

Desinfestação e germinação in vitro de *Lychnophora pohlii*

Allanne Pillar Dias Gonzaga¹ Natane Amaral Miranda^{2*} Miranda Titon¹ Evandro Luiz Mendonça Machado¹ Hisaias de Souza Almeida³ Bruna Mara Leão¹

¹Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Rodovia MGT 367, Km 583, 5000, Alto da Jacuba, CEP 39100-000, Diamantina, MG, Brasil

²Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rodovia BR 465, Km 07, CEP 23897-000, Seropédica, RJ, Brasil

³Universidade Federal de Itajubá, Av. BPS, 1303, Pinheirinho, CEP 37502-254, Itajubá, MG, Brasil

Original Article

*Corresponding author:
nataneamaral@gmail.com

Keywords:

Micropropagation

Native Species

Arnica

Palavras-chave:

Micropropagação

Espécie nativa

Arnica

Received in

2019/07/30

Accepted on

2020/05/13

Published in

2021/06/30



DOI: <http://dx.doi.org/10.34062/afs.v8i1.9343>



RESUMO: *Lychnophora pohlii* Sch. Bip., espécie conhecida como arnica, é muito utilizada na medicina popular, no entanto, o conhecimento sobre os aspectos básicos da sua propagação é escasso. Assim, o objetivo deste trabalho foi estabelecer metodologias de desinfestação e germinação in vitro de *L. pohlii*. Inicialmente avaliou-se a imersão das cipselas em hipoclorito de sódio (2,5 e 5%) durante 5, 10, 15, 20 e 25 minutos. No segundo teste avaliou-se a desinfestação em ácido sulfúrico por 5, 10, 15, 20 e 25 minutos, e em hipoclorito de sódio 5% por 20 e 25 minutos acrescida ou não de etapa anterior de imersão em fungicida (1 gL⁻¹) por 15 minutos. No terceiro teste fez-se a desinfestação em ácido sulfúrico durante 5 e 10 minutos, posteriormente inoculou-se as cipselas em meio de cultura contendo GA₃ (0, 1, 2 e 4 mgL⁻¹). Quando se avaliou o uso de hipoclorito de sódio, menor taxa de contaminação (63%) foi obtida com hipoclorito de sódio a 5% quando comparada à taxa de 83% na concentração de 2,5%, não havendo influência dos tempos de imersão. No segundo teste observou-se que o uso de ácido sulfúrico permitiu a obtenção das menores taxas de contaminação. Para a germinação, a imersão em ácido sulfúrico por 10 minutos foi mais eficiente (40%) quando comparada ao tempo de 5 minutos (31%), sendo desnecessário adicionar GA₃ no meio. Assim, para estabelecimento de *L. pohlii* in vitro o tratamento das cipselas com ácido sulfúrico é mais adequado por permitir a desinfestação e aumentar a germinação.

In vitro disinfestation and germination of *Lychnophora pohlii*

ABSTRACT: *Lychnophora pohlii* Sch. Bip., a species known as arnica, is widely used in folk medicine, however, knowledge about the basic aspects of its spread is scarce. Thus, the objective of this work was to establish disinfestation and in vitro germination methodologies for *L. pohlii*. Initially, immersion of the cypselas in sodium hypochlorite (2.5 and 5%) was evaluated for 5, 10, 15, 20 and 25 minutes. In the second test, disinfestation in sulfuric acid was evaluated for 5, 10, 15, 20 and 25 minutes, and in sodium hypochlorite 5% for 20 and 25 minutes, with or without the previous fungicide immersion step (1 gL⁻¹) for 15 minutes. In the third test, disinfestation in sulfuric acid was carried out for 5 and 10 minutes, then the cypselas were inoculated in culture medium containing GA₃ (0, 1, 2 and 4 mgL⁻¹). When the use of sodium hypochlorite was evaluated, a lower contamination rate (63%) was obtained with sodium hypochlorite at 5% when compared to the rate of 83% at a concentration of 2.5%, with no influence on immersion times. In the second test, it was observed that the use of sulfuric acid allowed to obtain the lowest contamination rates. For germination, immersion in sulfuric acid for 10 minutes was more efficient (40%) when compared to the time of 5 minutes (31%), being unnecessary to add GA₃ in the medium. Thus, for the establishment of *L. pohlii* in vitro, the treatment of cypselas with sulfuric acid is more appropriate because it allows disinfestation and increases germination.

Introdução

O gênero *Lychnophora* pertence à família Asteraceae, é representado por espécies conhecidas popularmente como arnicas, que são abundantes nos campos rupestres, possuem características medicinais e são endêmicas no Brasil (Gobbo-Neto et al. 2017; Vieira et al. 2019). As espécies do gênero possuem capacidade de adaptar-se a diferentes ambientes, além de possuírem, como principais características, a inflorescência do tipo capítulo e fruto cipsela (Silva et al. 2013), sendo cipselas definidas como frutos complexos, secos, indeiscentes, uniloculares, com uma única semente não aderida ao pericarpo e originários de um ovário inferior (Marzinek et al. 2008).

Lychnophora spp. têm sido utilizadas como fonte prospectiva de produtos naturais, por possuírem capacidade anti-inflamatória e agente analgésico (Gobbo-Neto et al. 2017; Vieira et al. 2019), considerado fonte promissora de compostos bioativos (Conti et al. 2016). Extratos de *Lychnophora pohlii* Sch. Bip. podem ser uma ferramenta importante no tratamento de muitas doenças inflamatórias crônicas (Kanashiro et al. 2006), utilizados até contra formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* (Grael et al. 2005).

L. pohlii ocorre no estado de Minas Gerais, no planalto de Diamantina e adjacências, habitando os Campos Rupestres do Cerrado, sendo encontrada em cinco locais em situação de ameaça (Silveira et al. 2016) devido à pressão das ações antrópicas como a mineração, a expansão urbana, o turismo, a agricultura, a criação de gado e as queimadas (CNCFlora 2012). Apesar da evidente importância da espécie e sua grande vulnerabilidade, haja vista ser endêmica de ambientes ameaçados (Amaral et al. 2006), são poucos os trabalhos que abordam suas formas de propagação (Silva et al. 2015a).

Em estudos de propagação sexuada de espécies da família Asteraceae é comumente relatado que o desempenho germinativo é dependente das condições ambientais típicas do local de crescimento da espécie, e também está associada à maturação desuniforme de sementes, presença de sementes mal formadas ou sem embrião (Dayrell et al. 2016; Cássero et al. 2018). Além disso, outras dificuldades podem ser encontradas no processo de propagação in vitro, como a contaminação do material vegetal. A desinfestação do material vegetal propagado in vitro é frequentemente realizada pela destruição química dos microrganismos por meio de compostos esterilizantes como álcool, hipoclorito de sódio, fungicidas, ácido sulfúrico, dentre outros (Pasqual et al. 2012).

Estudos sobre o tipo de substância a ser utilizada na desinfestação de explantes, sua concentração e tempo de exposição são alguns dos fatores de grande importância no estabelecimento de uma cultura in vitro, uma vez que essas soluções

desinfestantes podem também ocasionar injúrias e estresse no material vegetal (Taiz e Zeiger 2013). A construção de conhecimentos sobre aspectos relacionados à desinfestação e germinação de *L. pohlii* podem auxiliar na conservação da espécie em seu ambiente de ocorrência, bem como na produção de mudas para variados fins, assegurando assim sua perpetuação.

Neste sentido este trabalho teve como objetivo, estabelecer metodologias de desinfestação e germinação in vitro de cipselas de *Lychnophora pohlii*.

Material e Métodos

Material vegetal e condições de cultivo

As cipselas foram coletadas no Campus JK, da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), nas coordenadas geográficas 18°12'09"S, 43°34'01"W e altitude média de 1375 metros, no município de Diamantina, Minas Gerais. Após a coleta, foram beneficiadas e armazenadas em condições de temperatura e luminosidade ambiente. Antes da instalação dos experimentos, as cipselas foram imersas em água destilada sob agitação por 3 minutos, com descanso de 10 minutos para separação das que se depositaram no fundo do recipiente (submersas) para serem utilizadas nos experimentos, de acordo com método de separação por densidade proposto por Hammerton et al. (1989) e já aplicado para outras espécies do mesmo gênero (Melo et al. 2009).

Os experimentos de cultivo in vitro foram conduzidos no Laboratório de Melhoramento Florestal, do Departamento de Engenharia Florestal da UFVJM. Em todos os testes utilizou-se o meio de cultura MS (Murashige e Skoog 1962) acrescido de 0,1 gL⁻¹ de mio-inositol, 30 gL⁻¹ de sacarose, 0,8 gL⁻¹ de polivinilpirrolidona e 5 gL⁻¹ de ágar. Antes da adição do ágar, fez-se o ajuste de pH para 5,7±0,1. Utilizou-se tubos de ensaio (57 mL de capacidade) contendo 10 mL de meio de cultura, vedados com tampas de polipropileno. A esterilização foi realizada em autoclave à temperatura de 121°C e pressão de 1 atm, por 15 minutos.

Durante a desinfestação, antes da aplicação dos tratamentos, as cipselas selecionadas foram lavadas em água corrente, enxaguadas em água destilada autoclavada e imersas em solução de álcool 70% por 30 segundos. Após a aplicação dos tratamentos de desinfestação, foram enxaguadas em água destilada autoclavada e inoculadas em meio de cultura. A desinfestação e inoculação das cipselas foram realizadas em câmara de fluxo laminar. Após a inoculação, os propágulos foram mantidos em sala de cultura sob fotoperíodo de 16 horas com intensidade luminosa de 40 μmolm⁻²s⁻¹ e temperatura de 25±2°C.

Desinfestação em hipoclorito de sódio

Em câmara de fluxo laminar, testou-se a desinfestação das cipselas em solução de hipoclorito de sódio nas concentrações 2,5 e 5% durante 5, 10, 15, 20 e 25 minutos de imersão. Adicionou-se 4 gotas de Tween 20 para cada 100 mL de solução de hipoclorito de sódio. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 2x5, com quatro repetições, cinco cipselas por repetição e uma por tubo de ensaio. A taxa de contaminação foi avaliada por um período de 60 dias.

Hipoclorito de sódio, fungicida e ácido sulfúrico

Para desinfestação das cipselas, testaram-se diferentes soluções desinfestantes e tempos de

imersão na composição dos tratamentos. As soluções utilizadas foram hipoclorito de sódio 5%, acrescida de quatro gotas de Tween 20 para cada 100 mL de solução; solução fungicida Orthocide® na concentração 1 gL⁻¹; ácido sulfúrico a 98%. Com o ácido sulfúrico a 98%, os propágulos não receberam o procedimento inicial padrão de desinfestação. Os tratamentos aplicados no presente experimento são apresentados na tabela 1.

O experimento foi realizado em DIC com oito tratamentos, quatro repetições contendo cinco cipselas por repetição e uma por tubo de ensaio. Avaliou-se a contaminação por um período de 60 dias

Tabela 1. Tratamentos de desinfestação de cipselas de *Lychnophora pohlii*.

Identificação do tratamento	Detalhes do tratamento
NaClO (20)	Hipoclorito de sódio por 20 minutos
NaClO (25)	Hipoclorito de sódio por 25 minutos
Fung+NaClO (20)	Fungicida por 15 minutos + hipoclorito de sódio por 20 minutos
Fung+NaClO (25)	Fungicida por 15 minutos + hipoclorito de sódio por 25 minutos
H ₂ SO ₄ (5)	Ácido sulfúrico 98% por 5 minutos
H ₂ SO ₄ (10)	Ácido sulfúrico 98% por 10 minutos
H ₂ SO ₄ (15)	Ácido sulfúrico 98% por 15 minutos
H ₂ SO ₄ (20)	Ácido sulfúrico 98% por 20 minutos

Ácido sulfúrico e GA₃

Para desinfestação, as cipselas foram imersas em solução de ácido sulfúrico a 98% durante 5 e 10 minutos. Posteriormente foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura MS acrescido de GA₃ nas concentrações 0, 1, 2 e 4mgL⁻¹. O experimento foi conduzido em DIC, em esquema fatorial 2x4, totalizando oito tratamentos, quatro repetições, cinco cipselas por repetição sendo uma por tubo de ensaio. Avaliou-se a germinação diariamente por um período de 70 dias.

Análise de dados

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, após testados os pré-requisitos estatísticos, com o auxílio do software estatístico R versão 3.5.0 (R Core Team 2018), utilizando o pacote ExpDes, versão 1.1.2 (Ferreira et al. 2014).

Resultados*Desinfestação em hipoclorito de sódio*

Os fatores concentração de hipoclorito de sódio e tempos de imersão nas soluções agiram de forma independente na desinfestação de cipselas de *L. pohlii*. A concentração da solução de hipoclorito de sódio a 5% permitiu obtenção de menor taxa de contaminação (63%) quando comparada à concentração de 2,5%, onde se observou 83% de contaminação. Os tempos de imersão na solução não

influenciaram as taxas de contaminação. O coeficiente de variação do teste foi de 26,38%.

Desinfestação em hipoclorito de sódio, fungicida e ácido sulfúrico

As taxas de contaminação das cipselas de *L. pohlii* foram influenciadas pelos tratamentos de desinfestação utilizados. O uso do ácido sulfúrico, observado nos tratamentos H₂SO₄ (5), H₂SO₄ (10), H₂SO₄ (15) e H₂SO₄ (20), proporcionou as menores taxas de contaminação (Tabela 2). O coeficiente de variação foi de 28,77%.

Tabela 2. Valores médios de contaminação de cipselas de *Lychnophora pohlii*, sob diferentes tratamentos de desinfestação, após 60 dias de cultivo in vitro.

Tratamento	Contaminação (%)
NaClO (20)	95 a
Fung+NaClO (20)	95 a
Fung+NaClO (25)	90 a
NaClO (25)	85 ab
H ₂ SO ₄ (10)	45 bc
H ₂ SO ₄ (5)	25 c
H ₂ SO ₄ (15)	25 c
H ₂ SO ₄ (20)	25 c

Médias seguidas de letras iguais não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey em nível de 95% de probabilidade.

Ácido sulfúrico e GA₃

Não houve interação entre os fatores ácido sulfúrico e GA₃ na germinação das cipselas de *L. pohlii*. A germinação foi influenciada pelo tempo de imersão em solução de ácido sulfúrico a 98%, sendo maior no tempo de 10 minutos (39,75%) quando comparada ao tempo de 5 minutos (31,25%). As

concentrações de GA₃ utilizadas no meio de cultura não influenciaram as taxas de germinação. Para todos os tratamentos, a germinação teve início a partir do 21º dia após a inoculação em meio de cultivo (Figura 1). O coeficiente de variação do teste foi de 52,81%.

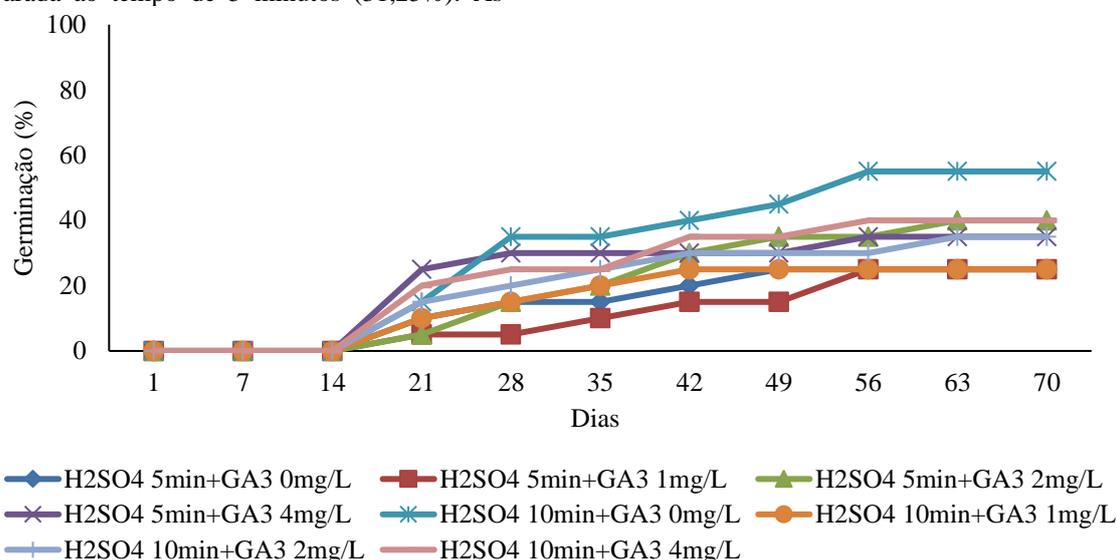


Figura 1. Percentual de germinação de cipselas de *Lychnophora pohlii* in vitro, ao longo de 70 dias, submetidas a tratamentos com ácido sulfúrico (H₂SO₄) e ácido giberélico (GA₃).

Discussão

A etapa de introdução de material vegetal em condições in vitro é complexa devido aos altos percentuais de contaminação pela proliferação de bactérias e fungos, difíceis de serem eliminados (Alfenas et al. 2009; Xavier et al. 2013). O uso de substâncias desinfestantes como etanol, hipoclorito de sódio e de cálcio, peróxido de hidrogênio, ácido clorídrico, ácido sulfúrico são relatados como eficientes na descontaminação de diferentes explantes de espécies vegetais (Silva et al. 2015b; Lazo-Javalera et al. 2016; Silva et al. 2016; Müller et al. 2017).

O hipoclorito de sódio é uma das substâncias mais utilizadas na desinfecção de material vegetal. Bevilacqua et al. (2011), no trabalho com *Calendula officinalis*, encontraram influência do tempo de imersão em hipoclorito de sódio a 2,5% na desinfestação das sementes, sendo os maiores tempos os mais eficientes. As taxas de contaminação das sementes podem variar muito com a concentração da solução desinfestante, e também com o tempo de exposição (Ferreira et al. 2009). No presente trabalho, houve redução da contaminação com o aumento na concentração de hipoclorito de sódio, no entanto, o uso de ácido sulfúrico mostrou-se ainda mais eficiente.

Além da contaminação, outro aspecto importante para a continuidade do processo de propagação in vitro é a germinação das sementes inoculadas. Algumas espécies vegetais, para

aumentarem as taxas de germinação, requerem métodos específicos de tratamento de sementes dependendo dos tipos de dormência que apresentam. No entanto, a escarificação do revestimento de sementes duras usando ácido sulfúrico é uma boa alternativa em muitos casos (Tiwari et al. 2018).

Muitos são os trabalhos que corroboram a eficácia do ácido sulfúrico na quebra de dormência física de sementes de várias espécies (Okunomo 2010; Bhardwaj et al. 2016; Labbafi et al. 2018; Tiwari et al. 2018). Para *Psidium cattleianum* a escarificação ácida das sementes com ácido sulfúrico é mais efetiva em aumentar porcentagens de germinação in vitro que a escarificação mecânica (Freire et al. 2017). Porém, também são encontrados na literatura trabalhos que abordam o efeito prejudicial do ácido na germinação (Alves et al. 2007).

Em testes com sementes de *Capparis spinosa*, que apresentam dormência devido à presença de inibidores e ao duro revestimento das sementes, foi relatada a importância do uso de ácido sulfúrico e GA₃ para aumento em até 75% na taxa de germinação (Labbafi et al. 2018). Para *Parkia bicolor* a maior taxa de germinação foi registrada quando as sementes foram tratadas com ácido sulfúrico, indicando que o ácido aumenta a permeabilidade da semente (Okunomo 2010). Além disso, a adição de ácidos pode alterar os níveis de pH das soluções que envolvem o embrião e, devido a níveis de pH específicos necessários para a

germinação, o processo de germinação pode ser afetado (Baskin e Baskin 2014).

Outro fator importante sobre o uso de ácido sulfúrico é o tempo de exposição, que pode reduzir significativamente a germinação das sementes, devido ao possível dano causado ao embrião ou incapacidade de quebrar a dormência física (Bhardwaj et al. 2016). Sementes tratadas em ácido concentrado por um curto período de tempo tendem a apresentar melhor desempenho na germinação. Em contrapartida, a exposição por períodos maiores em ácido aumenta o risco de danificar os tecidos, dificultando a germinação (Olatunji et al. 2012; Oyebamiji e Ogo 2019). No presente trabalho, foi possível observar a superioridade do ácido sulfúrico sobre a desinfestação de cipselas de *L. pohlii*, além de aumentar o potencial germinativo da espécie, que possivelmente não teve seu embrião danificado pelo efeito corrosivo do ácido sulfúrico, mesmo em tempos de imersão de 20 minutos.

Uso de giberelinas também é relatado para aumentar taxas de germinação de sementes (Kandari et al. 2012; Bhardwaj et al. 2016), porém os resultados são variáveis. Para *Psidium cattleianum* alguns autores observaram a influência positiva do uso de GA₃ na taxa de germinação das sementes, enquanto em outro estudo houve efeito negativo quanto à germinação e vigor das plantas obtidas (Tomaz et al. 2011; Freire et al. 2017).

O efeito das aplicações exógenas de GA₃ na germinação de sementes é dependente de outros fatores, como a concentração endógena de ácido abscísico e outros compostos inibidores presentes na semente (Taiz e Zeiger 2013), além de serem específicos, variando entre diferentes espécies do mesmo gênero, ou mesmo dentro da mesma espécie (Kumar et al. 2012). Para *L. pohlii*, em condições *in vitro*, é possível obter bons resultados na germinação com ausência de aplicações exógenas de GA₃.

Conclusões

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

- O uso de hipoclorito de sódio 5% permite a desinfestação de cipselas de *L. pohlii* inoculados *in vitro*;
- A imersão em ácido sulfúrico por até 20 minutos pode ser utilizada para aumentar as taxas de desinfestação e germinação de cipselas de *L. pohlii*;
- É dispensável a utilização de GA₃ em meio de cultivo para estimular a germinação de cipselas de *L. pohlii* tratadas com ácido sulfúrico.

Referências

Alfnas AC, Zauza EAV, Mafia RG, Assis TF de (2009) *Clonagem e doenças do eucalipto*. 2 Edição. Viçosa: UFV. 500p.

Alves AF, Alves AF, Guerra MEC, Medeiros Filho S (2007) Superação de dormência de sementes de

braúna (*Schinopsis brasiliense* Engl.). *Revista Ciência Agronômica*, 38(1):74-77.

Amaral GA, Pereira FFO, Munhoz CBR (2006) Fitossociologia de uma área de cerrado rupestre na Fazenda Sucupira, Brasília-DF. *Cerne*, 12(4):350-359

Baskin CC, Baskin JM (2014) *Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination*. 2. Edição. San Diego: Academic/Elsevier, 1600p

Bevilacqua CB, Reiniger LRS, Golle DP, Rosa FC (2011) Desinfestação superficial, germinação e regeneração *in vitro* a partir de sementes de Calêndula. *Ciência Rural*, 41(5):761-766, 2011. doi: 10.1590/S0103-84782011000500004

Bhardwaj AK, Kapoor S, Naryal A, Bhardwaj P, Warghat AR, Kumar B, Chaurasia OP (2016) Effect of various dormancy breaking treatments on seed germination, seedling growth and seed vigour of medicinal plants. *Tropical Plant Research*, 3(3):508–516. doi: 10.22271/tpr.2016.v3.i3.067

Cássero LZ, Pastorini LH, Souza LA de (2018) Anatomia e germinação de diásporos de *Chrysolaena cognata* (Less.) Dematt. (Asteraceae). *Neotropical Biology and Conservation*, 13(2), 154-160. doi: 10.4013/nbc.2018.132.07

CNCFlora. *Lychnophora pohlii* in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2 *Centro Nacional de Conservação da Flora*. Disponível em [http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Lychnophora pohlii](http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Lychnophora_pohlii). Acesso em 28 maio 2019

Conti R, Chagas FO, Caraballo-Rodriguez AM, Melo WG, Nascimento AM do, Cavalcanti BC, Moraes MO de, Pessoa C, Costa-Lotufu LV, Krogh R, Andricopulo AD, Lopes NP, Pupo MT (2016) Endophytic Actinobacteria from the Brazilian Medicinal Plant *Lychnophora ericoides* Mart. and the Biological Potential of Their Secondary Metabolites. *Chemistry and Biodiversity*, 13(6):727–736. doi: 10.1002/cbdv.201500225

Dayrell RLC, Garcia QS, Negreiros D, Baskin CC, Baskin JM, Silveira FAO (2016) Phylogeny strongly drives seed dormancy and quality in a climatically buffered hotspot for plant endemism. *Annals of Botany* 119: 267-277. doi: 10.1093/aob/mcw163

Ferreira EB, Cavalcanti PP, Nogueira DA (2014) ExpDes: An R Package for ANOVA and Experimental Designs. *Applied Mathematics*, 5(19):2952–2958. doi: 10.4236/am.2014.519280

Ferreira MGR, Santos MRA, Bragado ACR (2009) Propagação *in vitro* de cupuaçuzeiro: desinfestação de explantes Florais. *Saber Científico*, 2(2):37 – 44.

- Freire CG, Gardin J, Baratto C, Vieira R (2017) Different Methods for Overcoming Integumental Dormancy during in vitro Germination of Red Araza Seeds. *Journal of Agricultural Science*, 9(1):174–183. doi: 10.5539/jas.v9n1p174
- Gobbo-Neto L, Bauermeister A, Sakamoto HT, Gouvea DR, Lopes JLC, Lopes NP (2017) Spatial and temporal variations in secondary metabolites content of the Brazilian arnica leaves (*Lychnophora ericoides* Mart., Asteraceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 28(12):2382–2390. doi: 10.21577/0103-5053.20170092
- Grael CFF, Albuquerque S, Lopes JL (2005) Chemical constituents of *Lychnophora pohlii* and trypanocidal activity of crude plant extracts and of isolated compounds. *Fitoterapia*, 76(1):73-82. doi: 10.1016/j.fitote.2004.10.013
- Hammerton RD; Smith MT; Van Standen J (1989) Factors influencing seeds viability and germination in: *Hypoxis hemerocallidea* Fish. & Mayer. *Seed Science & Technology*, 17(1):613-624
- Kanashiro A, Kabeya LM, Grael CF, Jordão CO, Azzalini AE, Lopes JL, Lucisano-Valim YM (2006) Sesquiterpene lactones from *Lychnophora pohlii*: neutrophil chemiluminescence inhibition and free radical scavenger activity. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 58(6):853–858. doi: 10.1211/jpp.58.6.0016
- Kandari LS, Rao KS, Payal KC, Maikhuri RK, Chandra A, Vanstaden JV (2012) Conservation of aromatic medicinal plant *Rheum emodi* Wall ex Messl. through improved seed germination. *Seed Science & Technology*, 40(1):95–101, 2012. doi: doi.org/10.15258/sst.2012.40.1.10
- Kumar R, Misra KK, Misra DS, Brijwal M (2012) Seed germination of fruit crops: A review. *HortFlora Research Spectrum*, 1(3):199-207
- Labbafi MR, Mehrafarin A, Badi HN, Ghorbani M, Tavakoli M (2018) Improve germination of caper (*Capparis spinosa* L.) seeds by different induction treatments of seed dormancy breaking. *Trakia Journal of Sciences*, 16(1):70–74. doi: 10.15547/tjs.2018.01.011
- Lazo-Javalera MF, Troncoso-Rojas R, Tiznado-Hernández ME, Martínez-Tellez MA, Vargas-Arispuro I, Islas-Osuna MA, Rivera-Domínguez M (2016) Surface disinfection procedure and in vitro regeneration of grapevine (*Vitis vinifera* L.) axillary buds. *SpringerPlus*, 5:543–551, 2016. doi: 10.1186/s40064-016-2081-0
- Marzinek J, De-Paula OC, Oliveira DMT (2008) Cypsela or achene? Refining terminology by considering anatomical and historical factors. *Brazilian Journal of Botany*, 31(3), 549-553.
- Müller D, Giménez PG, Travacio A, Bueno M (2017) Establecimiento in vitro de *Zephyranthes* spp. *Biotecnología Vegetal*, 17(1):19–24.
- Melo PRB, Oliveira JA, Carvalho MLM, Guimarães RM, Carvalho BO (2009) Aplicação do teste de raios x no estudo da morfologia interna e da qualidade fisiológica de aquênios de arnica (*Lychnophora pinaster* Mart.). *Revista Brasileira de Sementes*, 31(2): 146-154.
- Murashige T, Skoog FA (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15:473-497.
- Okunomo K (2010) Germination and seedling growth of *Parkia bicolor* (A. Cheu) as influenced by various nursery techniques. *African Journal of General Agriculture*, 6(4): 187–197.
- Olatunji D, Maku JO, Odumefun OP (2012) Effect of pre-treatments on the germination and early seedlings growth of *Acacia auriculiformis* Cunn. Ex. Benth. *African Journal of Plant Science*, 6(14):364–369
- Oyebamiji NA, Ogo AA (2019) Some aspects of soil and seed pre-treatments on germination, growth and biomass production of *Tamarindus indica* seeds in the nursery. *Advances in Forestry Science*, 6(1):555–559. doi: 10.34062/afs.v6i1.7555
- Pasqual M, Dutra LF, Araujo AG de, Pereira AR (2012) Prevenção de contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas. In: Scherwinski-Pereira JE (ed) *Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas*. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, p. 61-161.
- R Core Team (2018) *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Version 3.5.0. Vienna, Austria.
- Silva JAT da, Winarto B, Dobránszki J, Zeng S (2015b) Disinfection procedures for in vitro propagation of Anthurium. *Folia Horticulturae*, 27(1):3–14. doi: 10.1515/fhort-2015-0009
- Silva JAT da, Winarto B, Dobránszki J, Cardoso JC, Zeng S (2016) Tissue disinfection for preparation of *Dendrobium* in vitro culture. *Folia Horticulturae*, 28(1):57–75. doi: 10.1515/fhort-2016-0008
- Silva NFE, Pereira IM, Titon M, Oliveira MLR de, Laia ML, Araújo LC (2015a). Resgate de mudas de *Lychnophora pohlii* como alternativa para recuperação e conservação de Campo Rupestre.

Floresta, 45(3):645-654. doi: 10.5380/rf.v45i3.31949

Silva PSS da, Linhares JFP, Marques MOM (2013) Caracterização morfológica, perfil químico, atividade biológica e conservação in situ do gênero *Lychnophora* Mart. (Asteraceae: Vernonieae: Lychnophorinae), Brasil. *Biotemas*, 26(2), 9-18. doi: 10.5007/2175-7925.2013v26n2p9

Silveira FAO, Negreiros D, Barbosa NPU, Buisson E, Carmo FF, Carstensen DW, Conceição AA, Cornelissen TG, Echternacht L, Fernandes GW, Garcia QS, Guerra TJ, Jacobi CM, Lemos-Filho JP, Stradic SL, Morellato LPC, Neves FS, Oliveira RS, Schaefer CE, Viana PL, Lambers H (2016) Ecology and evolution of plant diversity in the endangered campo rupestre: a neglected conservation priority. *Plant and Soil*, 403(1-2):129-152. doi: 10.1007/s11104-015-2637-8

Taiz L, Zeiger E (2013) *Plant Physiology*. 5th Edition. Porto Alegre: Artmed, 918p.

Tiwari KRS, Chandra KK, Dubey S (2018) Techniques for Breaking Seed Dormancy and its Efficacy on Seed Germination of Six Important Medicinal Plant Species. *International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology*, 11(2):293-301. doi: 10.30954/0974-1712.04.2018.10

Tomaz ZFP, Galarça SP, Lima CSM, Betemps DL, Gonçalves MA, Rufato AR (2011) Tratamentos pré-germinativos em sementes de araçazeiro (*Psidium cattleianum* Sabine L.). *Revista Brasileira de Agrociência*, 17(1-4):60-65. doi: 10.18539/CAST.V17I1.2032

Vieira RF, Bizzo H, Marengo A, Bicchi C, Sgorbini B, Rubiolo P (2019) Volatile profiling of Arnica (*Lychnophora salicifolia* Mart.), a wild medicinal species from Brazilian Cerrado. *Plant Biosystems*, 1-8. doi: 10.1080/11263504.2018.1549612

Xavier A, Wendling I, Silva RL (2013) *Silvicultura clonal: princípios e técnicas*. 2 Edição, Viçosa: UFV, 279p.