



KAIO HENRIQUE DOS SANTOS

**USO DE DIFERENTES EXPLANTES DE *Urtica dioica* L.
NO ESTABELECIMENTO E PROPAGAÇÃO IN VITRO**

**LAVRAS – MG
2021**

KAIO HENRIQUE DOS SANTOS

**USO DE DIFERENTES EXPLANTES DE *Urtica dioica* L. NO
ESTABELECIMENTO E PROPAGAÇÃO IN VITRO**

Monografia apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Agronomia, para a obtenção do título de Bacharel.

Prof. Dr. José Eduardo Brasil Pereira Pinto
Orientador
Pesq. Dr. Gustavo Costa dos Santos
Coorientador

**LAVRAS – MG
2021**

KAIO HENRIQUE DOS SANTOS

**USO DE DIFERENTES EXPLANTES DE *Urtica dioica* L. NO
ESTABELECIMENTO E PROPAGAÇÃO IN VITRO**

**USE OF DIFFERENT EXPLANTS OF *Urtica dioica* L. IN THE
ESTABLISHMENT AND IN VITRO PROPAGATION**

Monografia apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Agronomia, para a obtenção do título de Bacharel.

APROVADA em 18 de novembro de 2021.

Dr. José Eduardo Brasil Pereira Pinto UFLA

Dr. Gustavo Costa dos Santos UFLA

Dr. Alexandre Alves de Carvalho UFLA

Prof. Dr. José Eduardo Brasil Pereira Pinto

Orientador

Pesq. Dr. Gustavo Costa dos Santos

Coorientador

**LAVRAS – MG
2021**

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Alessandro e Mirian, pelo apoio concedido durante os anos de graduação e por sempre priorizarem a minha educação.

A Universidade Federal de Lavras, que me mostrou que através do conhecimento científico podemos mudar a nossa realidade e a da nossa sociedade. A todos os professores e técnicos dessa instituição que contribuíram para minha formação.

Ao Departamento de Agricultura (DAG), ao Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas Medicinais, pela estrutura e oportunidade de desenvolver esse trabalho. Ao Prof. José Eduardo pelo acolhimento e disponibilidade.

Ao Dr. Gustavo Costa pelos ensinamentos, amizade, disponibilidade e paciência. Através da sua coorientação tenho despertado cada vez mais interesse pela cultura de tecidos e em fazer ciência. A Ma. Adriane Duarte, pela disponibilidade e ensinamentos. Sua dedicação e trabalho são inspiração para mim.

A minha irmã Karen, aos meus amigos. Muito obrigado!

RESUMO

A *Urtica dioica* L. (Urticaceae), popularmente conhecida como urtiga, é uma espécie vegetal utilizada na medicina popular para o tratamento de artrite, reumatismo e paralisia muscular. A planta medicinal cultivada no campo está sujeita a variações ambientais e agronômicas, associadas à variação na concentração de metabolitos secundários nos tecidos vegetais. Esses fatores podem ser ajustados na propagação de plântulas onde é possível controlar o ambiente, como na cultura de tecidos. A contaminação é um dos maiores problemas da propagação *in vitro*, quando presente, pode matar, enfraquecer ou alterar significativamente as plântulas. Objetivou-se avaliar a sobrevivência e crescimento *in vitro* de diferentes explantes de urtiga na fase de estabelecimento e repicagem. O delineamento inteiramente causalizado (DIC) foi utilizado nos dois experimentos realizados. No primeiro, os explantes foram coletados de planta matriz estabelecida em casa de vegetação, sendo 5 tratamentos com 4 repetições e 7 tubos por repetição, os tratamentos eram representados por cinco posições diferentes do segmento caulinar, partindo-se do ápice para a base. No segundo, os explantes foram coletados de plântulas estabelecidas *in vitro*, sendo 3 tratamentos com 4 repetições, sendo 5 tubos por repetição, os tratamentos eram representados por três posições diferentes do segmento caulinar, partindo-se do ápice para a base. O meio de cultura MS foi utilizado no estabelecimento e na propagação. Os explantes provenientes de segmento apicais de *U. dioica* possuem menor contaminação e maior taxa de sobrevivência que segmentos nodais. Na propagação *in vitro*, o segmento apical obteve maior crescimento e acúmulo de biomassa que os segmentos nodais.

Palavras-chave: Urtiga, planta medicinal, contaminação, desinfestação e cultura de tecidos.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	6
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	8
2.1	Características botânicas e agronômicas de <i>Urtica dioica</i> L.....	8
2.2	Usos da <i>Urtica dioica</i> L.....	9
2.2.1	Uso medicinal da <i>Urtica dioica</i> L.	10
2.3	Cultura de tecidos de plantas medicinais.....	11
2.4	Contaminações na cultura de tecidos.....	12
2.5	Tipo de explante e contaminação.....	13
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1	Local de pesquisa e material biológico.....	15
3.2	Fase de estabelecimento	15
3.3	Repicagem do segmento apical e nodal das plântulas	16
3.4	Análises estatísticas	18
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
4.1	Sobrevivência e crescimento dos explantes no estabelecimento in vitro	19
4.2	Repicagem do segmento apical e nodal.....	21
5	CONCLUSÃO.....	24
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25

1 INTRODUÇÃO

A espécie *Urtica dioica* L., pertencente à família Urticaceae, possui uma variedade de subespécies conhecidas popularmente como urtiga. Quando tocada provoca dermatite aguda devido a presença de mediadores bioquímicos nos tricomas das folhas e caule. Diferentes partes da urtiga podem ser usadas como alimento, forragem, matéria-prima para cosméticos, indústria, medicina e na agricultura biodinâmica. Apesar de ser conhecida como um vegetal comestível e altamente nutritivo, os estudos têm se concentrado mais no seu valor como fonte de fibra e na medicina alternativa (RUTTO et al., 2013).

O tratamento com urtiga para artrite, reumatismo e paralisia muscular tornou-se um padrão na medicina popular. Experimentos pré-clínicos evidenciam a presença de atividades antiasmáticas, anticaspa, adstringente, depurativa, diurética, galactagogo, hemostática e hipoglicêmica provenientes dos compostos químicos dessa planta (AHMED; PARSURAMAN, 2014). Evidências farmacológicas comprovam a atividade anti-inflamatória e analgésica do extrato de folhas de *U. dioica* L., justificando o seu uso no tratamento de artrite e outras complicações inflamatórias (HAJHASHEMI; KLOOSHANI, 2013).

A planta medicinal cultivada no campo está sujeita a variações ambientais e agronômicas, associadas a concentração dos metabolitos secundários nos tecidos vegetais. Esses fatores podem ser ajustados na propagação de plântulas onde é possível controlar o meio ambiente, como na cultura de tecidos. Essa técnica se baseia no princípio da totipotência celular e depende da regeneração de novas plantas a partir de pequenos explantes (células, tecidos ou órgãos) que são isolados de plantas selecionadas, esterilizados e incubados em tubos de ensaio com meio de cultura definido e sob ambiente controlado.

Um dos maiores problemas da técnica é a contaminação por microrganismos, quando presente, pode matar, enfraquecer ou alterar significativamente os explantes utilizados. Tudo que entra em contato com o material vegetal passa a ser um contaminante em potencial, os protocolos de esterilização, desinfestação, higiene pessoal e limpeza do ambiente de trabalho são fatores essenciais para ter um ambiente asséptico e gerar um produto livre de contaminação.

A desinfestação impede a contaminação por microrganismos presentes na superfície do explante, essa pode ser feita utilizando água corrente e substâncias químicas. O processo de descontaminação causa lesões no tecido e muitas vezes levam a oxidação irreversível, ocorrendo vazamento fenólico e eventual morte do explante. As contaminações que persistem

após a desinfestação em laboratório podem ser provenientes da microbiota endógena que estão abrigados nas gemas apicais e axilares das plantas.

Através da cultura de meristema é possível eliminar os microrganismos endógenos, desde que o explante seja retirado no limite da diferenciação do floema e xilema (LEIFERT; CASSELLS, 2001). O tipo de explante (células, tecidos ou órgãos) escolhido depende das condições da planta-mãe, da espécie, das cultivares, e dos objetivos a serem alcançados com a micropropagação. Apesar dos segmentos caulinares serem mais velhos e potencialmente mais contaminados (SIVASITHAMPARAM; K. W; BARRETT, 2007), o seu uso para a propagação clonal é mais seguro, uma vez que normalmente não inclui o estágio de calo e a probabilidade de variação somaclonal é reduzida (ROUT; MOHAPATRA; JAIN, 2006). Geralmente, os nós são mais robustos e podem sobreviver a tratamentos de esterilização mais severos, mesmo que ocorram danos externos, as gemas axilares sofrem menos danos e são os primeiros locais de regeneração dos explantes nodais.

Nesse trabalho, objetivou-se avaliar a sobrevivência e crescimento de diferentes explantes de *Urtica dioica* L. na fase de estabelecimento e propagação *in vitro*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

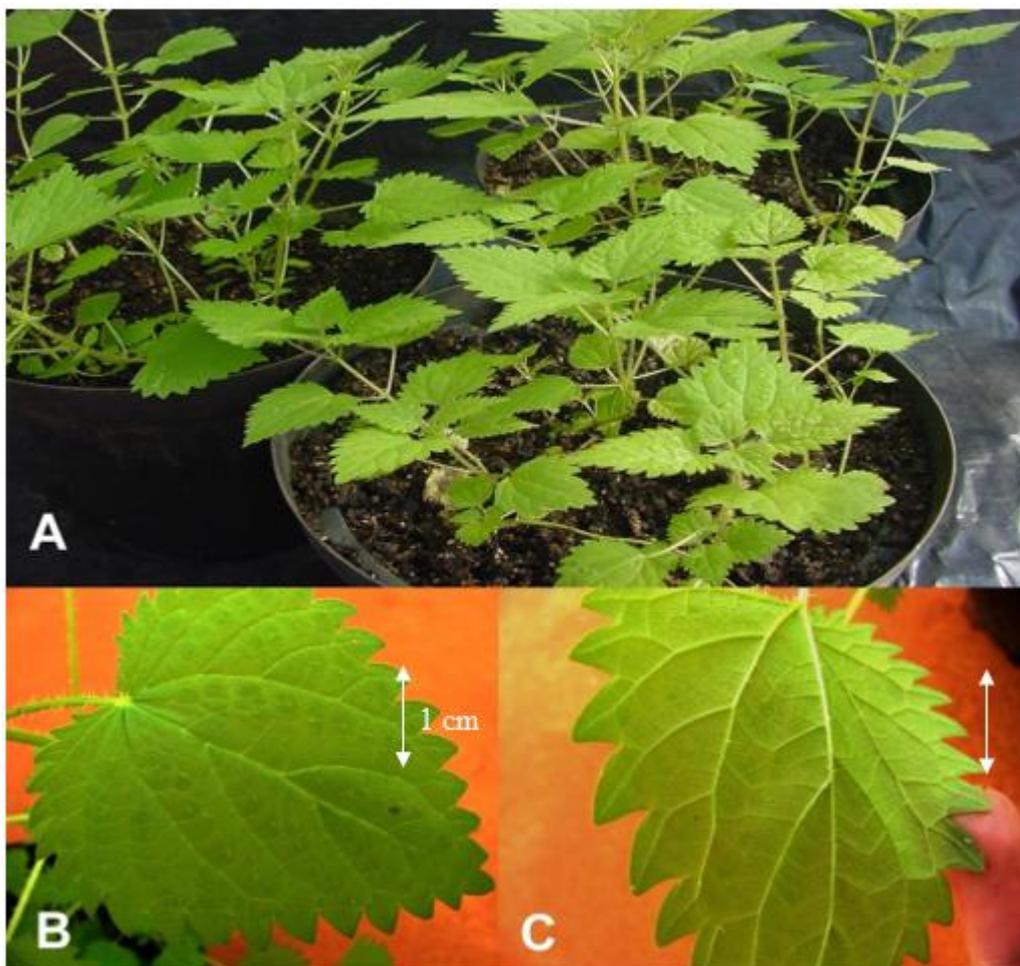
2.1 Características botânicas e agronômicas de *Urtica dioica* L.

A *Urtica dioica* L., pertencente à família Urticaceae, é a maior e mais difundida espécie dentro do gênero *Urtica* (DHOUIBI et al., 2020). Popularmente conhecida como urtiga, essa espécie cosmopolita possui uma grande variedade de subespécies, geralmente, as subespécies diploides ocorrem em habitats menos afetados pelos humanos e as subespécies tetraploides ocorrem em habitats de todos os tipos (DI VIRGILIO et al., 2015; REJLOVÁ et al., 2019). As plantas suportam todos os solos, especialmente aqueles que contêm matéria orgânica fresca (DHOUIBI et al., 2020). É comum encontrar espécies de urtiga crescendo em áreas ricas em nitratos inorgânicos e metais pesados (UPTON, 2013).

A urtiga possui um extenso sistema simpodial de rizomas e estolões, enraizando nos nós e dando origem a plantas de até 2 metros de altura (KREGIEL; PAWLIKOWSKA; ANTOLAK, 2018; TAYLOR, 2009) As raízes são numerosas, de cor marrom-acinzentada, lisas, fibrosas e muito finas (JOSHI; MUKHIJA; KALIA, 2014). As folhas de urtiga possuem coloração verde vibrante, bordas fortemente serrilhadas e venação na superfície inferior (UPTON, 2013). Tanto a parte superior quanto a inferior das folhas são cobertas por tricomas tectores unicelulares curtos (GRAUSO et al., 2020). O caule é ereto, fibroso, simples ou ramificado, quadrático, com 2 a 14 mm de espessura e com presença de tricomas de 1 mm de comprimento (JOSHI; MUKHIJA; KALIA, 2014). Os tricomas foram naturalmente selecionados por proteger a planta de ataque de insetos (KREGIEL; PAWLIKOWSKA; ANTOLAK, 2018). No verão, ocorre a floração e frutificação, as flores são pequenas, esverdeadas e unissexuais (DI VIRGILIO et al., 2015; TAYLOR, 2009). A semente possui cor bronze e preenche completamente o interior do fruto (JOSHI; MUKHIJA; KALIA, 2014).

As folhas possuem a maior concentração de princípios ativos (DHOUIBI et al., 2020). Quando tocada causa dermatite aguda, isso ocorre devido aos mediadores bioquímicos, como histamina e acetilcolina, presentes nos tricomas glandulares localizados nas folhas e no caule (DI VIRGILIO et al., 2015). A sensação de coceira e queimação pode durar até 12 horas após as toxinas serem liberadas na pele (KREGIEL; PAWLIKOWSKA; ANTOLAK, 2018).

Figura 1 – A – Espécie *Urtica dioica* L. (Urticaceae), cultivada em vasos na casa de vegetação; B – Face adaxial da folha; C – Face abaxial da folha.



Fonte: José Eduardo (2018)

As urtigas são consideradas plantas espontâneas devido ao seu rápido crescimento e cobertura do solo, mas existem razões econômicas e ecológicas para o seu cultivo (KREGIEL; PAWLIKOWSKA; ANTOLAK, 2018).

2.2 Usos da *Urtica dioica* L.

Diferentes partes da urtiga podem ser usadas como alimento, forragem, matéria-prima para cosméticos, indústria, medicina e na agricultura biodinâmica (AKGÜL, 2013). O seu uso dependerá de como e quando for colhida, por exemplo: para a produção de fibra a colheita deve ocorrer a partir do segundo ano de plantio, quando as sementes estiverem maduras ou

quando os colmos atingirem 80% da massa aérea, se o produto final for folhas, a colheita pode ser feita em plantas jovens (KREGIEL; PAWLIKOWSKA; ANTOLAK, 2018).

Recentemente, extratos de *U. dioica* foram estudados para utilização na agricultura pela sua ação antifúngica (LANGA-LOMBA et al., 2021) e como fertilizante de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) em sistemas orgânicos (MARIČIĆ et al., 2021). O óleo extraído das sementes de urtiga possui potencial antioxidante e pode ser utilizado em alimentos, cosméticos e farmacêuticos (MITROVIĆ et al., 2021). Apesar de a urtiga ser conhecida como um vegetal comestível e altamente nutritivo, os estudos têm se concentrado mais no seu valor como fonte de fibra e na medicina alternativa (RUTTO et al., 2013).

2.2.1 Uso medicinal da *Urtica dioica* L.

O uso de plantas como remédio é anterior a história escrita da humanidade e o seu conhecimento foi amplamente difundido nas civilizações antigas (HAYTA; POLAT; SELVI, 2014). A maioria das drogas farmacológicas foram desenvolvidas a partir de conhecimentos de comunidades locais sobre plantas medicinais (PÉREZ GUTIÉRREZ et al., 2021). Em países em desenvolvimento e sociedades rurais o uso de plantas medicinais oferece uma alternativa real para os sistemas de saúde de atenção primária (HAYTA; POLAT; SELVI, 2014). O tratamento com urtiga para artrite, reumatismo e paralisia muscular tornou-se um padrão na medicina popular (UPTON, 2013).

Experimentos pré-clínicos evidenciam a presença de atividades antiasmáticas, anticaspa, adstringente, depurativa, diurética, galactagogo, hemostática e hipoglicêmica provenientes dos compostos químicos dessa planta (AHMED; PARSURAMAN, 2014). Evidências farmacológicas comprovam a atividade anti-inflamatória e analgésica do extrato de folhas de *U. dioica* L., o que justifica o seu uso no tratamento de artrite e outras complicações inflamatórias (HAJHASHEMI; KLOOSHANI, 2013). Estudos sugerem que a raiz de urtiga, em combinação com outras ervas, como Saw Palmetto (*Serenoa repens*), pode ser eficaz para o tratamento de hiperplasia prostática, aliviando os sintomas urinários, como redução do fluxo urinário, necessidade constante em urinar, esvaziamento incompleto da bexiga e gotejamento após urinar (AHMED; PARSURAMAN, 2014). A atuação da urtiga no sistema nervoso central é uma alternativa para desintoxicar, potencializar e estimular o metabolismo (DHOUIBI et al., 2020).

A planta medicinal cultivada no campo está sujeita a variações ambientais, agronômicas, variabilidade genética da espécie, poluição, invasão por fungos, bactérias, viroses e insetos (ZOBAYED, 2005). Esses problemas estão associados a variação na concentração dos metabolitos medicinais nos tecidos vegetais e podem comprometer a segurança e eficácia do tratamento à base de plantas medicinais (ZOBAYED, 2005; ZOBAYED; SAXENA, 2004). Porém, esses fatores podem ser ajustados na propagação de plântulas onde é possível controlar o ambiente, como na cultura de tecidos (NGUYEN; XIAO; KOZAI, 2020).

2.3 Cultura de tecidos de plantas medicinais

A cultura de tecidos se baseia no princípio da totipotência celular e depende da regeneração de novas plantas a partir de pequenos explantes (células, tecidos ou órgãos) que são isolados de plantas selecionadas, esterilizados e incubados em vasos fechados com meio de cultura definido e sob ambiente controlado (ROUT; MOHAPATRA; JAIN, 2006; GUPTA et al., 2020). Todo tecido vegetal que possui células vivas e nucleadas é totipotente e pode vir a desenvolver crescimento e/ou diferenciação celular induzida pelo meio (SOUZA et al., 2018).

Os fatores que afetam a regeneração da planta *in vitro* são: genótipo (espécie, cultivar e variedade), a fonte de explantes (folha, raiz, caule, meristema, etc) ea condição da cultura (meio de cultura, luz, temperatura e vasilhame) (DE ANDRADE, 2002).

A propagação *in vitro* é base para as pesquisas biotecnológicas, uma vez que quase todos os usos da biotecnologia vegetal exigem o cultivo bem-sucedido de células, tecidos ou órgãos vegetais (KUMAR, 2011). Um dos maiores problemas da técnica é a contaminação por microrganismos, quando presente, pode matar, enfraquecer ou alterar significativamente os explantes utilizados (ROUT; MOHAPATRA; JAIN, 2006). As contaminações podem ser identificadas em cada etapa do cultivo *in vitro* e os explantes devem ser descartados. A perda devido a contaminação por microrganismos pode ser o elemento de maior custo na micropropagação quando expresso em termos de mão de obra, produtos químicos, energia e espaço (CASSELLS, 1997).

2.4 Contaminações na cultura de tecidos

Tudo que entra em contato com o material vegetal passa a ser um contaminante em potencial, os protocolos de esterilização, desinfestação, higiene pessoal e limpeza do ambiente de trabalho são fatores essenciais para ter um ambiente asséptico e gerar um produto livre de contaminação (ROUT; MOHAPATRA; JAIN, 2006).

A desinfestação da superfície dos explantes é a primeira etapa do cultivo *in vitro* e impede a contaminação por microrganismos presentes na superfície do material, como bactérias, fungos e leveduras (DE ANDRADE, 2002). Pode ser feita utilizando água corrente e substâncias químicas, como: etanol, hipoclorito de sódio, cloreto de mercúrio, etc (GUPTA et al., 2020). Perdas podem ocorrer nessa etapa, pois o processo de descontaminação causa lesões no tecido e muitas vezes levam a oxidação irreversível, ocorrendo vazamento fenólico e eventual morte do explante (SIVASITHAMPARAM; K. W; BARRETT, 2007).

Os microrganismos endofíticos não são eliminados através do tratamento de superfície, posto que esses não são expostos ao esterilizante durante o tratamento (SINGH, 2018; SIVASITHAMPARAM; K. W; BARRETT, 2007). Portanto, as contaminações que persistem após a desinfestação em laboratório podem ser provenientes da microbiota endógena que estão abrigados nas gemas apicais e axilares das plantas (HORNER et al., 2001).

Os microrganismos podem se expressar imediatamente após a inoculação ou podem permanecer latentes, não produzindo sintomas nas plantas e/ou crescimento visível no meio de cultura por longos períodos (LEIFERT; CASSELLS, 2001). Geralmente, fungos e leveduras não permanecem latentes em cultura de tecidos vegetais, diferente de algumas bactérias endofíticas (SIVASITHAMPARAM; K. W; BARRETT, 2007). As bactérias sobreviventes em um ambiente rico em nutrientes (açúcares e produtos orgânicos), podem mudar para um modo saprófita, induzir mudanças no meio de cultura, reduzir o crescimento da plântula e até matar (SIVASITHAMPARAM; K. W; BARRETT, 2007).

As contaminações por fungos podem ser facilmente identificadas, os micélios dos fungos filamentosos cobrem o meio de cultura em poucos dias após a inoculação, o crescimento de bactérias e leveduras são mais lentos e desenvolvem colônias claras ou coloridas, podem ser diferenciadas entre si pelo tamanho da célula (bactéria 0,5-2,0µm,

leveduras 3-5 μ m), bem como pela maior colônia não translúcida e pelo odor de fermentação (SIVASITHAMPARAM; K. W; BARRETT, 2007).

Os epicentros das colônias contaminantes no tecido do explante podem indicar se a contaminação é de origem endógena ou pode ser atribuído a um tratamento superficial ineficaz (SIVASITHAMPARAM; K. W; BARRETT, 2007). Alguns tratamentos químicos podem ser aplicados para diminuir a contaminação de microrganismos endógenos, incluindo calor, agitação prolongada ou antibióticos (ROUT; MOHAPATRA; JAIN, 2006). Se uma colônia ou turvação não forem detectadas e a suspeitas de bactérias endofíticas persistirem, a detecção pode ser feita incubando o tecido macerado em um meio bacteriológico (SIVASITHAMPARAM; K. W; BARRETT, 2007).

2.5 Tipo de explante e contaminação

É amplamente conhecido que todos os microrganismos restritos ao sistema vascular da planta são eliminados pela cultura de meristema, desde que o explante seja retirado no limite da diferenciação do floema e xilema (LEIFERT; CASSELLS, 2001). Porém, o tipo de explante (células, tecidos ou órgãos) escolhido depende das condições da planta-mãe, da espécie, das cultivares, e dos objetivos a serem alcançados com a propagação *in vitro* (ROUT; MOHAPATRA; JAIN, 2006).

A capacidade de regeneração dos explantes *in vitro* depende da maturidade do estágio fisiológico e do tecido utilizado, em geral, tecidos jovens e em crescimento são utilizados como fonte de explante (DE ANDRADE, 2002). Apesar dos segmentos caulinares serem mais velhos e potencialmente mais contaminados (SIVASITHAMPARAM; K. W; BARRETT, 2007), o seu uso para a propagação clonal é mais seguro, uma vez que normalmente não inclui o estágio de calo e a probabilidade de variação somaclonal é reduzida (ROUT; MOHAPATRA; JAIN, 2006).

Geralmente, os nós são mais robustos e podem sobreviver a tratamentos de esterilização mais severos, mesmo que ocorram danos externos, as gemas axilares sofrem menos danos e são os primeiros locais de regeneração dos explantes nodais (SIVASITHAMPARAM; K. W; BARRETT, 2007).

Após germinação e crescimento vigoroso, os brotos axilares podem ser separados, levados para a cultura posterior e enraizamento (ROUT; MOHAPATRA; JAIN, 2006). Para

evitar contaminações, o explante do nó original pode ser descartado, pois pode conter contaminantes latentes (SIVASITHAMPARAM; K. W; BARRETT, 2007).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de pesquisa e material biológico

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas Medicinais, do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA), localizado no município de Lavras, Minas Gerais, Brasil. A cidade, localiza-se a 21° 14' de latitude sul, 45° 00' de longitude W.Gr. A altitude média é 918 m. A temperatura média anual é de 19,4 °C. O clima é tipo Cwb da classificação de Köppen.

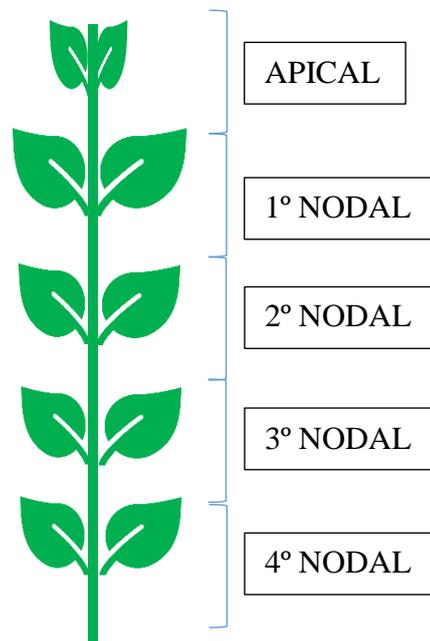
A planta matriz da espécie *U. dioica* L. cultivada em casa de vegetação foi selecionada como fonte de material vegetal. Os explantes foram coletados após ficarem três dias sem irrigação para diminuir a proliferação de microrganismos na sua superfície. Exsicatas desse espécime foram cadastradas no Herbário (*index Herbariorum* PAMG) da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), em novembro de 2018, sob o registro 58577.

3.2 Fase de estabelecimento

Caules jovens da planta matriz foram selecionados e retirados cinco segmentos a partir do ápice (Figura 2): segmento apical (Apical), primeiro segmento nodal (Nodal 1), segundo segmento nodal (Nodal 2), terceiro segmento nodal (Nodal 3) e quarto segmento nodal (Nodal 4). O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, sendo 5 tratamentos com 4 repetições e 7 tubos por repetição.

Os explantes foram lavados em água corrente com 10 gotas de detergente comercial, por 30 min. Posteriormente, os propágulos foram imersos em solução de etanol a 70% (v/v) por 1 min. Na sequência, os segmentos foram submersos em solução de água sanitária a 50% (v/v), por 15 min com agitação. A última etapa de desinfestação consistiu-se de tríplice lavagem em água destilada autoclavada.

Figura 2 – Esquema de posição dos explantes utilizados na etapa de inoculação.



Os segmentos apical e nodais foram padronizados em 1 cm de comprimento. Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio contendo 12,5 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e 5,5 g L⁻¹ de ágar. O pH do meio de cultura foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$, antes da autoclavagem por 20 min, a 121 °C. Os tubos de ensaios foram cultivados em sala de crescimento com fotoperíodo de 16h luz/8h escuro, sob 5 lâmpadas de LED brancas com intensidade luminosa de 94 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, à temperatura de 26 ± 1 °C (COELHO et al., 2021).

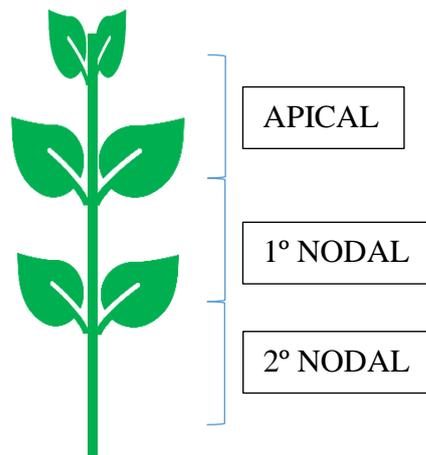
Após 40 dias da inoculação, as plântulas foram avaliadas quanto a porcentagem de contaminação bacteriana, contaminação fúngica, explantes oxidados e sobrevivência. Com o uso de paquímetro, as plântulas foram avaliadas quanto ao comprimento da parte aérea e da maior raiz. As medições da parte aérea foram feitas da base do caule até ápice caulinar e as medições da raiz foram da base do caule até o ápice radicular. Esses resultados foram expressos em centímetros. Também foram avaliados, visualmente o número de folhas, número de raízes, número de segmentos nodais e número de brotos.

3.3 Repicagem do segmento apical e nodal das plântulas

As plântulas saudáveis que sobreviveram na fase de estabelecimento foram utilizadas para a coleta de segmento apical (Apical), primeiro segmento nodal (Nodal 1) e segundo

segmento nodal (Nodal 2). Essas três posições de explante constituíram os três tratamentos dessa análise. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, sendo 3 tratamentos com 4 repetições, sendo 5 tubos por repetição.

Figura 3 – Esquema de posição dos explantes utilizados na fase de repicagem.



Com auxílio de um bisturi, os explantes foram padronizados no tamanho de 1 cm e inoculados em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), em condições de cultivo semelhantes às descritas na seção 3.2.

Aos 40 dias de crescimento, as plântulas foram avaliadas quanto ao comprimento da parte aérea e comprimento da maior raiz. As medições foram realizadas com paquímetro começando da base da brotação até a ponta da gema apical para determinar a altura da brotação. Para o comprimento das radículas, mediu-se da base da brotação até a ponta da raiz mais longa. Os resultados foram expressos em centímetros. Também foi contabilizado número de folhas, raízes, segmentos nodais e brotos. Na fase de multiplicação também foi avaliada a massa de matéria seca. Para isso, foram colocados separadamente os caules, raízes e folhas em sacos kraft, e depois postos em estufas de circulação forçada de ar a 37°C até alcançar peso constante, com o tempo aproximado de 72 h. Após o período de secagem, o material foi pesado em balança de precisão.

3.4 Análises estatísticas

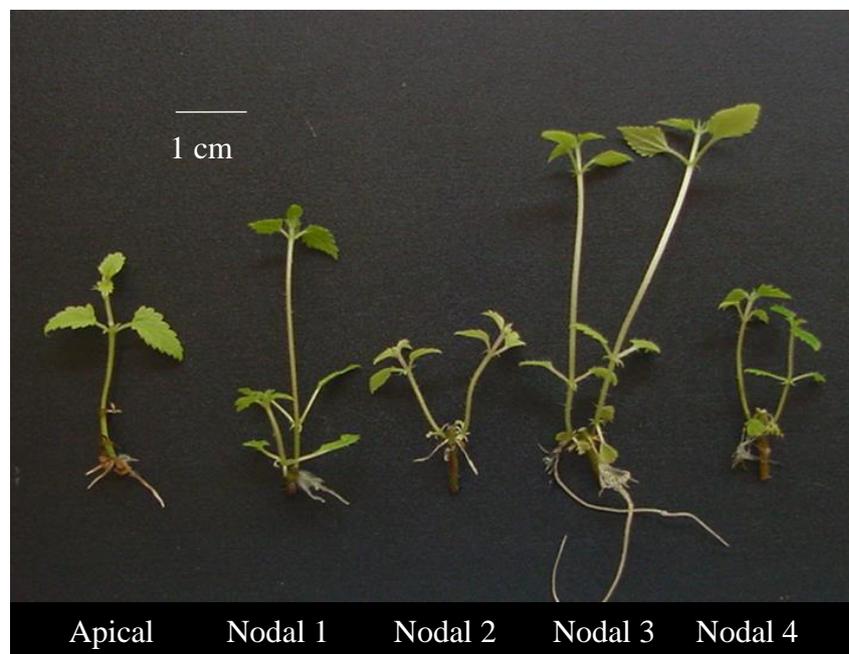
Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, utilizando-se o software Sisvar[®], versão 5.6 (FERREIRA, 2019).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Sobrevivência e crescimento dos explantes no estabelecimento *in vitro*

As diferentes posições dos explantes retirados da planta matriz influenciaram no estabelecimento e crescimento após 40 dias de cultivo *in vitro*.

Figura 4 – Plântulas de *U. dioica* estabelecidas *in vitro* a partir de segmento apical e diferentes segmentos nodais.



Na Tabela 1, observa-se diferenças significativas na porcentagem de contaminação bacteriana, fúngica, oxidação e sobrevivência. A taxa de contaminação por bactérias e fungos diminuiu conforme a posição do explante se aproximava do meristema apical (Tabela 1). A taxa de contaminação por bactérias foi menor no segmento apical e a taxa de contaminação por fungo foi menor no segmento apical, nodal 1 e nodal 2 (Tabela 1).

Os resultados de contaminação (Tabela 1) estão de acordo com Cassells (1997), onde reporta que a redução da distância do explante em relação ao meristema diminui a taxa de contaminação por microrganismos endógenos.

Tabela 1 – Valores médios de contaminação bacteriana, contaminação fúngica, explantes oxidados e sobrevivência de explantes de *Urtica dioica* L. oriundos de matrizes de casa de vegetação, aos 40 dias.

Segmento	Contaminação bacteriana (%)	Contaminação fúngica (%)	Explantes oxidados (%)	Sobrevivência (%)
Apical	25,00 a	17,88 a	0,00 a	57,12 a
Nodal 1	49,98 b	28,60 a	7,40 c	32,17 b
Nodal 2	57,15 c	37,75 a	3,70 b	21,45 c
Nodal 3	46,45 b	50,00 b	3,70 b	25,03 b
Nodal 4	50,00 b	53,58 b	7,40 c	21,45 c
CV (%)	4,40	12,46	7,07	1,71

As médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade.

A taxa de explantes oxidados apresentou valor nulo apenas na cultura de segmentos apicais de *U. dioica* (Tabela 1). A maior taxa de sobrevivência ocorreu na cultura de segmentos apicais (Tabela 1). O segmento apical é um tecido mais jovem e em crescimento, o seu estágio fisiológico favorece a regeneração do explante *in vitro* (DE ANDRADE, 2002).

O crescimento das plântulas estabelecidas apresentou variações significativas em todos os fatores analisados (Figura 4 e Tabela 2). O explante que apresentou maior crescimento das plântulas foi o Nodal 3 (Tabela 2). O fato de as gemas axilares regenerarem mais rápido após a desinfestação (SIVASITHAMPARAM; K. W; BARRETT, 2007) pode explicar o maior crescimento dos segmentos nodais 1 e 3 quando comparados com o segmento apical (Tabela 2).

Tabela 2 – Valores de comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da maior radícula (CR), número de radículas (NR), número de folhas (NF), número de segmentos nodais (NSN) e número de brotos (NB) de plântulas de *Urtica dioica* L., oriundas de diferentes posições na planta cultivada em casa de vegetação, cultivados *in vitro*, aos 40 dias.

Segmento	CPA (cm)	CR (cm)	NR	NF	NSN	NB
Apical	2,26 c	1,64 b	1,8 a	5,6 b	2,8 b	1,0 b
Nodal 1	3,28 b	0,68 c	1,4 b	6,0 b	3,0 b	1,6 a
Nodal 2	1,50 d	0,18 d	1,0 c	3,2 c	1,6 c	1,2 b
Nodal 3	3,82 a	3,08 a	1,8 a	7,2 a	3,6 a	1,4 a
Nodal 4	1,26 d	0,30 e	1,0 c	3,2 c	1,6 c	1,2 b
CV (%)	17,78	13,76	10,9	9,8	7,9	10,2

As médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade.

O menor crescimento dos segmentos nodais 2 e 4 (Tabela 2) pode estar relacionado com a presença de microrganismos latentes. As bactérias que são patogênicas (*in vivo*) em um

ambiente rico em nutrientes (açúcares e produtos orgânicos) podem mudar para um modo saprófita, induzir mudanças no meio de cultura e reduzir o crescimento da plântula in vitro (SIVASITHAMPARAM; K. W; BARRETT, 2007). Para confirmar a presença desses microrganismos seria necessário fazer a incubação do tecido macerado em um meio bacteriológico.

4.2 Repicagem dos segmentos apical e nodal

Após 40 dias do subcultivo dos explantes saudáveis, verificou-se que não houve contaminações em nenhum dos tratamentos, Apical, Nodal 1 e 2 (Figura 5). Foi observado um escurecimento (oxidação) próximo da região seccionada dos explantes provenientes de segmentos nodais, porém a presença de oxidação não causou danos ao crescimento. Observou-se diferença significativa no crescimento e acúmulo de matéria seca entre todos os tratamentos (Tabela 3 e Tabela 4).

Figura 5 – Plântulas de *U. dioica* micropropagadas a partir de segmento apical e diferentes segmentos nodais.



De modo geral, os maiores resultados de crescimento foram observados nas plântulas provenientes do segmento apical, esse tratamento obteve maior valor médio de comprimento da parte aérea e maior raiz, maior número de raízes, folhas e número de segmentos nodais (Tabela 3). Devido a maior produção de folhas, o segmento apical seria o mais indicado para a micropropagação com interesse medicinal (DHOUIBI et al., 2020).

O segmento nodal 1 apresentou o maior valor para número de brotações (Tabela 3), o que pode ser uma característica interessante durante a repicagem. O seccionamento do ápice caulinar evita o fluxo de auxinas do ápice para as gemas axilares, com isso, uma alta proporção de citocinina estimula a formação das brotações axilares (ROUT; MOHAPATRA; JAIN, 2006; DE CARVALHO; COSTA; DOS SANTOS, 2006).

O segmento apical não apresentou brotações laterais (Tabela 3), uma vez que não há a quebra de dominância apical nesse tipo de explante. A auxina, derivada do ápice caulinar, inibe o crescimento de gemas axilares (PINO-NUNES, 2009).

Tabela 3 – Valores de comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da maior raiz (CR), número de raízes (NR), número de folhas (NF), número de segmentos nodais (NSN) e número de brotos (NB) de plântulas de *Urtica dioica* L., na etapa de multiplicação.

Segmento	CPA (cm)	CR (cm)	NR	NF	NSN	NB
Apical	4,28 a	0,64 a	1,8 a	5,6 a	2,8 a	1,0 c
Nodal 1	2,69 b	0,38 b	1,4 b	6,0 a	3,0 a	1,6 a
Nodal 2	2,50 b	0,18 c	1,0 c	3,2 b	1,6 b	1,2 b
CV (%)	10,3	11,9	18,1	8,10	12,3	10,6

As médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade.

Verificou-se maior quantidade de matéria seca de folhas, raízes e caule nas plântulas provenientes de segmentos apicais (Tabela 4). Todos os tratamentos possuem distribuição de biomassa, através do quociente entre a massa seca de raízes e da parte aérea, que favorece a formação da parte aérea (Tabela 4).

Não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos para a relação entre matéria seca de raiz e matéria seca de parte aérea (Tabela 4). Porém, as plântulas provenientes do segmento apical possuem maior comprimento de raiz (Tabela 3) o que pode ser uma vantagem para a fase de aclimatização.

Tabela 4 – Matéria seca das folhas (MSF), do da raiz (MSR), do caule (MSC), total (MST), da parte aérea (MSPA) e relação entre matéria seca de raízes (MSR) e parte aérea (MSPA) de *Urtica dioica* oriundas de diferentes explantes cultivados *in vitro*.

Segmentos	MSF	MSR	MSC	MST	MSPA	MSR/MSPA
	mg plântula⁻¹					
Apical	5,12 a	4,61 a	4,10 a	13,83 a	9,22 a	0,5 a
Nodal 1	3,81 b	2,54 b	2,39 b	8,74 b	6,2 b	0,4 a
Nodal 2	3,54 b	2,37 b	2,21 b	8,12 b	5,75 b	0,4 a
CV (%)	8,3	19,1	18,1	10,8	12,6	17,3

As médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade.

5 CONCLUSÃO

Na fase de estabelecimento, os explantes provenientes de segmento apical de urtiga possuem menor contaminação e maior sobrevivência. As plântulas formadas a partir desse segmento possuem maior crescimento e acúmulo de biomassa na fase de repicagem. Portanto, o uso do segmento apical é o mais indicado para a propagação *in vitro* de *U. dioica* L.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, KK Mueen; PARSURAMAN, Subramani. *Urtica dioica* L.,(Urticaceae): a stinging nettle. **Systematic Reviews in Pharmacy**, v. 5, n. 1, p. 6, 2014.

AKGÜL, M. Suitability of stinging nettle (*Urtica dioica* L.) stalks for medium density fiberboards production. **Composites Part B: Engineering**, v. 45, n. 1, p. 925–929, 2013.

CASSELLS, Alan C. (Ed.). **Pathogen and microbial contamination management in micropropagation**. Springer Science & Business Media, 1997.

COELHO, Adriane Duarte et al. Wavelength and light intensity enhance growth, phytochemical contents and antioxidant activity in micropropagated plantlets of *Urtica dioica* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 145, n. 1, p. 59-74, 2021.

HORNER, LUCIANE DE A. et al. MICROPROPAGAÇÃO DE ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v. 7, n. 1, p. 87-96, 2001.

DE ANDRADE, S. R. M. Princípios da cultura de tecidos vegetais. **Embrapa Cerrados-Documentos (INFOTECA-E)**, 2002.

DE CARVALHO, A. C. P. P.; COSTA, AMG; DOS SANTOS, M. R. A. Efeito do tipo de incisão sobre a dominância apical em ápices caulinares em duas cultivares de bananeira (*Musa* sp.). **Embrapa Rondônia-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2006.

DHOUIBI, Raouia et al. Screening of pharmacological uses of *Urtica dioica* and others benefits. **Progress in biophysics and molecular biology**, v. 150, p. 67-77, 2020.

DI VIRGILIO, Nicola et al. The potential of stinging nettle (*Urtica dioica* L.) as a crop with multiple uses. **Industrial Crops and Products**, v. 68, p. 42-49, 2015.

FERREIRA, Daniel Furtado. SISVAR: A computer analysis system to fixed effects split plot type designs. **Revista brasileira de biometria**, v. 37, n. 4, p. 529-535, 2019.

GRAUSO, Laura et al. Stinging nettle, *Urtica dioica* L.: Botanical, phytochemical and pharmacological overview. **Phytochemistry Reviews**, v. 19, p. 1341-1377, 2020.

GUPTA, Nikita et al. A review on micropropagation culture method. **Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development**, v. 8, n. 1, p. 86-93, 2020.

HAJHASHEMI, Valiollah; KLOOSHANI, Vahid. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Urtica dioica* leaf extract in animal models. **Avicenna journal of phytomedicine**, v. 3, n. 2, p. 193, 2013.

HAYTA, Sukru; POLAT, Rıdvan; SELVI, Selami. Traditional uses of medicinal plants in Elazığ (Turkey). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 154, n. 3, p. 613-623, 2014.

JOSHI, Bhuwan Chandra; MUKHIJA, Minky; KALIA, Ajudhia Nath. Pharmacognostical review of *Urtica dioica* L. **International Journal of Green Pharmacy (IJGP)**, v. 8, n. 4, 2014.

KREGIEL, Dorota; PAWLIKOWSKA, Ewelina; ANTOLAK, Hubert. *Urtica* spp.: Ordinary plants with extraordinary properties. **Molecules**, v. 23, n. 7, p. 1664, 2018.

KUMAR, Nitish; REDDY, M. P. In vitro plant propagation: a review. **Journal of forest and environmental science**, v. 27, n. 2, p. 61-72, 2011.

LANGA-LOMBA, Natalia et al. Assessment of conjugate complexes of chitosan and *Urtica dioica* or *Equisetum arvense* extracts for the control of grapevine trunk pathogens. **Agronomy**, v. 11, n. 5, p. 976, 2021.

LEIFERT, Cassells; CASSELLS, A. C. Microbial hazards in plant tissue and cell cultures. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 37, n. 2, p. 133-138, 2001.

MARIČIĆ, Branka et al. Stinging Nettle (*Urtica dioica* L.) as an Aqueous Plant-Based Extract Fertilizer in Green Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Sustainable Agriculture. **Sustainability**, v. 13, n. 7, p. 4042, 2021.

MITROVIĆ, Jelena. et al. NETTLE (*URTICA DIOICA* L .) SEED OIL : EXTRACTION , CHEMICAL CHARACTERISATION AND ANTIOXIDANT ACTIVITY. **Journal of Hygienic Engineering and Design**, p. 119–123, 2021.

MURASHIGE, Toshio; SKOOG, Folke. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NGUYEN, Quynh Thi; XIAO, Yulan; KOZAI, Toyoki. Photoautotrophic micropropagation. **Plant factory**, p. 333-346, 2020.

PÉREZ GUTIÉRREZ, Rosa Martha et al. Evaluation of the Antidiabetic Potential of Extracts of *Urtica dioica*, *Apium graveolens*, and *Zingiber officinale* in Mice, Zebrafish, and Pancreatic β -Cell. **Plants**, v. 10, n. 7, p. 1438, 2021.

PINO-NUNES, Lilian Ellen. **Controle do desenvolvimento vegetal pela interação auxina-citocinina. Uma nova abordagem baseada no estudo de mutantes de tomateiro (*Solanum lycopersicum* cv *Micro-Tom*)**. 2009. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

REJLOVÁ, Ludmila et al. Polyploid evolution: the ultimate way to grasp the nettle. **PloS one**, v. 14, n. 7, p. e0218389, 2019.

ROUT, G. R.; MOHAPATRA, A.; JAIN, S. Mohan. Tissue culture of ornamental pot plant: A critical review on present scenario and future prospects. **Biotechnology advances**, v. 24, n. 6, p. 531-560, 2006.

RUTTO, Laban K. et al. Mineral properties and dietary value of raw and processed stinging nettle (*Urtica dioica* L.). **International journal of food science**, v. 2013, 2013.

SINGH, Chinnappan Ravinder. Review on problems and its remedy in plant tissue culture. **Asian Journal of Biological Sciences**, v. 11, n. 4, p. 165-172, 2018.

SIVASITHAMPARAM, Krishnapillai; DIXON, Kingsley W.; BARRETT, R. L. (Ed.). **Microorganisms in plant conservation and biodiversity**. Springer Science & Business Media, 2007.

SOUZA, Julio Cezar de et al. Produção de metabólitos secundários por meio da cultura de tecidos vegetais. **Revista Fitos**, v. 12, n. 3, p. 269, 2018.

TAYLOR, Kenneth. Biological flora of the British Isles: *Urtica dioica* L. **Journal of Ecology**, v. 97, n. 6, p. 1436-1458, 2009.

UPTON, Roy. Stinging nettles leaf (*Urtica dioica* L.): Extraordinary vegetable medicine. **Journal of Herbal Medicine**, v. 3, n. 1, p. 9-38, 2013.

ZOBAYED, Sayed MA; AFREEN, Fawzia; KOZAI, Toyoki. Necessity and production of medicinal plants under controlled environments. **Environmental Control in Biology**, v. 43, n. 4, p. 243-252, 2005.

ZOBAYED, S. S. P. K.; SAXENA, P. K. Production of St. John's wort plants under controlled environment for maximizing biomass and secondary metabolites. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 40, n. 1, p. 108-114, 2004.