



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA
CURSO DE AGRONOMIA

JORGE BRAGA RIBEIRO JUNIOR

APLICAÇÃO DA CITOCININA NA FORMAÇÃO DA SEMENTE SINTÉTICA DE
JAMBU

FORTALEZA

2022

JORGE BRAGA RIBEIRO JUNIOR

**APLICAÇÃO DA CITOCININA NA FORMAÇÃO DA SEMENTE SINTÉTICA DE
JAMBU**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Agronomia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Engenheiro Agrônomo.

Orientadora: Profa. Dra. Gabrielen de Maria Gomes Dias

Coorientador: Prof. Dr. Marcelo de Almeida Guimarães

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

R369a Ribeiro Júnior, Jorge Braga.
Aplicação da citocinina na formação da semente sintética de jambu / Jorge Braga Ribeiro Júnior. – 2022.
43 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Curso de Agronomia, Fortaleza, 2022.

Orientação: Profa. Dra. Gabrielen de Maria Gomes Dias.

Coorientação: Prof. Dr. Marcelo de Almeida Guimarães.

1. Acmella oleracea. 2. 6-benzilaminopurina. 3. Encapsulamento. 4. Micropropagação. I. Título.

CDD 630

JORGE BRAGA RIBEIRO JUNIOR

**APLICAÇÃO DA CITOCININA NA FORMAÇÃO DA SEMENTE SINTÉTICA DE
JAMBU**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao curso de Agronomia da Universidade
Federal do Ceará, como requisito parcial à
obtenção do título de Engenheiro Agrônomo.

Aprovado em: 02 / 11 / 2022.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Gabrielen de Maria Gomes Dias (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Marcelo de Almeida Guimarães (Coorientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Antônio Marcos Esmeraldo Bezerra
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Emanuel Alves Bezerra
Pesquisador do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (UFC)

Dedico este trabalho:

Aos meus pais,

Ana Regina e Jorge Braga Neto pelo apoio incondicional,

À minha namorada,

Laila Sabrina Queiroz Nazareno por todo o suporte,

Aos meus avós,

Francisco Carlos e Jorge Filho (*in memoriam*) com muito amor e

saudade,

À minha família.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Ana Regina e Jorge Braga Neto, não tenho palavras para transmitir meus sentimentos, tudo que eu escreva ou fale parece pouco. Obrigado pai, obrigado mãe por terem sido minha base para tudo aquilo que sou e serei. Agradeço por todo o amor que recebo de vocês, por todo dia batalharem permitindo que eu siga meus sonhos, por nunca medirem esforços e renuncias para que eu chegasse onde estou.

À Lailla, minha amada para a vida, fonte de amor e carinho, que sempre meu deu suporte em tudo. Obrigado por compartilhar seus momentos comigo. Minha linda você é minha inspiração para alma.

À Professora Dr^a. Gabrielen de Maria Gomes Dias, por sempre depositar confiança na minha capacidade, por sua dedicação à profissão, por sua paciência em me fazer aprender sempre me incentivando a crescer com sua excelente orientação.

Ao Professor Dr. Marcelo de Almeida Guimarães, por todo o conhecimento transmitido, reflexões e críticas que me ajudam a crescer.

Ao Professor Dr. Antônio Marcos Esmeraldo Bezerra, uma referência em sabedoria e conhecimento, por todo o apoio em minha trajetória no curso.

A minha família, avós, tias e tios, que me acompanharam durante toda a jornada, sempre com muito amor, carinho e incentivo.

Aos colegas que ingressaram comigo na universidade, em especial a Antônio Gilson e Elizeu Pereira, pelos bons momentos e por sempre estarem dispostos em ajudar no que for preciso.

Aos colegas do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais e do NEON, por todas as contribuições e compartilhamento de conhecimentos.

À Universidade Federal do Ceará (UFC), bem como todos os professores por todo o conhecimento partilhado ao longo desses anos.

“Não importa o que o mundo diz de mim, o que importa é que eu nunca fiz nada que contrariasse os meus princípios e nunca farei.”

(Roronoa Zoro)

RESUMO

No cultivo do jambu (*Acmella oleracea*), a propagação vegetativa é predominante pois apresenta melhor eficiência. Desta forma, o objetivo do trabalho foi avaliar diferentes concentrações de citocinina, BAP (6-benzilaminopurina), na multiplicação *in vitro* de segmentos nodais e na produção de sementes sintéticas de jambu. Os experimentos foram subdivididos em duas fases: Para o Exp. 1 foram utilizados como fonte de explantes segmentos nodais obtidos a partir de sementes germinadas *in vitro*. Cada segmento nodal contendo duas gemas axilares foi inoculado em meio de cultura (MS) com 30 g L⁻¹ de sacarose e acrescido de cinco concentrações de BAP (0,000; 0,025; 0,050; 0,100 e 0,200 mg L⁻¹), uma para cada tratamento. Foram conduzidas 10 repetições por tratamento, sendo dois segmentos nodais por frasco. Após 45 dias, os tratamentos foram avaliados quanto ao número de folhas e número de brotos. No Exp. 2, segmentos nodais originados de cada uma das concentrações do Exp. 1 foram utilizados como fontes de explantes para a produção de sementes sintéticas. Assim, foram avaliados cinco tratamentos de BAP em dois recipientes (tubo de ensaio e pote plástico). Para este experimento foram realizadas 18 repetições para o tubo de ensaio (contendo uma semente sintética por tubo e em meio de cultura MS) e, três repetições para o pote plástico (contendo seis sementes sintéticas por potes preenchido com substrato). Após 30 dias, foram avaliados quanto ao número de folhas, número de brotos, diâmetro do caule, massa fresca e seca da parte aérea e da raiz (g), hiperidricidade, taxa de conversão (%), e a microscopia eletrônica de varredura da epiderme adaxial da folha. O delineamento experimental utilizado para os dois experimentos foi o inteiramente casualizado. Ambos foram mantidos em sala de crescimento com 25 ± 2°C e fotoperíodo de 16 horas luz. No Exp. 1, a concentração de 0,05 mg L⁻¹ de BAP mostrou-se eficiente na multiplicação e na obtenção de explantes de jambu (média de 94,5 folhas e 29,36 brotos por planta). No Exp. 2, a concentração de 0,05 mg L⁻¹ de BAP, proporcionou melhor conversão e desenvolvimento das sementes sintéticas (95% de conversão, 16 folhas e 3 brotos por planta) de jambu em tubo de ensaio. Para os potes plásticos, verificou-se a conversão de 26% de sementes sintéticas em ambiente não estéril. Conclui-se que a multiplicação de segmentos nodais de jambu em meio enriquecido com 0,05 mg L⁻¹ de BAP mostrou-se eficiente na obtenção de explantes, e para a conversão e desenvolvimento das sementes sintéticas de jambu (*Acmella oleracea*).

Palavras-chave: *Acmella oleracea*; 6-benzilaminopurina; encapsulamento; micropropagação.

ABSTRACT

In the cultivation of jambu (*Acmella oleracea*), vegetative propagation is predominant because it presents better efficiency. Thus, the objective of this work was to evaluate different concentrations of cytokinin, BAP (6-benzylaminopurine), in the *in vitro* multiplication of nodal segments and in the production of synthetic seeds of jambu. The experiments were subdivided into two phases: For Exp. 1 were used as a source of explants nodal segments obtained from seeds germinated *in vitro*. Each nodal segment containing two axillary buds was inoculated in culture medium (MS) with 30 g L⁻¹ of sucrose and added with five concentrations of BAP (0.000; 0.025; 0.050; 0.100 and 0.200 mg L⁻¹), one for each treatment. Ten replicates were performed per treatment, with two nodal segments per flask. After 45 days, the treatments were evaluated for the number of leaves and number of shoots. Exp. 2, nodal segments originating from each of the concentrations of Exp. 1 were used as sources of explants for the production of synthetic seeds. Thus, five BAP treatments were evaluated in two containers (test tube and plastic pot). For this experiment, 18 repetitions were performed for the test tube (containing one synthetic seed per tube and in MS culture medium) and three repetitions for the plastic pot (containing six synthetic seeds per pot filled with substrate). After 30 days, they were evaluated for the number of leaves, number of shoots, stem diameter, fresh and dry mass of shoots and roots (g), hyperhydricity, conversion rate (%), and scanning electron microscopy of the adaxial leaf epidermis. The experimental design used for both experiments was completely randomized. Both were kept in a growth room at 25 ± 2°C and a 16-hour light photoperiod. Exp. 1, the concentration of 0.05 mg L⁻¹ of BAP proved to be efficient in the multiplication and in obtaining jambu explants (mean of 94.5 leaves and 29.36 shoots per plant). Exp. 2, the concentration of 0.05 mg L⁻¹ of BAP provided better conversion and development of synthetic seeds (95% conversion, 16 leaves and 3 shoots per plant) of jambu in a test tube. For plastic pots, there was a conversion of 26% of synthetic seeds in a non-sterile environment. It was concluded that the multiplication of jambu nodal segments in a medium enriched with 0.05 mg L⁻¹ of BAP was efficient in obtaining explants, and for the conversion and development of synthetic seeds of jambu (*Acmella oleracea*).

Keywords: *Acmella oleracea*; 6-benzylaminopurine; encapsulation; micropropagation.

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

- Figura 1. Passo-a-passo para a obtenção de uma cultura de jambu asséptica.....21
- Figura 2. Eletromicrografia de varredura (A), e fitomicrografias na visualização das sementes de jambu (B, C e D). Barra = 0,5 mm (A) 1,27 mm (B, C, D).24
- Figura 3. Gráficos de diferentes concentrações de BAP em jambu (*Acmella oleracea*) *in vitro*. (A) Número de folhas, e (B) número de brotos, aos 45 dias de cultivo *in vitro*.25
- Figura 4. Mudanças *in vitro* de jambu (*Acmella oleracea*) aos 45 dias em diferentes concentrações de BAP (A): 0,000 (B), 0,200 (C); 0,100 (D); 0,050 (E) e 0,025 (F) mg L⁻¹. Barra = 5 cm.26
- Figura 5. Gráficos de desenvolvimento das sementes sintéticas de jambu (*Acmella oleracea*) (A) número de folhas e (B) número de brotos, aos 30 dias de cultivo *in vitro*.28
- Figura 6. Sementes sintéticas de jambu (*Acmella oleracea*) (0,000, 0,200, 0,100, 0,050 e 0,025 mg L⁻¹ de BAP) (A) aos 30 dias, e semente sintética (B), aos 6 dias, oriundas de explantes *in vitro* em diferentes concentrações de BAP. Barra: 3 cm.29
- Figura 7. Gráfico de diâmetro do caule em muda de jambu (*Acmella oleracea*), advindas de sementes sintéticas em função da concentração de BAP dos explantes, aos 30 dias de cultivo *in vitro*.29
- Figura 8. Gráfico de desenvolvimento de mudas de jambu (*Acmella oleracea*), advindas de sementes sintéticas em função da concentração de BAP dos explantes, aos 30 dias de cultivo *in vitro*. (A) Massa fresca da parte aérea; (B) massa seca da parte aérea; (C) massa fresca das raízes e, (D) massa seca das raízes.30
- Figura 9. Sementes sintéticas não convertidas devido à hiperidricidade (A). Gráfico de ocorrência de hiperidricidade em função da concentração de BAP em meio MS na micropropagação (B). Barra = 2 cm.31
- Figura 10. Semente sintética de jambu (*Acmella oleracea*) descomplexada (A). Sementes sintéticas com 10 dias de desenvolvimento *in vitro* e *ex vitro* (B e C). Semente sintética com 15 dias de desenvolvimento *in vitro* (D). Barra: 2 mm; 1 cm; 2 cm.32
- Figura 11. Sementes sintéticas *ex vitro* de jambu (*Acmella oleracea*) em substrato. Número de folhas (A) e altura da parte aérea (B) por muda, aos 30 dias de cultivo *ex vitro*.33
- Figura 12. Sementes sintéticas de jambu (*Acmella oleracea*) convertidas em substrato apresentando contaminação, aos 30 dias de cultivo *ex vitro*. Barra = 1 cm e 5,5 cm.33
- Figura 13. Eletromicrografias de varredura, da epiderme da face adaxial da folha de jambu (*Acmella oleracea*) aos 30 dias, evidenciando os estômatos e epiderme adaxial nos diferentes

tratamentos: 0,000 (A) e (F), 0,2 (B) e (G); 0,1 (C) e (H); 0,05 (D) e (I); e 0,025 (E) e (J) mg
L⁻¹ de BAP em MS. Barra \approx 20 μ m e 50 μ m.34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA – Análise de variância

BAP – 6-benzilaminopurina

CTV – Cultura de Tecidos Vegetais

LCTV – Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

MFPA – Massa fresca da parte aérea

MFR – Massa fresca da raiz

MS – Meio de Murashige e Skoog

MSPA – Massa seca da parte aérea

MSR – Massa seca da raiz

PANCs – Planta alimentícias não convencionais

SS – Semente(s) sintética(s)

UFC – Universidade Federal do Ceará

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Jambu	16
2.2 Cultura de Tecidos Vegetais	17
2.3 Tecnologia de sementes sintéticas	18
3 MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 Experimento 1: Micropropagação do jambu em diferentes concentrações de BAP	21
3.2 Experimento 2: Sementes sintéticas de jambu provenientes de diferentes concentrações de BAP e combinadas com recipientes	22
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1 Experimento 1: Micropropagação do jambu em diferentes concentrações de BAP	25
4.2 Experimento 2: Sementes sintéticas de jambu provenientes de diferentes concentrações de BAP e combinadas com recipientes	28
5 CONCLUSÃO	36
REFERÊNCIAS	37

1 INTRODUÇÃO

A *Acmella oleracea* (R. K. Jansen), popularmente conhecida como jambu ou agrião do Pará, é uma planta da família da Asteraceae, de ciclo anual e de ocorrência global. A cultura tem importância econômica em países como o Brasil, Bolívia, China, Índia, México, Nepal, Sri Lanka e Taiwan (DUBEY *et al.*, 2013; BENELLI *et al.*, 2019).

Seu cultivo é amplo e destinado para fins culinários, inseticidas e medicinais. Estudos recentes apontam que o jambu, *in natura*, possui quantidades substanciais de nutrientes em suas folhas, apresentando aproximadamente, 24,01% de proteínas, 1,54% de lipídios, 63,38% de carboidratos, além de quantidades variadas de cálcio, magnésio e cobre (SEAL; CHAUDHURI; PILLAI, 2013; NEVES *et al.*, 2019).

De forma geral, o jambu compõe receitas de pratos típicos da região Norte do Brasil sendo, assim, considerado uma planta alimentícia não convencional (PANC) (KINUPP; LORENZI, 2014). Seu cultivo está limitado a algumas regiões do mundo, porém, estudos fitotécnicos e fitoquímicos tem buscado popularizar seu consumo graças às suas propriedades funcionais, nutricionais e sensoriais (UTHPALA; NAVARATNE, 2020).

Em áreas úmidas da região Norte do Brasil o jambu é propagado quase que exclusivamente por via vegetativa, uma vez que, o sucesso com o plantio de sementes é baixo. Tal fato tem relação com a rápida entrada em dormência da semente e a heterogeneidade da maturação do embrião que, em alguns casos, pode até não estar presente na semente (CARDOSO; GARCIA, 1997). Assim, uma alternativa viável para contornar os problemas relacionados à propagação dessa espécie é o uso da cultura de tecidos vegetais, o que consiste na propagação *in vitro* de explantes, sejam eles meristemas, segmentos nodais, tecidos e ou órgãos vegetais, em condições assépticas, em meio de cultura capaz de suprir as necessidades nutricionais da planta e em condições ambientais de temperatura e luz controladas (HUSSAIN *et al.*, 2012).

Dentro das técnicas de cultura de tecidos vegetais, a tecnologia de produção de sementes sintéticas, surge como uma importante ferramenta que, além da micropropagação, permite a conservação *in vitro* de material genético (MARUYAMA *et al.*, 1997). De forma geral, as sementes sintéticas apresentam várias vantagens como: 1. A obtenção de grande número de mudas por meio de apenas um explante, possibilitando a produção escalonável de mudas *in vitro* e *ex vitro* sem limites impostos pela sazonalidade, 2. Redução no tempo de produção, 3. Homogeneidade de produção, 4. Boa condição fitossanitária, 5. Elevado

potencial produtivo via seleção de material superior para clonagem (SINGH; SINGH, 2021) e 6. Pode ser usado para intercâmbio de germoplasma.

A produção de sementes sintéticas já é registrada para diversas espécies da família Asteraceae, tais como Artemísia (*Artemisia vulgaris*) (SUDARSHANA *et al.*, 2013), Erva-botão (*Eclipta alba*) (RAY; BHATTACHARYA, 2010), Margaridão (*Sphagneticola calendulacea*) (KUNDU *et al.*, 2018), Stévia (*Stevia rebaudiana*) (LATA *et al.*, 2014), *Spilanthes mauritiana* (SHARMA; SHAHZAD, 2014), sendo os segmentos nodais os explantes mais frequentemente encapsulados (KULUS, 2019).

Com base no exposto e na ausência de trabalhos que apresentem informações técnico-científicas sobre a produção de sementes sintéticas de jambu, objetivou-se com este trabalho avaliar diferentes concentrações de BAP (6-Benzilaminopurina) na multiplicação de segmentos nodais *in vitro* e na produção de sementes sintéticas de jambu (*Acmella oleracea*) em dois tipos de recipientes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Jambu

A *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen, conhecida popularmente como jambu, é a espécie do gênero *Acmella* mais cultivada, sendo pertencente à família Asteraceae. Essa espécie é nativa da América do Sul, sendo seu centro de origem muitas vezes atribuído ao Brasil e, em alguns casos, à região central do Peru (CRUZ *et al.*, 2016; MABBERLEY; CORNER, 2017; RONDANELLI *et al.*, 2020).

Na literatura são encontrados alguns equívocos quanto à similitude da espécie *A. oleracea*, em que suas características taxonômicas são confundidas com as de espécies do gênero *Spilanthus*. Por conta disso, a sobreposição de nomes botânicos acaba resultando em revisões e reclassificações taxonômicas (CHUNG; KONO; WANG, 2008; PAULRAJ; GOVINDARAJAN; PALPU, 2013).

As primeiras descrições relacionadas ao consumo da *A. oleracea* foram realizadas por Lamarck em sua *Encyclopedie Methodique* (LAMARCK, 1785), nela foram descritas o sabor picante das folhas. Apesar disso, é servida fresca em saladas na região Norte do Brasil, compondo diversos pratos típicos (YAMANE *et al.*, 2016), no entanto, não é muito conhecida no resto do mundo (NEVES *et al.*, 2019).

Recentes estudos analisaram os valores nutricionais e possíveis perdas da *A. oleracea* fresca e cozida, mostrando que os aminoácidos (asparagina, ácido glutâmico, valina e isoleucina), macronutrientes (proteínas e fibras) e minerais (cálcio, magnésio e cobre) permanecem em quantidades substanciais mesmo após cozida, no entanto, as partes cozidas perdem sua característica picante, indicando possível degradação dos princípios ativos (NEVES *et al.*, 2019). Também se destacam as bebidas, que utilizam seus botões florais, brotos e folhas devido às suas propriedades analgésicas (VASQUEZ, 2017; NEVES *et al.*, 2019).

O plantio do jambu pode ser realizado por semeadura direta ou via vegetativa. Devido a heterogeneidade e a ausência de embriões nas sementes, a propagação vegetativa é predominante (CARDOSO; GARCIA, 1997). Seu cultivo ocorre predominantemente em solos úmidos há muito úmidos, desenvolve-se melhor em solos argilosos ricos em matéria orgânica, sendo pouco tolerante a baixa umidade onde pode murchar facilmente (NASCIMENTO *et al.*, 2020). Seu ciclo fenológico é de 6 a 8 meses. Dificilmente enraíza na região do nó e, por isso, seu cultivo é realizado de forma densa para compensar possíveis perdas na propagação por estacas (SPINOZZI *et al.*, 2021; UTHPALA; NAVARATNE,

2020). Apesar do cultivo do jambu não possuir uma cadeia produtiva organizada, como ocorre com outras hortaliças consideradas convencionais, como o coentro (*Coriandrum sativum* L.), ele apresenta boa rentabilidade para populações da região Norte do país, onde é facilmente encontrado para a venda na forma *in natura*, em feiras e supermercados, ou pode ser encontrado na forma pré-cozida (HOMMA *et al.*, 2014).

2.2 Cultura de Tecidos Vegetais

A Cultura de Tecidos Vegetais (CTV) é entendida como a cultura de células vegetais, embriões, órgãos, protoplastos, sementes ou tecidos *in vitro*, em meio nutritivo com condições de temperatura, fotoperíodo, umidade e intensidade luminosa controlado, em ambiente asséptico (BRIDGEN; VAN HOUTVEN; EECKHAUT, 2018). Na biotecnologia vegetal a CTV integra-se às técnicas de propagação de plantas de forma crucial, sendo uma estratégia com potencial para contrapor problemas da produção hortícola (NEUMANN; KUMAR; IMANI, 2020; VIANA *et al.*, 2022). Segundo as Nações Unidas a população mundial aquecimento global, desertificação, crises hídricas, mudanças climáticas, ao mesmo tempo que enfrenta demandas da poderá chegar a 9,9 bilhões de pessoas até o ano de 2050, dessa forma, o estudo de alternativas para se aumentar a produção de alimentos são importantes, já que podem garantir a segurança alimentar em todo o mundo (ABDALLA *et al.*, 2022).

A CTV é uma ferramenta que, quando associadas às outras, contribui para o fornecimento de alimentos, pois sua produção independe de fatores ambientais ou geográficos, sendo este capaz de atender à demanda crescente da população (NEUMANN; KUMAR; IMANI, 2020). As técnicas da CTV envolvem a embriogênese somática, a micropropagação *in vitro* e a organogênese (BIDABADI; JAIN, 2020). Como vantagens de sua utilização pode-se citar a produção de mudas livres de patógenos (RANI; DONOVAN; MANTRIA, 2019; PE *et al.*, 2020), a multiplicação em massa de plantas de difícil propagação (PARK, 2021), melhorias nas características comercialmente desejadas (NAING; ADEDEJI; KIM, 2021), conservação da flora ameaçada de extinção (DHIMAN *et al.*, 2020), produção de variedades tolerantes a estresses e a possibilidade de produzir composto bioativos ou metabólitos secundários (FORTINI *et al.*, 2021; KYZIOL *et al.*, 2021).

A CTV tem sido fundamental para produtores de mudas de espécies florestais, frutíferas, hortaliças e ornamentais (RANI; DONOVAN; MANTRIA, 2019). Nesses sistemas de produção agrícola há grande dependência dos recursos desenvolvidos pela biotecnologia vegetal, dada a sua demanda, não apenas em quantidade como também em qualidade

(GREGORIO; HERBOHN; HARRISON, 2004; DEGRANDE *et al.*, 2013) e informação. A manutenção da sanidade do material vegetal, oriundo da CTV, é resultado das constantes triagens que, além de barrar a disseminação de pragas e doenças, ajudam a descobrir novos patógenos (MARSHALL; SUTHERLAND; HULME, 2021).

A cultura de tecidos vegetais possui alguns fatores que a limitam, um desses é a determinação da correta concentração e combinação de reguladores de crescimento para as espécies (COLOMBO *et al.*, 2010). Os reguladores de crescimento são hormônios sintéticos que participam e controlam o desenvolvimento das plantas. Seu uso, *in vitro*, permite através da indução, reprogramar o “destino celular” (DIAS, 2019; WU *et al.*, 2022).

Resultados de pesquisas tem mostrado a eficiência no uso de hormônios sintéticos à base de citocinina, como a cinetina e o 6-benzilaminopurina (BAP), na micropropagação de asteráceas (DEVI; KALAIPRIYA, 2018; STANILOVA *et al.*, 2022), sendo um dos papéis mais descritos da citocinina, na micropropagação, o estímulo para a proliferação celular, o que influencia na diferenciação, desdiferenciação e divisão celular (SCHALLER; STREET; KIEBER, 2014).

Desta forma, pesquisas com a micropropagação das espécies têm grande importância, já que permitem a multiplicação em larga escala, ao mesmo tempo em que pode padronizar e, até aumentar a síntese de substâncias bioativas em plantas (WANG *et al.*, 2017).

2.3 Tecnologia de sementes sintéticas

As Sementes Sintéticas (SS) são explantes artificialmente encapsulados, que possuem a capacidade de se converter em uma planta inteira sob condições *in vitro* ou *ex vitro*, mesmo após procedimentos de armazenamento (NONGDAM, 2016).

Antigamente, a classificação de SS era descrita como o encapsulamento único de embriões somáticos, que eram utilizados para o desenvolvimento e disseminação de plantas no campo (GRAY; PUROHIT, 1991; GUERRA *et al.*, 2001). Atualmente, a definição de SS, é mais ampla, referindo-se à utilização de qualquer tipo de micropropágulo capaz de converter-se em uma planta em condições *in vitro* ou *ex vitro* (NONGDAM, 2016).

As SS são constituídas por três componentes principais: 1. o explante, análogo ao eixo embrionário das sementes 2. a matriz, um material gelificante que envolve os micropropágulos que pode ser composto por bioestimulantes, compostos antipatogênicos, nutrientes e reguladores de crescimento, que simulam o endosperma da semente natural; e, 3. o tegumento artificial que é formado a partir de uma reação de complexação do agente

gelificante, funcionando como a testa das sementes protegendo o explante (CARTES *et al.*, 2009).

A tecnologia atual permite classificar as SS em dois tipos: dissecadas e hidratadas; sendo elas revestidas ou não revestidas (SAHOO; ROUT; SATYAJIT, 2012). As SS dissecadas são implantadas a partir da dessecação sob condições controladas, a níveis de umidade de 10 a 15% permitindo que sejam armazenadas por cerca de um ano sem que a integridade e viabilidade sejam comprometidas (KITTO; JANICK, 1982; KITTO; JANICK, 1985a; KITTO; JANICK, 1985b). No caso das SS hidratadas, o tecido vegetal ou embrião somático são sensíveis à dessecação, por isso são envoltos em uma matriz gelatinosa (ABBAS; MAHOOD; ALHASAN, 2022).

O alginato de cálcio é frequentemente utilizado como matriz devido à sua elevada biocompatibilidade, com destaque à baixa toxicidade e rápida gelificação (REDENBAUGH, 1993). Na produção das SS, os explantes são imersos em solução de alginato de sódio (0,5-5,0% p/v) e, então, pipetados em solução de cloreto de cálcio (30-100 mM) para que seja formada a matriz de alginato de cálcio. A esferificação ocorre com a substituição dos íons do sódio por íons de cálcio (REDDY; MURTHY; PULLAIAH, 2012; OCEANIA *et al.*, 2015).

Na biotecnologia, o emprego das SS é promissor pois retêm a capacidade de produção de plantas, em massa, com características superiores e de espécies raras, contribuindo para a preservação da biodiversidade. A produção de clones pela tecnologia das SS independe das questões que envolvem as estações do ano, podendo então ser produzidas plântulas uniformes, de forma contínua, em menos tempo e durante todo o ano (BEKHEET, 2006).

A tecnologia de produção de SS é uma alternativa promissora para a multiplicação e preservação de plantas, principalmente aquelas sem sementes, transgênicas ou que necessitam manter uma qualidade superior via propagação assexuada (SAIPRASAD, 2001). Além disso, as SS permitem a conservação *ex situ* do material superior, armazenando plantas heterozigotas ou que tenham uma combinação genética que seria impossível manter utilizando as sementes naturais (ABBAS; MAHOOD; ALHASAN, 2022).

A produção das sementes artificiais está desenvolvendo-se como alternativa complementar às atuais técnicas de propagação para várias culturas de interesse comercial, principalmente as hortícolas. A tecnologia pode reduzir significativamente as despesas com a propagação de plantas, reduzir a quantidade de trabalho manual, tempo, espaço e material necessário (CHEE; CANTLIFFE, 1992), como também, facilitar o manuseio de espécies que

possuem sementes muito pequenas e de difícil manipulação, como é o caso das sementes de jambu.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCTV), no Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal do Ceará (UFC). As plântulas de jambu (*Acmella oleracea* [(L.) R. K. Jansen]) foram estabelecidas *in vitro* a partir de sementes inoculadas (Figura 1) em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose e solidificado com 5,8 g L⁻¹ de ágar (HIMEDIA®). Após isso, segmentos nodais foram utilizados como fonte de explantes para a micropropagação e, posteriormente, produção de sementes sintéticas.

Figura 1. Passo-a-passo para a obtenção de uma cultura de jambu asséptica.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Os experimentos foram subdivididos para duas fases:

3.1 Experimento 1: Micropropagação do jambu em diferentes concentrações de BAP

Segmentos nodais de plântulas de jambu *in vitro* com, aproximadamente, 2,0 cm de comprimento, contendo duas gemas axilares, foram inoculados em frascos com 50 mL de meio MS adicionado de 30 g L⁻¹ de sacarose e solidificado com 5,8 g L⁻¹ de ágar. Os tratamentos foram constituídos por diferentes concentrações de BAP (6-benzilaminopurina) (0,000; 0,025; 0,050; 0,100 e 0,200 mg L⁻¹). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 e, em seguida, autoclavado a 121 °C e 1,2 atm, durante 20 minutos.

Após a inoculação dos segmentos nodais nos frascos, de acordo com cada tratamento, esses recipientes foram alocados em sala de crescimento, com fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25 ± 2 °C e intensidade luminosa de 35,1 W m⁻²s⁻¹ (Luxímetro digital: Equitherm 813-A)

Após 45 dias, foram avaliadas, visualmente, todas as plântulas do experimento quanto ao número de folhas e número de brotos.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e 10 repetições, sendo a repetição representada por um frasco. Cada frasco conteve dois segmentos nodais, totalizando 20 explantes por tratamento.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância utilizando-se o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2014), sendo realizada regressão nos dados.

3.2 Experimento 2: Sementes sintéticas de jambu provenientes de diferentes concentrações de BAP e combinadas com recipientes

Após 30 dias de cultivo do experimento anterior, as mudas micropropagadas em diferentes concentrações de BAP (0,000; 0,025; 0,050; 0,100 e 0,200 mg L⁻¹) tiveram inicialmente selecionados e seccionados seus segmentos nodais com, aproximadamente, 0,3 cm para produção das sementes sintéticas.

O material vegetal proveniente de cada tratamento foi misturado à matriz de alginato de sódio (2% p/v) (NEON[®]). Posteriormente, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur de 3 mL, esterilizada em álcool 99%, as sementes sintéticas foram individualmente resgatadas e gotejadas em solução de CaCl₂.2H₂O (75 mM) (NEON[®]), na qual permaneceram por 20 minutos para complexação. Em seguida, as sementes sintéticas, formadas por um segmento de nó, foram submetidas a três lavagens em água destilada e autoclavada para retirar o excesso de CaCl₂.2H₂O. Sequencialmente, as sementes foram imersas em solução de KNO₃ (200 mM) (ÊXODO CIENTÍFICA[®]) por 15 minutos para a descomplexação, sendo, em seguida, novamente lavadas em água destilada. O alginato de sódio foi dissolvido em solução de meio MS e junto com as soluções de CaCl₂.2H₂O e KNO₃, foram esterilizadas por autoclavagem a 121 °C durante 15 minutos e 1 atm de pressão. Após a descomplexação em KNO₃ as sementes foram colocadas em dois tipos de recipientes para emergência e desenvolvimento.

Com base no exposto, o delineamento experimental empregado foi inteiramente casualizado, as SS, advindas de segmentos nodais provenientes de cinco concentrações de BAP (0,000; 0,025; 0,050; 0,100 e 0,200 mg L⁻¹) na micropropagação (obtidos do experimento anterior) foram inoculadas em dois recipientes.

O primeiro tipo de recipiente utilizado foi o tubo de ensaio contendo 10 mL de meio MS. Para este foram conduzidas 20 repetições, sendo uma semente sintética por parcela. Já o segundo tipo de recipiente utilizado foi embalagem plástica fechada com furos na base. Para este foram conduzidas três repetições por tratamento e seis sementes sintéticas por repetição. Este recipiente foi preenchido com substrato Carolina Soil[®] autoclavado e, então, posicionado em recipiente com lâmina de água de 5 mm. O suprimento de água foi realizado diariamente com o auxílio de uma piceta. Ambos os recipientes, após inoculação, foram

mantidos em sala de crescimento, à temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de $(35,1 \text{ W m}^{-2}\text{s}^{-1})$.

Após 30 dias as sementes sintéticas foram avaliadas quanto às:

Características fitotécnicas - todas as plântulas foram avaliadas visualmente quanto ao número de folhas, número de brotos, hiperidricidade e taxa de conversão (%), e, com o auxílio de um paquímetro digital, o diâmetro do caule (cm). Para quantificar o ganho de biomassa, foram avaliadas as massas frescas da parte aérea e da raiz (g) (com auxílio de uma balança de precisão) e, posteriormente, após esse material ser submetido a secagem em estufa de circulação forçada de ar, a uma temperatura constante em 65 °C, por 72 horas, obteve-se também os resultados de massa seca da parte aérea e da raiz (g).

Características ultraestruturais - amostras constituídas de folhas foram preparadas de acordo com Dias *et al.* (2017). Após a desidratação, para a análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV), as amostras foram secas em aparelho de ponto crítico CDP 030, por meio de CO₂ líquido e, em seguida, montadas em 'stubs' para metalização com prata. Os espécimes foram observados em microscópio eletrônico de varredura (MEV XL30 Phillips). Observou-se toda a estrutura da epiderme adaxial de cada folha.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) empregando-se o teste F. Os dados qualitativos foram submetidos à comparação de médias através do teste de Tukey, calculando-se a diferença mínima significativa ao nível de 1% de probabilidade e, quando verificado efeito significativo, realizou-se análise de regressão. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o Software SISVAR (FERREIRA, 2014).

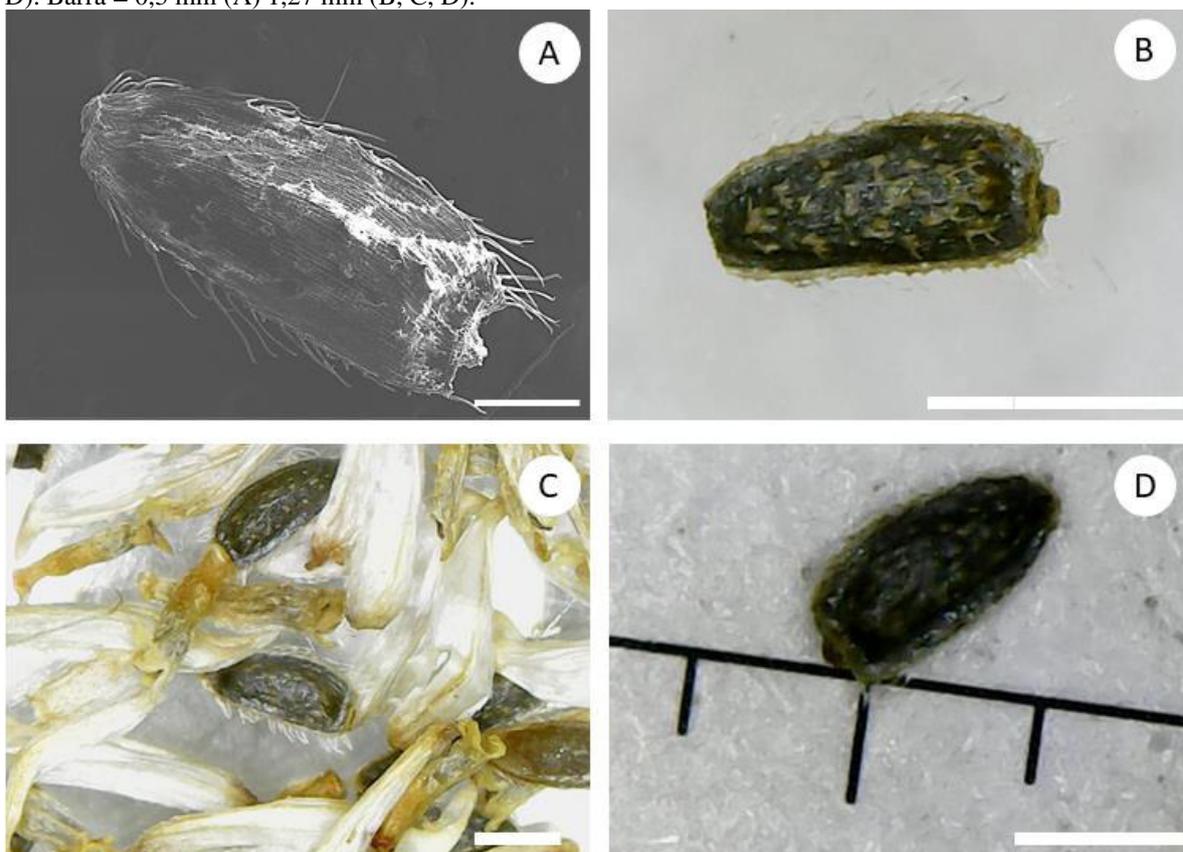
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A germinação das sementes *in vitro* para obtenção dos explantes teve início no quinto dia após a inoculação. O tempo para germinação *in vitro* foi semelhante ao encontrado por Lima *et al.* (2020) e Almeida *et al.* (2020), sendo que possíveis diferenças podem ser atribuídas às condições ambientais como fotoperíodo, intensidade luminosa, temperatura e umidade que exercem muita influência sobre as taxas de germinação das sementes.

O meio de cultura teve papel fundamental para a germinação e desenvolvimento inicial, apesar das sementes possuírem tecidos de reserva, o estabelecimento da cultura *in vitro* depende da concentração de nutrientes, e o meio MS como visto por Almeida *et al.* (2020) apresenta a combinação apropriada para o jambu.

A morfologia externa das sementes de jambu (*Acmella oleracea*) utilizadas foram classificadas como: cor cinza-escura, parcialmente envolvida por partes membranosas, alongadas longitudinalmente, ciliadas e com pequenas manchas amarelas (Figura 2) (HIND; BIGGS, 2003; SARMENTO *et al.*, 2019), apresentando tamanho variando de 1 a 2 mm.

Figura 2. Eletromicrografia de varredura (A), e fitomicrografias na visualização das sementes de jambu (B, C e D). Barra = 0,5 mm (A) 1,27 mm (B, C, D).

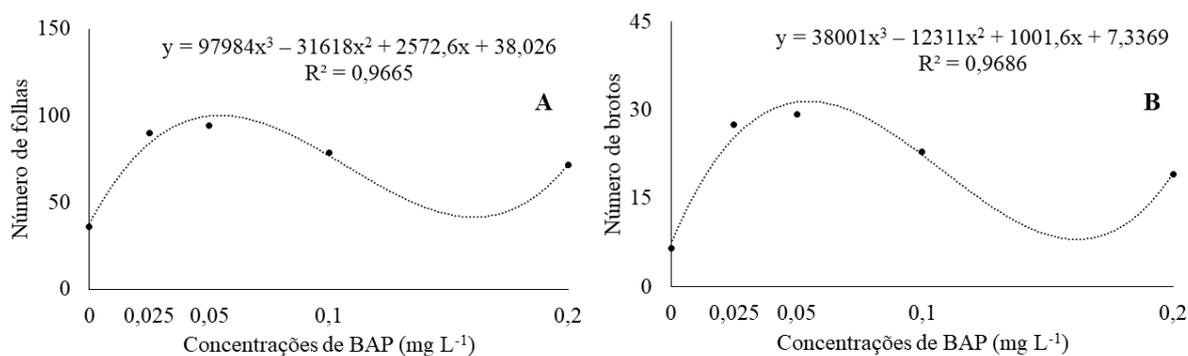


Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

4.1 Experimento 1: Micropropagação do jambu em diferentes concentrações de BAP

Aos 45 dias, as variáveis número de folhas e número de brotos apresentaram resultados significativos para as diferentes concentrações de BAP no meio de cultura, ajustando-se os dados à uma regressão cúbica (Figura 3).

Figura 3. Gráficos de diferentes concentrações de BAP em jambu (*Acmella oleracea*) *in vitro*. (A) Número de folhas, e (B) número de brotos, aos 45 dias de cultivo *in vitro*.



Para o número de brotos e número de folhas, o tratamento com 0,05 mg L⁻¹ de BAP, apresentou valores superiores, com média de 29,36 brotos e 94,50 folhas, respectivamente (FIGURA 4A). Já para Almeida *et al.* (2020), trabalhando com a mesma espécie, obteve ganho crescente no número de brotos até a concentração de 0,125 mg L⁻¹ de BAP na micropropagação aos 30 dias, mas com uma média de 3 brotos, número bem inferior comparado aos obtidos neste trabalho.

Figura 4. Mudanças *in vitro* de jambu (*Acmella oleracea*) aos 45 dias em diferentes concentrações de BAP (A): 0,000 (B), 0,200 (C); 0,100 (D); 0,050 (E) e 0,025 (F) mg L⁻¹. Barra = 5 cm.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

O incremento no número de brotos utilizando BAP também foi verificado em outras espécies da família Asteraceae, como em segmentos nodais de *Artemisia Chamaemelifolia*, que utilizando concentrações de 0,1 a 1,0 mg L⁻¹ de BAP, verificaram incremento no número de brotos superior a 10 por explante até a concentração de 0,7 mg L⁻¹ de BAP. Em *Eupatorium glandulosum* a concentração de 3 mg L⁻¹ de BAP induziram à formação média de 59,66 brotos/explante (HRISTOVA *et al.*, 2013; NITHYA; KAMALAM, 2021).

O número de brotos, junto ao incremento no número de folhas são constantemente relatados na micropropagação. Além das espécies pertencentes à família Asteraceae, existem outras de grande importância comercial, que são micropropagadas, como a banana (*Musa sp.*) (KHAN *et al.*, 2021), cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) (SHIMELIS; BANTTE; FEYISSA, 2014; TESFA; ADMASSU; BANTTE, 2016), kiwi (*Actinidia chinensis*) (SAEIAHAGH *et al.*, 2019), limão (*Citrus lemon*) (NOORI; LATEEF, 2020), plantas ornamentais (ERAWATI *et al.*, 2020), batata inglesa (*Solanum tuberosum*) (KUMLAY; KAYA; YILDIRIM, 2021) e abacaxi (*Ananas comosus*) (ELIAS *et al.*, 2021). Todas se beneficiam do uso do BAP até uma determinada concentração no meio de cultura, o que pode variar de acordo com a espécie.

Apesar de induzir significativamente à formação de brotos e folhas, as concentrações de 0,1 e 0,2 mg L⁻¹ de BAP com possíveis níveis endógenos de auxina do jambu (WERNER

et al., 2010), promoveram, neste trabalho, a formação de calos (Figura 4C e D), sendo que os meios com menores concentrações de BAP apresentaram proliferação de brotos e expansão foliar foi mais expressiva (Figura 4E e F). Tal condição já é esperada na micropropagação, pois o uso de elevadas concentrações de BAP, para a cultura, está associada à composição de meios promotores da calogênese, bem como na manutenção de culturas de calos (MARTINEZ *et al.*, 2021; RAHMAN *et al.*, 2021).

Os resultados obtidos nessa fase do experimento sugerem que o jambu possui elevado nível endógeno de auxinas, mesmo que o uso exógeno de citocinina possa inibir a formação de raízes (ARGUESO; FERREIRA; KIEBER, 2009; WERNER *et al.*, 2010). Neste trabalho, foram observados que em todos os tratamentos houve o desenvolvimento do sistema radicular adventício (Figura 4), e na ausência do regulador o desenvolvimento das raízes foi mais expressivo.

O cultivo em BAP foi capaz de induzir a formação de calos, principalmente, no primeiro par de folhas em contato com o meio de cultura. Skoog e Miller (1957) já haviam observado que as diferentes combinações de citocinina e auxina podem induzir a formação de calos ou à organogênese. Nessa primeira etapa, a exceção do controle, os meios de cultura que continham BAP promoveram a organogênese direta, sem necessidade do cultivo em meio indutor de brotos, dando origem a um grande número de brotos na face adaxial das folhas, quando em contato com o meio de cultura.

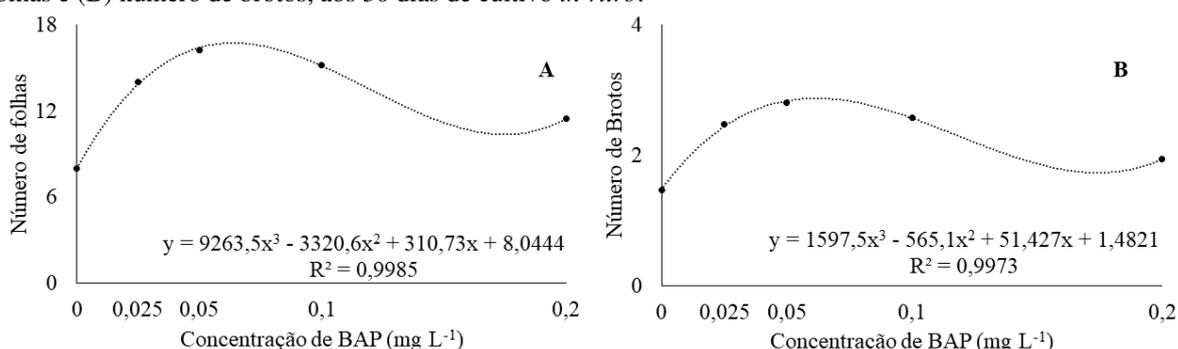
Trabalhos com cultivo *in vitro* apontam que brotos e raízes adventícias podem iniciar seu desenvolvimento a partir do procâmbio ou do câmbio vascular em várias espécies (XU *et al.*, 2014). Estudos histológicos detalhados confirmam que as células do procâmbio são as responsáveis pela regeneração a partir de nova organogênese (LIU *et al.*, 2014). Dessa forma, o procâmbio e o câmbio junto às células do periciclo funcionam como “ponto de partida” inicial para a regeneração da planta (SANG; CHENG; ZHANG, 2018).

De forma geral, as citocininas desempenham duas funções chaves nos meristemas apicais, que é a divisão celular, controlando a transição da fase G1 para S da mitose celular, e atuando em conjunto com outros fatores para estabelecer a organização dos meristemas apicais (MARTINEZ *et al.*, 2021). Assim, nesta primeira etapa do trabalho observou-se que, a depender das concentrações, as citocininas podem promover a proliferação de células indiferenciadas nos meristemas apicais e também a iniciação de brotos na cultura (SKOOG; MILLER, 1957; MARTINEZ *et al.*, 2021).

4.2 Experimento 2: Sementes sintéticas de jambu provenientes de diferentes concentrações de BAP e combinadas com recipientes

A produção de folhas e a multiplicação de brotos respondeu de forma positiva, quando os explantes foram advindos de meio de cultura com BAP, comparado ao tratamento controle. Os melhores resultados foram obtidos com o tratamento contendo 0,05 mg L⁻¹ de BAP, com 2,8 brotos e 16,28 folhas por semente sintética (SS). Para essas duas variáveis os resultados se ajustaram a uma regressão polinomial de terceira ordem (FIGURA 5).

Figura 5. Gráficos de desenvolvimento das sementes sintéticas de jambu (*Acmella oleracea*) (A) número de folhas e (B) número de brotos, aos 30 dias de cultivo *in vitro*.



O desenvolvimento das mudas obtidas a partir das sementes sintéticas foram beneficiadas positivamente pelas alterações endógenas induzidas através da micropropagação em diferentes concentrações de BAP até a concentração de 0,05 mg L⁻¹ de BAP, sofrendo decréscimo conforme o aumento da concentração (Figura 5 e 6). Esse mesmo comportamento foi observado por Hussain, Ahmad e Anis (2018) em *Rauvolfia tetraphylla*, e em *Artemisia chamaemelifolia* por Hristova *et al.* (2013), após a concentração ótima de 0,45 mg L⁻¹ e 0,5 mg L⁻¹ de BAP, respectivamente, o número de brotos sofre decréscimo gradual. Geetha, Gopal e Niranjan (2009) obtiveram conversão de 92% das SS de *Spilanthes acmella*, em quatro semanas, quando o meio de cultura foi suplementado com 1,0 mg L⁻¹ de BAP, porém ao adicionarem o regulador de crescimento à composição das SS, houveram más formações no desenvolvimento das mudas.

A interação dos níveis de citocinina e auxina determinam a resposta observada, podendo ser ela a proliferação de brotos e desenvolvimento foliar, ou promoção à formação de calos (SKOOG; MILLER, 1957; MARTINEZ *et al.*, 2021) (Figura 6).

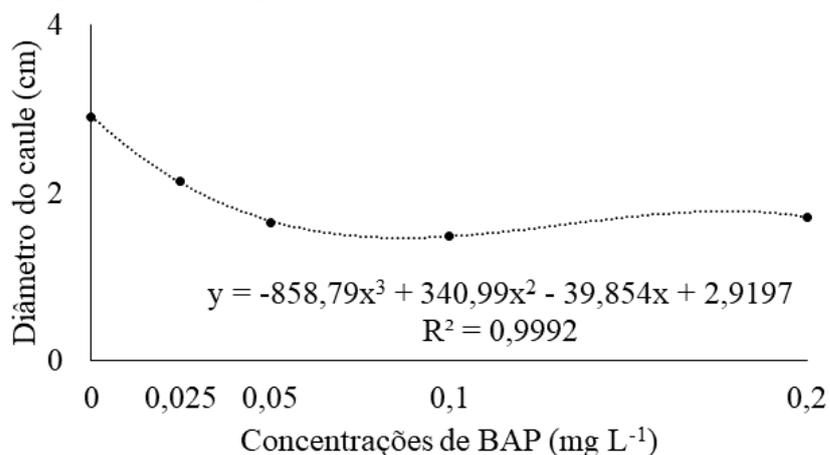
Figura 6. Sementes sintéticas de jambu (*Acmella oleracea*) (0,000, 0,200, 0,100, 0,050 e 0,025 mg L⁻¹ de BAP) (A) aos 30 dias, e semente sintética (B), aos 6 dias, oriundas de explantes *in vitro* em diferentes concentrações de BAP. Barra: 3 cm.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Para o diâmetro do caule das mudas, também foi verificada a formação de uma regressão polinomial de terceira ordem (Figura 7). No entanto, diferente de todos os outros parâmetros relacionados ao desenvolvimento da muda, a maior média para o diâmetro do caule, foi observada para o tratamento controle (2,91 cm). Para Ćosić *et al.* (2022), em pesquisa com a micropropagação de *Hennediella heimmi* observaram que baixas concentrações de BAP no meio e ausência de auxina, inibiram o desenvolvimento do floema secundário reduzindo o diâmetro caulinar da muda *in vitro*.

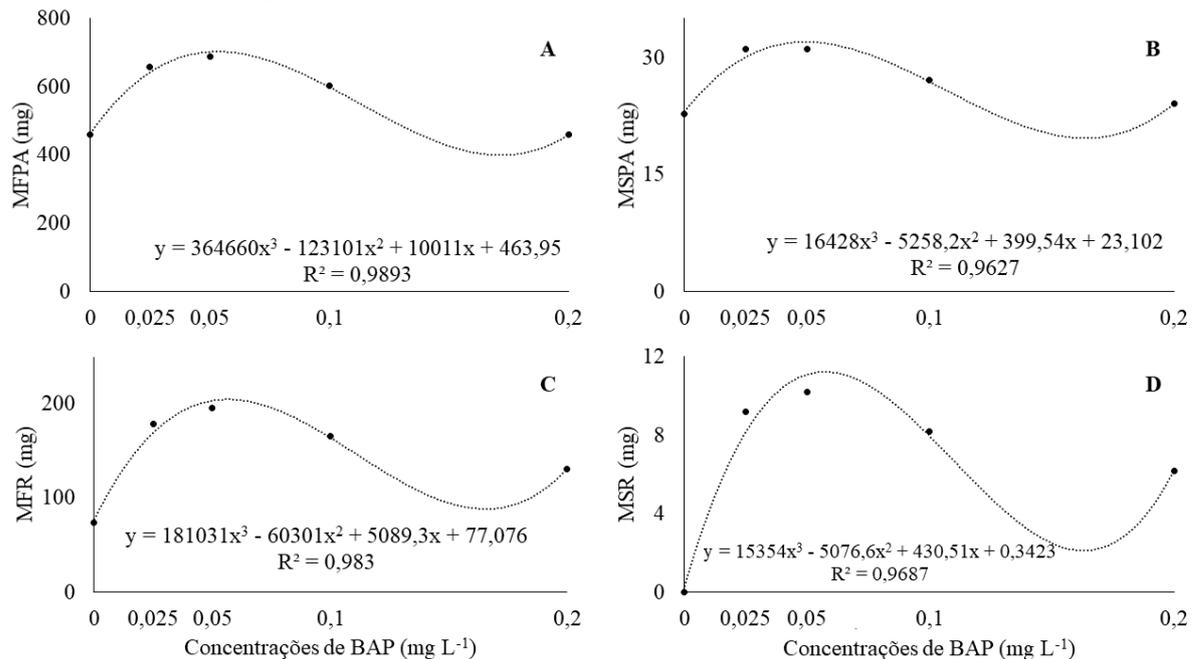
Figura 7. Gráfico de diâmetro do caule em muda de jambu (*Acmella oleracea*), advindas de sementes sintéticas em função da concentração de BAP dos explantes, aos 30 dias de cultivo *in vitro*.



As mudas do tratamento controle, na presença da mesma concentração de nutrientes, pouco investiram na proliferação de brotos, produção de folhas e incremento de biomassa, justificando assim, o maior diâmetro do caule desenvolvido neste tratamento. As alterações nos níveis de citocina sinalizam para as células competentes da planta a mudança nos padrões de relação fonte-dreno, como resposta, também é verificada a quebra de dormência de gemas axilares que ativa a brotação e intensificação na síntese de clorofila resultando no incremento da biomassa (TAIZ; ZEIGER, 2013; FAGAN *et al.*, 2017; COUTINHO NETO, 2022).

Quanto a massa fresca e seca da parte aérea e de raiz, as maiores médias, 688,08 - 31,04 mg e 195,49 - 10,19 mg, respectivamente, foram obtidas na concentração de 0,05 mg L⁻¹ de BAP (FIGURA 8). Lima *et al.* (2020) avaliando o desenvolvimento *in vitro* de jambu também verificaram ganho na biomassa em 0,1 e 0,5 mg L⁻¹ de BAP, comparado ao meio de cultura sem reguladores de crescimento.

Figura 8. Gráfico de desenvolvimento de mudas de jambu (*Acmella oleracea*), advindas de sementes sintéticas em função da concentração de BAP dos explantes, aos 30 dias de cultivo *in vitro*. (A) Massa fresca da parte aérea; (B) massa seca da parte aérea; (C) massa fresca das raízes e, (D) massa seca das raízes.

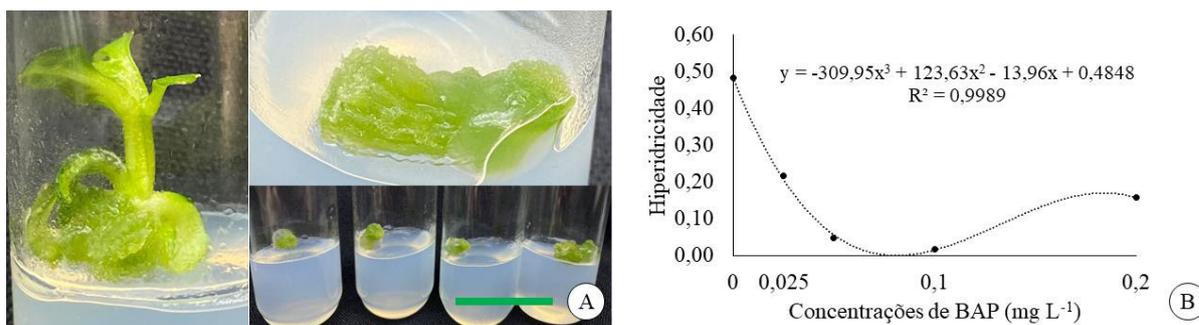


Os níveis de citocinina podem induzir respostas que alteram o fluxo de assimilados pela planta, elevam a atividade meristemática e modulam a absorção de nutrientes (PIMENTEL, 1998; ARGUESO; FERREIRA; KIEBER, 2009; WERNER *et al.*, 2010). Outros trabalhos também verificaram a relação do número de brotos e números de folhas têm com o ganho de biomassa, bem como a existência de um ponto máximo, onde o aumento na

concentração de citocinina reduz os ganhos (CRUVINEL; VASCONCELLOS; MARTELLETO, 2019), como foi observado nesse trabalho.

Em relação à conversão (germinação) da SS, houve destaque para as concentrações de 0,05 e 0,10 mg L⁻¹ de BAP, apresentando conversão em mudas de 95 e 98%, respectivamente, sendo que esses mesmos tratamentos apresentaram 5 e 2%, respectivamente, de sementes sintéticas com sintomas de hiperidricidade (Figura 9A e B).

Figura 9. Sementes sintéticas não convertidas devido à hiperidricidade (A). Gráfico de ocorrência de hiperidricidade em função da concentração de BAP em meio MS na micropropagação (B). Barra = 2 cm.



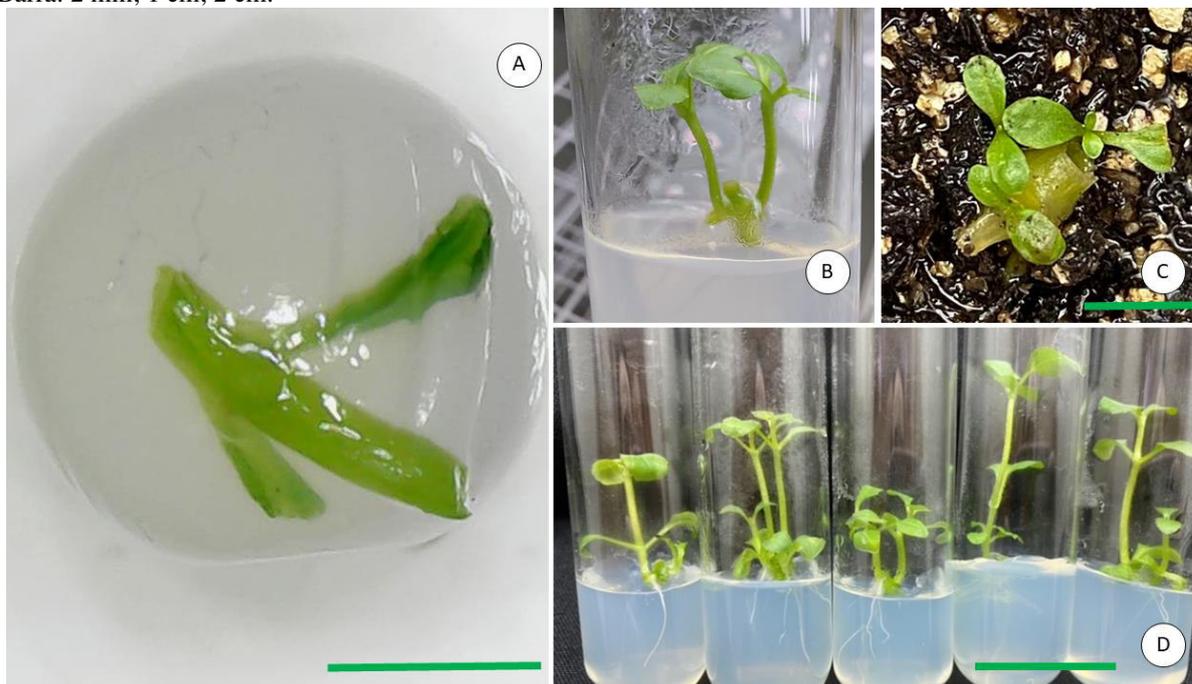
Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

No presente estudo observou-se diferença significativa na capacidade de conversão das sementes sintéticas devido à ocorrência de hiperidricidade (FIGURA 9B). No tratamento controle, 48% das sementes sintéticas não desenvolveram devido a esse distúrbio. Entretanto, quando os explantes encapsulados estavam em meio de cultura contendo BAP a ocorrência da hiperidricidade foi mitigada. Tais resultados sofrem influência de, pelo menos, quatro fatores: a concentração de citocinina, o tipo de citocinina utilizada, os níveis endógenos de hormônio e fatores genéticos relacionados a espécie. Para este trabalho, acredita-se que os fatores relacionados à espécie tiveram maior influência. Apesar de diversos estudos mostrarem que o uso da citocinina pode induzir à hiperidricidade (DECLERCK; KORBAN, 1995; SHIBLI; SMITH; NASR, 1997), faz-se necessário avaliar a concentração e o tipo de molécula utilizada, pois, como já observado por Haddadi *et al.* (2013) e Abdouli *et al.* (2022), a combinação correta pode melhorar as taxas de conversão.

O aspecto mais importante na tecnologia de produção de sementes sintéticas é a conversão do explante encapsulado em plântulas (STANDARDI; PICCIONI, 1998). Comparando os resultados com os protocolos existentes para espécies da família Asteraceae: *Artemisia vulgaris* (SUDARSHANA *et al.*, 2013), *Spilanthes Acmella* (SINGH *et al.*, 2009) e *Stevia rebaudiana* (LATA *et al.*, 2014), a conversão *in vitro* ocorreu de forma satisfatória para

os tratamentos 0,025; 0,050; 0,100 e 0,200 mg L⁻¹ de BAP (78%; 95%; 98% e 84%, respectivamente) (Figura 10), com exceção do controle (52%) onde foram observadas conversões inferiores àquelas vistas na literatura (BEKHEET, 2006, SINGH *et al.*, 2009, SUDARSHANA *et al.*, 2013).

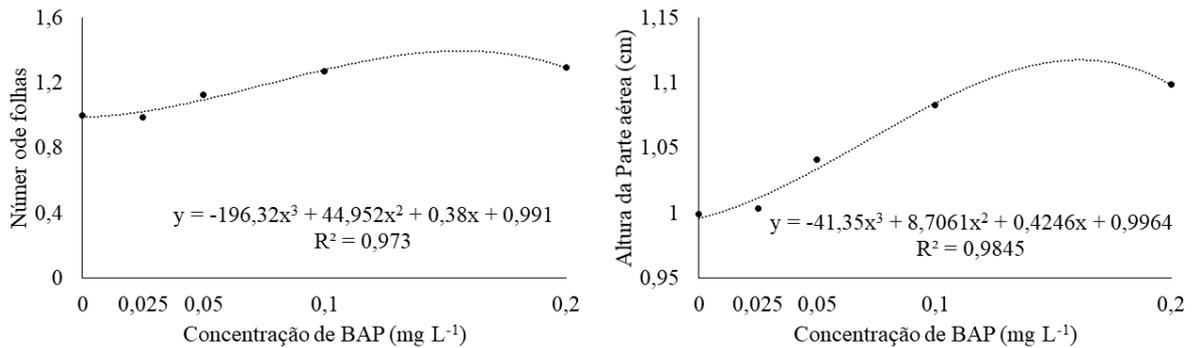
Figura 10. Semente sintética de jambu (*Acmella oleracea*) descomplexada (A). Sementes sintéticas com 10 dias de desenvolvimento *in vitro* e *ex vitro* (B e C). Semente sintética com 15 dias de desenvolvimento *in vitro* (D). Barra: 2 mm; 1 cm; 2 cm.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

As sementes sintéticas em recipientes plásticos preenchidos com substrato não apresentaram boa conversão em plântulas. No total, apenas 26% das SS foram convertidas (Figura 10C). Os melhores resultados obtidos para o número de folhas e altura da parte aérea, em condições *ex vitro*, foram de 1,27 folhas e 1,09 cm por SS, nas concentrações de 0,1 e 0,2 mg L⁻¹ de BAP (Figura 11).

Figura 11. Sementes sintéticas *ex vitro* de jambu (*Acmella oleracea*) em substrato. Número de folhas (A) e altura da parte aérea (B) por muda, aos 30 dias de cultivo *ex vitro*.



Os resultados foram muito influenciados pela ocorrência de contaminações (FIGURA 12), apesar das SS terem sido produzidas na câmara de fluxo e do substrato ter sido autoclavado, a elevada umidade é propícia à contaminação por fungos. Apesar das perdas, foi possível verificar que o meio de cultura MS utilizado para dissolver o alginato de sódio, é suficiente para que as SS sejam convertidas a plântulas (Figura 10C).

Figura 12. Sementes sintéticas de jambu (*Acmella oleracea*) convertidas em substrato apresentando contaminação, aos 30 dias de cultivo *ex vitro*. Barra = 1 cm e 5,5 cm.

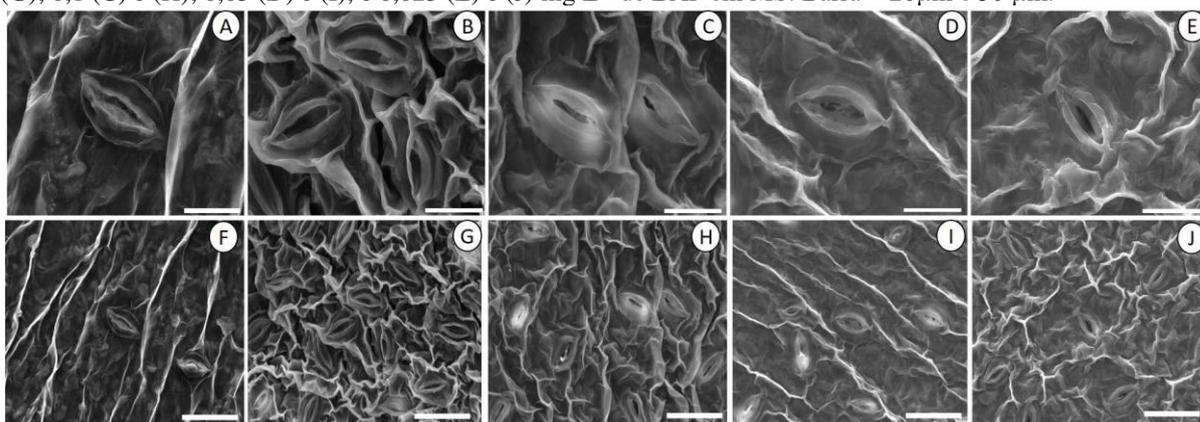


Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Na microscopia eletrônica de varredura (MEV), observamos a maioria dos estômatos abertos e bem definidos (Figura 13A, B, C, D e F). Segundo Garvita e Wawangningrum, (2020), os estômatos das folhas, em algumas mudas cultivadas *in vitro*, também podem ser atípicos e incapazes de fechamento completo sob umidade relativa baixa, como em condições *in vitro*.

Neste trabalho foi observado pouca presença de cera, ou total ausência nas proximidades da epiderme adaxial (Figura 13F, G, H, I e J). Resultado também encontrado por Garvita e Wawangningrum, (2020), trabalhando com *Paraphalaenopsis* spp *in vitro*, verificaram pouca presença de cera epicuticular na epiderme adaxial das folhas. Já para Dias *et al.* (2014), trabalhando com *Anthurium in vitro*, observaram a presença de cera epicuticular na superfície da epiderme adaxial das folhas com maior frequência.

Figura 13. Eletromicrografias de varredura, da epiderme da face adaxial da folha de jambu (*Acmella oleracea*) aos 30 dias, evidenciando os estômatos e epiderme adaxial nos diferentes tratamentos: 0,000 (A) e (F), 0,2 (B) e (G); 0,1 (C) e (H); 0,05 (D) e (I); e 0,025 (E) e (J) mg L⁻¹ de BAP em MS. Barra ≈ 20µm e 50 µm.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

As folhas *in vitro* podem não desenvolver uma cera cuticular (epicuticular) e estômatos funcionais na mesma extensão encontrada em folhas de plantas produzidas em casa de vegetação (LANDO *et al.*, 2016). Segundo Garvita e Wawangningrum, (2020), a produção de folhas em mudas *in vitro* com intensidades de luz baixas é semelhante ao sombreamento, consequentemente, produzindo folhas com pouca cera epicuticular e cuticular.

Na literatura não existem informações sobre células da epiderme e células estomáticas em jambu (*Acmella oleracea*). Desta forma, seguindo a classificação de Glória e Guerreiro, (2012), os estômatos da família Asteraceae podem ser classificados como anisocíticos, onde o estômato é circundado por três células subsidiárias de tamanhos diferentes.

Os estômatos abrem ou fecham de acordo com as condições ambientais, como por exemplo, são fechados no escuro, mas gradualmente abertos à medida que os níveis de luz aumentam (DOMINGUES, 2022). O maior número de estômatos e maior abertura estomática, possibilita que mais CO₂ seja assimilado, portanto, permite um aumento na condutância estomática que possui relação direta com a taxa fotossintética (SAMPAIO *et al.*, 2021).

Devido à escassez de informações anatômicas e ultraestruturais de jambu (*Acmella oleracea*), é de suma importância estudos mais aprofundados nesta área para melhor entendimento da fisiologia e desenvolvimento desta espécie.

5 CONCLUSÃO

A partir dos dados observados, a multiplicação em meio MS com 0,05 mg L⁻¹ de BAP mostrou-se eficiente na obtenção de segmentos nodais, e na conversão e desenvolvimento das sementes sintéticas, de jambu (*Acmella oleracea*).

REFERÊNCIAS

- ABBAS, M. K.; MAHOOD, H. E.; ALHASAN, A. S. Production of Synthetic Seeds in Vegetable Crops: A Review. **IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science**, v. 1060, p. 1-13, 2022.
- ABDALLA, N.; EL-RAMADY, H.; SELIEM, M. K.; EL-MAHROUK, M. E.; TAHA, N.; BAYOUMI, Y.; SHALABY, T. A.; DOBRÁNSZKI, J. An Academic and Technical Overview on Plant Micropropagation Challenges. **Horticulturae**, v. 8, p. 1-68, 2022.
- ABDOULI, D.; PLAČKOVÁ, L.; DOLEŽAL, K.; BETTAIEB, T.; WERBROUCK, S. P. Topolin cytokinins enhanced shoot proliferation, reduced hyperhydricity and altered cytokinin metabolism in *Pistacia vera* L. seedling explants. **Plant Science**, v. 322, p.1-22, 2022.
- ALMEIDA, S. P.; SOUZA, J. M. M.; AMORIM, A. M. T.; GUSMÃO, S. A. L.; SOUZA, R. O. R. M.; SANTOS, A. S. In vitro culture of jambu with different growth regulators. **Horticultura Brasileira**, v. 38, p. 134-138, 2020.
- ARGUESO, C. T.; FERREIRA, F. J.; KIEBER, J. J. Environmental perception avenues: the interaction of cytokinin and environmental response pathways. **Plant, Cell & Environment**, v. 32, p. 1147-1160, 2009.
- BEKHEET, S. A. A synthetic seed method through encapsulation of in vitro proliferated bulblets of garlic (*Allium sativum* L.). **Arab journal of biotechnology**, v. 9, n. 3, p. 415-426, 2006.
- BENELLI, G.; PAVELA, R.; DRENAGGI, E.; MAGGI, F. Insecticidal efficacy of the essential oil of jambú (*Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen) cultivated in central Italy against Filariasis Mosquito Vectors, Houseflies and Moth Pests. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 229, p. 272-279, 2019.
- BIDABADI, S. S.; JAIN, S. M. Cellular, Molecular, and Physiological Aspects of In Vitro Plant Regeneration. **Plants**, v. 9, p. 1-20, 2020.
- BRIDGEN, M.; VAN HOUTVEN, W.; EECKHAUT, T. Plant Tissue Culture Techniques for Breeding. In: HUYLENBROECK, J. V. **Ornamental Crops: Handbook of Plant Breeding**. Switzerland: Springer International Publishing, 2018. p. 127-144.
- CARDOSO, M. O.; GARCIA, L. C. Jambu (*Spilanthes oleracea* L.). In: CARDOSO, M. O. (Org.). **Hortalças não-convencionais da Amazônia**. Brasília: EMBRAPA-SPI; Manaus: EMBRAPA-CPAA, 1997. p. 133-140.
- CARTES, P. R.; CASTELLANOS, H. B.; RÍOS, D. L.; SÁEZ, K. C.; SPIERCCOLLI, S. H. Encapsulated somatic embryos and zygotic embryos for obtaining artificial seeds of rauli-beech [*Nothofagus alpina* (Poepp. & Endl.) Oerst.]. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 69, p. 112-118, 2009.

- CHEE, R. P.; CANTLIFFE, D. J. Improved procedures for production of sweet potato somatic embryos for a synthetic seed system. **Horticultural Science**, v. 27, p. 1314-1316, 1992.
- CHUNG, K. F.; KONO, Y.; WANG, C. M.; PENG, C. I. Notes on *Acmella* (Asteraceae: Heliantheae) in Taiwan. **Botanical Studies**, v. 49, p. 73-82, 2008.
- COLOMBO, L. A.; ASSIS, A. M.; DE FARIA, R. T.; ROBERTO, S. R. Establishing a protocol for in vitro multiplication of Philippine wax flower (*Etlingera elatior*) Jack RM Sm/ Estabelecimento de protocolo para multiplicação in vitro de Bastão-do-imperador (*Etlingera elatior*) Jack RM Sm. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 32, n. 4, p. 695-701, 2010.
- ĆOSIĆ, M. V.; SABOVLJEVIĆ, M. S.; PAPP, B.; GIBA, Z. S.; ŠINŽAR-SEKULIĆ, J. B.; SABOVLJEVIĆ, A. D.; VUJIČIĆ, M. M. Micropropagation of rare bryo-halophyte *Hennediella heimii*. **Botanica Serbica**, v. 46, n. 2, 187-195, 2022.
- COUTINHO NETO, A. A. As citocininas no desenvolvimento vegetal: Correlação com o nitrogênio. In: CHAN, A. K.; RAYMUNDO, C. E. V.; BETETE, B. B.; LOPES, A. S.; SILVEIRA, E. R.; MATOS, T. M.; RIBEIRO, R. S.; FURLAN, C. M. **Botânica no inverno**. São Paulo: Instituto de Biociências/ USP, 2022. p. 64-74.
- CRUVINEL, F. F.; VASCONCELLOS, M. A. S.; MARTELLETO, L. A. P. Efeitos da citocinina benzilaminopurina na estaquia da pitaia. **Nativa**, v. 7, n. 1, p. 43-49, 2019.
- CRUZ, P. B.; BARBOSA, A. F.; ZERINGÓTA, V.; MELO, D.; NOVATO, T.; FIDELIS, Q. C.; FABRI, R. L.; CARVALHO, M. G.; SABAA-SRUR, A. U. O; DAEMON, E.; et al. Acaricidal Activity of Methanol Extract of *Acmella oleracea* L. (Asteraceae) and *Spilanthol* on *Rhipicephalus Microplus* (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor Nitens* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 228, p. 137-143, 2016.
- DIAS, G. M. G.; SOARES, J. D. R.; PASQUAL, M.; SILVA, R. A. L.; RODRIGUES, L. C. A.; PEREIRA, F. J.; CASTRO, E. M. Photosynthesis and leaf anatomy of 'Anthurium' cv. Rubi plantlets cultured 'in vitro' under different silicon (Si) concentrations. **Australian Journal of Crop Science**, v. 8, p. 1160-1167, 2014.
- DECLERCK, V.; S. KORBAN. Shoot regeneration from leaf tissues of *Phlox paniculata* L. **Journal of Plant Physiology**, v. 147, p. 441-446, 1995.
- DEGRANDE, A.; TADJO, P.; TAKOUTSING, B.; ASAAH, E.; TSOBENG, A.; ZAC TCHOUNDJEU, Z. Getting Trees In to Farmers' Fields: Success of Rural Nurseries in Distributing High Quality Planting Material in Cameroon. **Small-Scale Gold Mining**, v. 12, p. 403-420, 2013.
- DEVI, B. C.; KALAIPRIYA, A. Micropropagation of *Acmella calva* (DC.) RK Jansen (Asteraceae) from in vitro nodal explants. **Advances in Applied Research**, v. 10, n. 1, p. 23-28, 2018.
- DHIMAN, K. M.; SHARMA, L.; SINGH, A.; SHARMA, M. M. Ex situ Conservation Using In vitro Methods of an Endangered Plant *Sterculia urens* Roxb: A High Volume Trade Plant for Gum. **Industrial Crops and Products**, v. 158, p. 1-12, 2020.

DIAS, G. M. G.; SOARES, J. D. R.; CASTRO, A. C. R.; PASQUAL, M.; ASCARI, I. J.; COSTA, A. C. Grouping of anthurium genotypes based on genetic and morpho-anatomical features. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 17, n. 4, p. 341-349, 2017.

DIAS, J. P. T. Plant growth regulators in horticulture: practices and perspectives. **Biotecnología Vegetal**, v. 19, p. 3-14, 2019.

DOMINGUES, T. F. Stomata secretive ways: A commentary on Lamour et al. (2022). **Global Change Biology**, v. 28, p. 3484–3485, 2022.

DUBEY, S.; MAITY, S.; SINGH, M.; SARAF, S. A.; SAHA, S. Phytochemistry, Pharmacology and Toxicology of *Spilanthes acmella*: A Review. **Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences**, v. 2013, p. 1-9, 2013.

ELIAS, H.; TAHA, R. M.; SANI, H.; KHAMARUL HUDA1, N. F.; AHMED, B. A.; ABDULLAH, S.; ZAKERI, S. A. In vitro propagation of *Ananas comosus* L. Merr. (Morris). **Acta Horticulturae**, v. 1320, p. 319-326, 2021.

ERAWATI, D. N.; WARDATI, I.; HUMAIDA, S.; FISDIANA, U. Micropropagation of Vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews) with Modification of Cytokinins. **Second International Conference on Food and Agriculture**, v. 411, p. 1-6, 2020.

FAGAN, E. B.; ONO, E. O.; RODRIGUES, J. D.; CHALFUN JUNIOR, A.; DOURADO NETO, D. *Fisiologia Vegetal: reguladores vegetais*. São Paulo: Andrei, 2015. 300p. FAO, Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura; OPAS, Organização Pan-americana de Saúde. **Panorama da segurança alimentar e nutricional, sistemas alimentares sustentáveis para acabar com a fome e a má nutrição**. Santiago: FAO; OPAS, 2017. 48p.

FERREIRA, D. F. *Sisvar: A Guide for Its Bootstrap Procedures in Multiple Comparisons*. **Ciência e Agrotecnologia**, v.38, n. 2, p.109-112, 2014.

FORTINI, E. A.; BATISTA, D. S.; MAMEDES-RODRIGUES, T.C.; FELIPE, S. H. S.; CORREIA, L. N. F.; CHAGAS, K.; SILVA, P. O.; ROCHA, D. I.; OTONI, W. C. Gas exchange rates and sucrose concentrations affect plant growth and production of flavonoids in *Vernonia condensata* grown in vitro. **Plant Cell Tissue Organ Cult**, v. 144, p. 593–605, 2021.

GARVITA, R. V.; WAWANGNINGRUM, H. Stomata cells studies of *Paraphalaenopsis* spp. from in vitro and greenhouse condition. **Biodiversitas**, v. 21, n. 3, p. 1116-1121, 2020.

GEETHA, R.; GOPAL, G. V.; NIRANJAN, M. H. In vitro response of encapsulated shoot tips of *Spilanthes acmella*. **International journal of basic and applied biology**, v. 3, p. 82-86, 2009.

GLÓRIA, B. A.; GUERREIRO, S. M. C. **Anatomia vegetal**. 3. ed. Viçosa: UFV, 2012. 404p.

GRAY, D. J.; PUROHIT, A. Critical Review. **Plant Science**, v. 10, p. 33-61, 1991.

GREGORIO, N.; HERBOHN, J.; HARRISON, S. Small-scale Forestry Development in Leyte, Philippines: The Central Role of Nurseries. **Small-Scale Gold Mining**, v. 3, p. 337-351, 2004.

GUERRA, M.P.; DAL VESCO, L.L.; DUCROQUET, J.P.H.J.; NODARI, R.O.; REIS, M.S. dos. Somatic embryogenesis in goiabeira serran: genotype response, auxinic shock and synthetic seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13, n. 2, p. 117-128, 2001.

HADDADI, F.; AZIZ, M. A.; KAMALADINI, H.; RAVANFAR, S. A. Thidiazuron- and Zeatin-induced High-frequency Shoot Regeneration from Leaf and Shoot-tip Explants of Strawberry. **HortTechnology**, v. 23, n. 3, p. 276-281, 2013.

HIND, N.; BIGGS, N. Plate 460: *Acmella oleracea* Compositae. **Curtis's Botanical Magazine**, v. 20, n. 1, p. 31-39, 2003.

HOMMA, A. K. O.; SANCHES, R. S.; MENEZES, A. J. E. A.; GUSMÃO, S. A. L. Etnocultivo do jambu para abastecimento da cidade de Belém, estado do Pará. In: HOMMA, A. K. O. (Org.). **Extrativismo Vegetal na Amazônia: História, Ecologia, Economia e Domesticação**. 1 ed. Brasília: Embrapa, 2014. p. 331-343.

HRISTOVA, L.; DAMYANOVA, E.; DOICHINOVA, Z.; KAPCHINA-TOTEVA, V. Effect of 6-benzylaminopurine on micropropagation of *Artemisia chamaemelifolia* Vill. (Asteraceae). **Bulgarian Journal of Agricultural Science**, v. 19, n. 2, p. 57-60, 2013.

HUSSAIN, A.; QARSHI, L. A.; NAZIR, H.; ULLAH, I. Plant Tissue Culture: Current Status and Opportunities. In: LEVA, A.; RINALDI, L. M. R. **Recent Advances in Plant in vitro Culture**. Croácia: IntechOpen, 2012. 222p.

HUSSAIN, S. A.; AHMAD, N.; ANIS, M. Synergetic effect of TDZ and BA on minimizing the post-exposure effects on axillary shoot proliferation and assessment of genetic fidelity in *Rauvolfia tetraphylla* (L.). **Rendiconti Lincei. Scienze Fisiche e Naturali**, v. 29, p. 109-115, 2018.

JOSEPH, B.; GEORGE, J.; MV, J. The role of *Acmella oleracea* in medicine-a review. **World Journal of Pharmaceutical Research**, v. 2, p. 2781-2788, 2013.

KHAN, A.; BASHIR, A.; ERUM, S.; KHATAK, J. Z. K.; MUHAMMAD, A. Effects of 6-Benzylaminopurine and Indole-3-acetic acid on growth and root development of banana explants in micropropagation. **Sarhad Journal of Agriculture**, v. 37, p. 9-13, 2021.

KINUPP, V. F.; LORENZI, H. **Plantas alimentícias não convencionais (PANC) no Brasil**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2014. 768p.

KITTO, S. K.; JANICK, J. Polyox as an artificial seed coat for asexual embryos. **Horticultural Science**, v. 17, p. 488-490, 1982.

KITTO, S. L.; JANICK, J. Hardening treatments increase survival of synthetically-coated asexual embryos of carrot. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.110, p. 283-286, 1985b.

KITTO, S. L.; JANICK, J. Production of synthetic seeds by encapsulating asexual plant embryos of carrot. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 110, p. 277-282, 1985a.

KULUS, D. Application of Synthetic Seeds in Propagation, Storage, and Preservation of Asteraceae Plant Species. In: FAISAL, M.; ALATAR, A. (eds) **Synthetic Seeds**. Berlin: Springer Science and Business Media LLC, 2019. p. 321-331.

KUMLAY, A. M.; CANAN, K. A. Y. A.; YILDIRIM, B. Different Plant Growth Regulators on Improvement of Potato (*Solanum tuberosum* L.). **Journal of the Institute of Science and Technology**, v. 11, n. 2, p. 1603-1615, 2021.

KUNDU, S.; SALMA, U.; ALI, N.; MANDAL, N. Conservation, ex vitro direct regeneration, and genetic uniformity assessment of alginate-encapsulated nodal cuttings of *Sphagneticola calendulacea* (L.) Pruski. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 40, n. 53, p. 1-10, 2018.

KYZIOL, A.; ŁUKASIEWICZ, S.; SEBASTIAN, V.; KUSTROWSKI, P.; KOZIEŁ, M.; MAJDA, D.; CIERNIAK, A. Towards plant-mediated chemistry – Au nanoparticles obtained using aqueous extract of *Rosa damascena* and their biological activity in vitro. **Journal of Inorganic Biochemistr**, v. 214, p. 1-14, 2021.

LAMARCK, J. B. P. A. M. **Encyclopédie Méthodique, Botanique**. Paris: Chez Panckoucke, 1785. 563p.

LANDO, A. P.; WOLFART, M. R.; FERMINO JÚNIOR, P. C. P.; SANTOS, M. *Cattleya xanthina* leaves cultivated in vitro and acclimatized ex vitro. **Biologia Plantarum**, v. 60, n. 2, p. 219-225, 2016.

LATA, H., CHANDRA, S., WANG, Y. H., ELSOHLY, M. A., KHAN, I. A. Ecophysiological, biochemical and metabolic characterization of *Stevia rebaudiana* Bert. plantlets grown from synthetic seeds following in vitro storage. **Planta Medica**, v. 80, n. 10, p. 132, 2014.

LIMA, N. K.; SILVA, E. S.; CRUZ, R. M. S.; MONTEIRO, P. H. R.; SILVA, G. J. Plant growth regulators in the in vitro cultivation of *Acmella oleracea* (L.). **Journal of Agricultural Studies**, v. 8, n. 2, p. 774-784, 2020.

LIU, J.; SHENG, L.; XU, Y.; LI, J.; YANG, Z.; HUANG, H.; XU, L. WOX11 and 12 are involved in the first-step cell fate transition during de novo root organogenesis in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v. 26, p. 1081-1093, 2014.

MABBERLEY, D. **Mabberley's Plant-book: A Portable Dictionary of Plants, their Classification and Uses**. 4th ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2017. 1120p.

MARSHALL, M.; SUTHERLAND, R.; HULME, P. E. Assessing the role of plant trade networks in the vulnerability of forest nurseries to plant pathogens. Australas. **Journal of Plant Pathology**, v. 50, p. 671–681, 2021.

MARTINEZ, M. E.; JORQUERA, L.; POIRRIER, P.; DÍAZ, K.; CHAMY, R. Effect of the Carbon Source and Plant Growth Regulators (PGRs) in the Induction and Maintenance of an

In Vitro Callus Culture of *Taraxacum officinale* (L) Weber Ex F.H. Wigg. **Agronomy**, v. 11, p. 3-17, 2021.

MARUYAMA, E.; KINOSHITA, I.; ISHII, K.; OHBA, K.; SAITO, A. Germplasm conservation of the tropical forest trees, *Cedrela odorata* L., *Guazuma crinita* Mart., and *Jacaranda mimosaeifolia* D. Don., by shoot tip encapsulation in calcium-alginate and storage at 12-25 °C. **Plant Cell Reports**, v. 16, n. 1, p. 393-396, 1997.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NAING, A. H.; ADEDEJI, O. S.; KIM, C. K. Protoplast technology in ornamental plants: Current progress and potential applications on genetic improvement. **Scientia Horticulturae**, v. 283, p. 1-18, 2021.

NASCIMENTO, L. E. S.; ARRIOLA, N. D. A.; SILVA, L. A. L.; FAQUETI, L. G.; SANDJO, L. P.; ARAÚJO, C. E. S.; BIAVATTI, M. W.; BARCELOS-OLIVEIRA, J. L.; AMBONI, R. C. M. B. Phytochemical profile of different anatomical parts of jambu (*Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen): A comparison between hydroponic and conventional cultivation using PCA and cluster analysis. **Food Chemistry**, v. 332, p. 1-12, 2020.

NEUMANN, K. H.; KUMAR, A.; IMANI, J. **Plant Cell and Tissue Culture-A Tool in Biotechnology Basics and Application**. 2 ed. Switzerland: Springer Nature, 2020. p. 1-11.

NEVES, D. A.; SCHMIELE, M.; PALLONE, J. A. L.; ORLANDO, E. A.; RISSO, E. M.; CUNHA, E. C. E.; GODOY, H. T. Chemical and Nutritional Characterization of Raw and Hydrothermal Processed Jambu (*Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen). **Food research international**, v. 116, p. 1144-1152, 2019.

NITHYA, V.; KAMALAM, M. Standardization of a protocol for micropropagation of *Eupatorium glandulosum* L. an important medicinal plant. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 146, n. 2, p. 339-344, 2021.

NONGDAM, P. Development of synthetic seed technology in plants and its applications: A Review. **International Journal of Current Science**, v. 19, n. 4, p. 86-101, 2016.

NOORI, A. M.; LATEEF, M. A. A. In vitro multiplication of *Citrus lemon* L. with different 6-Benzylaminopurine (BA) concentrations. **Plant Archives**, v. 20, n. 2, p. 6966-6968, 2020.

OCEANIA, C.; DONI, T.; TIKENDRA, L.; NOGDAM, P. Establishment of efficient in vitro culture and plantlet generation of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) and development of synthetic seeds. **Journal of Plant Sciences**, v. 10, p. 15-24, 2015.

PARK, S. **Plant Tissue Culture Techniques and Experiments**. 5th ed. Cambridge: Academic Press, 2021. 23p.

PAULRAJ, J.; GOVINDARAJAN, R.; PALPU, P. The genus *Spilanthes* ethnopharmacology, phytochemistry, and pharmacological properties: A review. **Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences**, v. 2013, p. 1-22, 2013.

- PE, P. P. W.; NAING, A. H.; SOE, M. T.; KANG, H.; PARK, K. I.; KIM, C. K. Establishment of meristem culture for virus-free and genetically stable production of the endangered plant *Hosta capitata*. **Scientia Horticulturae**, v. 272, p. 1-7, 2020.
- PIMENTEL, C. **Metabolismo do Carbono na Agricultura Tropical**. Seropédica: Edur, 1998. 150p.
- RAHMAN, Z. A.; SEMAN, Z. A.; OTHMAN, A. N.; GHAFFAR, M. B. A.; RAZAK, S. A.; YUSOF, M. F. M.; NASIR, K. H.; AHMAD, K.; CHOW, Y. L.; SUBRAMANIAM, S. Efficient callus induction and plant regeneration of Malaysian indica rice MR219 using anther culture. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 31, p. 1-7, 2021.
- RANI, A.; DONOVAN, N.; MANTRIA, N. Review: The future of plant pathogen diagnostics in a nursery production system. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 145, p. 1-12, 2019.
- RAY, A.; BHATTACHARYA, S. Storage and conversion of *Eclipta alba* synseeds and RAPD analysis of the converted plantlets. **Biologia Plantarum**, v. 54, n. 3, p. 547–550, 2010.
- REDDY, M. C.; MURTHY, K. S. R.; PULLAIAH, T. Synthetic seeds: A review in agriculture and forestry. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 78, p. 14254-14275, 2012.
- REDENBAUGH, K. Introduction. In: REDENBAUGH, K. **Synthetic Seeds: Application of Synthetic Seeds to Crop Improvement**. Boca Raton: CRC Press, 1993. p. 3-10.
- RONDANELLI, M.; FOSSARI, F.; VECCHIO, V.; BRASCHI, V.; RIVA, A.; ALLEGRINI, P.; PETRANGOLINI, G.; IANNELLO, G.; FALIVA, M. A.; PERONI, G.; et al. *Acmella oleracea* for pain management. **Fitoterapia**, v. 140, p. 87-113, 2020.
- SAEIAHAGH, H.; MOUSAVI, M.; WIEDOW, C.; BASSETT, H. B.; PATHIRANA, R. Effect of cytokinins and sucrose concentration on the efficiency of micropropagation of ‘Zes006’ *Actinidia chinensis* var. *chinensis*, a red-fleshed kiwifruit cultivar. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 138, p. 1-10, 2019.
- SAHOO, S. L.; ROUT, J. R.; SATYAJIT, K. S. Synthetic Seed. In: SHARMA, H. P.; DOGRA, J. V. V.; MISRA, A. N. **Plant Tissue Culture: Toptipotency to Transgenic**. India: Agrobios, 2012. 14p.
- SAIPRASAD, G. V. S. Artificial Seeds and their applications. **Resonance**, v. 6, p. 39-47, 2001.
- SAMPAIO, I. M. G.; SILVA JÚNIOR, M. L.; BITTENCOURT, R. F. P. M.; SANTOS, G. A. M.; NUNES, F. K. M.; COSTA, V. C. N. Productive and physiological responses of jambu (*Acmella oleracea*) under nutrient concentrations in nutrient solution. **Horticultura Brasileira**, v. 39, p. 65-71. 2021.
- SANG, Y. L.; CHENG, Z. J.; ZHANG, X. S. Plant stem cells and de novo organogenesis. **New phytologist**, v. 218, p. 1334-1339, 2018.

SARMENTO, E. C. S.; PEREIRA, K. T. O.; OLIVEIRA, F. S. O.; LEAL, C. C. P.; TORRES, S. B.; DUTRA, A. S. Morphology and germination of *Acmella oleracea* L. R. Jansen under different temperatures and photoperiods. **Revista Ciência Agronômica**, v. 50, p. 660-668, 2019.

SCHALLER, G. E.; STREET, I. H.; KIEBER, J. J. Cytokinin and the cell cycle. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 21, p. 7-15, 2014.

SEAL, T.; CHAUDHURI, K.; PILLAI, B. Traditionally Used by the Local People of Meghalaya State in India. **Asian Journal of Plant Sciences**, v. 12, n. 4, p. 171-175, 2013.

SHARMA, S.; SHAHZAD, A. Synseed production in *Spilanthes mauritiana* DC. for short-term storage and germplasm exchange. **British Biotechnology Journal**, v. 4, n. 6, p. 696-707, 2014.

SHIBLI, R. A.; SMITH, M. A. L.; NASR, R. Iron source and cytokinin mitigate the incidence of chlorosis and hyperhydratation in vitro. **Journal of Plant Nutrition**, v. 20, p. 773-781, 1997.

SHIMELIS, D.; BANTTE, K.; FEYISSA, T. Interaction effects of 6-benzylaminopurine and kinetin on in vitro shoot multiplication of two sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) genotypes. **Advances in Crop Science and Technology**, v. 2, p. 4, p. 1-5, 2014.

SINGH, P. R.; SINGH, L. J. In vitro propagation for improvement of medicinal plants: A review. **Journal of pharmacognosy phytochemistry**, v. 10, p. 1484-1489, 2021.

SINGH, S. K.; RAI, M. K.; ASTHANA, P.; PANDEY, S.; JAISWAL, V. S.; JAISWAL, U. Plant regeneration from alginate-encapsulated shoot tips of *Spilanthes acmella* (L.) Murr., a medicinally important and herbal pesticidal plant species. **Acta physiologiae plantarum**, v. 31, n. 3, p. 649-653, 2009.

SKOOG, F.; MILLER, C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. **Symposia of the Society for Experimental Biology**, v. 11, p. 118-130, 1957.

SPINOZZI, E.; PAVELA, R.; BONACUCINA, G.; PERINELLI, D.R.; CESPI, M.; PETRELLI, R.; CAPPELLACCI, L.; FIORINI, D.; SCORTICHINI, S.; GARZOLI, S.; et al. Spilanthol-rich essential oil obtained by microwave-assisted extraction from *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen and its nanoemulsion: Insecticidal, cytotoxic and anti-inflammatory activities. **Industrial Crops and Products**, v. 172, p. 1-17, 2021.

STANDARDI, A.; PICCIONI, E. Recent perspectives on synthetic seed technology using non embryogenic in vitro derived explants. **International Journal Plant Sciences**, v. 159, n. 6, p. 968-978, 1998.

STANILOVA, M.; TRAYKOVA, B.; VLADIMIROV, V.; PETROVA, M.; SEMERDJIEVA, I.; YANKOVA-TSVETKOVA, E. In vitro Micropropagation of *Helichrysum arenarium* (Asteraceae) as a Tool for Introducing the Species in Agriculture. **Proceedings of the Bulgarian Academy of Sciences**, v. 75, n. 10, p. 1454-1461, 2022.

SUDARSHANA, M. S.; RAJASHEKAR, N.; NIRANJAN, M. H.; BORZABAD, R. K. In vitro regeneration of multiple shoots from encapsulated somatic embryos of *Artemisia vulgaris* L. **Journal of Pharmaceutical and Biological Sciences**, v. 6, n. 6, p. 11-15, 2013.

TAIZ, L., ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918p.

TESFA, M.; ADMASSU, B.; BANTTE, K.; CENTER, P. O.; WONJI, E. In vitro shoot multiplication of elite sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) genotypes using liquid shake culture system. **In Vitro**, v. 6, p. 35-40, 2016.

UTHPALA, T. G. G.; NAVARATNE, S. B. *Acmella oleracea* Plant; Identification, Applications and Use as an Emerging Food Source – Review. **Food Reviews International**, v. 37, n. 4, p. 399-414, 2020.

VASQUEZ, N. C. **Acmella Oleracea**: the toothache plant. the toothache plant. 2017. Disponível em: <<http://mecklenburghsquaregarden.org.uk/acmella-oleracea-the-toothache-plant/>>. Acesso em: 24 nov. 2022.

VIANA, C. M.; FREIRE, D.; ABRANTES, P.; ROCHA, J.; PEREIRA, P. Agricultural land systems importance for supporting food security and sustainable development goals: A systematic review. **Science of The Total Environment**, v. 806, p. 1-13, 2022.

WANG, J.; LI, J.; LI, J.; LI, J.; LIU, S.; HUANG, L.; GAO, W. Production of active compounds in medicinal plants: from plant tissue culture to biosynthesis. **Chinese Herbal Medicines**, v. 9, p. 115-125, 2017.

WERNER, T.; NEHNEVAJOVA, E.; KÖLLMER, I.; NOVÁK, O.; STRNAD, M.; KRÄMER, U.; SCHMÜLLING, T. Root-Specific Reduction of Cytokinin Causes Enhanced Root Growth, Drought Tolerance, and Leaf Mineral Enrichment in *Arabidopsis* and Tobacco. **The Plant Cell**, v. 22, p. 3905-3920, 2010.

WU, L.; SHANG, G.; WANG, F.; GAO, J.; WAN, M.; XU, Z.; WANG, J. Dynamic chromatin state profiling reveals regulatory roles of auxin and cytokinin in shoot regeneration. **Developmental Cell**, v. 57, n. 4, p. 526-542, 2022.

XU, L.; HUANG, H. Genetic and epigenetic controls of plant regeneration. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 108, p. 1-33, 2014.

YAMANE, L. T.; PAULA, E.; JORGE, M. P.; FREITAS-BLANCO, V. S.; JUNIOR, Í. M.; FIGUEIRA, G. M.; ANHOLETO, L. A.; OLIVEIRA, P. R.; RODRIGUES, R. A. F. *Acmella oleracea* and *Achyrocline satureioides* as Sources of Natural Products in Topical Wound Care. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, p. 1-9, 2016.