BOLETIM DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO
342

ISSN 0102-0110
Dezembro / 2018

Procedimento simplificado para introdução e multiplicação in vitro de *Lantana camara* L., uma espécie nativa de uso ornamental e medicinal

Embrapa

ISSN 0102-0110
Dezembro/2018

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da agricultura, Pecuária e Abastecimento

BOLETIM DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO 342

Procedimento simplificado para introdução e multiplicação in vitro de *Lantana camara* L., uma espécie nativa de uso ornamental e medicinal

Jéssika Veridiano Dutra
Rosângela Caldas Mundim
Izulmé Rita Imaculada Santos
Antonieta Nassif Salomão

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Brasília, DF
2018

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Parque Estação Biológica
PqEB, Av. W5 Norte (final)
70970-717 , Brasília, DF
Fone: +55 (61) 3448-4700
Fax: +55 (61) 3340-3624
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações
da Unidade Responsável

Presidente
Marília Lobo Burle

Secretária-Executiva
Ana Flávia do N. Dias Côrtes

Membros
Antonieta Nassif Salomão; Diva Maria Alencar Dusi; Francisco Guilherme V. Schmidt; João Batista Teixeira; João Batista Tavares da Silva; Maria Cléria Valadares Inglis; Rosamares Rocha Galvão;Tânia da Silveira Agostini Costa

Supervisão editorial
Ana Flávia do N. Dias Côrtes

Revisão de texto
João Batista Teixeira

Normalização bibliográfica
Ana Flávia do N. Dias Côrtes

Tratamento das ilustrações
Adilson Werneck

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Adilson Werneck

Foto da capa
Izulmé Santos

1ª edição
1ª impressão (ano): tiragem

Todos os direitos reservados.
A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Procedimento simplificado para introdução e multiplicação in vitro de *Lantana camara* L. uma espécie nativa de uso ornamental e medicinal / Jéssica Veridiano Dutra... [et al.]. – Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2018.
22 p. - (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 342).

ISSN: 0102-0110
Sistema requerido: Adobe Acrobat Reader
Modo de Acesso: World Wide Web

1. Conservação. 2. Micropropagação. I. Dutra, Jessica Veridiano. III. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. III. Série

Ana Flávia do N. Dias Côrtes (CRB-1999) 333.72 – CDD 21
© Embrapa, 2018

Sumário

Resumo 5

Abstract 6

Introdução.....7

Material e Métodos 10

Resultados e Discussão 12

Conclusão.....17

Referências 18

Procedimento simplificado para introdução e multiplicação in vitro de *Lantana camara* L., uma espécie nativa de uso ornamental e medicinal

Jéssika Veridiano Dutra[1]
Rosângela Caldas Mundim[2]
Izulmé Rita Imaculada Santos[3]
Antonieta Nassif Salomão[4]

Resumo – *Lantana camara* L. (Verbenaceae), conhecida popularmente como lantana ou camará, é uma espécie nativa de uso ornamental e medicinal. O objetivo desse trabalho foi estabelecer um procedimento simplificado para a introdução e multiplicação clonal in vitro de lantana. Ramos coletados de plantas em crescimento no campo experimental da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em Brasília- DF, foram submetidos a tratamento de descontaminação com solução de hipoclorito de sódio (2,0% – 2,5% de cloro ativo) e "Tween 20". Segmentos nodais contendo duas gemas laterais foram isolados desses ramos e inoculadas in vitro, em meio de cultura WPM solidificado com ágar (0,7%), sem adição de reguladores de crescimento e cultivadas em sala de crescimento à temperatura de 25 ± 2°C, com fotoperíodo de 12 horas e intensidade luminosa de 50 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$, fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas. Evidências de crescimento foram observadas em 100% das gemas laterais presentes no segmento nodal sete dias após a inoculação in vitro e, aos 30 dias após a inoculação, 98,33% das gemas laterais inoculadas deram origem a brotações com parte aérea e sistema radicular bem desenvolvidos e altura média de três cm. Aos 60 dias após a inoculação, as plântulas apresentavam em média oito cm de altura e seis nós. Para a multiplicação clonal, ápices caulinares e segmentos nodais foram excisados dessas plântulas e subcultivados usando o mesmo meio de cultura

[1] Ciências Biológica, graduanda, estagiária da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

[2] Técnica, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

[3] Bióloga, Doutora, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

[4] Engenheira Florestal, Doutora, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

e condições de cultivo descritas acima. O procedimento descrito é bastante simples e permite a introdução e a rápida multiplicação in vitro de lantana para usos diversos, como por exemplo, propagação clonal, produção in vitro de metabólitos secundários, e conservação de germoplasma.

Termos para indexação: Conservação, germoplasma*, Lantana,* micropropagação*.*

Simplified procedure for introduction and multiplication in vitro of *Lantana camara* L., a native species with ornamental and medicinal application

Abstract – *Lantana camara* L. (Verbenaceae), popularly known as lantana or camará, is a native species widely used for its ornamental and medicinal importance. The objective of this work was to establish a simplified procedure for the introduction and multiplication in vitro of lantana. Branches were harvested from plants growing at Embrapa Genetic Resources and Biotechnology, in Brasília-DF, and decontaminated with a sodium hypochlorite (2,0% a 2,5% active chlorine) and “Tween 20” solution. Nodal segments containing two lateral buds were excised from these branches and inoculated in vitro, on WPM culture medium jellified with agar (0.7%), without growth regulators. Nodal segments were cultured in a growth room at constant temperature (25 ± 2°C), 12 hours photoperiod, and light intensity of 50 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ supplied by fluorescent white lights. Evidence of growth could be observed in 100% of the lateral buds seven days after innoculation in vitro and days after innoculation 30 98.33 % of the lateral buds formed plantlets with well-developed shoots and root systems and average height of three cm. At 60 days after innoculation, plantlets had on average height of eight cm and six nodes. For clonal multiplication, shoot tips and nodal segments were excised from these plantlets and subcultured using the same growth medium and culture conditions described above. The procedure described here is very simple and allows introduction and rapid multiplication in vitro of lantana for diverse research activities, such as clonal propagation, in vitro production of secondary metabolites, and germplasm conservation.

Index terms: Conservation, germplasm*, Lantana,* micropropagation*.*

Introdução

Lantana camara L., conhecida popularmente como lantana ou camará, é um arbusto perene de 0,50 a 2,00 metros de altura, pertencente à família Verbenaceae. A espécie é encontrada em quase todo continente Americano e em outras regiões tropicais e subtropicais do mundo, não sendo, portanto, endêmica do Brasil, mas tem ampla distribuição na flora brasileira, ocorrendo naturalmente em quase todos os estados do país (Flora do Brasil, 2018; Cruz e Salimena, 2017; Watanabe 2005). As plantas apresentam folhas ovaladas, opostas, crenado-serradas, ásperas, pilosas e aromáticas (Flora do Brasil, 2018; Correa, 1984), florescem praticamente o ano todo, produzindo inflorescências densas, em capítulo, compostas por flores tubulosas pequenas, numerosas, de cores variadas e vistosas, que atraem polinizadores diversos, como abelhas, borboletas, vespas e beija-flores. A espécie é invasora e coloniza novas áreas por meio da dispersão de sementes por pássaros. Ao alcançar uma nova área, as plantas rapidamente se espalham, podendo sobreviver em uma ampla gama de condições climáticas, mas sendo mais abundantes em áreas com clima quente e úmido (Watanabe, 2005). É uma planta pouco exigente quanto à qualidade do solo, mas apresenta melhor desenvolvimento em solos férteis e enriquecidos com matéria orgânica, bem drenável, com baixa salinidade e irrigado a intervalos regulares (Braga, 2018). É relativamente tolerante ao fogo e pode rapidamente estabelecer-se em áreas recém-queimadas (Braga, 2018; Lantana..., 2017)

A espécie tem alto valor ornamental devido à beleza de suas inflorescências de cores variadas e vistosas, já tendo sido produzidas numerosas variedades por meio de cruzamentos (Lantana..., 2017). Além do apelo visual, as plantas são rústicas, resistentes a podas, florescem o ano todo e podem ser cultivadas a sol pleno, o que levou ao uso da espécie em paisagismo para compor maciços, bordaduras ou cercas-vivas (Lantana..., 2017).

Lantana é frequentemente citada na literatura como planta tóxica, e seu nome popular reflete esse efeito, pois “camará” procede do termo tupi caa (“planta”) mbaraá (“enfermidade”) (Tokarnia et al., 1999; Brito et al., 2004). As folhas e frutos desta planta são ricos em óleos essenciais, compostos fenólicos e triterpenoides (lantadenos A e B), com predominância de flavonoides. Segundo Tokarnia et al. (1999) e Brito et al. (2004), atribui-se aos flavonoides

presentes nas folhas e frutos o efeito tóxico ao homem e aos animais domésticos, os quais atuam diretamente no fígado causando lesões. Ainda segundo esses autores, estima-se que a ingestão de folhas e frutos em quantidades superiores a 40g/kg de peso, em dose única, pode levar ao óbito, já tendo sido relacionada à morte de ruminantes (bovinos, caprinos, ovinos).

Na medicina popular, a espécie é utilizada como antisséptico, antiespasmódico, anti-hemorrágico, diurético, expectorante, febrífugo, antirreumático e suas raízes como anticonvulsivo (Sagar et al., 2005). Em condições de laboratório, extratos foliares apresentaram atividade antimicrobiana, fungicida, inseticida e nematicida (Iannacone; Lamas, 2003; Kalita et al., 2012; Reddy, 2013). Um verbascosídeo extraído de suas folhas apresentou ação antimicrobiana, imunossupressora e antitumoral (Kalita et al., 2012; Shashi et al., 1994). Porém, devido ao risco de toxidez é necessária cautela no uso dessa planta para fins medicinais.

O desenvolvimento de uma tecnologia para produção de estoques de plantas de qualidade é essencial. Em primeiro lugar, para a realização de estudos agronômicos, botânicos, carga microbiana, contaminação química, desenvolvimento tecnológico, farmacológicos, fito-químicos, padronização, toxicológicos e validação, entre outros, os quais são fundamentais no processo de transformação de uma planta medicinal nativa em medicamento fitoterápico (Klein et al., 2009). Em segundo lugar, para a produção sustentável de matéria prima para a extração de compostos bioativos com qualidade e quantidade requeridas para a produção em escala comercial de fitoterápicos. Tradicionalmente, a propagação de lantana tem sido feita por meio da germinação de suas sementes ou por estaquias das pontas dos ramos, entretanto as taxas de germinação são baixas e a produção de plantas por estaquia é ineficiente, sendo que a propagação usando a cultura de tecidos in vitro é indicada como a alternativa mais promissora para a propagação em massa dessa espécie (Day et al., 2003; Samani et al., 2014; Veraplakorn, 2016; Braga, 2018). A cultura de tecidos vegetais in vitro abrange diversas técnicas que se baseiam no cultivo in vitro, em meio de cultura apropriado, em condições assépticas, de propágulos vegetais isolados de plantas matrizes (George et al., 2008). Essa tecnologia fundamenta-se na totipotência celular, princípio pelo qual a célula vegetal pode voltar ao estado meristemático, redefinir seu padrão de diferenciação celular e, dessa forma, dar origem a novos tecidos, órgãos, embriões ou a uma nova planta (Termignoni, 2005).

Essa tecnologia tem sido aplicada em várias áreas da pesquisa com espécies vegetais, e tornou-se uma ferramenta importante para a multiplicação clonal de genótipos de interesse, a produção de compostos bioativos em plântulas em crescimento in vitro, a conservação ex situ de recursos genéticos vegetais, a manutenção de duplicatas de segurança de coleções de germoplasma mantidas em campo e a otimização do intercâmbio de germoplasma vegetal (Bairu et al., 2011; Engelmann, 2011; Sarasan et al., 2006).

Existem alguns poucos relatos de cultivo in vitro de *Lantana camara* L. (Samani et al., 2014, 2016; Veraplakorn, 2016). Esses estudos relatam que a adição de citocininas e de auxinas ao meio de cultura foi essencial para a indução de calos e novas brotações, ou para o enraizamento dos brotos obtidos (Samani et al., 2014, 2016; Veraplakorn, 2016). Entretanto, a regeneração direta de brotações a partir de gemas laterais (GL) é uma alternativa mais prática e rápida de multiplicação clonal in vitro, geralmente não sendo necessário adicionar reguladores de crescimento ao meio de cultura para estimular o seu crescimento (George et al., 2008).

Nesse contexto, o principal objetivo desse estudo foi estabelecer um procedimento simplificado para a introdução e a multiplicação clonal in vitro de *Lantana camara* L., usando o cultivo de segmentos nodais.

Material e Métodos

Material vegetal

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Criobiologia Vegetal (LCV) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, localizada em Brasília, Distrito Federal (DF). Os materiais vegetais utilizados neste estudo foram segmentos nodais (SN) contendo duas gemas laterais (GL) excisadas de ramos de lantana coletados de plantas em crescimento no campo experimental da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em condições de temperatura e iluminação naturais.

Descontaminação

Ramos com aproximadamente 5,0 cm de comprimento, contendo pelo menos um nó, foram coletados das plantas, colocados em frasco contendo água destilada e levados ao Laboratório de Criobiologia Vegetal onde os procedimentos de descontaminação, excisão dos segmentos nodais (SN) e introdução in vitro foram realizados. No laboratório, a água foi descartada, os ramos foram cobertos com 100 ml de solução de água destilada com 1,0 ml de detergente comercial, e o frasco foi colocado em agitador horizontal por três min., com agitação de 90 rpm, para remoção de poeira e outros resíduos. Transcorridos os 3 min., a solução foi descartada e o procedimento foi repetido mais duas vezes. Após a terceira lavagem, a solução foi descartada e foi feito o tratamento de descontaminação dos ramos adicionando-se ao frasco 100 ml de solução comercial de hipoclorito de sódio (2,0 - 2,5% de cloro ativo) e 1,0 ml de Tween 20 (Sigma-Aldrich). O frasco foi levado novamente ao agitador horizontal por 15 minutos, com agitação a 90 rpm. Em seguida, o frasco contendo os ramos foi levado à cabine de fluxo laminar, onde a solução de hipoclorito de sódio foi descartada e os ramos foram enxaguados 3 vezes com água destilada esterilizada em autoclave (1,5 atm, 121ºC, 15 min.), com agitação manual por 2 - 3 min.

Excisão, introdução e cultivo in vitro dos SN e multiplicação clonal das plântulas

Seguindo-se aos três enxágues, SN com 0,5 cm de comprimento foram excisados dos ramos. Até o término do procedimento de excisão, os SN foram transferidos para placa de Petri forrada com papel filtro esterilizado, umedecido com 3,0 ml de água destilada esterilizada em autoclave (1,5 atm, 121ºC, 15 min.), para evitar sua dessecação. Os SN contendo duas GL foram inoculados individualmente em tubos de ensaio (25 mm de largura, 150 mm de altura, 147,26 cm^3 de volume interno) contendo 10 ml de meio de cultura WPM (Lloyd; McCown, 1981) suplementado com 3,0 g/L de carvão ativado, sem adição de reguladores de crescimento, com pH ajustado para 5,8 antes da adição de 7,0 g/L de ágar e da esterilização em autoclave (1,5 atm, 121ºC, 15 min.). O cultivo dos SN foi feito em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2ºC, fotoperíodo de 12 horas e intensidade luminosa de 50 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$, fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas, por até 60 dias, contados como

dias após a inoculação in vitro (DAI). Para a multiplicação clonal, aos 60 DAI, ápices caulinares (AC) e SN foram excisados das plântulas obtidas in vitro e transferidos para tubos de ensaio contendo meio de cultura WPM sólido, sem reguladores de crescimento. Em cada tudo de ensaio, foi inoculado um único AC ou SN. As culturas foram mantidas em sala de crescimento nas condições de cultivo descritas acima, e a regeneração dos explantes foi acompanhada por 60 dias a contar da data da inoculação. O experimento foi casualizado, com quatro repetições de quinze tubos de ensaio, com um explante em cada tubo. A resposta de regeneração dos explantes nas fases de introdução e de multiplicação clonal foram expressos em valores percentuais.

Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental desse estudo foi o inteiramente casualizado com quatro repetições de quinze tubos de ensaio, com um explante em cada tubo, na fase de introdução in vitro e com seis repetições de dez tubos, com um explante em cada tubo, na fase de multiplicação clonal. Os valores médios para as respostas de contaminação, oxidação, regeneração dos explantes foram expressos em valores percentuais, tendo sido calculadas as médias e o desvio padrão desses valores. O número de brotos por explante foi expresso em valores absolutos, tendo sido calculado o desvio padrão para esse fator. Todos os cálculos e análise dos dados foram feitos usando o programa estatístico Graph Pad Prism©.

Resultados e Discussão

No momento da coleta as plantas de lantana doadoras de explantes para os experimentos encontravam-se saudáveis e vigorosas, com ramos jovens com ou sem a presença das inflorescências típicas da espécie (Figura 1 A e B). Os nós dos ramos dessas plantas apresentavam folhas opostas típicas da espécie, em cujas axilas encontravam-se gemas laterais de interesse para os experimentos (Figura 1B, em destaque no círculo vermelho).

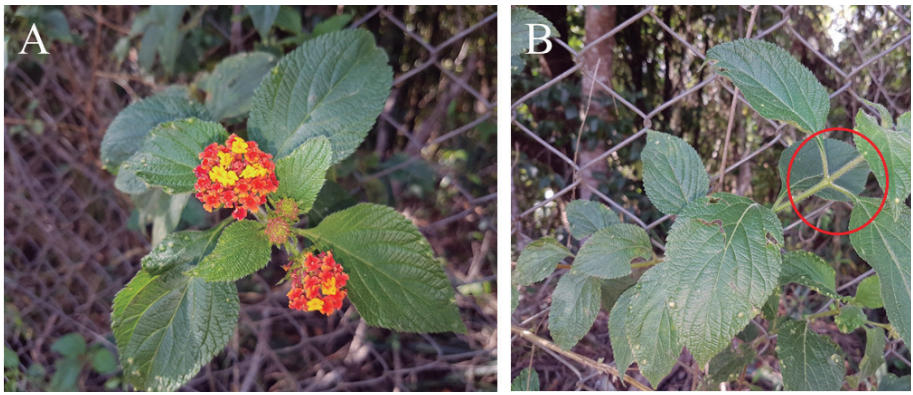

Figura 1. Ramos com (A) ou sem (B) inflorescências típicas de plantas adultas de *Lantana camara* L., em crescimento no campo experimental da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Brasília – DF). Em destaque, no círculo vermelho, região do nó contendo as gemas laterais, que foi usado como explante para a introdução in vitro. Fotos: Izulmé Santos

Nas observações realizadas diariamente na primeira semana de cultivo, não foi detectada a ocorrência de contaminação por microrganismos em nenhum dos SN inoculados in vitro, evidenciando que o procedimento de descontaminação com solução de hipoclorito de sódio antes da introdução dos SN in vitro foi eficaz (Tabela 1).

Aos sete DAÍ, observaram-se evidências de crescimento em 100% das gemas laterais (GL) e após quinze DAI 98,33% dos SN inoculados apresentavam dois brotos novos resultantes de regeneração direta a partir das GL presentes nos SN, já sendo visíveis as folhas jovens em expansão (Figura 2A, Tabela 1). Transcorridos 30 DAI, as brotações apresentavam aspecto vigoroso, com altura média de 3,0 cm, apresentando tipicamente caule verde, piloso, com 1 a 3 nós, os quais exibiam folhas expandidas também verdes e pilosas e um sistema radicular bem desenvolvido (Figura 2B). Transcorridos 60 DAI, as plântulas obtidas apresentavam altura média de nove cm, com número médio de cinco nós por plântula, cada nó contendo duas GL (Figuras 2C e 3A).

AC e SN com aproximadamente 1,0 cm de comprimento (Figura 3B), isolados das plântulas obtidas e subcultivados em meio de cultura WPM (Figura 3C), deram origem a novas plântulas por regeneração direta, sem a

formação de calos (Figura 4), evidenciando sua capacidade de regeneração e multiplicação clonal. No primeiro subcultivo cada AC inoculado produziu uma nova planta, ao passo que cada SN inoculado produziu duas novas plântulas. Entretanto, foi observado que as plântulas obtidas após o subcultivo apresentaram um gradiente de crescimento e vigor o qual foi correlacionado diretamente com a posição do explante na plântula doadora, sendo que os AC e primeiro, segundo e terceiro SN, localizados logo abaixo dos AC, produziram plântulas mais vigorosas, ao passo que plântulas regeneradas a partir do quarto SN, mais próximo ao sistema radicular, apresentavam menor vigor (Figura 4). Existem relatos semelhantes na literatura de que a posição do explante na planta mãe é um dos fatores determinantes do seu potencial de crescimento e desenvolvimento. Isso foi observado, por exemplo, na organogênese de *Bauhinia cheilantha*, conhecida popularmente como pata de vaca, e de *Dendranthema grandiflora* (atualmente *Chrysanthemum morifolium* Ramat.), o crisântemo (Gutiérrez et al., 2011; Campos et al., 2014).

Tipo de Explante	Valores médios de:			
	Oxidação (%, ± Desvio Padrão das Médias)	Contaminação (%, ± Desvio Padrão das Médias)	Regeneração (%, ± Desvio Padrão das Médias)	N° brotos por explante (± Desvio Padrão das Médias)
SN	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	98,33 ± 1,66	2,0 ± 0,0
AC	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	100,00 ± 0,0	1,0 ± 0,0
N1	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	100,00 ± 0,0	2,0 ± 0,0
N2	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	100,00 ± 0,0	2,0 ± 0,0
N3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	100,00 ± 0,0	2,0 ± 0,0
N4	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	91,66 ± 3,40	2,0 ± 0,0
N5	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	94,99 ± 3,96	2,0 ± 0,0
N6	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	93,33 ± 4,35	2,0 ± 0,0

Tabela 1. Resposta de explantes de *Lantana camara* L. ao cultivo in vitro. Segmentos nodais (SN) isolados de plantas em crescimento no campo experimental da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia foram utilizados na fase de introdução in vitro e ápices caulinares (AC) e segmentos nodais (N1 a N6), isolados de plântulas obtidas in vitro, foram utilizados na fase de multiplicação clonal da espécie.

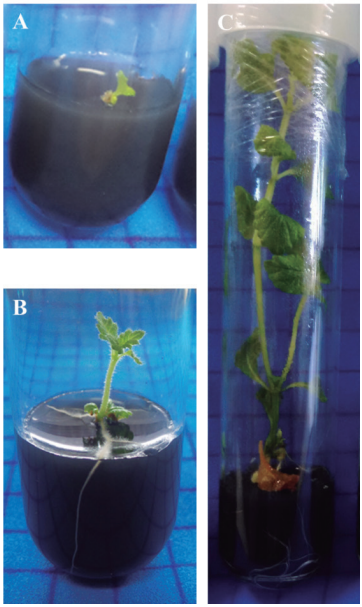

Figura 2. Plântulas de *Lantana camara* L., obtidas in vitro por organogênese direta a partir de gemas laterais, em meio de cultura WPM, sem reguladores de crescimento, após 15 (A), 30 (B) e 60 (C) dias de cultivo. Fotos: Izulmé Santos

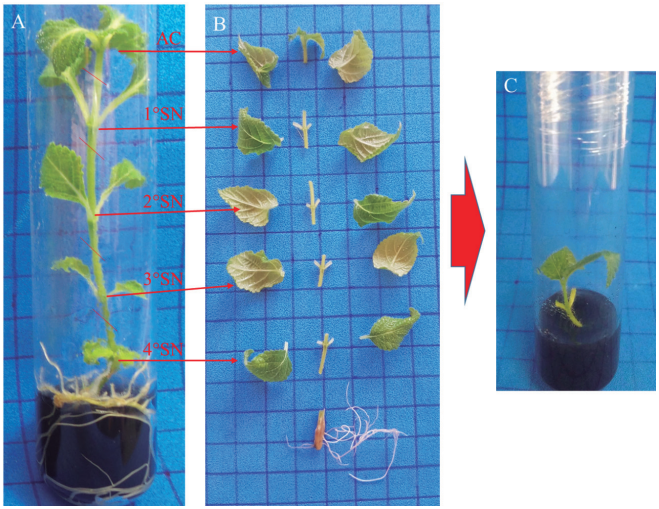

Figura 3. Multiplicação clonal in vitro de *Lantana camara* L. meio de cultura WPM, sem de reguladores de crescimento. (A) plântula obtida in vitro a partir SN excisados de plantas em crescimento no campo, após 60 dias de cultivo; (B) ápices caulinares (AC) e segmentos nodais (SN) isolados para o subcultivo e (C) estágio de desenvolvimento de AC após 15 dias de subcultivo. Fotos: Izulmé Santos.

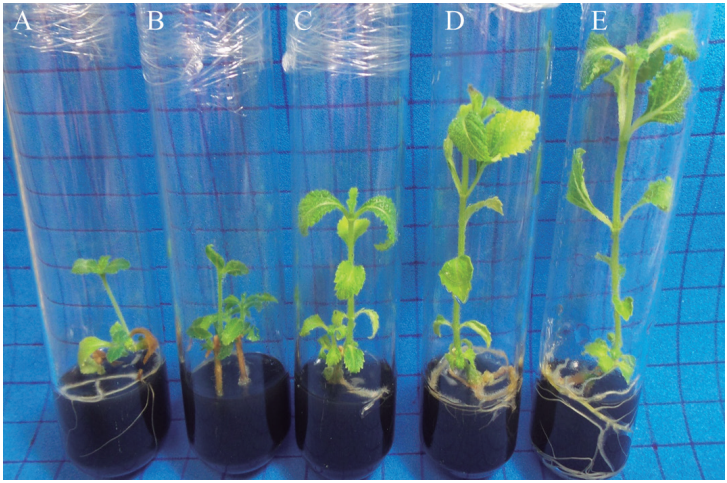

Figura 4. Vigor das plântulas de *Lantana camara* L. obtidas por subcultivo de ápices caulinares (AC) e segmentos nodais (SN), após 30 dias de cultivo em meio de cultura WPM, em função da posição do SN a partir do AC: (A) plântulas regeneradas do 5° SN, (B) plântulas regeneradas do 4° SN, (C) plântulas regeneradas do 3° SN, (D) plântulas regeneradas do 2° SN, (E) plântulas regeneradas obtidos do AC. Foto: Izulmé Santos.

A regeneração e a multiplicação in vitro de lantana já foi reportada previamente na literatura por Samani et al. (2014 e 2016) e por Veraplakorn (2016). Nesses trabalhos, foram adotados procedimentos mais complexos de cultura in vitro, tendo sido relatado que a suplementação do meio de cultura utilizado (MS, Murashigue e Skoog, 1962) com altas concentrações de reguladores de crescimento exógenos ou outras substâncias indutoras foi necessária tanto para induzir a regeneração de novos brotos e a formação de plântulas a partir dos explantes inoculados in vitro, quanto para o enraizamento das plântulas obtidas. Os resultados obtidos no presente trabalho evidenciam que um procedimento mais simples de cultura in vitro, usando meio de cultura sem reguladores de crescimento exógenos, é igualmente eficaz para induzir altas taxas de regeneração de novas brotações e viabilizar a multiplicação clonal in vitro de GL de lantana. Provavelmente, a formação das brotações obtidas nesse estudo foi induzida por citocininas endógenas presentes nas GL. Tipicamente, citocininas são sintetizadas nas raízes e transportadas para a região apical da planta, sendo comum seu acúmulo nas GL onde essas citocininas têm papel fundamental na quebra da dominância apical e da dormência dessas GL, resultando na indução do crescimento de novos brotos e na promoção do crescimento da planta (Samani et al. 2014 e 2016).

Do ponto de vista prático, procedimentos mais complexos usando meios de cultura suplementados com altas concentrações de reguladores de

crescimento exógenos apresentam alguns inconvenientes relevantes, como aumento do custo de produção de mudas, baixa reprodutibilidade, aumento na probabilidade de ocorrência de erros de manipulação e aumento significativo do risco de indução de variação somaclonal. A variação somaclonal é um dos maiores problemas encontrados na propagação clonal por meio do cultivo in vitro, sendo que uma das recomendações para evitá-la é a utilização de técnicas de micropropagação simplificadas, priorizando a regeneração direta a partir de meristemas apicais ou gemas laterais, em meios de cultura sem adição de reguladores de crescimento ou contendo concentrações mais baixas desses compostos caso sua adição seja indispensável para a regeneração de brotações (Bairu et al., 2011; Konan et al., 2010).

O presente trabalho objetivou simplificar e otimizar as técnicas de regeneração e multiplicação in vitro de lantana, o que foi satisfatoriamente alcançado. O procedimento testado permitiu obter altos percentuais de regeneração de novas brotações, sem fase intermediária de calos (Figura 2), a partir da regeneração direta das GL presentes nos SN obtidos de plantas de lantana em crescimento no campo. Seguindo uma estratégia semelhante, a multiplicação clonal foi obtida pelo subcultivo de AC e SN isolados das plântulas obtidas in vitro (Figura 3) no mesmo meio de cultura e mesmas condições de cultivo. Esses resultados demostram ser possível obter plântulas vigorosas, com morfologia normal, ou seja, com parte aérea e sistema radicular bem desenvolvidos (Figura 2), utilizando o meio de cultura WPM (Lloyd e McCown, 1981), sem a adição de reguladores de crescimento exógeno, um procedimento simples e de fácil reprodução. Procedimentos simplificados como esse tem aplicação prática para a introdução e a multiplicação in vitro de germoplasma de interesse para diversos usos, como, por exemplo, multiplicação clonal para propagação em larga escala, limpeza clonal, produção in vitro de compostos bioativos e conservação ex situ de germoplasma usando a conservação in vitro em condições de crescimento lento (Costa et al. 2007; Oliveira; Nino, 2009). Adicionalmente, o procedimento descrito tem aplicação para a produção de lotes de plântulas para estudos de criopreservação de germoplasma dessa espécie, para viabilizar sua conservação em longo prazo em bancos criogênicos. Esses estudos já estão em andamento e os resultados obtidos serão divulgados futuramente.

Conclusões

Os resultados obtidos no presente estudo evidenciam que o estabelecimento in vitro de lantana, produzindo altos percentuais de regeneração de plântulas, pode ser viabilizado pelo cultivo de SN em meio WPM básico, sem adição de reguladores de crescimento exógenos. O procedimento testado viabilizou a regeneração de plântulas vigorosas, com morfologia normal, apresentando parte aérea e sistema radicular bem desenvolvidos. O subcultivo de AC e SN das plântulas obtidas in vitro é uma estratégia eficiente para a multiplicação clonal da espécie, permitindo a produção de grande número de indivíduos a partir de um único segmento nodal. As plântulas obtidas a partir do subcultivo de ápices caulinares e segmentos nodais localizados mais próximos do ápice caulinar apresentaram crescimento mais vigoroso e, portanto, é recomendável dar preferência a esses explantes para a micropropagação da espécie.

Referências

BAIRU, M. W.; AREMU, A. O.; STADEN, J. V. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. **Plant Growth Regulation**, v. 63, p.147-173, 2011.

BRAGA, C. Lantana – *Lantana camara*. Disponível em:< https://www.floresefolhagens.com.br/cambara-lantana-camara/>. Acesso em: 28 maio de 2018.

BRITO, M. F.; TOKARNIA, C. H.; DOBEREINER, I. A toxidez de diversas lantanas para bovinos e ovinos no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 24, n. 3, 2004.

CAMPOS, M. R. de C.; FERREIRA, A. de S.; CECON, P. R.; OTONI, W. C. Morfogênese in vitro de crisântemo (*Dendranthema grandiflora* Tzelev) a partir de explantes de caule e pedicelo. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 6, p. 1903 - 1911, 2014.

CORREA, M. P.; Penna, L. de A. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: IBDF; Ministério da Agricultura. 1984. v.1

COSTA, A. S.; ARRIGONI-BLANK M. F.; BLANK A. F.; MENDONÇA A. B.; AMANCIO V. F.; LEDO A. S. Estabelecimento de alecrim-pimenta in vitro. **Horticultura Brasileira**, v. 25, p. 68 - 72, 2007.

CRUZ, L. V. V.; SALIMENA F. R. G. Verbenaceae J. St.- Hill do Parque Estadual do Ibitipoca, Minas Gerais, Brasil. **Boletim de Botânica**, São Paulo, v. 35, p. 65 - 74, 2017.

ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In vitro Cellular & Development Biology:** Plant, v. 47, p. 5 - 16, 2011.

FLORA do Brasil 2020: algas fungos e plantas. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB15164>. Acesso em: 12 set. 2018.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. Plant Tissue Culture Procedure - Background. In: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. (Ed.) **Plant Propagation by Tissue Culture**. 3. ed. The Netherlands: Springer, 2008. p. 1 - 28.

GUTIÉRREZ, I. E. M. de; NEPOMUCENO, C. F.; LEDO, C. A. da S.; SANTANA, J. R. F. de. Regeneração in vitro via organogênese direta de *Bauhinia cheilantha*. **Ciência Rural**, v. 41, n. 2, p. 260 - 265, 2011.

IANNACONE, J.; LAMAS, G. Efecto insecticida de cuatro extractos botanicos y del cartap sobre la polilla de la papa *Phtrorimae opercula* en el Perú. **Entomotropica**, v. 18, n. 2, p. 95 - 105, 2003.

KALITA, S.; KUMAR, G.; KARTHIK, L.; RAO. K. V. B. A review on medicinal properties of *Lantana camara* L. **Research Journal of Pharmacy and Technology**, v. 5, p. 711-715, 2012.

KLEIN, T.; LONGHINI, R.; BRUSCHI, M. L.; MELLO, J. C. P. Fitoterápicos: um mercado promissor. **Revista de Ciências Farmaceuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 3, p. 241 – 248, 2009.

KONAN, K. E.; DURAND-GASSELIN, T.; KOUADIO, Y. J.; FLORI, A.; RIVAL, A.; DUVAL, Y.; PANNETIER, C. In vitro conservation of oil palm somatic embryos for 20 years on a hormone-free culture medium: characteristics of the embryogenic cultures, derived plantlets and adult palms. **Plant Cell Reproduction**, v. 29, p.1-13, 2010.

LANTANA: a planta arco-íris. Disponível em: <revistanatureza.com.br/lantana/> Acesso em: 28 Mai. 2018. Acesso em: 28/05/2018.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of Mountain laurel, Kalmia latifolia, by use of shoot tip culture. **Combined Proceedings International Plant Propagators Society**, v. 30, p. 421-427, 1981.

OLIVEIRA, R. P.; NINO, A. F. P. Potencial de multiplicação in vitro de cultivares de framboeseira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, p. 280-284, 2009.

Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbf/v31n1/v31n1a40.pdf>. Acesso em: 28 maio de2018.

REDDY, N. M. *Lantana camara* L. chemical constituents and medicinal properties: a review. **Scholars Academic Journal of Pharmacy,** v. 2, n. 6, p. 445-448, 2013.

SAGAR, L.; SEHGAL, R.; OJHA, S. Evaluation of antimotility effect of *Lantana camara* L. var. acuelata constituents on neostigmine induced gastrointestinal transit in mice. **BMC – Complementary and Alternative Medicine**, v.18, n.5, p.1-6, 2005.

SAMANI, E. N.; JABBARZADEH, Z.; GHOBADI, S. Micropropagation of *Lantana camara* through axillary shoots proliferation. **Journal of Ornamental Plants**, v. 6, n. 4, p. 217–223, 2016.

SAMANI, E. N.; JABBARZADEH, Z.; GHOBADI, S.; MOTAMEDI, M. Effect of different concentrations of plant growth regulators on micropropagation of *Lantana camara*. J**ournal of Medicinal Plant Research**, v. 8, n. 44, p. 1299–1303, 2014.

SARASAN, V.; CRIPPS, R.; RAMSAY, M. M.; ATHERTON, C.; MCMICHEN, M.; PRENDERGAST, G.; ROWNTREE, J. K. Conservation in vitro of threatened plants: progress in the past decade. **In vitro cellular developmental biology-Plant**, v. 42, p. 206-214, 2006.

SHASHI, B. M.; NIRANJAN, P. S.; SUBODH, K. R.; SHARMA, O. P. Potential antitumor agents from *Lantana camara*: structures of flavonoid and phenylpropanoid glycosides. **Tetraedron**, v. 50, p. 9439-9446, 1994.

TERMIGNONI, R. R. **Cultura de tecidos vegetais**: morfogênese e crescimento in vitro. 1. ed. Porto Alegre: UFRGS, 2005.

TOKARNIA, C. H.; ARMIÉN, A. G.; de BARROS, S. S.; PEIXOTO, P. V.; DOBEREINER, J. Estudos complementares sobre toxidez de *Lantana camara* (Verbenaceae) em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 19, n. 3/4, p.128-132, 1999.

VERAPLAKORN, V. Micropropagation and callus induction of *Lantana camara* L. – A medicinal plant. **Agriculture and Natural Resources**, v. 50, p. 338–344, 2016.

WATANABE, M. A. Ácaros em Lantana camara. In: ENCONTRO LATINO-AMERICANO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 10.; ENCONTRO LATINO AMERICANO DE PÓS GRADUAÇÃO, 6., 2005. [S.l.]:[S.n] **Anais**... [Universidade do Vale do Paraíba], 2005. (Embrapa Meio Ambiente, informativo, n. 51, 2005).

Embrapa

Recursos Genéticos e Biotecnologia

CGPE: 14946

MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO

BRASIL
GOVERNO FEDERAL