presentes em 75% do total de sementes, além de *Phomopsis* (12,5%), *Curvularia* (1%) e *Cladosporium* (1%).

Por outro lado, em coentro (*Coriandrum sativum* L.) mesmo estando presentes duas espécies do gênero *Alternaria*, não houve prejuízos à germinação e ao vigor, pois a emergência ocorreu em mais de 80% das sementes (REIS et al., 2006).

Na única caixa Gerbox em que não ocorreu *Alternaria*, verificaram-se indivíduos do gênero *Phomopsis*, sugerindo a existência de uma relação antagônica, através de uma antibiose, entre esses dois gêneros. Um trabalho realizado por Gomes (2008) sugeriu uma relação de antagonismo entre *Phomopsis* sp. e *Guignardia citricarpa*, fungos endofíticos de plantas medicinais, em virtude da ocorrência de inibição do crescimento de linhagens do fitopatógeno *Guignardia citricarpa* através da ação antimicrobiana de *Phomopsis* sp. Dos 49 isolados de *Phomopsis* avaliados, 38 inibiram o crescimento, em mais de 50%, de *G. citricarpa* 50%. Contudo, são necessários estudos adicionais para comprovar a interação proposta no presente trabalho.

4.2 Experimentos

4.2.1 Experimento I - Desinfestação superficial e germinação *in vitro* das sementes de calêndula

Não ocorreu germinação, da mesma maneira que foi observado na Análise Germinativa, o que pode ser explicado pela presença de fungos, principalmente, pertencentes ao gênero *Alternaria*.

Não foi observada diferença entre os tratamentos em relação à contaminação fúngica, obtendo-se uma média de 27,56 %.

Já para a contaminação bacteriana verificou-se diferença significativa entre os tratamentos, observando-se a redução da contaminação à medida que aumentou o tempo de imersão em solução de NaOCl a 2,5%. Com imersão durante 10 min obteve-se 6,61% de contaminação bacteriana, utilizando-se 20 min de imersão a contaminação foi reduzida para 1,61%, sendo totalmente eliminada ao ser utilizado o tratamento de 30 min de imersão. Já para as testemunhas, ocorreu uma média de 30,42% de contaminação bacteriana (FIGURA 3).

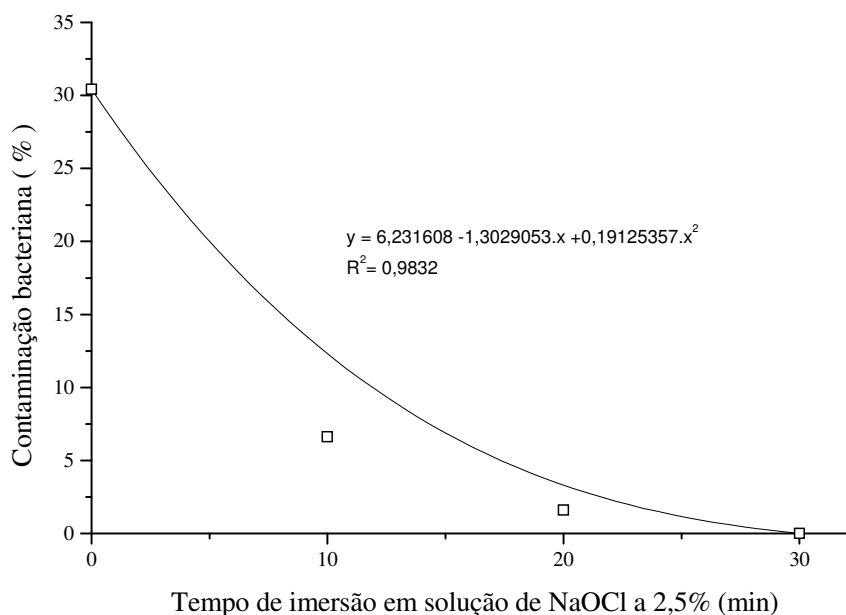


FIGURA 3 - Efeito de diferentes tempos de imersão em solução de NaOCl a 2,5% sobre a contaminação bacteriana das sementes de calêndula aos 15 dias de cultivo *in vitro*. Santa Maria-RS, UFSM, 2009.

Uma das maneiras de realizar a desinfestação de sementes de orquídeas para serem utilizadas no cultivo *in vitro* foi o uso de solução de hipoclorito de sódio. Contudo, com o aumento na concentração da solução ocorreu um decréscimo na germinação de sete espécies de orquídeas. Dentre os tratamentos utilizados o que continha solução de hipoclorito de sódio a 0,4% foi o mais eficiente, com uma taxa de germinação de 87%. Já em outra concentração testada, 0,8%, os resultados não foram satisfatórios. Além disso, o menor tempo de imersão testado, 5 min, foi o recomendado (ALVAREZ-PARDO; FERREIRA; NUNES, 2006). Estes resultados diferem dos obtidos neste trabalho com sementes de calêndula, nos quais se recomenda o tempo de imersão mais alto utilizado, 30 min, e a concentração, de 2,5%, que é alta por ser um experimento de desinfestação.

4.2.2 Experimento II - Desinfestação superficial e germinação *in vitro* das sementes de calêndula utilizando a retirada do tegumento da semente

Os tratamentos que incluíram a imersão em solução de NaOCl a 2,5% a 10, 20 e 30 min tiveram médias de germinação de, respectivamente, 79,86%, 64,85% e 74,84% enquanto no tratamento testemunha essa média foi reduzida a 39,50% (FIGURA 4), o que sugere que a utilização de NaOCl e a retirada do tegumento foram eficientes em promover a germinação.

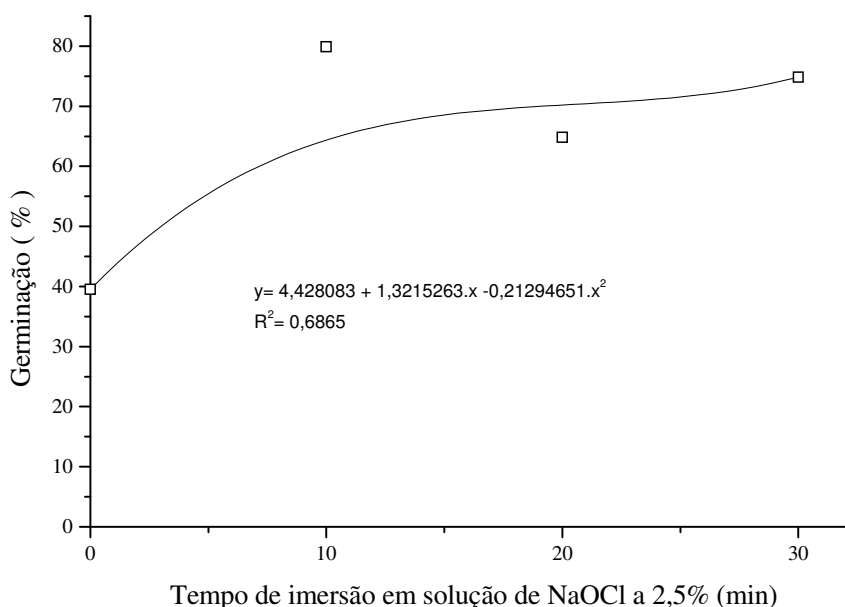


FIGURA 4 - Efeito de diferentes tempos de imersão em solução de NaOCl a 2,5% na germinação *in vitro* das sementes de calêndula aos 15 dias de cultivo, utilizando-se a retirada do tegumento. Santa Maria-RS, UFSM, 2009.

Ocorreu diferença significativa entre os tratamentos em relação à variável contaminação fúngica. Com imersão em solução de NaOCl a 2,5% durante 30 min, foi verificada média de 13,35% para a contaminação por fungos; utilizando-se um tempo de imersão de 20 min, a média foi de 30,71%, e imersão durante 10 min promoveu 25,4% de contaminação. Já para a testemunha, o resultado foi de 38,55%, o que indica que a imersão em solução de NaOCl a 2,5% não ocasiona prejuízos à germinação e é eficiente na descontaminação (FIGURA 5).

O uso da mesma concentração de solução de hipoclorito de sódio (2,5%) em sementes de mamoneira (*Ricinus communis* L.), durante 20 min, demonstrou que sementes inteiras e sementes quebradas não são indicadas para o processo de regeneração *in vitro*, por apresentarem alto nível de contaminação por *Aspergillus flavus* sp. Nesta espécie é recomendada a utilização de eixo embrionário obtido de semente embebida ou não em água estéril (ROCHA et al., 2003). Evidenciando, desta maneira, a inexistência de toxicidade da solução de NaOCl (2,5%), a eficácia na minimização de contaminantes fúngicos e na utilização de sementes sem tegumento. A retirada do tegumento, ao permitir a germinação possibilita inferir que os fungos estariam presentes no tegumento das sementes e não no interior dessas.

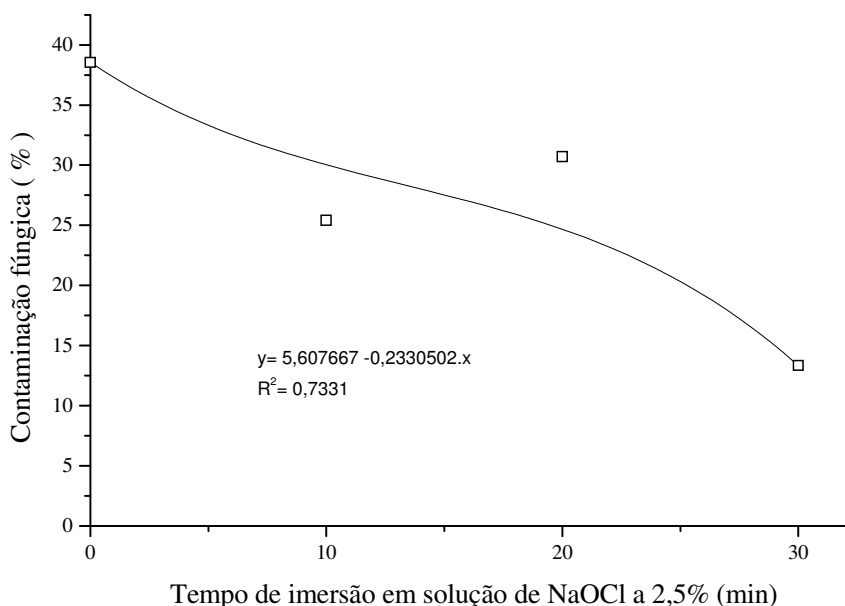


FIGURA 5 - Efeito de diferentes tempos de imersão em solução de NaOCl a 2,5% sobre a contaminação fúngica de sementes de calêndula após 15 dias de cultivo *in vitro*, utilizando-se a retirada do tegumento. Santa Maria-RS, UFSM, 2009.

O processo de desinfestação foi fundamental para a redução das contaminações causadas por bactérias, havendo diferença significativa entre os tratamentos. A imersão em solução de NaOCl a 2,5% por 30 min, mostrou-se a mais eficiente na eliminação de bactérias, apresentando uma média de 93,39% de desinfestação. A imersão por 20 min eliminou 88,62% e, para o tratamento que

utilizou a imersão durante 10 min, a média foi de 71,9% de desinfestação. Já para a testemunha, a desinfestação foi de 61,02% (FIGURA 6).

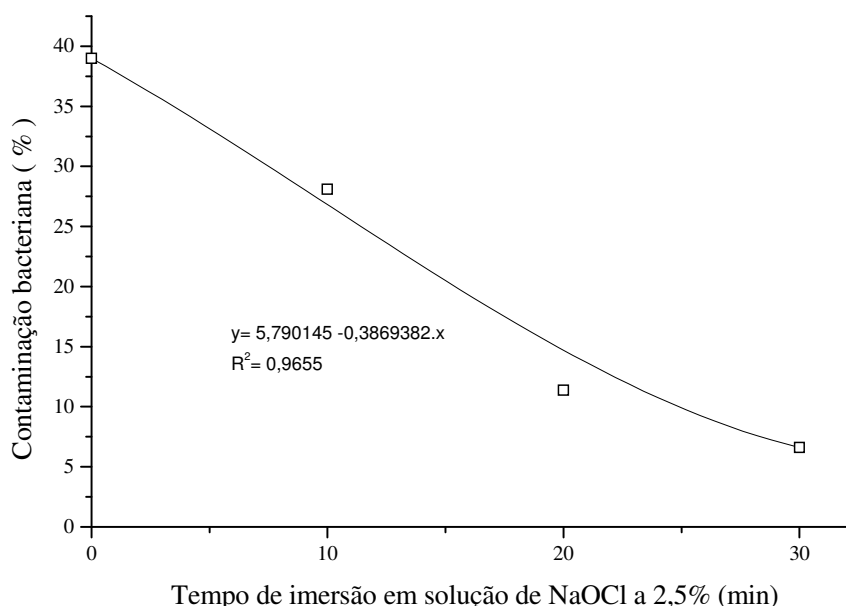


FIGURA 6 - Efeito de diferentes tempos de imersão em solução de NaOCl a 2,5% sobre a contaminação bacteriana de sementes de calêndula após 15 dias de cultivo *in vitro*, utilizando-se a retirada do tegumento. Santa Maria-RS, UFSM, 2009.

Ao serem avaliadas as concentrações 0,2; 0,4; 0,6 e 0,8% de hipoclorito de sódio e 8, 12, 16 e 20 min de imersão, a maior concentração associada ao tempo de imersão de 16 min promoveu uma melhor desinfestação de segmentos nodais (33,7%) de Alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham) (COSTA et al., 2007).

Em porongo (*Lagenaria siceraria* (Mol.) Standl), a desinfestação e a germinação *in vitro* foram otimizadas através da retirada do tegumento de sementes (BISOGNIN et al., 2008). Para a desinfestação, as sementes, desprovidas de tegumento, foram imersas em álcool a 70% por 1 min e, após, em solução de 3 a 4% de hipoclorito de sódio por 10 min. Esse procedimento também foi eficiente no presente estudo, sendo a retirada do tegumento uma forma de maximizar a desinfestação e a germinação em *Calendula officinalis*.

No teste de diferentes explantes (sementes, capítulos florais e segmentos nodais oriundos de cultivo *in vitro* e, também, de plantas do campo) de calêndula para cultivo *in vitro*, capítulos florais e segmentos nodais oriundos de cultivo *in vitro*

apresentaram menos contaminação que os demais, sendo recomendados para uso. O índice de desinfestação observado para sementes foi de 64,00% e segmentos nodais oriundos do cultivo a campo apresentaram 100% de contaminação (BERTONI et al., 2006).

Em estudos preliminares, ocorreu vitrificação em todos os tratamentos avaliados, mas não na totalidade dos explantes.

Na micropropagação de calêndula, Bertoni et al. (2006) também observaram vitrificação quando foram utilizados segmentos nodais como explantes. Esse evento ocorreu em todos os tratamentos com diferentes fitorreguladores (cinetina - KIN, zeatina - ZEA e benziladenina - BA), mesmo quando foram utilizados meios basais diferentes e testados fotoperíodo, ausência de luz ou luz contínua. A hiperhidricidade impede a redução na condutância estomatal, levando à redução na eficiência da fotossíntese, e diminui o incremento no conteúdo de clorofila, sendo esses fatores determinantes para a incapacidade de plantas vitrificadas serem futuramente aclimatizadas (BERTONI et al., 2006).

Para cravo, tratamentos com diferentes concentrações de BAP foram testados quanto à vitrificação e, mesmo em concentrações consideradas baixas, a vitrificação não foi impedida. O aumento da concentração de BAP é considerado um dos responsáveis pelo aumento da porcentagem de vitrificação. No entanto, o controle também apresentou alguns indivíduos vitrificados, o que sugeriu que BAP não é o único fator responsável pela vitrificação (CUZZUOL et al., 1995).

Experimentos com diferentes "tipos de vedação" e concentrações de ágar contribuíram e muito na redução da vitrificação (CUZZUOL et al., 1995). Concentrações elevadas de phytigel também contribuíram para reduzir os níveis percentuais de vitrificação em calêndula (BERTONI et al., 2006). No entanto, nos dois trabalhos, o aumento da concentração do agente solidificante interferiu negativamente no desenvolvimento das plântulas.

Para calêndula, o aumento na concentração de sacarose estimulou o aumento da porcentagem de plantas vitrificadas (BERTONI et al., 2006). Além disso, a redução da concentração de sacarose diminui a reprodução de fungos e bactérias que se nutrem do meio, já que a sacarose aumenta a contaminação microbiana (ERIG; SCHUCH, 2005).

4.2.3 Experimento III – Seleção do método de superação da barreira à germinação *in vitro* de calêndula

Para a variável germinação *in vitro* ocorreu diferença significativa entre os tratamentos. A retirada do tegumento das sementes possibilitou a germinação de 74,41% das sementes de calêndula (TABELA 1), sendo o método mais eficiente em promover a germinação. A ausência de germinação, no tratamento controle, sugere que, além da barreira à germinação gerada pela contaminação fúngica, indicada na análise sanitária e germinativa, há obstáculos a serem superados devido à possível presença de compostos fenólicos no tegumento das sementes. Esse fato é agravado no cultivo *in vitro*, no qual há uma concentração dos compostos fenólicos abaixo e ao redor do explante, pois não ocorre lixiviação, como ocorreria em substrato de cultivo *ex vitro*. Outro componente do cultivo *in vitro*, a luz, ocasiona a oxidação desses compostos fenólicos, limitando a disponibilidade de oxigênio (VIEIRA, 1991), e, conseqüentemente, a germinação.

TABELA 1 – Médias de germinação *in vitro* de sementes de calêndula utilizando-se diferentes métodos de superação da barreira. Santa Maria, UFSM, 2009.

Tratamento	Germinação (%)
Sem Tegumento e com embebição	74,41a
Embebição	3,94 b
H ₂ SO ₄	2,61 b
HCl	0,00 b
Controle	0,00 b

* Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Igualmente, em outro estudo com calêndula, Grzelak e Janiszowska (2002) verificaram que a excisão de embriões maduros de sementes foi eficiente em promover a germinação *in vitro*. Em *Passiflora giberti* N.E.Brown, Viana e Junghans (2006) observaram que a retirada parcial do tegumento elevou, extremamente, o percentual de sementes germinadas *in vitro*. Para maximizar a velocidade de germinação de sementes de maracujá-doce (*Passiflora alata* Curtis), a retirada do

tegumento mostrou-se o tratamento mais eficiente, sendo que sua remoção parcial também apresentou bom resultado (JUNGHANS; JUNGHANS; CASTELLEN, 2006).

A despeito dos bons resultados obtidos, a superação da barreira à germinação por meio da retirada do tegumento é muito trabalhosa e demorada, sendo necessário avaliar outras possibilidades menos custosas (FIGURA 7).



Figura 7 – Plântula normal de calêndula cultivada *in vitro* oriunda do tratamento que utilizou embebição em água destilada e retirada do tegumento. Santa Maria, UFSM, 2009.

4.2.4 Experimento IV – Calogênese e regeneração *in vitro* de calêndula a partir de segmentos foliares

Ocorreu a formação de raiz após 15 dias e, de calos, a partir de 21 dias de cultivo.

Em relação à formação de raiz foi verificada diferença significativa apenas entre os diferentes tratamentos com BAP. Para os tratamentos com diferentes

concentrações de ANA não ocorreu diferença significativa, o mesmo sendo verificado para a interação entre os fitorreguladores BAP e ANA.

Na ausência da citocinina, foi observada a formação de raiz, com média de 19,63% de rizogênese (FIGURA 8); com a suplementação com BAP não ocorreu a formação de raiz. Isso sugere não haver necessidade de suplementação com citocininas para promover a rizogênese em calêndula.

Em sangra d'água (*Croton urucurana* Baill.), Lima et al. (2008), observaram a emissão de raízes na ausência de BAP e presença de ANA, nas concentrações 1, 2, 3, 4 e 5 mg L⁻¹, o mesmo acontecendo com 1 mg L⁻¹ BAP e 4 e 5 mg L⁻¹ de ANA. Este resultado difere do registrado por Grzelak e Janiszowska (2002), que sugerem que quantidades de citocininas cinco vezes superiores às quantidades de auxinas favorecem a formação de raízes em calêndula.

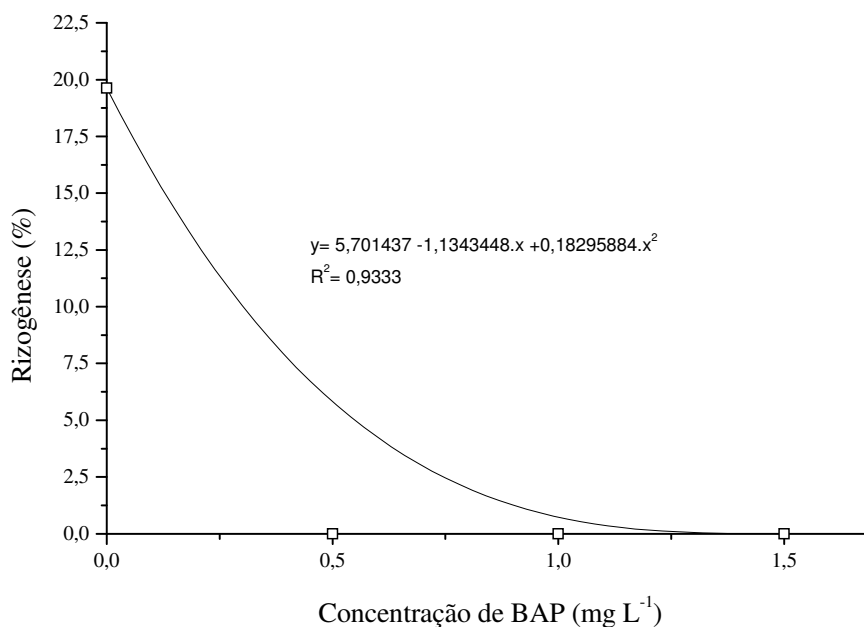


FIGURA 8 - Efeito de diferentes concentrações de BAP (mg L⁻¹) sobre a formação de raiz em calêndula após 30 dias de cultivo *in vitro*. Santa Maria-RS, UFSM, 2009.

A calogênese foi verificada em 24,58% dos explantes, tanto na ausência quanto na presença dos fitorreguladores testados. Portanto, para a variável

formação de calos não ocorreu diferença significativa entre os tratamentos para a interação entre os fitorreguladores BAP e ANA. Isso demonstra que a suplementação com esses fitorreguladores, nas concentrações avaliadas, não interferiu na formação de calos. Em segmentos foliares de sangra d'água o uso de BAP, isoladamente, e a combinação entre ANA e BAP não promoveu calogênese (LIMA et al., 2008).

Com o objetivo de obter calos friáveis a partir de explantes foliares de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A Juss.) foram avaliadas diferentes concentrações de 2,4-D e suas combinações com Thidiazuron (TDZ) e BAP, sendo observado que as citocininas avaliadas, nas concentrações utilizadas, não influenciaram a formação de calos e que o oposto ocorreu com a auxina, além de ser verificada a necessidade de condições de escuro. Os autores supõem que a citocinina adicionada ao meio nutritivo em ação conjunta à citocinina endógena do segmento foliar geraram uma elevada concentração deste fitorregulador em relação à auxina, diminuindo a calogênese (NOGUEIRA et al., 2007).

Melhores resultados para a indução, crescimento e manutenção de calos de explantes foliares em *Ginkgo biloba* L. ocorreu com ANA (4,37 e 43,7 μ M), ou 2,4D (4,52 μ M), sacarose 87,6 mM e na presença de luz (MANTOVANI et al., 2006).

A formação de calos a partir de explantes foliares também foi verificada em cupuaçu, com uma porcentagem de até 69,2% de calos friáveis utilizando se TDZ (thidiazuron). Essa calogênese talvez seja dependente da presença de citocininas. A presença de ANA, 2iP (isopentenil adenina) e água de coco, em meio secundário, também induziu a formação de calos friáveis em folhas jovens. Devido ao meio de cultura ou ao tipo e concentração de fitorreguladores ou ao tipo e estágio de desenvolvimento dos explantes, não foi verificada a formação de calos embriogênicos (LEDO; LAMEIRA; BENBADIS, 2002).

4.2.5 Experimento V - Calogênese e regeneração de calêndula a partir de segmentos foliares oriundos de meio nutritivo contendo Iprodione

As sementes inoculadas em meio contendo Iprodione apresentaram 84,16% de germinação, ou seja, um alto percentual germinativo *in vitro*. Para desinfestar

sementes de calêndula, BERTONI et al. (2006) utilizaram solução de Benomil 1% (p/v), durante 1 h, e solução de hipoclorito de cálcio a 0,5% (p/v), durante 15 min, ambas sob agitação, e, por último, enxaguaram-nas com água autoclavada. No entanto, obtiveram uma porcentagem de desinfestação de apenas 64%.

Em sementes de coentro, a associação dos fungicidas Thiram e Iprodione também mostrou-se eficiente no controle de *Alternaria* (REIS et al., 2006).

Para a variável formação de calos houve diferença significativa entre os tratamentos para os efeitos principais. É interessante ressaltar a média do tratamento a 0,5 mg L⁻¹ de BAP, o qual apresentou a melhor porcentagem de formação de calos (89,2%) (FIGURA 9). A suplementação com ANA, na concentração utilizada, mostrou se eficiente na formação de calos quando comparada à ausência desse fitorregulador (71,51 x 43,8 respectivamente).

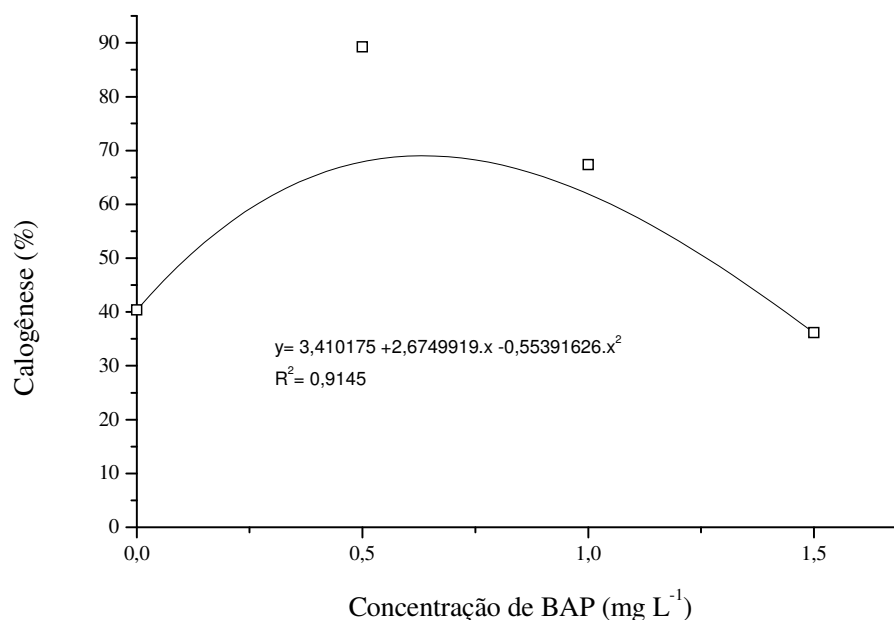


FIGURA 9 - Efeito de diferentes concentrações de BAP (mg L⁻¹) sobre a formação de calos em calêndula após 30 dias de cultivo *in vitro*. Santa Maria-RS, UFSM, 2009.

Para calos intumescidos e não intumescidos ocorreu diferença significativa entre os tratamentos com relação às diferentes concentrações de BAP.

Calos mais intumescidos aumentaram de tamanho com o tempo de cultivo e foram mais friáveis que os calos menos intumescidos. No tratamento em que não ocorreu a suplementação com BAP os calos formados tornaram-se menos intumescidos (TABELA 2). Provavelmente, a suplementação com esse fitorregulador estabelece um novo balanço hormonal, favorável ao intumescimento dos calos. Portanto, é sugerida a suplementação com 0,5 mg L⁻¹ de BAP, favorecendo tanto o intumescimento quanto a calogênese, e a adição de ANA (0,01 mg L⁻¹), sendo esse fitorregulador utilizado no intumescimento, porém dispensável para a calogênese.

TABELA 2 - Teste de médias para a variável intumescimento de calos nas diferentes concentrações de BAP. Santa Maria, UFSM, 2009.

Concentrações de BAP (mg L ⁻¹)	Intumescimento de calos(%)
0	26,13 b
0,5	71,02a
1	39,13ab
1,5	51,31ab

*Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Alguns calos mais intumescidos tiveram a capacidade de regenerar folhas (FIGURA 10), como, por exemplo, no Tratamento 4 (repetição 10) e no Tratamento 7 (repetição 7).

Os calos dos tratamentos 6 (repetição 1), 7 (repetição 10) e 8 (repetição 8) foram utilizados, 135 dias depois, para a realização do experimento que investigou a presença ou ausência de diferenças entre a regeneração desses calos e de calos com apenas 30 trinta dias de cultivo *in vitro*.



Figura 10 – Regeneração de calo oriundo de segmento foliar em meio contendo $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP e $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA. Santa Maria, UFSM, 2009.

4.2.6 Experimento VI – Calogênese e regeneração *in vitro* de calêndula a partir de segmentos foliares oriundos de cultivo *ex vitro*

Para a variável formação de calos não houve interação significativa entre os fitorreguladores utilizados, assim como a presença e a ausência de ANA não interferiram na calogênese; o contrário foi verificado na suplementação com diferentes concentrações de BAP.

Os tratamentos em que não ocorreu suplementação com BAP e naqueles com a menor concentração testada ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP) foram os responsáveis pelas menores porcentagens de calogênese. Já com $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP foi verificada a maior média de formação de calos, 37,82%. Isso ocorre, provavelmente, devido ao novo balanço hormonal verificado em um estágio mais avançado de desenvolvimento, no qual se encontravam os explantes utilizados (FIGURA 11).

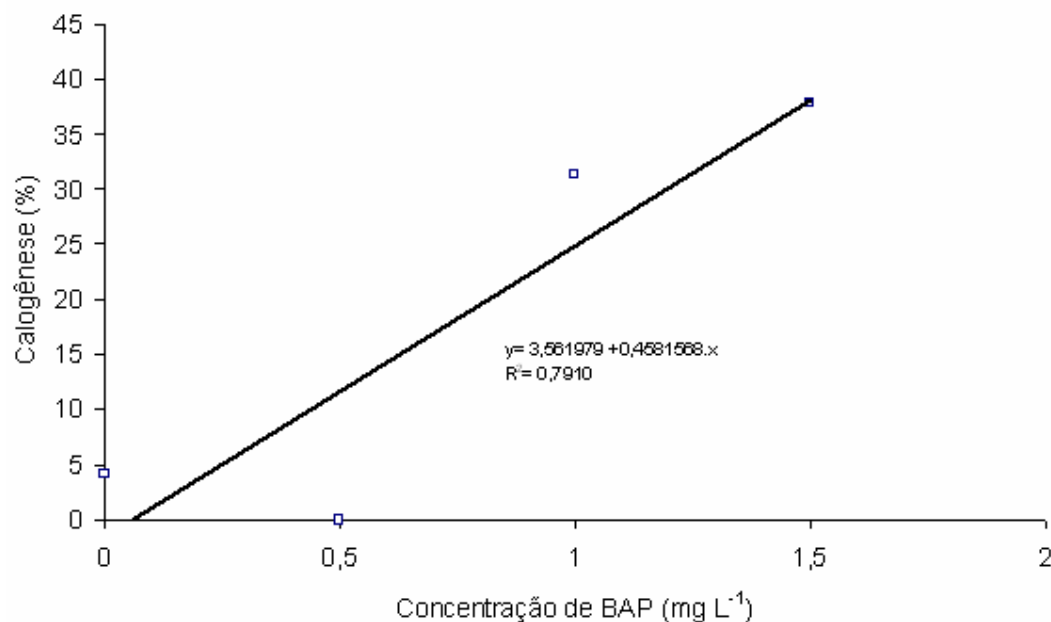


FIGURA 11 - Efeito de diferentes concentrações de BAP (mg L⁻¹) sobre a formação de calos em segmentos foliares de calêndula cultivados *in vitro*. Santa Maria-RS, UFSM, 2009.

Explantos oriundos de brotações novas são os mais indicados, como explantes, para promoverem a calogênese (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998), pois, como verificado no presente estudo, os calos formados senesceram ao serem transferidos para meio contendo $\frac{1}{4}$ de MS acrescido de 15 g L⁻¹ de sacarose e 7 g L⁻¹ de ágar, provavelmente em função dos explantes serem oriundos de folhas que não eram mais jovens, tendo sido semeadas há 90 dias. É possível que o estágio de desenvolvimento avançado das plantas na casa de vegetação que deram origem aos explantes tenha proporcionado essa resposta. Esses resultados sugerem que esse estágio de desenvolvimento avançado das plantas matrizes proporciona uma menor concentração endógena de citocinina e necessita de concentrações mais elevadas de citocininas exógenas para ordenarem o novo balanço hormonal necessário à formação de calos.

A alta atividade de citocinina oxidase, em alguns explantes, ao degradar as citocininas impede que ocorra um balanço auxina/citocinina endógeno e, até mesmo, que ocorra a adição de elevadas concentrações de citocininas no meio de cultivo.

Tal fato impede a indução da formação de gemas (PERES, 2002), justificando a inexistência de regeneração no presente estudo com calêndula.

Em tomateiro, a calogênese foi observada em meios contendo auxinas e citocininas ($1,0 \text{ mg L}^{-1}$ BAP e $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ ANA), com média de 16% após 30 dias, sendo verificada a presença de calos verdes a partir da cultura de anteras *in vitro* (BRASILEIRO et al., 1999). O percentual observado foi muito inferior ao verificado no presente experimento.

4.2.7 Experimento VII - Regeneração *in vitro* a partir de sementes de calêndula

Ocorreu germinação de 69,76% das sementes, sendo que todas aquelas que germinaram apresentaram parte aérea, independente do tratamento aplicado. Ocorreram rizogênese e calogênese após 15 dias de cultivo *in vitro*. Além disso, ocorreram multibrotações (FIGURA 12) em quatro frascos pertencentes ao tratamento 4 (dois frascos, $2 \mu \text{ mol}$ de BAP e $0,5 \mu \text{ mol}$ de ANA), 5 ($3 \mu \text{ mol}$ de BAP) e 6 ($3 \mu \text{ mol}$ de BAP e $0,5 \mu \text{ mol}$ de ANA), os quais apresentaram possibilidade de regenerar aproximadamente 20 plantas, baseado no número de brotações. Assim, foram observadas a organogênese direta de folhas e a organogênese indireta (neorganogênese) (FIGURA 13).

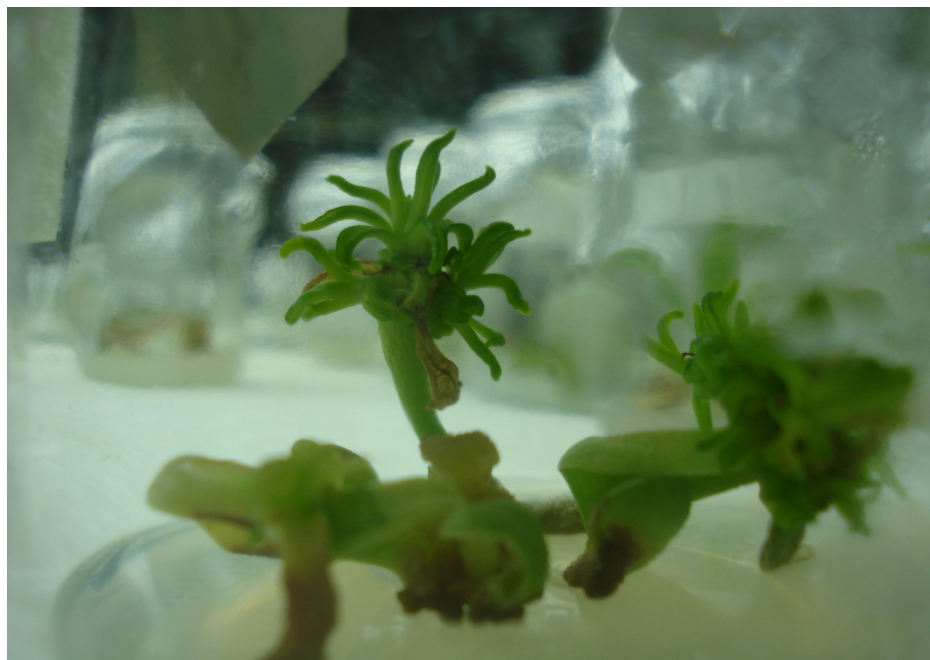


Figura 12 – Regeneração através da multibrotação em plântulas de calêndula *in vitro* em meio contendo $3 \mu\text{mol}$ de BAP e $0,5 \mu\text{mol}$ de ANA. Santa Maria, UFSM, 2009.



Figura 13 – Calogênese e organogênese em plântulas de calêndula *in vitro* em meio contendo $3 \mu\text{mol}$ de BAP e $0,5 \mu\text{mol}$ de ANA. Santa Maria, UFSM, 2009.

Ocorreu neorganogênese de ápices vegetativos desenvolvendo-se novas folhas a partir dos calos formados, ou seja, originou-se uma estrutura monopolar, evidenciando a terceira fase da formação de um calo e a ausência de embriogênese somática, a qual não era desejada.

Ocorreu diferença significativa para a interação entre BAP e ANA em relação à variável formação de calo, no entanto, essa interação só foi verificada na presença de ANA. Para as médias de BAP dentro do fator 2 de ANA (presença de ANA a $0,5 \mu\text{mol}$) o tratamento que induziu mais calos foi o tratamento que utilizou $7 \mu\text{mol}$ de BAP, obtendo-se uma média de 43,64 %. Evidencia-se, novamente, que com o uso de auxina é necessário um suplemento de citocinina a fim de efetivar a calogênese (FIGURA 14).

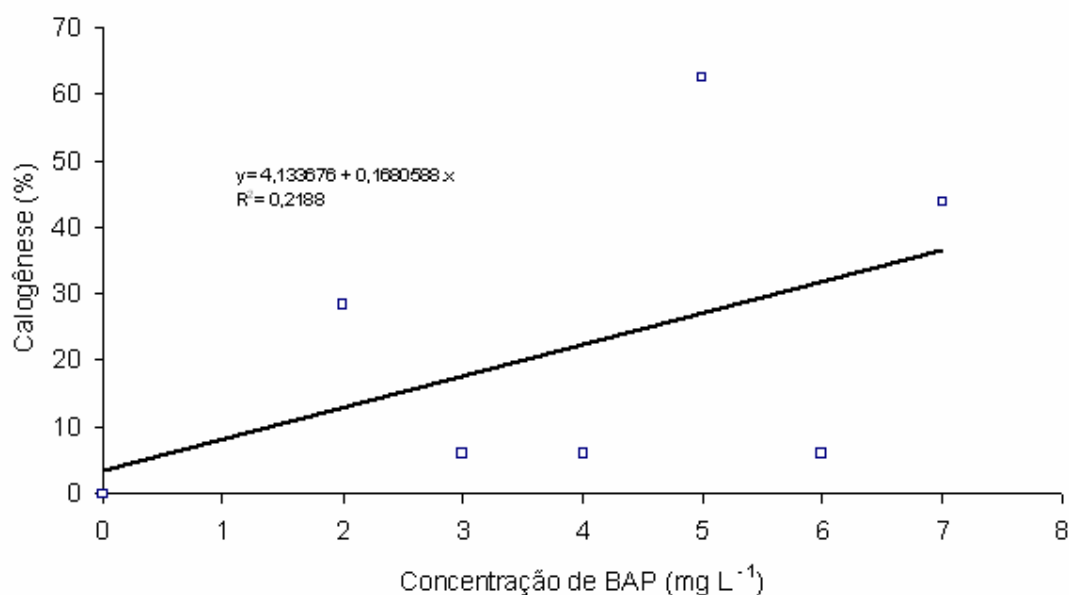


FIGURA 14 - Efeito de diferentes concentrações de BAP (mg L⁻¹) na presença de ANA sobre calos oriundos de calêndula após 30 dias de cultivo *in vitro*. Santa Maria-RS, UFSM, 2009.

Diferindo desse estudo, o emprego de ANA (4,37 e 43,7 μM) ou 2,4D (4,52 μM), independentemente do tipo e concentração de citocinina, com a sacarose como carboidrato e o cultivo dos explantes na presença de luz, Mantovani et al. (2006) obtiveram os melhores resultados para as fases de indução, crescimento e manutenção de calos em *Ginkgo biloba* L. A formação de calos friáveis em explantes

foliares de cupuaçu talvez seja dependente da presença de citocininas (LEDO; LAMEIRA; BENBADIS, 2002).

Em abaxizeiro (*Ananas comosus* (L.) Merr.) a melhor taxa de brotos axilares por explante foi de 15,7, sendo verificada no tratamento que continha ANA (2,7 µM) + BAP (4,4 µM) (GUERRA et al., 1999). Também com abacaxizeiro, Macêdo et al. (2003) ao adicionar 1 mg L⁻¹ de BAP e 0,5 de mg L⁻¹ de ANA ao meio de cultivo, observaram a maior regeneração de brotos e de matéria fresca, apesar desses brotos apresentarem dificuldades de individualização.

Para a formação de raiz, não houve interação significativa entre os fatores BAP e ANA, havendo diferença significativa entre os tratamentos para os efeitos principais.

O tratamento que promoveu maior rizogênese foi o tratamento que não utilizou BAP, obtendo-se uma média de 53,92% (FIGURA 15).

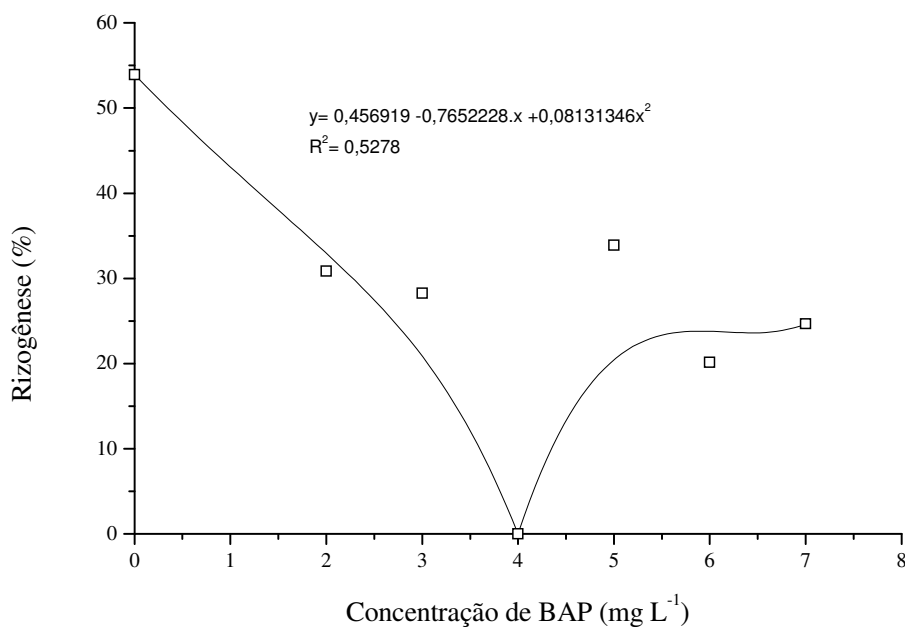


FIGURA 15 - Efeito de diferentes concentrações de BAP (mg L⁻¹) na ausência e na presença de ANA sobre a rizogênese em explantes de calêndula após 30 dias de cultivo *in vitro*. Santa Maria-RS, UFSM, 2009.

Para que ocorra a rizogênese *in vitro*, não é necessária a suplementação com ANA, tendo sido observado 19,75% de formação de raiz na presença deste regulador de crescimento e 33,85% na sua ausência.

Foram obtidos baixos valores dos coeficientes de determinação (R^2) nesse experimento, provavelmente, devido ao tipo de explante utilizado. Nas sementes cultivadas em meio nutritivo contendo fitorreguladores, ocorre uma grande variabilidade de resposta para formação de calo e raiz, já que a organogênese e a calogênese podem, teoricamente, surgir em qualquer tecido vegetal.

Em todos os tratamentos, exceto nos quais não foi adicionado ANA, observou-se, em algumas repetições, um crescimento anormal das plântulas, identificado pela inexistência de um caule desenvolvido do qual surgiria abundante folhagem, ao invés, surgiram muitas folhas oriundas de um pequeno caule.

Em *Gingko biloba* L. em todos os tratamentos foi verificada a formação de folhas anormais, além de pecíolos curtos e lâmina foliar retorcida nos brotos, sendo que a presença de auxina foi fundamental para a produção de calos (MANTOVANI et al., 2006).

4.2.8 Experimento VIII – Regeneração de calos oriundos de diferentes tempos de cultivo

Na presença de carvão ativado não foram verificadas alterações morfológicas nos calos. O carvão ativado não foi efetivo para a formação de múltiplos brotos.

Foi verificada a ocorrência da interação entre os fatores, ou seja, os fatores tempo de cultivo de calos e concentrações de BAP interferem no tipo de calo originado, sendo verificada a presença de calos pequenos, calos esponjosos e friáveis (FIGURA 16) e calos verdes e rígidos.

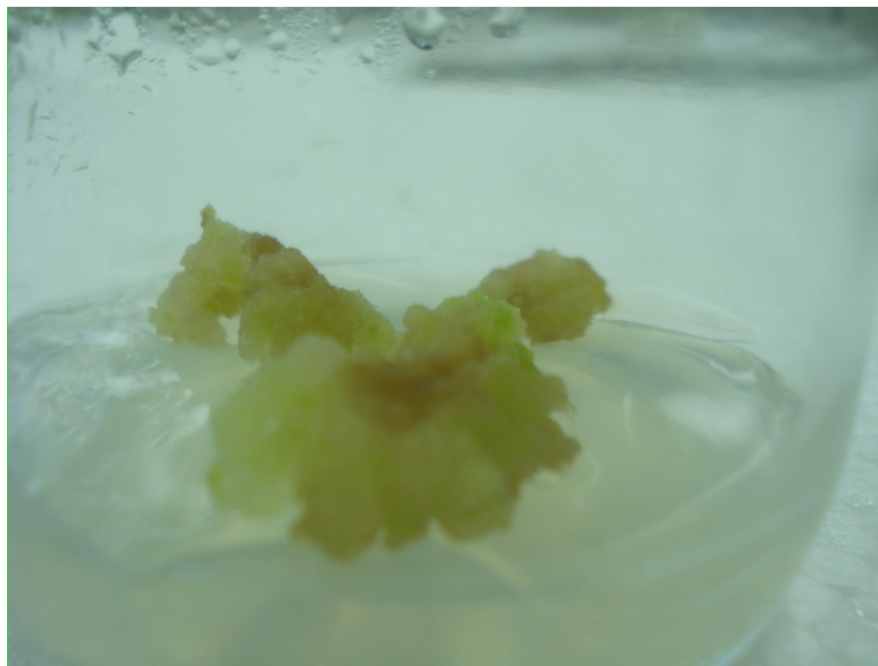


Figura 16 – Calos jovens e esponjosos, cultivados durante 60 dias. Santa Maria, UFSM, 2009.

Os primeiros pesquisadores a induzirem a formação de calos em calêndula foram Grzelak e Janiszowska (2002), efetuando a iniciação de calos e culturas em suspensão sintetizando ácido oleanólico. Esses autores observaram a formação de calos em suspensões de células de segmentos foliares e cotilédones de calêndula utilizados como explante, observando tanto calos verdes, raiz e com rápido crescimento quanto calos pequenos.

Para calos velhos, a suplementação com BAP induziu a formação tanto de calos esponjosos quanto calos verdes; nas mesmas condições, analisando-se calos jovens, formaram-se os mesmos tipos de calos. Os calos velhos mostraram-se mais indicados para a formação de calos esponjosos e friáveis, no entanto, os calos novos apresentaram uma porcentagem maior de regeneração. Já na ausência de fitorreguladores houve apenas a formação de calos pequenos (TABELA 3).

TABELA 3 - Médias das notas atribuídas aos tipos de calo formados a partir de calos jovens e velhos em diferentes concentrações de BAP. Santa Maria, UFSM, 2009.

Concentrações de BAP (μ M)	Calos jovens	Calos velhos
0	33.3 bB	33.3 bA
2	72,9 aB	100 aA
5	79,5 aB	100 aA
6	66,6 aB	100 aA
7	72,9 aB	100 aA

*Médias seguidas de letras maiúsculas distintas diferem na linha e médias seguidas de letras minúsculas distintas diferem na coluna ao nível de significância de 5% pelo Teste de Tukey.

A distribuição dos calos nessa nova fase de regeneração foi aleatória, pois segundo Termignoni (2005) o padrão de diferenciação celular pode ser alterado fazendo se uso de um novo balanço hormonal, mesmo em subcultivos do calo gerado.

No presente estudo, ocorreu a regeneração de partes aéreas em 10% dos calos, sendo 2% oriundos de calos velhos e 8% oriundos de calos jovens. Isso sugere que calos cultivados durante 60 dias são mais indicados para a regeneração em calêndula comparados a calos de 175 dias de cultivo. Em tomateiro, após 150 dias de cultivo, 0,27% dos calos regeneraram, sendo esses calos obtidos através da cultura de anteras *in vitro* (BRASILEIRO et al., 1999).

5 CONCLUSÕES

- A imersão em solução de hipoclorito de sódio a 2,5% por 30 min aliada à remoção do tegumento promove a germinação *in vitro* de sementes de calêndula, efetuando uma desinfestação superficial satisfatória das sementes utilizadas;
- não há necessidade de suplementação com citocininas para promover a rizogênese em calêndula;
- é necessária a adição de BAP ao meio nutritivo para ocorrer a calogênese em segmentos foliares oriundos de cultivo *in vitro* e em sementes, devendo ser maior a concentração desse fitorregulador se o cultivo for efetuado na presença de ANA;
- no caso de calogênese em segmentos foliares advindos de cultivo *ex vitro*, não é necessário aumentar a concentração de BAP na presença de ANA;
- para a regeneração de partes aéreas a partir de sementes não é necessária a suplementação com fitorreguladores;
- para a regeneração de raízes a partir de sementes não é necessária a presença de BAP nem de ANA, contudo com a adição de ANA torna-se necessária a suplementação com BAP;
- a calogênese é favorecida pela utilização de BAP;
- calos mais intumescidos são verificados na presença de fitorreguladores;
- na presença de ANA e de BAP calos primários induzem à formação de calos esponjosos e de calos verdes e na ausência desses fitorreguladores é induzida a formação de calos pequenos;
- calos jovens são mais eficientes em regenerar partes aéreas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVAREZ-PARDO, V.M.; FERREIRA, A.G.; NUNES, V.F. Seed disinfestation methods for *in vitro* cultivation of epiphyte orchids from Southern Brazil. **Horticultura Brasileira**, v.24, n.2, p.217-220, abr.-jun., 2006.

ANDRADE, S.R.M. de. **Princípios da cultura de tecidos vegetais**. Documentos, 58. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2002.

BARKLEY, S. Department of Agriculture, Food and Rural Development. In: Aromatic, Culinary and Medicinal Crops, Information, 2007. Alberta, Canadá.
<[http://www1.agric.gov.ab.ca/\\$department/deptdocs.nsf/all/crop803?opendocument](http://www1.agric.gov.ab.ca/$department/deptdocs.nsf/all/crop803?opendocument)>
Acesso em 18 nov.2008.

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

BISOGNIN, A.D. et al. Germinação e propagação de porongo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.2, p.332-339, Mar-abr, 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNAD, DNDV, CLAV, 1992. 365p.

BRASILEIRO, A.C.R et al. Callus induction and plant regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum* CV. IPA5) via anther culture. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.29, n.4, p.619-623, 1999.

CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios Nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa –SNPH, v. 1., p.87-132, 1998.

CID, L.P.B. In: Introdução aos hormônios vegetais. CID, L.P.B. **Citocininas**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p.55-75, 2000.

COSTA, A.S. et al. Estabelecimento de alecrim-pimenta *in vitro*. **Horticultura Brasileira**. v. 25, n.1, p.68-72, jan.-mar. 2007

CUZZUOL, G.R.F. et al. Controle da vitrificação do cravo (*Dianthus caryophyllus* L.) *in vitro*. **Scientia agrícola**, Piracicaba, v.52, n.3, p. 604-614, set. - dez., 1995.

DODDS, J.H.; ROBERTS, L.W. **Experiments in plant tissue culture**. 3rd ed. New York: Cambridge University Press, 1995.

ERIG, A.C.; SCHUCH, M.W. Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural. **Revisão bibliográfica. Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.4, p.961-965, Jul-ago, 2005.

FERREIRA, F. A. **Patologia florestal: principais doenças florestais no Brasil**. Viçosa: SIF, 570p., 1989.

GAZIM, Z.C. et al. Identificação dos constituintes químicos da fração volátil de *Calendula officinalis* produzida no Paraná. **Horticultura Brasileira**, v.25, n.1, Jan.-mar., 2007.

GOMES, R.R. **Phomopsis spp. Endófitos de plantas medicinais: diversidade genética e antagonismo ao fungo *Guignardia citricarpa***. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2008.

GRATTAPAGLIA, D; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa SNPH, v. 1, p.183-260, 1998.

GRZELAK, A.; JANISZOWSKA, W. Initiation and growth characteristics of suspension cultures of *Calendula officinalis* cells. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v. 71, n.1, p. 29 – 40, Oct. 2002.

GUERRA, M.P. et al. Estabelecimento de um protocolo regenerativo para a micropropagação do abacaxizeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.34, n.9, p.1557-1563, set. 1999.

HINOJOSA, G.F. In: Introdução aos hormônios vegetais. CID, L.P.B **Auxinas**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p.15-48, 2000.

JUNGHANS, T.G.; JUNGHANS, D.T; CASTELLEN, M.S. Germinação de sementes de maracujá-doce submetidas a tratamento mecânico. **Segundo Workshop de Recursos Genéticos Vegetais no Estado da Bahia. Ilhéus, Bahia. Magistra, número especial.** Cruz das Almas – BA, v.18, Out., 2006.

KALVATCHEV, Z.; WALDER, R.; GARZARO, D. Anti-HIV activity of extracts from *Calendula officinalis* flowers. **Biomedicine & Pharmacotherapy.** Venezuela, v. 51, p. 176-180, Abril, 1997.

LEDO, A.S.; LAMEIRA, O.A.; BENBADIS, A.K. Explantes de cupuaçuzeiro submetidos a diferentes condições de cultura *in vitro*. **Revista Brasileira de Fruticultura.** Jaboticabal, São Paulo, v. 24, n.3, p. 604-607, Dez., 2002.

LESHEM, B.; WERKER, E.; SHALEV, D.P. The effect of cytokinins on vitrification in melon and carnation. **Annals of Botany**, v. 62, n.3, p.271-276, 1988.

LIMA et al. Callus induction in leaf segments of *Croton urucurana* Baill. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 32, n. 1, p. 17-22, jan.-fev., 2008.

MACÊDO, C.E.C. de et al. Concentrações de ANA e BAP na micropropagação de abacaxizeiro L. Merrill (*Ananas comosus*) e no cultivo hidropônico das plântulas obtidas *in vitro*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, São Paulo, v. 25, n.3, p. 501-504, dez. 2003.

MANTOVANI, N. et al. Morfogênese e regeneração *in vitro* de *Ginkgo biloba* L. Anais, resumo expandido. **Congresso Brasileiro de Olericultura.** 2006.

<http://www.abhorticultura.com.br/biblioteca/arquivos/Download/Biblioteca/46_0643.pdf>

Acesso em 21.01.2009.

MURASHIGE, T; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n.1, p. 473-497, 1962.

NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados na avaliação das plântulas. In: KRZYZANOWSKI, F.C., VIEIRA, R.D; FRANÇA NETO, J.B.(Ed.) **Vigor de sementes: conceitos e testes.** Londrina: ABRATES, 1999. p. 2:1 – 2:21.

NOGUEIRA, R.C. et al. Indução de calos em explantes foliares de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.) **Ciência Agrotécnica.** Lavras, v. 31, n. 2, p. 366-370, Mar.-abr., 2007.

PACHECO, A.C. et al. Germinação de sementes de camomila [*Chamomilla recutita* (L.) Rauschert] e calêndula (*Calendula officinalis* L.) tratadas com ácido salicílico. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9, n.1, p. 61-67 2007.

PARENTE, L.M.L. et al. *Calendula officinalis*: características, propriedades químicas e terapêuticas. **Arquivos de Ciências da Saúde**, Unipar, v. 6, n.2, Mai. - ago., 2002.

PERES, L.E.P. Bases fisiológicas e genéticas da Regeneração de plantas *in vitro*. **Biotechnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 25, mar-abr. 2002.

REIS, A. et al. Associação de *Alternaria dauci* e *A. alternata* com sementes de coentro e eficiência do tratamento químico. **Horticultura Brasileira**, v. 24, n. 1, p.107-111, jan.-mar., 2006

ROCHA, M.S. et al. Métodos de regeneração *in vitro* da mamoneira a partir de diferentes tipos de explantes. **Revista Brasileira de oleaginosas e fibrosas**, Campina Grande, v. 7, n. 1, p. 647-652, jan-abr., 2003.

SILVA, F. et al. Desorption isotherms of *Calendula officinalis* L. **Proceedings of the 14th International Drying Symposium**. Sao Paulo, Brazil, v. C, p. 1569-1576, 22-25, Aug. 2004.

SILVA, W.B.; GONÇALVES, T.C.; RODRIGUES, P.O. Influência de diferentes sistemas de solventes no processo de extração de *Calendula officinalis* L. (Asteraceae). **Latin American Journal of Pharmacy**. v. 23, n.1, p. 27-31, 2004.

SILVEIRA, M.A.M; VILLELA, F.A.; TILLMANN, M.A.A. Comparação de métodos para avaliação da qualidade fisiológica em sementes de calêndula. **Revista Brasileira de Sementes**. v. 24, n. 2, p. 24-30, 2002.

_____ Maturação fisiológica de sementes de Calêndula (*Calendula officinalis* L.). **Revista Brasileira de Sementes**. v. 24, n. 2, p. 31-37, 2002 a.

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

SCHUCH, L.O.B. et al. Crescimento em laboratório de plântulas de aveia-preta (*Avena strigosa* Schreb.) em função do vigor das sementes. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 21, n. 1, p. 229-234, 1999.

TERMIGNONI, R.R. **Cultura de tecidos vegetais**. Porto Alegre: UFRGS, p. 184, 2005.

TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; FERREIRA, A.T. Retrospectiva da cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa –SNPH, v. 1, p. 11-20, 1998.

VIANA, A.J.C.; JUNGHANS, T.G. Germinação *in vitro* e em casa de vegetação de sementes de *Passiflora giberti* N.E. Brown com tegumento íntegro e parcialmente removido. **Segundo Workshop de Recursos Genéticos Vegetais no Estado da Bahia. Ilhéus, Bahia. Magistra, número especial**. Cruz das Almas – BA, v. 18, Out., 2006.

VIEIRA, A.R. **Efeitos de compostos fenólicos na dormência de sementes de arroz (*Oryza sativa* L.) e eficiência de tratamentos pré-germinativos**. Dissertação (Mestrado) Lavras: Escola Superior de Agricultura de Lavras, p. 58, 1991.

VIEIRA, M.C. et al. Crescimento e produção de biomassa de calêndula (*Calendula officinalis* L.) proveniente de dois tipos de diásporos e duas colorações de capítulos florais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 8, n. 4, p.193-197, 2006.

VIEIRA, M.C.; HEREDIA, N.A.Z.; AMORIM, P.Q. Produção de biomassa de calêndula em função de tipos de diásporos de cama-de-aviário. **I Latin-American Symposium on the Production of Medicinal, Aromatic and Condiments Plants**. Ed. MING, L.C.; CRAKER, L.E.; SCHEFFER, M.C. International Society for Horticultural Science. Sao Paulo, Brazil, v. 1, p.149-154, Feb. 2002.

YEOAMA, M.M. Early development in callus culture. **Internacional Review of Cytology**, v. 29, p. 383-409, 1970.

ZONTA, E.P.; MACHADO, A.A. **SANEST – Sistema de análise estatística para microcomputadores**. Pelotas: DMEC/IFM/UFPel, 138p, 1987.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Análise de Variância para a variável contaminação fúngica em sementes de calêndula utilizando-se diferentes tempos de imersão em solução de NaOCl a 2,5%. Sendo Graus de Liberdade (G.L.), Soma de Quadrados (S.Q.), Quadrado Médio (Q.M.) e Coeficiente de Variação (C.V.) Santa Maria, UFSM, 2009.

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
Tempo de imersão	3	0.3007571	0.1002524	0.6839	0.57761
RESIDUO	16	2.3455591	0.1465974		
TOTAL	19	2.6463162			

MEDIA GERAL = 5.051068

C.V. = 7.580 %

APÊNDICE B - Análise de Variância para a variável contaminação bacteriana em sementes de calêndula utilizando-se diferentes tempos de imersão em solução de NaOCl a 2,5%. Sendo Graus de Liberdade (G.L.), Soma de Quadrados (S.Q.), Quadrado Médio (Q.M.) e Coeficiente de Variação (C.V.) Santa Maria, UFSM, 2009.

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
Tempo de imersão	3	3.7991863	1.2663954	9.0666	0.00125
RESIDUO	16	2.2348329	0.1396771		
TOTAL	19	6.0340191			
MÉDIA GERAL = 4.408746					
C.V. = 8.477 %					

APÊNDICE C - Análise de Variância para a variável germinação *in vitro* de sementes de calêndula utilizando-se diferentes tempos de imersão em solução de NaOCl a 2,5%. Sendo Graus de Liberdade (G.L.), Soma de Quadrados (S.Q.), Quadrado Médio (Q.M.) e Coeficiente de Variação (C.V.) Santa Maria, UFSM, 2009.

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
Tempo de imersão	3	3.7223503	1.2407834	9.3552	0.00110
RESIDUO	16	2.1220794	0.1326300		
TOTAL	19	5.8444297			
MEDIA GERAL =	6.134800				
C.V. = 5.936 %					

APÊNDICE D - Análise de Variância para a variável contaminação fúngica *in vitro* de sementes de calêndula utilizando-se diferentes tempos de imersão em solução de NaOCl a 2,5%. Sendo Graus de Liberdade (G.L.), Soma de Quadrados (S.Q.), Quadrado Médio (Q.M.) e Coeficiente de Variação (C.V.) Santa Maria, UFSM, 2009.

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
Tempo de imersão	3	7.4084003	2.4694668	2.7227	0.04917
RESIDUO	76	68.9310726	0.9069878		
TOTAL	79	76.3394730			
MEDIA GERAL =	5.025042				
C.V. = 18.952 %					

APÊNDICE E - Análise de Variância para a variável contaminação bacteriana *in vitro* de sementes de calêndula utilizando-se diferentes tempos de imersão em solução de NaOCl a 2,5%. Sendo Graus de Liberdade (G.L.), Soma de Quadrados (S.Q.), Quadrado Médio (Q.M.) e Coeficiente de Variação (C.V.) Santa Maria, UFSM, 2009.

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
Tempo de imersão	3	3.8769715	1.2923238	7.7886	0.00230
RESIDUO	16	2.6548105	0.1659257		
TOTAL	19	76.3394730			
MEDIA GERAL =	4.822799				
C.V. = 8.446 %					

APÊNDICE F – Análise de Variância para a variável germinação *in vitro* de sementes de calêndula utilizando-se diferentes métodos de superação da barreira para a germinação *in vitro* de calêndula. Sendo Graus de Liberdade (G.L.), Soma de Quadrados (S.Q.), Quadrado Médio (Q.M.) e Coeficiente de Variação (C.V.) Santa Maria, UFSM, 2009.

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
Tempo de imersão	4	20.9528737	5.2382184	175.3428	0.00001
RESIDUO	20	0.5974832	0.0298742		
TOTAL	24	21.5503569			
MEDIA GERAL =	4.577060				
C.V. =	3.776 %				

APÊNDICE G – Análise de Variância para a variável rizogênese *in vitro* de segmentos foliares de calêndula utilizando-se diferentes tratamentos com fitorreguladores. Sendo Graus de Liberdade (G.L.), Soma de Quadrados (S.Q.), Quadrado Médio (Q.M.) e Coeficiente de Variação (C.V.) Santa Maria, UFSM, 2009.

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
BAP	3	4.0168968	1.3389656	35.4335	0.00001
ANA	1	0.0001610	0.0001610	0.0043	0.94690
BAP*ANA	3	0.0003860	0.0001287	0.0034	0.99951
RESIDUO	32	1.2092191	0.0377881		
TOTAL	39	5.2266629			
MEDIA GERAL =	4.237766				
C.V. =	4.587 %				

APÊNDICE H – Análise de Variância para a variável calogênese *in vitro* de segmentos foliares de calêndula utilizando-se diferentes tratamentos com fitorreguladores. Sendo Graus de Liberdade (G.L.), Soma de Quadrados (S.Q.), Quadrado Médio (Q.M.) e Coeficiente de Variação (C.V.) Santa Maria, UFSM, 2009.

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
BAP	3	3.9983865	1.3327955	2.5129	0.07508
ANA	1	0.8352157	0.8352157	1.5748	0.21640
BAP*ANA	3	4.1723473	1.3907824	2.6223	0.06658
RESIDUO	32	16.9720144	0.5303755		
TOTAL	39	25.9779639			
MEDIA GERAL =	4.889000				
C.V.=	14.896 %				

APÊNDICE I – Análise de Variância para a variável calogênese *in vitro* de segmentos foliares de calêndula utilizando-se diferentes tratamentos com fitorreguladores. Sendo Graus de Liberdade (G.L.), Soma de Quadrados (S.Q.), Quadrado Médio (Q.M.) e Coeficiente de Variação (C.V.) Santa Maria, UFSM, 2009.

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
BAP	3	13.9090217	4.6363406	4.7645	0.00757
ANA	1	5.9437712	5.9437712	6.1080	0.01799
BAP*ANA	3	3.0971430	1.0323810	1.0609	0.38021
RESIDUO	32	31.1393727	0.9731054		
TOTAL	39	54.0893087			
MEDIA GERAL =	5.943283				
C.V. =	16.598 %				

APÊNDICE J – Análise de Variância para a variável intumescimento *in vitro* de segmentos foliares de calêndula utilizando-se diferentes tratamentos com fitorreguladores. Sendo Graus de Liberdade (G.L.), Soma de Quadrados (S.Q.), Quadrado Médio (Q.M.) e Coeficiente de Variação (C.V.) Santa Maria, UFSM, 2009.

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
BAP	3	9.2715885	3.0905295	4.2465	0.01233
ANA	1	2.8825090	2.8825090	3.9607	0.05235
BAP*ANA	3	4.1915326	1.3971775	1.9198	0.14511
RESIDUO	32	23.2889135	0.7277785		
TOTAL	39	39.6345436			
MEDIA GERAL =	5.628924				
C.V. =	15.156 %				

APÊNDICE K – Análise de Variância para a variável calogênese *in vitro* de segmentos foliares de calêndula utilizando-se diferentes tratamentos com fitorreguladores. Sendo Graus de Liberdade (G.L.), Soma de Quadrados (S.Q.), Quadrado Médio (Q.M.) e Coeficiente de Variação (C.V.) Santa Maria, UFSM, 2009.

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
BAP	3	13.2690582	4.4230194	8.0621	0.00060
ANA	1	2.0161735	2.0161735	3.6750	0.06112
BAP*ANA	3	2.5126846	0.8375615	1.5267	0.22548
RESIDUO	32	17.5558547	0.5486205		
TOTAL	39	35.3537711			
MEDIA GERAL =	4.707371				
C.V. =	15.735 %				

APÊNDICE L – Análise de Variância para a variável calogênese *in vitro* de calêndula utilizando-se diferentes tratamentos com fitorreguladores. Sendo Graus de Liberdade (G.L.), Soma de Quadrados (S.Q.), Quadrado Médio (Q.M.) e Coeficiente de Variação (C.V.) Santa Maria, UFSM, 2009.

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
BAP	6	10.3576376	1.7262729	2.5162	0.03123
ANA	1	2.4528344	2.4528344	3.5752	0.06058
BAP*ANA	6	13.6019002	2.2669834	3.3043	0.00761
RESIDUO	56	38.4195338	0.6860631		
TOTAL	69	64.8319060			
MEDIA GERAL =	4.618722				
C.V. =	17.933 %				

APÊNDICE M – Análise de Variância para a variável rizogênese *in vitro* de calêndula utilizando-se diferentes tratamentos com fitorreguladores. Sendo Graus de Liberdade (G.L.), Soma de Quadrados (S.Q.), Quadrado Médio (Q.M.) e Coeficiente de Variação (C.V.) Santa Maria, UFSM, 2009.

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
BAP	6	17.5049955	2.9174992	4.3640	0.00139
ANA	1	3.7547237	3.7547237	5.6164	0.02008
BAP*ANA	6	8.6830105	1.4471684	2.1647	0.05955
RESIDUO	56	37.4379125	0.6685342		
TOTAL	69	67.3806422			
MEDIA GERAL =	5.022297				
C.V. =	16.280 %				

APÊNDICE N – Análise de Variância para a variável tipo de calo de calêndula utilizando-se diferentes tratamentos com fitorregulador e tempos de cultivo *in vitro*. Sendo Graus de Liberdade (G.L.), Soma de Quadrados (S.Q.), Quadrado Médio (Q.M.) e Coeficiente de Variação (C.V.) Santa Maria, UFSM, 2009.

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
BAP	4	17.2768735	4.3192184	88.6238	0.00001
TEMPO	1	3.5641660	3.5641660	73.1313	0.00001
BAP*TEM	4	1.0305186	0.2576297	5.2862	0.00194
RESIDUO	40	1.9494614	0.0487365		
TOTAL	49	23.8210195			
MEDIA GERAL =		6.408462			
C.V.=		3.445 %			