

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

PROPAGAÇÃO DE *Angelonia integerrima* Sprengel

Mara Cíntia Winhelmann  
Engenheira Agrônoma/UFPel

Dissertação apresentada como um dos requisitos  
à obtenção do Grau de Mestre em Fitotecnia  
Área de Concentração Sistemas de Produção Vegetal

Porto Alegre (RS), Brasil  
Fevereiro de 2017

Winhelmann, Mara Cíntia  
Propagação de *Angelonia integerrima* Sprengel /  
Mara Cíntia Winhelmann. -- 2017.  
102 f.  
Orientador: Gilmar Schafer.

Coorientador: Claudimar Sidnei Fior.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa  
de Pós-Graduação em Fitotecnia, Porto Alegre, BR-RS,  
2017.

1. Bioma Pampa. 2. Ornamental nativa. 3.  
Micropropagação. 4. Estaquia. I. Schafer, Gilmar,  
orient. II. Fior, Claudimar Sidnei, coorient. III.  
Título.

MARA CINTIA WINHELMANN

Engenheira Agrônoma - UFPel

## **DISSERTAÇÃO**

Submetida como parte dos requisitos  
para obtenção do Grau de

### **MESTRE EM FITOTECNIA**

Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia  
Faculdade de Agronomia  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovado em: 23.02.2017  
Pela Banca Examinadora

Homologado em: 31.10.2017  
Por

GILMAR SCHÄFER  
Orientador - PPG Fitotecnia

CRHISTIAN BREDEMEIER  
Coordenador do Programa de  
Pós-Graduação em Fitotecnia

CLAUDIMAR SIDNEI FIOR  
Coorientador - PPG Fitotecnia

TATIANA DA SILVA DUARTE  
PPG Fitotecnia/UFRGS

PAULO VITOR DUTRA DE SOUZA  
PPG Fitotecnia/UFRGS

MÁRCIA WULFF SCHUCH  
UFPel

CARLOS ALBERTO BISSANI  
Diretor da Faculdade de  
Agronomia

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por ter saúde, força e determinação para vencer mais esta etapa da minha vida.

Ao meu marido, Maico Estevam Pletsch, pelo companheirismo, carinho, amor, atenção, apoio financeiro e pelo incentivo à minha carreira acadêmica. Obrigada por compreender minha ausência em alguns períodos. Espero que logo mais possamos estar morando juntos novamente.

Aos meus pais Glaci Lang Winhelmann e Romeu Pedro Winhelmann, pela vida, pelos ensinamentos, por todo carinho, procurando sempre ajudar. À minhas irmãs Marisa e Marina, afilhada Anna e demais familiares por todo carinho e auxílio e pela compreensão da ausência em alguns momentos.

Ao meu orientador, professor Gilmar Schafer, por aceitar me orientar, pela calma e tranquilidade, pelo incentivo e ensinamentos durante a realização deste trabalho.

Ao meu coorientador, professor Claudimar Sidnei Fior, por estar sempre disponível para ajudar e pelo apoio concedido.

Aos amigos de longa data Mariane Inês Ohlweiler e Felipe Krüger Leal por me acolherem em Porto Alegre.

Aos amigos do PPG Fitotecnia: Marília Tedesco, Priscila Paris, Gislaine Grzeça, Aquélis Armiliato Emer, Eduarda Demari Avrella, Julio Riegger Lucchese, Samanta Siqueira de Campos, Luciana Paim, Monique Caumo e Luciana Salazar Rehbein pelo auxílio, troca de ideias e ajuda nos experimentos e nas análises estatísticas, à bolsista Joana Paolazzi que auxiliou nos experimentos, e ao servidor Idenir de Conto pela ajuda nos diversos trabalhos.

A todos os professores, funcionários e colegas do PPG Fitotecnia, do Departamento de Horticultura e Silvicultura e da Faculdade de Agronomia.

Ao Cnpq e a CAPES pelo apoio financeiro.

A Prefeitura Municipal de Porto Alegre, especialmente à bióloga Maria Carmen Sestren Bastos, da Secretaria Municipal de Meio Ambiente pela autorização e viabilização da coleta de sementes.

# PROPAGAÇÃO DE *Angelonia integerrima* Sprengel<sup>1</sup>

Autor: Mara Cíntia Winhelmann  
Orientador: Gilmar Schafer  
Coorientador: Claudimar Sidnei Fior

## RESUMO

A floricultura é uma alternativa para produtores que não possuem grandes áreas à disposição, sendo uma opção ao desenvolvimento regional. Nesse cenário a flora brasileira pode contribuir para a expansão e oferta de novos produtos. O Bioma Pampa apresenta uma diversidade de espécies que podem ser utilizadas nesse setor, como por exemplo, a *Angelonia integerrima* Sprengel, é uma espécie promissora que pode ser usada nesse contexto, porém são necessários estudos básicos para o conhecimento das formas de propagação e cultivo, para que esta possa ser explorada comercialmente de forma sustentável, bem como evitar o extrativismo e a posterior extinção. Diante disso o objetivo deste trabalho é levantar informações referentes à propagação de *A. integerrima*, por via sexuada e assexuada. Foram desenvolvidos estudos de modo a gerar informações para a produção de mudas *in vitro*, através da germinação de sementes que foram coletadas no município de Barão do Triunfo - RS e armazenadas em dois locais (ambiente refrigerado e bancada de laboratório), posteriormente foram germinadas em meio Murashige e Skoog (MS) com diferentes concentrações de sais, com a posterior multiplicação em meio com os fitorreguladores benzilaminopurina (BAP) e ácido naftalenoacético (ANA), enraizamento *in vitro* com ácido indolbutírico (AIB) e aclimatização das mudas em substrato casca de arroz carbonizada (CAC) em ambiente protegido. Outro estudo avaliou tamanhos de ápices caulinares no estabelecimento *in vitro*, a fim de obter explantes sem contaminações por fungos e bactérias, como estratégia de limpeza clonal para a micropropagação massal de espécimes adultos. Outro trabalho avaliou o efeito da concentração de ácido indol-3-butírico (AIB) em pó e substratos no enraizamento de estacas apicais. Sementes armazenadas sob ambiente refrigerado apresentaram maior porcentagem de germinação, não sendo afetada pela concentração de sais do meio; 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ANA proporcionaram maior números de brotos por explante (15,17); 0,83 mg L<sup>-1</sup> de AIB foi o ponto de máxima resposta para o enraizamento. Na aclimatização obteve-se 50,8% de mudas aclimatizadas. Durante a fase de estabelecimento dos diferentes tamanhos de ápices caulinares *in vitro* (primeiros 45 dias de cultivo), somente os explantes com tamanho de 1,0 mm não apresentaram contaminação, já no segundo subcultivo (90 dias) somente brotações oriundas de explantes iniciais com tamanho de 7 mm ou maiores apresentaram contaminação. É possível obter plantas livres de contaminações *in vitro* por fungos e bactérias, podendo utilizar explantes com tamanho médio inferior ou igual a 5 mm. O BAP proporcionou incremento linear para a multiplicação. Na estaquia obteve-se enraizamento médio de 79%. No enraizamento por estaquia de *Angelonia integerrima* não é necessário usar AIB e pode-se utilizar o substrato comercial à base de turfa ou a CAC.

<sup>1</sup> Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (102f.) Fevereiro, 2017.

## PROPAGATION OF *Angelonia integerrima* Sprengel<sup>1</sup>

Author: Mara Cíntia Winhelmann  
Adviser: Gilmar Schafer  
Co adviser: Claudimar Sidnei Fior

### ABSTRACT

Floriculture is an alternative for producers who do not have large areas available, being an option for regional development. In this scenario, Brazilian flora may contribute to expand and offer new products. The Pampa biome presents a diversity of species that can be used in this sector. *Angelonia integerrima* Sprengel is a promising species and can be used in this context, but basic studies are required for the understanding of its propagation methods and cultivation, so that it can be commercially exploited in a sustainable manner, as well as avoiding the extraction and subsequent extinction. Therefore, the aim of this study is to collect information about the propagation of *A. integerrima*, sexually and asexually. Studies have been developed in order to generate information for the production of seedlings *in vitro* from the germination of seeds collected at Barão do Triunfo and stored in two places (refrigerated environment and laboratory bench). They were subsequently germinated on a Murashige and Skoog (MS) medium with different concentrations of salts. Subsequently, a medium multiplication using the growth regulators benzylaminopurine (BAP) and naphthaleneacetic acid (NAA), *in vitro* rooting with indole-3-butyric acid (IBA) and acclimatization of seedlings on a substrate containing carbonized rice husks (CRH) in a protected environment was performed. Another study evaluated shoot apex sizes in the sample *in vitro* to obtain explants without contamination by fungi and bacteria, as a cleaning strategy for clonal mass micropropagation of adult specimens. Another study evaluated the effect of the concentration of indole-3-butyric acid (IBA) in powder and substrates on the rooting of apical cuttings. Seeds stored at refrigerated environment showed a higher germination percentage. They were not affected by the concentration of salts in the medium. The values 1.0 mg L<sup>-1</sup> of BAP and 0.1 mg L<sup>-1</sup> of IBA provided the highest numbers of shoots per explant (15.17). The value 0.83 mg L<sup>-1</sup> of IBA obtained the maximal response point for rooting. Under acclimatization, there were 50.8% of acclimatized seedlings. During the different sizes of *in vitro* caudal apices establishment phase (the first 45 days of culture), only the explants with 1.0 mm in size were not contaminated. However, in the second subculture (90 days), only shoots from initial explants, with 7 mm in size or larger, were contaminated. It is possible to obtain plants free of contaminations *in vitro* by fungi and bacteria, and can use explants with an average size less than or equal to 5 mm. The IBA provided linear increment for multiplication. In the stem, 79% average rooting was obtained. In the rooting by cutting of *Angelonia integerrima* it is not necessary to use IBA. For acclimatization a commercial substrate based on peat or CRH can be used.

---

<sup>1</sup> Master of Science dissertation in Plant Science, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (102p.) February, 2017.

## SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO .....	1
Referências bibliográficas .....	5
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	6
2.1 O gênero <i>Angelonia</i> e a espécie <i>A. integerrima</i> Sprengel .....	6
2.2 Propagação sexuada .....	7
2.3 Propagação assexuada .....	9
2.3.1 Estaquia .....	10
2.3.2 Micropropagação ou propagação <i>in vitro</i> .....	11
2.4 Substratos .....	17
2.5 Referências bibliográficas .....	18
3 ARTIGO 1 – Propagação <i>in vitro</i> de <i>Angelonia integerrima</i> Sprengel .....	23
4 ARTIGO 2 – Limpeza clonal e multiplicação <i>in vitro</i> de <i>Angelonia integerrima</i> Sprengel .....	50
5 ARTIGO 3 – Enraizamento de estacas apicais de <i>Angelonia integerrima</i> Sprengel: concentrações de ácido indol-3-butírico e substratos .....	66
6 CONCLUSÃO GERAL .....	83
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	84
8 APÊNDICES .....	85

## RELAÇÃO DE TABELAS

Página

### ARTIGO 1

1. Análise de variância da germinação de sementes de *Angelonia integerrima* Sprengel sob diferentes concentrações de sais do meio MS e diferentes locais de armazenamento (experimento 1); e multiplicação de *Angelonia integerrima* Sprengel sob diferentes concentrações BAP (benzilaminopurina) e ANA (ácido naftalenoacético) (experimento2)..... 34
2. Número de brotos por explante *in vitro* de *Angelonia integerrima* Sprengel sob concentrações BAP (benzilaminopurina) e ANA (ácido naftalenoacético)..... 38
3. Análise de variância do enraizamento *in vitro* (experimento 3) e aclimatização (experimento 4) de *Angelonia integerrima* Sprengel sob diferentes concentrações de ácido indolbutírico (AIB)..... 41

### ARTIGO 3

1. Análise de variância da estaquia de *Angelonia integerrima* Sprengel, submetida a diferentes concentrações de AIB e substratos..... 74
2. Influência de concentrações de ácido indol-3-butírico (AIB) e de substratos no percentual de enraizamento (% E), no percentual de formação de calo (% Calo), no comprimento da parte aérea (PA), no comprimento do sistema de radicular (SR), no número de folhas novas (N° folhas), no volume do sistema radicular (VSR), na massa seca da parte aérea (MS PA) e das raízes (MS SR) de estaquia de *Angelonia integerrima* Sprengel..... 75
3. Análise química e física dos substratos utilizados no enraizamento de estacas de *Angelonia integerrima* Sprengel..... 78



## RELAÇÃO DE FIGURAS

Página

### ARTIGO 1

1. A) Porcentagem de germinação e formação de plântulas; B) Tempo médio de germinação (TMG); C) Índice de velocidade de germinação (IVG) para diferentes locais de armazenamento; D) Tempo médio de germinação (TMG) de sementes de *Angelonia integerrima* Sprengel sob concentrações de sais do meio MS; médias seguidas por letras iguais não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro..... 35
2. Massa seca da parte aérea (g) de multiplicação *in vitro* de *Angelonia integerrima* Sprengel sob concentrações de BAP (benzilaminopurina); médias seguidas por letras iguais não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro..... 39
3. Percentual de enraizamento (A) e de formação de calos (B) no cultivo *in vitro* de *Angelonia integerrima* Sprengel sob diferentes concentrações de AIB..... 41

### ARTIGO 2

1. Contaminação *in vitro* de diferentes tamanhos de explantes de *Angelonia integerrima* Sprengel aos 45 e 90 dias..... 58
2. Número de brotos por explante aos 45 e 90 dias de cultivo *in vitro* de diferentes tamanhos de ápices caulinares de *Angelonia integerrima* Sprengel..... 60
3. A) Comprimento da parte aérea (cm); B) número médio de brotos formados por explante; C) massa fresca da parte aérea (g) na propagação *in vitro* de *Angelonia integerrima* Sprengel sob diferentes concentrações de benzilaminopurina (BAP) 62

## 1 INTRODUÇÃO

No último levantamento realizado a área mundial ocupada pela floricultura era estimada em aproximadamente 190 mil ha, sendo que os maiores produtores mundiais eram União Europeia, Estados Unidos e Japão. Na América Latina destaque para Colômbia, Equador e Costa Rica e na Ásia a China. A União Europeia além de maior produtor, também maior consumidor mundial, sendo a Holanda o país que domina esse mercado. No continente americano os maiores consumidores eram Estados Unidos, importando principalmente flores de corte da Colômbia (Buainain & Batalha, 2007).

No Brasil, o cultivo comercial de flores e plantas ornamentais teve início na década de 50, sendo essa uma tradição que veio junto com os imigrantes: japoneses, em São Paulo; poloneses, alemães e suíços na região Sul (Junqueira & Peetz, 2008).

Dados do Instituto Brasileiro de Floricultura (IBRAFLOR) mostram que o Brasil possui aproximadamente 8.248 produtores numa área de quase 15 mil ha, sendo que o tamanho médio das propriedades tem 1,82 ha e são produzidas mais de 350 espécies de plantas ornamentais. A região Sudeste é a maior produtora, ocupando a maior área (46%) e também o maior número de produtores (2.228), seguida da região Sul, com destaque para os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, que ocupam 9 e 7% da área total, respectivamente (Ibraflor, 2015).

As propriedades que trabalham neste setor no Rio Grande do Sul utilizam basicamente mão de obra familiar o que contribui para a fixação do homem ao meio rural.

A floricultura nesse estado tem apresentado expressiva importância econômica e social, sendo, no entanto muito importante realizar pesquisas para o desenvolvimento de tecnologias adequadas às condições locais dos produtores e também gerar informações que possam servir de suporte para os extensionistas que prestam assistência técnica nessa área (Stumpf *et al.*, 2007).

A floricultura, muitas vezes surge como uma alternativa aos produtores que querem diversificar sua renda e, ao mesmo tempo não possuem grandes áreas à disposição para explorar, sendo uma opção ao desenvolvimento regional. Dessa forma, o conhecimento das condições locais e da cadeia produtiva é de fundamental importância para a elaboração de políticas e programas de apoio, bem como para obter êxito na atividade (Stumpf *et al.*, 2007).

Um dos principais entraves à produção, é que o consumo brasileiro de flores e plantas ornamentais está basicamente concentrado em datas especiais como Dia das Mães, Dia dos Namorados, Finados, Natal e Ano Novo; o que ocasiona sazonalidade na produção e nas vendas, gerando instabilidade na renda do produtor. Associado a isso, também, está à baixa diversidade de espécies que são as mais vendidas e preferidas pelo consumidor brasileiro (Junqueira & Peetz, 2008).

O uso de plantas como ornamentais é uma prática milenar nos continentes Europeu e Asiático, os quais domesticaram muitas espécies para esse fim, sendo que a escolha das espécies é muito relativa e particular, pois envolve gostos subjetivos e sentimentais (Weiss, 2002). No Brasil, o uso de plantas ornamentais exóticas no paisagismo vem desde a época colonial, pois os imigrantes traziam consigo espécies cultivadas em sua região de origem, além de ornamentais também trouxeram olerícolas e medicinais (Heiden *et al.*, 2006). Com

relação à história da colonização do Rio Grande do Sul, isso talvez explique o fato de serem usadas muitas espécies exóticas ao invés de nativas para esse fim (Barroso, 2006).

Os brasileiros dão pouco valor à diversidade da flora nativa que têm à disposição, sendo que numerosas espécies ainda são desconhecidas e muitas nem foram descritas. Os maiores admiradores dessa diversidade são os estrangeiros que acabam se apropriando dos recursos genéticos e criam patentes para a comercialização de plantas melhoradas (Barroso, 2006). Porém as plantas nativas já estão sendo utilizadas, mas há um desconhecimento sobre a origem da planta, por isso em muitos casos as mesmas podem ser atribuídas como sendo exóticas. Atualmente são comercializados híbridos que passaram pelo processo de melhoramento por pesquisas realizadas em outros países. Dessa forma são lançados como novidade no país de origem e conseqüentemente bem aceitos por parte do consumidor (Heiden *et al.*, 2006), como por exemplo, é o caso da flor símbolo do Rio Grande do Sul, o brinco-de-princesa (*Fuchsia regia* (Vand. ex Vell.) Munz).

Muito importante destacar que a flora brasileira possui uma diversidade imensa, o que pode contribuir para a expansão e diversidade do setor, sendo que muitas espécies são desconhecidas, o que pode ser uma opção promissora, sendo praticamente um mercado inexplorado. A diversidade existente na flora nacional desperta o interesse de consumidores nacionais, bem como de estrangeiros (Junqueira & Peetz, 2008).

Inúmeras espécies nativas, com potencial ornamental, compõem a flora do Rio Grande do Sul, porém é importante destacar que muitas vezes essas espécies são retiradas de forma ilegal da natureza. Esse fato contribui para a vulnerabilidade dessas plantas, bem como com a futura extinção (Carneiro *et al.*, 2016). Por isso a necessidade e importância de estudar as espécies nativas, de modo que se possa compreender e desenvolver tecnologias

relacionadas com a propagação e ao mesmo tempo, domesticar as espécies para disponibilizar protocolos para padronizar a produção e ofertar produtos regularmente, de modo que os produtores tenham acesso.

Há falta de dados com relação à oferta e procura de plantas ornamentais nativas, mas existe uma demanda para utilização em projetos paisagísticos e que não está sendo atendida pelo setor produtivo, o que vem na contramão para a implantação de um projeto paisagístico ecológico ou de caráter regional (Heiden *et al.*, 2006).

Existem trabalhos e iniciativas para a utilização de espécies nativas arbóreas na ornamentação, mas poucas são as referências para usar plantas herbáceas para esse fim, sendo que há uma infinidade de espécies que poderiam ser utilizadas. Esse cenário configura uma oportunidade para a pesquisa em estudar espécies com potencial ornamental e paisagístico (Barroso, 2006). As espécies nativas, em geral, são mais rústicas e adaptadas do que as exóticas, demonstrando uma boa opção para uso em ornamentações, pois requerem pouca manutenção (Campos & Petry, 2009).

Países exportadores de flores, como por exemplo, a Argentina e Colômbia estão produzindo plantas ornamentais nativas com viés de paisagismo ecológico, e ao mesmo tempo estão disponibilizando essas plantas no mercado internacional (Heiden *et al.*, 2006), visto que iniciativas como essa valorizam a flora e a cultura local.

O Bioma Pampa oferece uma flora diversificada, porém essa diversidade está ameaçada com o rápido avanço da urbanização, cultivo de grandes culturas e invasão de espécies exóticas (Stumpf *et al.*, 2008). Dessa forma, há necessidade de se identificar espécies que tenham potencial ornamental e posteriormente estudá-las, como por exemplo, a *Angelonia integerrima* Sprengel, onde são necessários estudos básicos para o

conhecimento das formas de propagação e cultivo, para que esta possa ser explorada comercialmente de forma sustentável, bem como evitar o extrativismo e a posterior extinção. A partir dessas observações o objetivo geral deste trabalho é levantar informações referentes à propagação de *A. integerrima*, por via sexuada e assexuada.

### Referências bibliográficas

- BARROSO, C. M. **Propagação de espécies nativas com potencial ornamental: *Kelissa brasiliensis* (Baker) Ravenna e *Sinningia lineata* (Hjelmq.) Chautems.** 2006. 212 p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.
- BUAINAIN, A. M.; BATALHA, M. O. **Cadeias produtivas de flores e mel.** Séries Agronegócios, v. 9. 2017. Disponível em: <<http://repiica.iica.int/DOCS/B0587P/B0587P.PDF>>. Acesso em: 05 jan. 2017.
- CAMPOS, C. C. D.; PETRY, C. Propagação vegetativa e potencial paisagístico de uma verbena rasteira. **Ornamental Horticulture**, Campinas, v. 14, n. 2, p. 169-178, 21 jul. 2009.
- CARNEIRO, A. M. et al. O uso de plantas ornamentais nativas do Rio Grande do Sul. **Natureza em Revista**, Porto Alegre, p. 16-25, mar. 2016.
- IBRAFLOR - Instituto Brasileiro de Floricultura (Holambra). **O mercado de flores no Brasil.** 2017. Disponível em: <<http://www.ibraflor.com/publicacoes/vw.php?cod=235>>. Acesso em: 05 jan. 2017.
- JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, M. S. Mercado interno para os produtos da floricultura brasileira: características, tendências e importância sócio-econômica recente. **Ornamental Horticulture**, Campinas, v. 14, n. 1, p. 37-52, 8 jul. 2008.
- STUMPF, E. R. T. et al. Método para avaliação da potencialidade ornamental de flores e folhagens de corte nativas e não convencionais. **Ornamental Horticulture**, Campinas, v. 13, n. 2, p. 143-148, 13 jun. 2007.
- STUMPF, E. R. T. et al. Prospecção de plantas nativas do Bioma Pampa para uso na arte floral. **BioScriba**, [S.l.], v. 1, n. 2, p. 65-72, ago 2008.
- WEISS, D. Introduction of new flowers cut flowers: domestication of new species and introduction of new traits not found in commercial varieties. In: VAINSTEIN, A. (Ed.). **Breeding for ornamentals: classical and molecular approaches.** Dordrecht: Kluwer, 2002 p. 129-137.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 O gênero *Angelonia* e a espécie *A. integerrima* Sprengel

O gênero *Angelonia* é originário da região neotropical, que se estende do centro do México até o extremo sul da América do Sul (Boff *et al.*, 2014), atualmente são descritas aproximadamente 50 espécies (Tropicos, 2017), as quais possuem diversidade no formato e coloração da flor, que vai desde azul à violeta e de branco à pink (Gosch *et al.*, 2014).

O conhecimento de como surgiram as diferentes cultivares das mais diversas espécies do gênero *Angelonia* até o momento não está totalmente esclarecido. *Angelonia salicariifoli* Humb. et Bonpl., *Angelonia angustifolia* Benth., *Angelonia grandiflora* C. Morr. e *Angelonia integerrima* Sprengel são geralmente consideradas espécies ancestrais, por essa razão é utilizado o termo *Angelonia* x *angustifolia* aceitando como se fossem híbridos (Plaschil & Olbricht, 2008; Gosch *et al.*, 2014).

As plantas do gênero *Angelonia* são herbáceas com caule subterrâneo muito desenvolvido, perenes e pertencem à família Plantaginaceae (anteriormente Scrophulariaceae). No Brasil são encontradas 18 espécies, das quais 15 são endêmicas das cinco regiões brasileiras e verificadas nos biomas: Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal. São encontradas nos diferentes tipos de vegetação: Caatinga, Campo de Altitude, Campo Limpo, Campo Rupestre, Cerrado, Floresta de Terra Firme, Floresta Ombrófila e Restinga (Lista de Espécies da Flora do Brasil, 2017).

As flores do gênero *Angelonia* têm o cálice com cinco divisões mais ou menos profundas, corola bilabiada, quatro estames didínamos, anteras biloculares com tecas divergentes, filamentos geniculados e curtos. São zigomorfas (simetria bilateral), as quais formam um cacho racemoso e tem alto valor comercial. Possuem cinco pétalas que são fundidas na base, as anteras e o estigma estão localizados na parte superior da corola. O fruto é uma cápsula globosa e elipsoide, raramente indeiscente (Burkart, 1979; Plaschil & Olbricht, 2008). O gênero compreende espécies produtoras de óleo floral, sendo que as flores são altamente especializadas para a atração de polinizadores (Martins & Alves dos Santos, 2013).

*Angelonia integerrima* Sprengel, conhecida popularmente como violeta-do-campo, é uma planta herbácea, perene (Stumpf *et al.*, 2009) e possui distribuição ampla, podendo ser encontrada nos campos do sul do Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai; com ocorrência em áreas de campo aberto e, geralmente, em populações densas e agregadas (Martins *et al.*, 2013). As folhas são verdes, oblongas e opostas. O caule apresenta coloração bordô e a planta atinge em média 40 cm de altura. As flores possuem coloração branca à lilás claro e com alguma coloração púrpura, ficando dispostas em ramos terminais, os quais têm diferentes estágios de desenvolvimento. A floração ocorre de outubro a março. Essa espécie possui potencial ornamental, podendo ser cultivada em canteiros, floreiras e vasos e também pode ser usada como complemento de arranjos florais (Burkart, 1979; Stumpf *et al.*, 2009).

## **2.2 Propagação sexuada**

A produção de mudas via propagação sexuada, também denominada gâmica ou reprodutiva, é aquela que envolve a participação de gametas e ocorre o processo de fecundação, formação de sementes e germinação, sendo que a semente é usada para multiplicação de plantas (Kämpf, 2000; Wendling *et al.*, 2005).



Algumas vantagens da propagação sexuada: facilidade de produção para maioria das espécies, maior taxa de propagação, manutenção da maior variabilidade genética entre as plantas, sistema radicular com melhor qualidade obtido em mudas de espécies lenhosas, facilidade de transporte e armazenamento das estruturas de propagação (sementes) (Kämpf, 2000; Wendling *et al.*, 2005; Grolli, 2008).

Entretanto, a produção de mudas via sementes apresenta algumas desvantagens, como por exemplo: dificuldade de obtenção de sementes para determinadas espécies e que sejam de qualidade; necessidade de conhecer a época de maturação para coleta de sementes; dificuldade de armazenamento e germinação de algumas espécies, sendo que este é um processo delicado e tecnicamente exigente, variando muito de espécie para espécie; obtenção de mudas com características (flores, folhas e frutos) diferentes da planta matriz e cujo aumento da variabilidade pode não ser desejável para a produção comercial; plantas podem apresentar sementes inviáveis ou não gerarem sementes; a deficiência de informações sobre a pureza e a taxa de germinação das sementes (Kämpf, 2000; Wendling *et al.*, 2005; Fraga, 2007; Grolli, 2008).

O conhecimento da tecnologia de sementes está basicamente restrito às grandes culturas, então é preciso fazer adaptações dos métodos para que os mesmos possam ser empregados em sementes nativas. É importante que estes métodos levem em consideração a heterogeneidade das sementes, devido a grande variabilidade genética existente, como uma resposta a forma de adaptação e sobrevivência das espécies (Barroso, 2006).

Como são raros os estudos sobre a viabilidade das sementes de espécies nativas, bem como seu poder germinativo, é importante que sejam realizados estudos sobre a reprodução sexuada dessas espécies. É de suma importância dispor de informações sobre as exigências

requeridas para a germinação, no que se refere às condições ideais de luz, temperatura, umidade e substrato (Barroso, 2006). No caso específico da *Angelonia integerrima*, não foram encontradas informações disponíveis na literatura sobre a propagação por sementes da espécie, sendo esta uma demanda que pode ser atendida pela pesquisa.

### **2.3 Propagação assexuada**

A propagação assexuada, também chamada de agâmica ou vegetativa, consiste na multiplicação de plantas pelo processo que não envolve gametas, mas a partir da potencialidade da célula de regenerar uma planta. Como por exemplo, porções de caule podem regenerar raízes; de folhas regeneram raízes e caules; de raízes regeneram as gemas (Barbosa & Lopes, 2007).

A obtenção de mudas por via assexuada tem como vantagens a possibilidade de obtenção de indivíduos idênticos às características fenotípicas da planta-matriz (Kämpf, 2000; Wendling, 2005). Também, há maior rapidez na produção de mudas, maior precocidade das plantas produzidas, eventual fixação de variações somáticas desejáveis (Kämpf, 2000; Grolli, 2008) e possibilidade de aproveitamento de restos de podas e de propagação de plantas que não produzem sementes viáveis (Fraga, 2007). Já, como aspectos negativos, há a necessidade de manutenção das plantas matrizes que necessitam de espaço e manejo adequados; a taxa de multiplicação é menor; há maior risco de transmissão de doenças vasculares, bacterianas e viroses (por exemplo, patógenos em estacas contaminadas são transmitidos para as mudas) (Kämpf, 2000; Fraga, 2007; Grolli, 2008).

#### **2.3.1 Estaquia**

A estaquia é um método de propagação que utiliza pequenas porções dos caules, folhas ou raízes, os quais são expostos a condições que favorecem o enraizamento. Podem ser utilizados leitos de enraizamento, câmaras de nebulização (Barbosa & Lopes, 2007).

O enraizamento é afetado por diversos fatores: características genéticas da espécie, condições à que os tecidos são expostos; fase de desenvolvimento da planta ou época do ano, sendo que a fase vegetativa é a mais indicada, já que na fase reprodutiva as reservas são direcionadas para a floração e reprodução; estacas com folhas enraízam mais rapidamente, pois as mesmas são responsáveis pela produção de carboidratos e síntese de co-fatores de enraizamento; presença de gemas laterais sintetizam auxinas que auxiliam no enraizamento; estado nutricional das plantas matrizes tem relação com a quantidade de reservas das estacas; hormônios como auxina e etileno são promotores do enraizamento, sendo que o ácido indolbutírico (AIB) é muito utilizado para espécies que tem dificuldade de enraizar (Barbosa & Lopes, 2007).

Os fatores ambientais também afetam o enraizamento. A temperatura ideal do meio é de aproximadamente 27°C e a do ar em torno de 23°C; a umidade é muito importante, principalmente em estacas herbáceas com folhas, por estas apresentarem alto teor de água nos tecidos, qualquer falta de água provoca desidratação e, conseqüentemente, compromete o enraizamento (Barbosa & Lopes, 2007).

Nas estacas herbáceas, os meristemas primários e secundários estão bem ativos, por isso, quando submetidas a condições adequadas, enraízam com facilidade. É importante que as estacas sejam retiradas de plantas matrizes saudáveis e bem nutridas. O enraizamento leva de 10 a 14 dias, variando entre espécies. Depois de enraizadas, as estacas devem ser retiradas imediatamente da câmara de nebulização para evitar o surgimento de doenças e crescimento excessivo do sistema radicular (Barbosa & Lopes, 2007).

O enraizamento das estacas é um fenômeno controlado geneticamente e requer a presença de auxina, que através das células meristemáticas localizadas próximo ao cilindro

vascular, induz a formação dos primórdios radiculares. Muitas vezes ocorre um desbalanço nos níveis naturais desse hormônio, por isso se faz necessário o uso de reguladores exógenos à planta, como por exemplo, o ácido indolbutírico (AIB) e o ácido naftalenoacético (ANA) (Paiva *et al.*, 2005).

Estacas mais jovens apresentam maiores concentrações de auxina natural, por isso pode-se fornecer menor quantidade exógena de reguladores para induzir o processo de enraizamento. A poda pode ser utilizada como uma forma de rejuvenescimento, a fim de obter estacas mais novas, pois ocorre o processo de desdiferenciação com a formação de gemas (Neves *et al.*, 2006).

Muitas espécies podem não apresentar diferenças significativas com relação à porcentagem de enraizamento com ou sem a utilização de reguladores, porém os mesmos podem afetar positivamente a qualidade do sistema radicular (Fachinello *et al.*, 2005) que terá relação direta com o desenvolvimento das mudas, bem como a sobrevivência das mesmas no momento do transplante (Lima & Ohashi, 2016), conseqüentemente apresentando crescimento mais rápido e vigoroso (Reis *et al.*, 2000).

### **2.3.2 Micropropagação ou propagação *in vitro***

A propagação *in vitro* é a técnica de cultura de tecidos e órgãos vegetais que consiste em cultivar de forma asséptica partes da planta (explantes) em meio de cultura, que contém substâncias para suprir as suas necessidades, bem como condições adequadas de luz, temperatura e fotoperíodo permitindo gerar novos indivíduos (Mantovani *et al.*, 2008). Esta é uma alternativa viável para a multiplicação de espécies que tem dificuldade de produção e obtenção de sementes viáveis ou quando os métodos tradicionais de propagação não são efetivos (Mantovani *et al.*, 2008), bem como para alcançar a limpeza clonal (Carvalho & Vidal, 2003), ou seja, a obtenção de mudas isentas de microorganismos, mesmo utilizando

uma planta matriz infectada. Essa técnica pode contribuir para a produção de clones em ambiente asséptico e obtenção de germoplasma livre de patógenos, bem como prover material para a manipulação genética das plantas (Cassells, 2002).

A técnica da micropropagação foi utilizada de forma comercial pela primeira vez em 1960 por Morel, que multiplicou orquídeas através da cultura de ápices caulinares e regeneração de protocormos (diminutas estruturas globulares que se diferenciam e dão origem aos embriões), o que acelerou a propagação de orquídeas (Grattapaglia & Machado, 1998).

A micropropagação é utilizada comercialmente em diversos países do mundo, sendo que a maioria dos laboratórios comerciais surgiu junto com os viveiros das companhias produtoras de mudas. Essas empresas visam à obtenção de material propagativo livre de doenças ou como alternativa para acelerar a propagação vegetativa convencional (Grattapaglia & Machado, 1998).

A propagação *in vitro* é uma técnica eficiente para a obtenção de mudas idênticas à planta matriz (Mantovani *et al.*, 2008). É muito empregada para a limpeza clonal e multiplicação de espécies ornamentais herbáceas e arbustivas, com menor destaque para as lenhosas (Grattapaglia & Machado, 1998).

Para muitas espécies exóticas que estão difundidas comercialmente, como orquídeas, antúrios, gérbereas e lírios, por exemplo, há diversos protocolos consagrados no cultivo *in vitro*, disponíveis na literatura (Segeren, 2011). Já para as espécies nativas, diversos trabalhos estão sendo realizados com o intuito de estabelecer protocolos de multiplicação, um exemplo é a *Glandularia perakii* Cov. Et Schn. (Verbenaceae) (Marino *et al.*, 2003) através do estabelecimento de brotos *in vitro*. As mais diversas espécies do gênero *Angelonia*

também são exemplos de plantas nativas da América, as quais são micropropagadas, como por exemplo, segmentos nodais de *Angelonia salicariifolia* foram cultivados *in vitro* (Datta & Datta, 1984).

Os explantes mais indicados para serem utilizados na propagação *in vitro* são os ápices caulinares, gemas axilares e meristemas isolados. Essas estruturas, quando expostas a condições nutricionais adequadas, desenvolvem-se em plantas, isso se deve ao fato dessas estruturas serem determinadas ao crescimento vegetativo (Grattapaglia & Machado, 1998).

Para que se tenha sucesso na micropropagação é necessário considerar o controle de diversos fatores, sendo que a formulação do meio de cultura é um fator determinante para se obter êxito na atividade (Grattapaglia & Machado, 1998). Dessa forma cada espécie necessita basicamente de um protocolo para cada etapa do processo, que consiste na desinfestação do material e meios específicos para multiplicação e enraizamento (Diniz *et al.*, 2008).

O setor de floricultura atende mercados exigentes que requerem produtos de alta qualidade, sendo que os mesmos devem ser desenvolvidos e produzidos num curto período de tempo para que sejam competitivos, o que justifica o uso da micropropagação (Mantovani *et al.*, 2008). Neste setor predominam basicamente variedades híbridas, sendo que a clonagem *in vitro* de matrizes selecionadas permite a padronização de características desejáveis como: floração, coloração, tamanho e forma das flores (Fuzitani & Nomura, 2004).

O setor que mais demanda a técnica de micropropagação é a floricultura, devido à necessidade de produzir um grande número de plantas numa área pequena e por um período de tempo relativamente curto. As plantas são homogêneas com alto padrão genético e livres

de doenças. Permite a multiplicação de espécies que não se propagam facilmente por métodos convencionais; usada para a conservação de germoplasma; viabiliza a multiplicação de híbridos mantendo as características; possibilita a produção de mudas durante todo o ano; serve de apoio a programas de melhoramento, pois propicia uma rápida multiplicação das plantas selecionadas; o manuseio e o transporte são facilitados e tem custo reduzido; indução de mutações para obtenção de variedades distintas; resgate de embriões imaturos obtidos através de hibridações interespecíficas que darão origem a novos híbridos (Grattapaglia & Machado, 1998; Fuzitani & Nomura, 2004; Paiva *et al.*, 2005; Mantovani *et al.*, 2008; Segeren, 2011).

O manejo da planta-matriz é de suma importância, sendo que o estado fisiológico tem grande influência. A planta não deve apresentar sintomas de deficiência nutricional ou hídrica, dessa forma os explantes terão melhor qualidade. Também é importante observar a fase de crescimento em que a planta se encontra, o ideal é retirar os explantes de brotações novas, as quais são formadas durante o crescimento ativo da planta. A seleção dos mesmos vai depender da finalidade da micropropagação, mas o que se quer é material que tenha maior quantidade de tecido meristemático. Em plantas herbáceas as gemas apicais tem maior potencial de crescimento, quando comparadas com as gemas axilares. No campo, a planta está exposta a intempéries e pragas, por isso é indicada a manutenção da planta-matriz num ambiente mais limpo, como por exemplo, numa casa de vegetação ou câmara de crescimento. O cultivo das plantas em vasos com substrato esterilizado, sobre bancadas e com sistema de irrigação por gotejamento, são algumas medidas preventivas que podem auxiliar na manutenção da sanidade. Além de maior controle nos tratos fitossanitários e nutricionais, o cultivo da planta-matriz em ambiente protegido também auxilia no controle e na manipulação do fotoperíodo, da luminosidade e da temperatura, o que contribui para a

obtenção de novas brotações em épocas do ano em que muitas vezes se teria dificuldade de obter material a campo (Grattapaglia & Machado, 1998).

O uso de reguladores de crescimento é opcional, sendo que na fase de estabelecimento não é necessário, porém para algumas espécies o uso de citocininas e auxinas, quando utilizadas em baixas concentrações favorecem o crescimento e desenvolvimento dos ápices caulinares (Nehra & Kartha, 1998). Já após o estabelecimento da cultura, na fase de multiplicação, a necessidade de adicionar uma citocinina sintética ao meio é de fundamental importância, sendo que a benzilaminopurina (BAP) é a mais utilizada (Nehra & Kartha, 1998).

O enraizamento *in vitro* tem relação com os níveis endógenos de auxina, meio de cultura e presença de reguladores de crescimento (Souza e Pereira, 2007). Por isso, nessa fase também pode se fazer uso de reguladores, sendo que o ácido indolbutírico (AIB) é o que mais favorece o aparecimento de raízes adventícias, tanto em estacas como em explantes *in vitro*, por apresentar maior estabilidade na solução quando comparado ao ácido indolacético (AIA) (Lemos, 2014).

O cultivo *in vitro* pode ser uma alternativa também para germinação de sementes, sendo utilizado principalmente para espécies que produzem poucas sementes e que são de difícil estabelecimento *in vitro*, muitas vezes por demandarem protocolos específicos. O estabelecimento da cultura no meio asséptico constitui a fase mais crítica da micropropagação. A desinfestação das sementes deve ser eficaz de modo que ocorra a remoção de agentes que causam contaminações *in vitro* (Fermino Junior *et al.*, 2009; Effegem *et al.*, 2014).

A germinação de sementes *in vitro* é uma técnica utilizada para as mais diversas espécies, dentre elas medicinais como a *Calendula officinalis* L. (Victório & Lage, 2009),



de florestais como a teca (*Tectona grandis* L. f.) (Fermino Junior *et al.*, 2009) e bracatinga (*Mimosa sacabrella* Benth.) (Rosa *et al.*, 2012), de plantas comestíveis como a pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) (Effegem *et al.*, 2014) e a alcachofra (*Cynara cardunculus* subsp. *scolymus* (L.) Fiori) (Moraes *et al.*, 2010), de plantas nativas com potencial ornamental como a rainha-do-abismo (*Sinningia leucotricha* (Hoehne) Moore) (Unemoto *et al.*, 2006) e *Syngonanthus elegans* (Bong.) Ruhland (Pêgo *et al.*, 2014), estes são alguns exemplos de espécies descritas na literatura.

Diversos são os trabalhos realizados com propagação de sementes *in vitro*, a alcachofra (*Cynara cardunculus* subs. *scolymu*) é um exemplo, pois essa espécie apresenta alta taxa de contaminação e baixa taxa de multiplicação *in vitro* (Moraes *et al.*, 2010). Essa tecnologia também está sendo utilizada para espécies nativas ameaçadas de extinção como a rainha-do-abismo (*Sinningia leucotricha*), pois é possível produzir plantas em larga escala num período de tempo reduzido (Unemoto *et al.*, 2006).

O desenvolvimento de técnicas de propagação de plantas nativas é de suma importância para a manutenção da biodiversidade, pois dessa forma evita o extrativismo insustentável e a extinção de espécies (Barroso *et al.*, 2007). Além disso, o estabelecimento de protocolos específicos facilita alguns processos de domesticação, melhoramento e, posterior propagação de genótipos de interesse (Pêgo *et al.*, 2014). *Angelonia integerrima* Sprengel é um exemplo de espécie que precisa ser estudada para conhecer as formas de propagação, de modo que seja explorada comercialmente de forma sustentável e evitar a sua extinção.

## **2.4 Substratos**

Outro fator determinante para o sucesso na obtenção de mudas, sejam elas oriundas por via sexuada ou assexuada, e para a aclimatização *ex vitro* é a composição do substrato,

o qual tem fundamental importância no crescimento e desenvolvimento das plantas. Diversos materiais podem ser empregados como componentes de substratos, podendo ser naturais ou sintéticos, minerais ou orgânicos (Kämpf, 2000).

Para a produção de mudas em sementeiras, os materiais mais utilizados na composição das misturas ou mesmo de substratos comerciais são: turfas, casca de arroz carbonizada, vermiculita, perlita e compostos orgânicos como, por exemplo, casca de árvores compostadas (Kämpf, 2000; Fermino & Bellé, 2008).

Já para o enraizamento de estacas o substrato deve ter elevada porosidade e baixa retenção de água, visto que o enraizamento das mesmas é feito sob nebulização, ou seja, num ambiente com alta umidade. Os materiais mais utilizados são casca de arroz carbonizada, vermiculita e areia (Kämpf, 2000; Fermino & Bellé, 2008).

Para a produção de mudas de *Zinnia elegans* Zacq., utilizando substratos à base de resíduos agroindustriais e agropecuários em bandejas plásticas com células de diferentes volumes (228, 150 e 126 células), Sousa *et al.* (2011) observaram que a porcentagem de germinação para todos os substratos e bandejas foi semelhante.

Para a aclimatização de plântulas oriundas de semeadura *in vitro* de *Arundina graminifolia* “alba” (orquídea bambu), Zandoná *et al.* (2014) testaram substratos alternativos ao esfagno. Foram utilizados a casca de arroz carbonizada, casca de arroz carbonizada + fibra de coco (1:1 v/v), esfagno + casca de arroz carbonizada (1:1 v/v) e somente esfagno. Foram observados valores elevados de sobrevivência (80%) e de número de folhas (4,3) nas plantas cultivadas em casca de arroz carbonizada + fibra de coco (1:1 v/v), sendo esta mistura uma boa alternativa para substituir o esfagno.

Na aclimatização de mudas de violeta africana (*Saintpaulia ionantha* Wendl), os autores testaram nove composições de substratos (pó de coco seco, Plantagro®, Bioplant®, vermiculita, palha de carnaúba, pó de coco verde, palha de carnaúba + pó de coco verde 1:1 v/v, pó de coco verde + casca de arroz 3:1 v/v e palha de carnaúba + pó de coco seco + casca de arroz 1,5:1,5:1). Os resultados superiores foram obtidos nos substratos comerciais Plantagro® e Bioplant®, seguidos dos substratos pó de coco seco e vermiculita para todas as variáveis analisadas (matéria fresca e seca da parte aérea e raiz, número de folhas e nutrientes totais da parte aérea) (Terceiro Neto *et al.* 2004).

Dessa forma a escolha de um substrato adequado é de fundamental importância, para que o mesmo atenda às demandas da espécie, seja durante a fase de germinação de sementes, na formação de raízes em estacas ou na aclimatização de mudas *ex vitro*.

## 2.5 Referências bibliográficas

BARBOSA, J. C.; LOPES, L. C. **Propagação de plantas ornamentais**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2007.

BARROSO, C. M. **Propagação de espécies nativas com potencial ornamental: *Kelissa brasiliensis* (Baker) Ravenna e *Sinningia lineata* (Hjelmq.) Chautems**. 2006. 212 p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

BARROSO, C. M. et al. B. Considerações sobre a propagação e o uso ornamental de plantas raras ou ameaçadas de extinção no Rio Grande do Sul. **Revista brasileira de horticultura ornamental**, Campinas, v. 13, n. 2, p. 91-94, 2007.

BOFF, S. et al. Perfume production in flowers of *Angelonia salicariifolia* attracts males of *Euglossa annectans* which do not promote pollination. **Apidologie**, Paris, v. 46, n. 1, p. 84-91, 18 jul. 2014.

BURKART, A. Parte V: Dicotiledoneas Metaclamideas. In: FLORA Ilustrada de Entre Rios (Argentina). Buenos Aires, 1979. Tomo VI, parte 5ª, p. 481-484.

CARVALHO, J. M. F. C.; VIDAL, M. S. **Noções de Cultivo de tecidos Vegetais**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2003. (Documentos 116).

CASSELLS, A. C. Tissue culture for ornamental breeding. In: VAINSTEIN, A. (Ed.). **Breeding for ornamentals: classical and molecular approaches**. Dordrecht: Springer, 2002. p. 139-153.

DATTA, K.; DATTA, S. K. Rapid clonal multiplication of *Angelonia salicariifolia* through tissue culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 3, n. 3, p. 215-220, 1984.

DINIZ, J. D. N. et al. Protocolo para desinfestação, multiplicação e enraizamento *in vitro* de *Spathiphyllum wallisi*. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 39, n. 1, p. 107-113, 12 nov. 2008.

EFFEGEM, C. et al. Desinfestação e germinação *in vitro* de sementes de pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.). **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 10, n. 18, p. 1221-1228, 2014.

FACHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. C. **Propagação de plantas frutíferas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. 221 p.

FERMINO JUNIOR, P. C. P.; NAGAO, E. O.; PEREIRA, J. E. S. Estabelecimento, germinação e multiplicação *in vitro* de teca (*Tectona grandis* L.f.) a partir de genótipos da Amazônia Sul-Occidental. **Scientia Florestalis**, Piracicaba, v. 37, n. 84, p. 427-435, dez. 2009.

FERMINO, M. H.; BELLÉ, S. Substrato para plantas. In: PETRY, C. (Org.). **Plantas ornamentais - aspectos para a produção**. 2 ed. Passo Fundo: Universidade de Passo Fundo, 2008. p. 46-58.

FRAGA, S. V. de. **Floricultura, jardinagem e plantas ornamentais**. 2 ed. Porto Alegre: Imprensa Livre, 2007. 136 p.

FUZITANI, E. J.; NOMURA, E. S. Produção de mudas *in vitro*. **Ornamental Horticulture**, Campinas, v. 10, n. 1, p.15-19, 4 jun. 2004.

GOSCH, C et al. Isolation of dihydroflavonol 4-reductase cDNA clones from *Angelonia x angustifolia* and heterologous expression as GST fusion protein in *Escherichia coli*. **PLOS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 9, p. e107755, 19 set. 2014.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa – SPI/Embrapa – CNPH, 1998. 2 v. p. 183-260.

GROLLI, P. R. Propagação de plantas ornamentais. In: PETRY, C. (Org.). **Plantas ornamentais - aspectos para a produção**. 2 ed. Passo Fundo: Universidade de Passo Fundo, 2008. p. 59-69.

KÄMPF, A. N. **Produção comercial de plantas ornamentais**. Guaíba: Agropecuária, 2000. 254 p.

- LEMOS, E. E. P. de. Organogênese. In: CID, L. P. B. (Editor técnico) **Cultivo *in vitro* de plantas**. 3. ed. ampl. Brasília, DF: Embrapa, 2014, 325 p.
- LIMA, C. C. L.; OHASHI, S. T. Substratos no enraizamento de estacas provenientes de mudas de *Schizolobium parahyba* var. *amazonicum*. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 13, n. 23, p. 1270-1282, 2016.
- LISTA de espécies da flora do Brasil. Rio de Janeiro, 2017. Disponível em <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>; Acesso em 05 jan. 2017.
- MANTOVANI, N. et al. Micropropagação de plantas ornamentais. In: PETRY, C. (Org.). **Plantas ornamentais - aspectos para a produção**. 2 ed. Passo Fundo: Universidade de Passo Fundo, 2008. p. 70-91.
- MARINO, C. et al. Micropropagation of *Glandularia perakii* Cov. et Schn. (Verbenaceae): a native species with ornamental potential. **Biocell**, Mendoza, v. 27, n. 1, p. 57-60, abr. 2003.
- MARTINS, A. C.; AGUIAR, A. J. C.; ALVES-DOS-SANTOS, I. Interaction between oil-collecting bees and seven species of Plantaginaceae. **Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, [S.l.], v. 208, n. 7, p. 401-411, jul. 2013.
- MARTINS, A. C.; ALVES-DOS-SANTOS, I. Floral-oil-producing Plantaginaceae species: geographical distribution, pollinator rewards and interactions with oil-collecting bees. **Biota Neotropica**, Campinas, v. 13, n. 4, p. 77-89, dez. 2013.
- MORAES, C. F. et al. Germinação *in vitro* de sementes de alcachofra. **Horticultura Brasileira**, Campinas, v. 28, n. 1, p. 64-69, mar. 2010.
- NEHRA, N. S.; KARTHA, K. Meristem and shoot tip culture: requirements and applications. IN: VASIL, I. K.; THORPE, T. A.(Ed.). **Plant cell and Tissue Culture**. Dordrecht: Kluwer, c1994. p. 37-70.
- NEVES, T. S. ; et al. A. Enraizamento de corticeira-da-serra em função do tipo de estaca e variações sazonais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 12, p. 1699-1705, dez. 2006.
- PAIVA, R. et al. Aspectos fisiológicos da produção de flores e plantas ornamentais. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 26, n. 227, p. 73-84, 2005.
- PÊGO, R. G.; PAIVA, P. D. de O.; PAIVA, R. Micropropagation Protocol for *Syngonanthus elegans* (Bong.) Ruhland: An Ornamental Species. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 36, n. 3, p. 347-353, 7 jul. 2014.
- PLASCHIL, S.; OLBRICHT, K. Histogenetic Variation in Flowers of *Angelonia* Humb. et Bonpl. **Journal of Applied Botany and Food Quality**, [S.l.], v. 82, n. 1, p. 41-46, 28 nov. 2008.

- REIS, D. J. et al. Efeito do estiolamento e do ácido indolbutírico no enraizamento de estacas do porta-enxerto *Pyrus calleryana* Dcne. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n. 4, p. 931-938, out./dez. 2000.
- ROSA, F. C. et al. Superação da dormência e germinação *in vitro* de sementes de bracatina (*Mimosa scabrella* Benth). **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 3, p. 1021-1026, 28 jun. 2012.
- SEGEREN, M. I. Micropropagação *in vitro* de flores e plantas ornamentais. In: GERALD, L. T. S. (Org.). **Biofábrica de plantas: Produção industrial de plantas *in vitro***. São Paulo: Antiqua, 2011. p. 134-147.
- SOUSA, H. H. F. et al. Produção de mudas de *Zinia elegans* em substratos à base de resíduos agroindustriais e agropecuários em diferentes tamanhos de recipientes. **Ornamental Horticulture**, Campinas, v. 17, n. 2, p. 115-120, 25 out. 2011.
- SOUZA, A. V.; PEREIRA, A. M. S. Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 9, n. 4, p. 103-116, 1 nov. 2007.
- STUMPF, E. R. T.; BARBIERI, R. L.; HEIDEN, G. **Cores e formas no Bioma Pampa: plantas ornamentais nativas**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2009. 276 p.
- TERCEIRO NETO, C. P. C. et al. Efeito de diferentes substratos na aclimatização “*ex vitro*” de mudas de Violeta Africana (*Saintpaulia ionantha* Wendl). **Revista de Biologia e Ciência da Terra**, São Cristovão, v. 4, n. 2, 2004.
- TROPICOS. **Missouri Botanical Garden**. St. Louis, 2017. Disponível em <<http://www.tropicos.org/NameSearch.aspx?name=Angelonia&commonname>>; Acesso em 05 jan. 2017.
- UNEMOTO, L. K. et al. Estabelecimento de um protocolo para a propagação *in vitro* de rainha-do-abismo, *Sinningia leucotricha* (Hoehne) Moore- (Gesneriaceae) **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 28, n. 4, p. 503-506, 28 fev. 2006.
- VICTÓRIO, C. P.; LAGE, C. L. S. Germinação e desenvolvimento pós-germinativo *in vitro* de *Calendula officinalis* L. sob diferentes qualidades de luz. **BioFar Revista de Biologia e Farmácia**, [S.l.], v. 3, n. 1, p. 81-87, 2009.
- WENDLING, I.; PAIVA, H. N. de; GONÇALVES, W. **Técnicas de produção de mudas de plantas ornamentais**. Viçosa: Aprenda Fácil, 2005. 223 p.
- ZANDONÁ, A. P.; FARIA, R. T. de; LONE, A. B.; HOSHINO, R. T. Substratos alternativos ao esfagno na aclimatização de plântulas de *Arundina graminifolia* “alba” (Orchidaceae). **Ornamental Horticulture**, Campinas, v. 20, n. 1, p. 7-12, 21 set. 2014.

### **3 ARTIGO 1**

## **PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE *Angelonia integerrima* SPRENGEL<sup>1</sup>**

---

<sup>1</sup> Artigo formatado segundo as normas da Revista Rodriguésia

## PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE *Angelonia integerrima* SPRENGEL

### RESUMO

Com o objetivo de propagar a *Angelonia integerrima* foram desenvolvidos estudos de modo a gerar informações para a produção de mudas *in vitro*. Foram conduzidos quatro experimentos: a) germinação de sementes armazenadas em dois locais (ambiente refrigerado e bancada de laboratório) e concentrações de sais (100, 75 e 50%) do meio Murashige e Skoog (MS); b) multiplicação com benzilaminopurina (BAP) (0,0, 0,5 e 1,0 mg L<sup>-1</sup>) e ácido naftalenoacético (ANA) (0,0, 0,1 e 0,5 mg L<sup>-1</sup>); c) enraizamento *in vitro* com ácido indolbutírico (AIB) (0; 0,25; 0,50; 0,75 e 1,0 mg. L<sup>-1</sup>), e, d) aclimatização das mudas. As sementes armazenadas sob ambiente refrigerado apresentaram maior porcentagem de germinação, índice de velocidade de germinação (IVG) e de plântulas formadas. A germinação não foi afetada pela concentração de sais do meio, podendo-se utilizar a menor concentração. Para a multiplicação, houve interação entre as concentrações de BAP e ANA, recomendando-se utilizar 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ANA. No enraizamento, ajustou-se uma equação quadrática para as variáveis: porcentagem de formação de calo e enraizamento, sendo que a concentração de 0,83 mg L<sup>-1</sup> é o ponto de máxima resposta para a porcentagem de enraizamento. A espécie apresentou 50,8% de aclimatização.

**Palavras-chave:** Produção de mudas; Bioma Pampa, germinação, micropropagação, ornamental nativa, Plantaginaceae.

## *IN VITRO* PROPAGATION OF *Angelonia integerrima* SPRENGEL

### ABSTRACT

In order to propagate *Angelonia integerrima*, studies have been developed to generate information for the *in vitro* production of seedlings. Four experiments were conducted: a) germination of seeds stored at two locations (refrigerated environment and laboratory bench) and different salt concentrations (100, 75 and 50%) in a Murashige and Skoog (MS) medium; b) multiplication using benzylaminopurine (BAP) (0.0, 0.5 and 1.0 mg L<sup>-1</sup>) and naphthalene acetic acid (NAA) (0.0, 0.1 and 0.5 mg L<sup>-1</sup>); c) *in vitro* rooting using indole-3-butyric acid (IBA) (0, 0.25, 0.50, 0.75 and 1.0 mg L<sup>-1</sup>); and d) acclimatization of seedlings. Seeds stored at refrigerated environment showed higher germination percentages, germination speed indexes (GSI) and plantlets formed. Germination was not affected by the concentration of salts in the medium and can be used at low concentrations. For multiplication, there was an interaction between BAP and NAA. 1.0 mg L<sup>-1</sup> of BAP and 0.1 mg L<sup>-1</sup> of NAA are recommended. For rooting, a quadratic equation was adjusted for the variables percentage of callus formation and rooting. The concentration 0.83 mg L<sup>-1</sup> results in the maximum response point for rooting. The species presented 50.8% of acclimatization.

**Key words:** Production of seedlings; Pampa biome, germination, micropropagation, native ornamental, Plantaginaceae.



## INTRODUÇÃO

O gênero *Angelonia* ocorre em toda região Neotropical que vai do México ao sul do Brasil (Boff *et al.*, 2014), mas com registros principalmente na América do Sul (Martins *et al.*, 2014). *Angelonia* spp. pertencem à família Plantaginaceae, e compreendem espécies produtoras de óleo floral, sendo que as flores são altamente especializadas para a atração de polinizadores (Martins & Alves dos Santos, 2013). As flores possuem corola tubular com coloração que varia entre azul, violeta, branco e pink, com anteras e estigma localizados na parte superior da corola, e o fruto é uma cápsula globosa e elipsoide, raramente indeiscente (Burkart, 1979; Plaschil & Olbricht, 2008; Gosch *et al.*, 2014).

*Angelonia integerrima* Sprengel, popularmente conhecida por violeta-do-campo ou simplesmente angelônia, é uma espécie herbácea e perene, podendo ser encontrada em afloramentos rochosos e campos pedregosos. Apresenta folhas oblongas e opostas, com caule de coloração bordô, atingindo, em média, 40 cm de altura. As flores se encontram em racemos bem definidos, apresentando coloração branca a lilás claro, com alguma coloração púrpura, sendo que o florescimento ocorre de outubro a março (Burkart, 1979; Stumpf *et al.*, 2009).

A espécie possui distribuição ampla, podendo ser encontrada nos campos do sul do Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai; com ocorrência em áreas de campo aberto e geralmente em populações densas e agregadas (Martins *et al.*, 2013). Possui potencial ornamental, podendo ser cultivada em canteiros, floreiras e vasos, bem como pode ser utilizada em arranjos florais (Stumpf *et al.*, 2009). *A. integerrima* é uma espécie que tem potencial para ser propagada por sementes e/ou vegetativamente, porém são necessários estudos nessa área, a fim de definir protocolos adequados para que se obtenha êxito, sendo

que a propagação clonal *in vitro* é uma técnica eficiente para a obtenção de lotes homogêneos de mudas (Fior *et al.*, 2000).

A propagação *in vitro* é a técnica de cultura de tecidos e órgãos vegetais que consiste em cultivar de forma asséptica partes da planta (explantes) em meio de cultura, que contém substâncias para suprir as suas necessidades, bem como condições adequadas de luz, temperatura e fotoperíodo (Mantovani *et al.*, 2008). Esta é uma alternativa viável para a multiplicação de espécies que têm dificuldade de obtenção de sementes viáveis ou quando os métodos tradicionais de propagação não são efetivos (Mantovani *et al.* 2008), bem como para fazer a limpeza clonal (Carvalho & Vidal, 2003). Essa técnica pode contribuir para a produção de clones em ambiente asséptico e obtenção de germoplasma livre de patógenos, bem como prover material para a manipulação genética das plantas (Cassells, 2002).

A micropropagação apresenta como principal vantagem a preservação da identidade genética desejável aos clones, sendo possível, num pequeno espaço, obter um grande número de plantas com alta qualidade sanitária (Guerra *et al.*, 1999). Nesse sentido, faz-se necessário testar métodos, a fim de adaptar protocolos que possibilitem a propagação de cada espécie, otimizando a produção de mudas saudáveis em larga escala, com sanidade e identidade genética garantidas.

O desenvolvimento de técnicas de propagação de plantas nativas é de suma importância para auxiliar na conservação da biodiversidade, pois dessa forma evita-se o extrativismo insustentável e a extinção de espécies (Barroso *et al.*, 2007). Além disso, o estabelecimento de protocolos específicos facilita alguns processos de domesticação, melhoramento e, posterior propagação de genótipos de interesse (Pêgo *et al.*, 2014). *Angelonia integerrima* Sprengel é um exemplo de espécie que precisa ser estudada para

conhecer as formas de propagação, de modo que seja explorada comercialmente de maneira sustentável e evitar a sua extinção.

No setor de floricultura, predominam basicamente variedades híbridas, sendo que a clonagem *in vitro* de matrizes selecionadas permite a padronização de características desejáveis como: floração, coloração, tamanho e forma das flores (Fuzitani & Nomura, 2004). Cada espécie necessita basicamente de um protocolo para cada etapa do processo, que consiste principalmente na desinfestação do material, estabelecimento *in vitro* e utilização de meios específicos para multiplicação e enraizamento (Diniz *et al.*, 2008).

Para muitas espécies exóticas difundidas comercialmente, como orquídeas, antúrios, gérberras e lírios, por exemplo, já há a disposição diversos protocolos que estão consagrados no cultivo *in vitro* (Segeren, 2011). Já para as espécies nativas, diversos trabalhos são realizados com o intuito de estabelecer protocolos de multiplicação (Marino *et al.*, 2003).

O cultivo *in vitro* pode ser uma alternativa também para germinação de sementes e posterior multiplicação das plântulas, principalmente para espécies que produzem poucas sementes (Fermino Junior *et al.*, 2009). Também pode ser utilizado para espécies que têm dificuldade de germinarem em sistemas convencionais, como por exemplo em substrato, como é o caso da espécie objeto desse estudo. O estabelecimento da cultura no meio asséptico constitui a fase mais crítica da micropropagação, sendo que o processo de desinfestação deve ser eficaz de modo que ocorra a remoção de agentes que causam contaminações *in vitro* (Effegem *et al.*, 2014).

A germinação de sementes *in vitro* é uma técnica utilizada para as mais diversas espécies, dentre elas medicinais, como a *Calendula officinalis* (Victório & Lage, 2009), a alcachofra (*Cynara cardunculus* subs. *scolymu*) (Moraes *et al.*, 2010) e a chia (*Salvia hispanica*) (Arfux *et al.*, 2015); de florestais, como a teca (*Tectona grandis*) (Fermino Junior

*et al.*, 2009) e a bracatinga (*Mimosa sacabrella*) (Rosa *et al.*, 2012); de plantas comestíveis como a pimenta-do-reino (*Piper nigrum*) (Effegem *et al.*, 2014); de plantas nativas com potencial ornamental como a *Aechmea blanchetiana* e a *Aechmea distichantha* (Santa-Rosa *et al.*, 2013), sendo estes alguns exemplos descritos na literatura.

A germinação *in vitro* também está sendo utilizada para espécies nativas ameaçadas de extinção como a rainha-do-abismo (*Sinningia leucotricha*) (Unemoto *et al.*, 2006) e a massaranduba (*Persea willdenovii* Kosterm.) (Fior *et al.*, 2007), pois é possível produzir plantas em larga escala num período de tempo reduzido. Para a maioria das espécies, o primeiro passo para um programa de melhoramento é estabelecer um protocolo de micropropagação, fato esse que coloca a cultura de tecidos como uma importante ferramenta biotecnológica (Alderete *et al.*, 2006).

A fim de propagar a *Angelonia integerrima*, através da cultura de tecidos, foram desenvolvidos estudos com o objetivo de gerar informações para produção de mudas *in vitro*.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Os estudos foram conduzidos no laboratório de Biotecnologia do Departamento de Horticultura e Silvicultura da Faculdade de Agronomia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

Sementes de *Angelonia integerrima* foram coletadas em área de vegetação nativa, localizada no município de Barão do Triunfo, RS (30° 18' S, 51° 50' W) em fevereiro de 2015. Os frutos apresentavam transição da coloração verde para palha amarronzada, apresentando deiscência natural.

Após a coleta, as sementes foram levadas para laboratório e separadas em dois lotes, que em seguida foram armazenadas durante 10 meses em frascos de vidro transparente tipo *snap cap*, em dois locais: ambiente refrigerado (geladeira) com temperatura  $5^{\circ}\text{C}\pm 1$ , e em bancada de laboratório. O trabalho foi composto por quatro experimentos: germinação *in vitro*, multiplicação, enraizamento e aclimatização.

### **Experimento 1: Germinação *in vitro***

Foi realizado em dezembro de 2015, onde foram testadas três concentrações de sais (100, 75 e 50%) do meio Murashige e Skoog (1962) (MS), acrescidos de  $30\text{ g L}^{-1}$  de sacarose e  $2,3\text{ g L}^{-1}$  de Phytigel®, com pH corrigido para 5,8, antes da autoclavagem. Antes da semeadura, as sementes foram desinfestadas por 2 minutos em álcool 70%, seguido de 15 minutos em hipoclorito de sódio 2,25% e, em seguida, em fluxo laminar estéril, foi realizada a tríplice lavagem com água deionizada autoclavada.

O delineamento foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial (concentração de sais MS e local de armazenamento), com oito repetições, seis frascos por parcela e cinco sementes por frasco. Os frascos com as sementes foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 24 a  $29^{\circ}\text{C}$  e intensidade luminosa de 27 a  $33,75\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ . A cada dois dias foi realizada a contagem das sementes germinadas, ou seja, que apresentavam a radícula visível a olho nu. No fim do período experimental foi calculada a porcentagem de germinação, o tempo médio (TMG), o índice de velocidade de germinação (IVG) e a porcentagem de plântulas formadas, que foi calculado pela equação de Maguire (1962), modificada conforme Santana e Ranal (2004), com base na soma do número de sementes germinadas, plântulas emergidas ou plântulas formadas em cada avaliação,

dividido pelo respectivo tempo, dividindo-se o resultado final pelo número total de sementes germinadas, plântulas emergidas ou plântulas formadas em cada repetição.

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e posteriormente as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro pelo *software* SigmaPlot 11.0. Os dados de TMG e IVG não atenderam aos pressupostos da ANOVA, por isso foram transformados para inverso da raiz quadrada e raiz quadrada de x, respectivamente.

### **Experimento 2: Multiplicação *in vitro***

Inicialmente as plantas do experimento 1 foram repicadas, ou seja, foi realizada a retirada do sistema radicular e das folhas basais, posteriormente foram cultivadas em meio MS acrescido de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 7 g L<sup>-1</sup> de ágar, durante 43 dias, de modo que a concentração inicial de sais utilizada na germinação das sementes não tivesse efeito sobre a multiplicação. Após, as plantas foram repicadas e os explantes com aproximadamente 1 cm de comprimento e duas gemas foram utilizados para o experimento 2.

Para este estudo foi utilizado o meio MS, acrescido de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 7 g L<sup>-1</sup> de ágar, pH corrigido para 5,8, antes da autoclavagem. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial (3 x 3), com oito repetições, seis frascos por parcela e cinco explantes em cada frasco. Foram testadas três concentrações de BAP (0,0, 0,5 e 1,0 mg L<sup>-1</sup>) e três concentrações de ANA (0,0, 0,1 e 0,5 mg L<sup>-1</sup>). Os frascos com os explantes foram mantidos em sala de crescimento, descrita no experimento 1. Transcorridos 35 dias foram avaliados 30 frascos por tratamento, sendo computadas as seguintes variáveis: número de brotos por explante, comprimento da parte aérea e massa seca da parte aérea.

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e posteriormente as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro pelo *software* SigmaPlot 11.0. Os dados de número de brotos por explante e massa seca da parte aérea não atenderam aos pressupostos da ANOVA por isso foram transformados para raiz (x).

### **Experimento 3: Enraizamento *in vitro***

Neste estudo comparou-se o enraizamento de explantes de *A. integerrima* utilizando diferentes concentrações de ácido indolbutírico (AIB) no meio de cultivo. Foram utilizados explantes oriundos do experimento 2, os quais foram aleatorizados de modo que todos os tratamentos do experimento 2 fossem utilizados para cada tratamento nesse experimento. Os explantes foram padronizados para 1 cm de comprimento.

O delineamento foi inteiramente casualizado, com cinco concentrações de AIB (0; 0,25; 0,50; 0,75 e 1,0 mg L<sup>-1</sup>), cinco repetições, dois frascos por parcela e cinco explantes em cada frasco. Os frascos com os explantes foram mantidos em sala de crescimento (idem experimento 1). Transcorridos 52 dias foram avaliados: a porcentagem de explantes enraizados, a porcentagem de formação de calo, o comprimento da parte aérea e do sistema radicular.

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e regressão polinomial pelo *software* SigmaPlot 11.0.

### **Experimento 4: Aclimatização das mudas**

O trabalho foi conduzido em ambiente protegido, localizado na Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), em Porto Alegre, RS, no período de 06 de junho a 27 de setembro de 2016 (113 dias).

As mudas oriundas do experimento 3 foram transferidas para bandejas multicelulares de polipropileno com 50 células com 100 mL de volume em cada célula, contendo substrato casca de arroz carbonizada. Em um ambiente com nebulização intermitente, as bandejas foram mantidas em sistema de irrigação do tipo *floating* ininterrupto. As bandejas foram cobertas por uma estrutura de cobertura plástica de 1 m de altura, para que as mudas não ficassem com lâmina de água sobre as folhas. Neste local a umidade relativa era maior ou igual a 90%, com temperatura média de 14,8°C durante o período experimental.

Ao final do período experimental foram avaliados a porcentagem de plantas aclimatizadas, o comprimento da parte aérea e do sistema radicular, o número de folhas e brotos por planta e massa seca da parte aérea e do sistema radicular.

O delineamento foi inteiramente casualizado, com cinco repetições e dez plantas por tratamento. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo *software* SigmaPlot 11.0. Os dados de comprimento da parte aérea e massa seca do sistema radicular foram transformados para raiz quadrada de  $x$  e o número de brotos para raiz quadrada de  $x+1$ , pois não atenderam aos pressupostos da ANOVA.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Experimento 1:**

Não houve interação entre a concentração de sais do meio MS com o local de armazenamento das sementes para nenhuma das variáveis analisadas (Tabela 1). As sementes armazenadas sob ambiente refrigerado apresentaram maior IVG, porcentagem de



germinação e de plântulas formadas, e menor TMG (Figura 1). A germinação não foi afetada pelas diferentes concentrações de sais do meio MS.

Um dos fatores mais importantes para conservar a viabilidade das sementes são as condições ambientais durante o processo de armazenamento (Zonta *et al.*, 2014). A utilização de frascos herméticos é um mecanismo adotado no manejo de sementes, sendo que protege as mesmas do ataque de insetos e roedores (Hartmann *et al.*, 2002), bem como evita a absorção ou perda de umidade das sementes para o ambiente (Labbé & Villela, 2012), mantendo, dessa forma, a viabilidade das mesmas por mais tempo. Os dois lotes de sementes foram armazenados nos mesmos frascos de vidro *snap cap*, somente o que diferiu foi o local de armazenamento, visto que possivelmente, ocorreu redução no metabolismo e também menor perda de água para o ambiente (Hossel *et al.*, 2016) para as sementes armazenadas em ambiente refrigerado, já que apresentaram maior porcentagem de germinação.

A redução da temperatura, associada ao nível de umidade adequada possibilita aumentar o tempo de conservação das sementes, pois este arranjo reduz a deterioração interna, diminuindo o consumo de reservas (Moura *et al.*, 2015; Martins *et al.*, 2012). No caso específico da espécie em estudo, não foi possível verificar o teor de umidade das sementes, visto que a espécie possui sementes diminutas, necessitando de uma grande quantidade das mesmas para realizar o teste. Outro fato relevante foi à dificuldade de coleta *in situ*, pois se conseguiu coletar poucas sementes, as quais foram suficientes somente para este trabalho.

Tabela 1. Análise de variância da germinação de sementes de *Angelonia integerrima* Sprengel sob diferentes concentrações de sais do meio MS e diferentes locais de armazenamento (experimento 1); e multiplicação de *Angelonia integerrima* Sprengel sob diferentes concentrações BAP (benzilaminopurina) e ANA (ácido naftalenoacético) (experimento 2).

<b>VARIÁVEIS ANALISADAS EXPERIMENTO 1</b>	<b>LA valor p</b>	<b>CS MS valor p</b>	<b>Interação valor p</b>	<b>Média Geral</b>
<b>G (%)</b>	<0,01	0,73	0,55	39,03
<b>TMG (dias)</b>	<0,01	<0,01	0,80	17,52
<b>IVG</b>	<0,01	0,07	0,47	0,99
<b>PLF (%)</b>	<0,01	0,69	0,73	37,85
<b>VARIÁVEIS ANALISADAS EXPERIMENTO 2</b>	<b>BAP valor p</b>	<b>ANA valor p</b>	<b>Interação valor p</b>	<b>Média Geral</b>
<b>COMP. PA</b>	0,07	0,30	0,09	1,66
<b>Nº BROTOS</b>	<0,01	0,09	0,01	9,29
<b>MS PA</b>	0,01	0,38	0,09	0,026

LA=local de armazenamento; CS MS=concentração de sais do meio MS; CV=coeficiente de variação; G=germinação; TMG=tempo médio de germinação; IVG=índice de velocidade de germinação; PLF=plântulas formadas; BAP=benzilaminopurina; ANA=ácido naftalenoacético; COMP. PA=comprimento da parte aérea; Nº BROTOS=número de brotos; MS PA=massa seca da parte aérea; \*5% de significância.

A viabilidade das sementes é representada pela porcentagem de germinação, que é afetada por diversos fatores como, por exemplo, condições climáticas durante o desenvolvimento e armazenamento, a nutrição da planta matriz (Kämpf, 2000) e mudanças fisiológicas, morfológicas e funcionais que ocorrem durante o processo de desenvolvimento da semente, as quais são características inerentes de cada espécie (Lopes *et al.*, 2005).

Para a coleta das sementes de angelônia, o único critério adotado foi à coloração e deiscência natural dos frutos. Provavelmente, nesta fase, as sementes estavam na maturidade fisiológica, ou seja, quando a planta já cessou o fornecimento de assimilados para as sementes, visto que as mesmas estão sujeitas à mudanças climáticas e ataque de pragas (Carvalho & Nakagawa, 2000), fatores esses que podem influenciar a germinação e a posterior formação de plântulas.

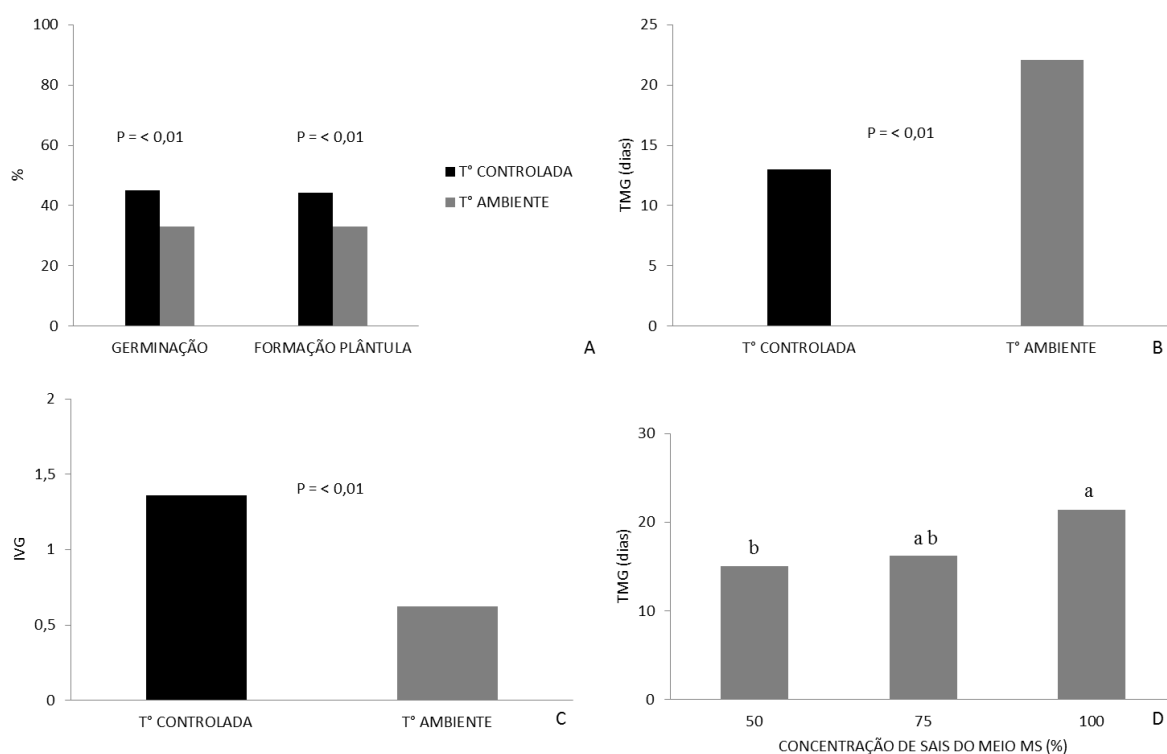


Figura 1. A) Porcentagem de germinação e formação de plântulas; B) Tempo médio de germinação (TMG); C) Índice de velocidade de germinação (IVG) para diferentes locais de armazenamento; D) Tempo médio de germinação (TMG) de sementes de *Angelonia integerrima* Sprengel sob concentrações de sais do meio MS; médias seguidas por letras iguais não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

O cultivo *in vitro* propicia as condições adequadas para a germinação da maioria das espécies, quando comparado com métodos tradicionais, mas mesmo assim a *angelônia* apresentou baixa viabilidade das sementes. Quando a semeadura foi realizada em papel germiteste, apresentou 63,5% de germinação, porém as sementes eram provenientes de outro local (Morro Santana – Porto Alegre, RS) e de outra época de coleta (dezembro de 2015 e janeiro de 2016) (Winhelmann *et al.*, 2016). Na germinação de sementes de *Syngonanthus elegans* (Bong.) Ruhland, uma sempre-viva nativa dos Campos Rupestres, também apresentou baixa porcentagem de germinação, variando de 5 a 35%, para diferentes locais e épocas de coleta (Nunes *et al.*, 2008). Já na germinação *in vitro* de *Comanthera curralensis* Moldenke, sempre viva nativa, a porcentagem de germinação aumentou 2,2 vezes quando

da utilização de MS<sup>1/2</sup>, comparado ao MS (Albuquerque *et al.*, 2016), confirmando que a germinação pode ser afetada por diversas variáveis.

O cultivo das plantas matrizes em locais controlados, com correta nutrição e sanidade, pode contribuir para a formação de sementes e aumentar o percentual de germinação. Porém, na comparação da germinação de sementes coletadas em diferentes locais, sendo um desses, a casa de vegetação, foi verificado que a angelônia é dependente de polinização, visto que as sementes da casa de vegetação apresentaram valores muito inferiores de germinação quando comparado às sementes coletadas a campo (Winhelmann *et al.*, 2016), dessa maneira a espécie precisa de um manejo adequado para que a produção de sementes em ambiente protegido seja viável. A viabilidade de utilizar plantas matrizes de nativas para a produção de sementes ainda é dependente de estudos básicos para saber o comportamento de cada espécie, pois muitas ainda não passaram pelo processo de domesticação.

Quanto à concentração de sais no meio, somente para a variável TMG houve diferença, sendo que quanto maior a concentração, maior o TMG (Figura 1D). A quantidade de sais presente no meio afetou negativamente o TMG, pois as sementes levaram mais tempo para germinarem, o mesmo foi verificado para *Syngonanthus elegans* (Bong.) Ruhland (Pêgo *et al.*, 2014), visto que a salinidade, conseqüente da alta concentração de sais pode afetar a germinação das sementes, pois o excesso de sais solúveis refletem numa menor absorção de água pelas mesmas (Lima *et al.*, 2005).

## **Experimento 2:**

Dentre as variáveis avaliadas houve interação significativa entre concentrações de BAP e ANA somente para números de brotos (Tabela 1). A concentração de BAP teve efeito

significativo sobre a massa seca da parte aérea, já o ANA não influenciou significativamente as variáveis analisadas (Tabela 1).

Para a principal variável, número de brotos, observa-se que a concentração de BAP de 0,5 mg L<sup>-1</sup> foi a que proporcionou maior efeito, já quando combinado com 0,1 ou 0,5 mg L<sup>-1</sup> ANA, a concentração que apresentou as maiores médias foi de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP (Tabela 2), tendo havido um incremento de 27% na formação do número de brotos, quando comparado ao tratamento com a concentração máxima de BAP, mas sem ANA.

Os reguladores de crescimento são considerados os principais responsáveis por estímulos à morfogênese e organogênese, como por exemplo, a formação de brotos ou raízes em tecidos vegetais, através da organogênese direta ou indireta, sob condições nutricionais ideais (Lemos, 2014). A combinação adequada de auxina e citocinina exógenas são responsáveis por desencadear uma ação que pode interferir no balanço interno das citocininas endógenas, consequentemente estimulando a formação de novas estruturas vegetativas (Lemos, 2014). Isso pode explicar porque ocorreu a maior formação de brotos em angelônia quando foram combinados 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,1 ou 0,5 mg L<sup>-1</sup> de ANA. Com o resultado obtido com a taxa de multiplicação nestas doses (Tabela 2), se fossem realizados 3 subcultivos, um único explante de angelônia *in vitro* poderia produzir aproximadamente 3491 explantes. Isso demonstra a potencialidade desta técnica ser utilizada na produção de mudas, pois é possível obter uma grande quantidade de mudas, num curto espaço de tempo.

Tabela 2. Número de brotos por explante *in vitro* de *Angelonia integerrima* Sprengel sob concentrações BAP (benzilaminopurina) e ANA (ácido naftalenoacético).

BAP	ANA		
	0 mg L <sup>-1</sup>	0,1 mg L <sup>-1</sup>	0,5 mg L <sup>-1</sup>
0 mg L <sup>-1</sup>	1,67 c A*	2,38 b A	2,16 c A
0,5 mg L <sup>-1</sup>	13,72 a A	10,17 a A	11,84 b A
1,0 mg L <sup>-1</sup>	9,05 b B	15,17 a A	17,47 a A

BAP=benzilaminopurina; ANA=ácido naftalenoacético; \*Médias seguidas por letras minúsculas distintas na coluna e maiúsculas distintas na linha diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Em alcachofra a combinação de auxina e citocinina favoreceu a formação de brotos axilares, sendo 5,1 a taxa média de multiplicação (Didoné *et al.*, 2015), comprovando que um adequado balanço desses dois reguladores tem relação direta com a taxa de multiplicação (Grando *et al.*, 2011), o mesmo foi observado nesse trabalho, porém o incremento de brotos foi maior.

No cultivo *in vitro* de *Dolichandra unguis-cati* (L.) L.G. Lohmann, a combinação de BAP e ANA favoreceu a formação de brotações com folhas (Siqueira *et al.*, 2014). Contudo, para algumas espécies e/ou etapas, o uso de apenas uma classe de fitorregulador pode possibilitar resultados superiores, como por exemplo, no cultivo *in vitro* de *Mercadonia tenella*, uma espécie nativa da família Plantaginaceae, foi verificado que o uso de BAP promoveu maior taxa de multiplicação, quando comparado à combinação desse com ANA (Alderete *et al.*, 2006).

Com relação à massa seca da parte aérea, observou-se um incremento significativo com a adição de 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP no meio de cultivo (Figura 2). No cultivo *in vitro* de *Lipia alba*, os autores verificaram que a medida que se aumentou a concentração de BAP ocorreu menor acúmulo de massa seca, devido à inibição no desenvolvimento das plantas (Asmar *et al.*, 2012). Já na multiplicação *in vitro* de *Menta piperita* L. foi verificado um

comportamento linear, ou seja, à medida que se aumentou a concentração de BAP, aumentou a massa seca (Asmar *et al.*, 2011).

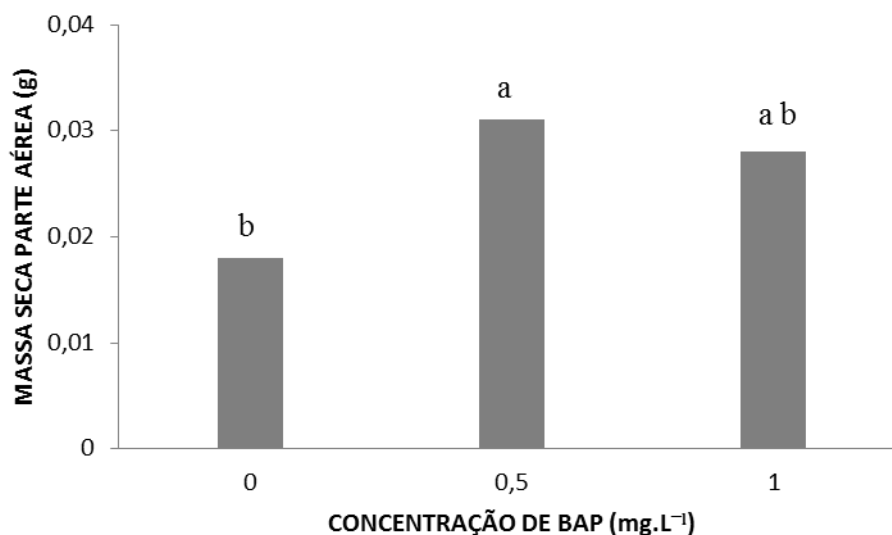


Figura 2. Massa seca da parte aérea (g) de multiplicação *in vitro* de *Angelonia integerrima* Sprengel sob concentrações de BAP (benziaminopurina); médias seguidas por letras iguais não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

### Experimento 3:

As variáveis comprimento de parte aérea e do sistema radicular não diferiram estatisticamente entre as diferentes concentrações de AIB (Tabela 3), já a porcentagem de calo e enraizamento apresentaram diferença entre os tratamentos e foi possível ajustar uma equação quadrática (Figura 3). Através do cálculo do ponto de máxima, a concentração de 0,83 mg L<sup>-1</sup> de AIB foi a mais eficiente para que os explantes apresentem 84% de enraizamento (Figura 3.A). No enraizamento *in vitro* de *Crossandra infundibuliformis* foram utilizadas as mesmas concentrações de AIB, sendo que a maior porcentagem de explantes enraizados (60%) foi verificada no tratamento que utilizou a concentração de 0,5 mg L<sup>-1</sup>

(Almeida *et al.*, 2008), comprovando que para cada espécie deve-se buscar um ponto de máxima resposta.

O enraizamento *in vitro* tem relação com os níveis endógenos de auxina, meio de cultura, presença de reguladores de crescimento (Souza & Pereira, 2007), sem o uso de AIB a espécie apresentou 34% de enraizamento mostrando que possui potencial rizogênico mesmo sem o fornecimento de auxina exógena, provavelmente porque apresentou níveis suficientes desse regulador endogenamente. A espécie enraizou sem a utilização de AIB, mas o uso do regulador favoreceu o enraizamento, visto que a utilização de AIB proporcionou um aumento de 2,5 vezes na porcentagem de enraizamento quando comparado ao controle. Desta maneira podemos classificar a espécie no grupo II, de acordo com a facilidade de enraizamento, sendo que a responde à aplicação de auxina (Hatmann *et al.*, 2002; Fachinello *et al.*, 2005).

Na maior concentração pode-se verificar 100% de formação de calo (Figura 3.B), conforme já relatado por Lemos (2014), em algumas espécies, a presença de auxina no meio favorece o aparecimento de calos e a posterior formação de raízes. É o que foi constatado na espécie em questão, pois o ponto de máxima é de 0,79 mg L<sup>-1</sup> de AIB, o que favorece 99% de formação de calo nos explantes. Este resultado já foi descrito no cultivo *in vitro* de *Rubus sp.*, onde ocorreu maior porcentagem de formação de calo nos explantes que se encontravam em meio de cultura suplementado com AIB (Radmann *et al.*, 2003).



Tabela 3. Análise de variância do enraizamento *in vitro* (experimento 3) e aclimatização (experimento 4) de *Angelonia integerrima* Sprengel sob diferentes concentrações de ácido indolbutírico (AIB).

VARIÁVEIS ANALISADAS	AIB	Média
<b>EXPERIMENTO 3</b>	<b>p valor</b>	<b>Geral</b>
COMP. PA (cm)	0,07	2,26
COMP. SR (cm)	0,27	1,57
RAIZ (%)	<0,01*	66,8
CALO (%)	<0,01*	79,6
<b>EXPERIMENTO 4</b>	<b>AIB</b>	<b>Média</b>
	<b>p valor</b>	<b>Geral</b>
COMP. PA (cm)	0,10	2,17
COMP. SR (cm)	0,37	4,49
Nº FOLHAS	0,66	8,77
Nº BROTOS	0,92	1,47
ACLIMATIZADAS (%)	0,93	50,8
MS PA (g)	0,27	0,03
MS SR (g)	0,86	0,01

AIB=ácido indolbutírico; CV=coeficiente de variação; COMP. PA=comprimento da parte aérea; COMP. SR=comprimento do sistema radicular; MS PA=massa seca da parte aérea; MS SR=massa seca do sistema radicular; \*5% de probabilidade de erro.

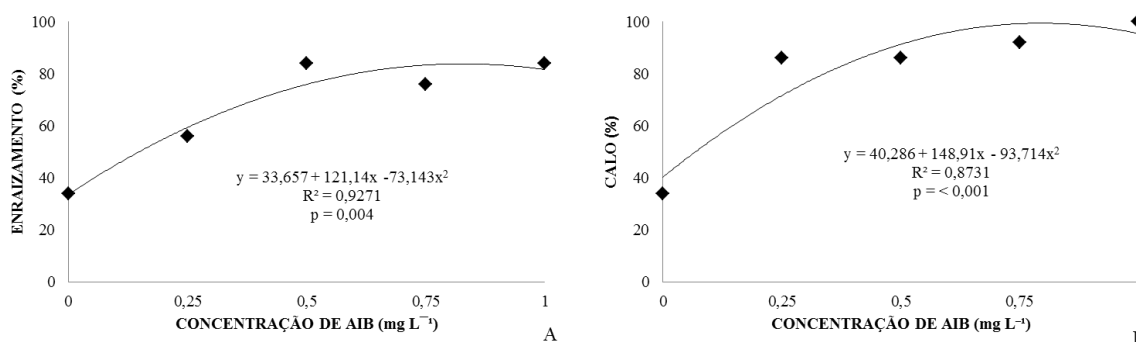


Figura 3. Percentual de enraizamento (A) e de formação de calos (B) no cultivo *in vitro* de *Angelonia integerrima* Sprengel sob diferentes concentrações de ácido indolbutírico (AIB).

#### Experimento 4:

Como pode-se observar na Tabela 3, não houve diferença estatística significativa para as variáveis analisadas na aclimatização. A principal variável a ser analisada nesta fase

é o percentual de plantas aclimatizadas, que deve ser o maior possível, pois determina uma grande eficiência do sistema de propagação *in vitro*.

Neste trabalho, os índices ficaram em 50,8%, podendo ser considerado um resultado insatisfatório, visto que em algumas espécies, como por exemplo, *Arundina graminifolia* “alba” apresentou 50 a 83% de aclimatização dependendo do substrato utilizado (Zandoná *et al.*, 2014), mostrando que o mesmo interfere diretamente na sobrevivência das plantas *ex vitro*. Outras espécies, como a *Syngonathus elegans*, são mais sensíveis à aclimatização, apresentando valores bem menores (25,6%) (Pêgo *et al.*, 2014), mostrando que essa variável depende de cada espécie, bem como de outros fatores, pois a fase de aclimatização é um processo de adaptação das plantas em condições ambientais diferentes da sala de crescimento.

É de fundamental importância manter as mudas numa condição de alta umidade relativa do ar a fim de evitar a desidratação dos tecidos (Souza *et al.*, 2013), sendo importante descartar plantas com má formação ou hiperhidratadas. Neste trabalho não foi verificada a presença desse tipo de planta. É importante frisar que, durante o desenvolvimento *in vitro* ocorre a formação de estômatos não funcionais ou irregulares, o que contribui para dificultar o processo de aclimatização (Rodrigues *et al.*, 2013). No final deste processo foi verificado que durante a aclimatização as mudas de angelônia emitiram, em média, 8,8 folhas por planta, sendo esse um indicativo da adaptação às condições *ex vitro*.

O desempenho das plantas durante a fase de enraizamento *in vitro* e aclimatização pode definir o sucesso de um protocolo de micropropagação (Silva *et al.*, 2007). A aclimatização é considerada uma etapa crítica, sendo que nesse processo aproximadamente metade das plantas não sobreviveram (Pompelli & Guerra 2005). O sistema anatômico das mudas produzidas *in vitro* é ineficiente no controle da transpiração, o que causa uma rápida

perda de água dos tecidos, visto que os estômatos não são funcionais (Grattapaglia & Machado, 1998).

É muito difícil a indução de raízes funcionais *in vitro*, pois as mesmas não apresentam pelos absorventes (Debergh & Maene, 1981) e a conexão entre o sistema vascular do caule e das raízes adventícias é deficiente, não permitindo dessa forma um fluxo transpiratório adequado (Grattapaglia & Machado, 1998), porém as raízes formadas servem de sustentação, bem como são fontes de reservas de nutrientes, até que ocorra a formação de novas raízes (Debergh & Maene, 1981).

As citocininas exógenas, de modo geral, inibem o enraizamento, porém em concentrações muito baixas, em algumas espécies, podem ter efeito promotor (Assis & Teixeira, 1998). Na multiplicação *in vitro* de *Handroanthus chrysotrichus*, não foi verificado enraizamento em meio cultivado com BAP, já quando cultivada em meio nutritivo suprimido desse regulador, apresentou enraizamento, mesmo que em baixa porcentagem, menor que 20% (Pereira *et al.*, 2015). As plantas de angelônia não apresentaram diferenças durante a fase de aclimatização para os diferentes tratamentos de enraizamento testados *in vitro*.

As mais diversas espécies do gênero *Angelonia* são exemplos de plantas nativas da América, as quais são micropropagadas, como por exemplo, o cultivo *in vitro* de segmentos nodais de *Angelonia salicariifolia* (Datta & Datta, 1984). Porém, o estudo com esta espécie é precursor, sendo o primeiro relato na literatura. A partir deste trabalho mais estudos podem ser realizados a fim de aprimorar o protocolo de micropropagação completo para a espécie.

## CONCLUSÃO

Na germinação *in vitro* de *A. integerrima* indica-se utilizar 50% da concentração de sais do meio MS e armazenar as sementes em ambiente refrigerado ( $5^{\circ}\text{C}\pm 1$ ). Para a

multiplicação é recomendado utilizar 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ANA, a fim de obter um maior número de brotos. O AIB na concentração de 0,83 mg L<sup>-1</sup> aumenta a porcentagem de enraizamento *in vitro*. A espécie teve 50,8% de aclimatização para as condições deste trabalho.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, M. M. S. et al. *In vitro* establishment of *Comanthera curralensis*, “sempre viva” native of Chapada Diamantina - Bahia. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 46, n. 6, p. 991-995, jun. 2016.

ALDERETE, L. M. et al. Establishment of an *in vitro* micropropagation protocol for *Mecardonia tenella*. **Electronic Journal of Biotechnology**, Chile, v. 9, n. 3, p. 263-266, jun. 2006.

ALMEIDA, J. L.; DINIZ, J. D. N.; HERNANDEZ, F. F. F. Micropropagação de *Crossandra infundibuliformis* Nees cultivar “Mona Wallhead”. **Revista brasileira de horticultura ornamental**, Campinas, v. 14, n. 2, p. 115-122, 2008.

ARFUX, C. R. B. et al. Cultivo *in vitro* de *Salvia hispanica* L. **Electronic Journal of Management, Education and Environmental Technology (REGET)**, Santa Maria, v. 19, n. 2, p. 1555-1560, 1 abr. 2015.

ASMAR, S. A. et al. Citocininas na multiplicação *in vitro* de hortelã-pimenta (*Mentha x piperita* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 13, n. SPE, p. 533-538, 2011.

ASMAR, S. A. et al. Concentrações de BAP sobre a proliferação *in vitro* de brotos de *Lippia alba* [(Mill.) N.E.Brown]. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 14, n. SPE, p. 149-153, 2012.

ASSIS, T. F. de; TEIXEIRA, S. L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: Embrapa - SPI, 1998.

BARROSO, C. M. et al. B. Considerações sobre a propagação e o uso ornamental de plantas raras ou ameaçadas de extinção no Rio Grande do Sul. **Revista brasileira de horticultura ornamental**, Campinas, v. 13, n. 2, p. 91-94, 2007.

BOFF, S. et al. Perfume production in flowers of *Angelonia salicariifolia* attracts males of *Euglossa annectans* which do not promote pollination. **Apidologie**, Paris, v. 46, n. 1, p. 84-91, 18 jul. 2014.

BURKART, A. Parte V: Dicotiledoneas Metaclamideas. In: FLORA Ilustrada de Entre Rios (Argentina). Buenos Aires, 1979. Tomo VI, parte 5ª, p. 481-484.

CARVALHO, J. M. F. C.; VIDAL, M. S. **Noções de Cultivo de tecidos Vegetais**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2003. (Documentos 116).

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. Maturação de Sementes. In: **Sementes: Ciência, Tecnologia e Produção**. 4 ed. Jaboticabal: FUNEP, 2000.

CASSELLS, A. C. Tissue culture for ornamental breeding. In: VAINSTEIN, A. (Ed.). **Breeding for ornamentals: classical and molecular approaches**. Dordrecht: Springer, 2002. p. 139-153.

DATTA, K.; DATTA, S. K. Rapid clonal multiplication of *Angelonia salicariifolia* through tissue culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 3, n. 3, p. 215-220, 1984.

DEBERGH, P. C.; MAENE, L. J. A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. **Scientia Horticulturae**, New York, v. 14, n. 4, p. 335-345, 1 abr. 1981.

DIDONÉ, S. F. et al. Micropropagação de alcachofra a partir de plântulas germinadas *in vitro*. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 33, n. 3, p. 311-318, set. 2015.

DINIZ, J. D. N. et al. Protocolo para desinfestação, multiplicação e enraizamento *in vitro* de *Spathiphyllum wallisi*. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 39, n. 1, p. 107-113, 12 nov. 2008.

EFFEGEM, C. et al. Desinfestação e germinação *in vitro* de sementes de pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.). **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 10, n. 18, p. 1221-1228, 2014.

FACHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. C. **Propagação de plantas frutíferas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. 221 p.

FERMINO JUNIOR, P. C. P.; NAGAO, E. O.; PEREIRA, J. E. S. Estabelecimento, germinação e multiplicação *in vitro* de teca (*Tectona grandis* L.f.) a partir de genótipos da Amazônia Sul-Occidental. **Scientia Florestalis**, Piracicaba, v. 37, n. 84, p. 427-435, dez. 2009.

FIOR, C. S.; RODRIGUES, L. R.; KÄMPF, A. N. Propagação *in vitro* de *Limonium latifolium* Kuntze (Plumbaginaceae). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 4, p. 575-580, ago. 2000.

FIOR, C. S. et al. Aspectos da propagação de *Persea willdenovii* Kosterm. (Lauraceae). **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 58, n. 1, p. 27-44, 2007.

FUZITANI, E. J.; NOMURA, E. S. Produção de mudas *in vitro*. **Ornamental Horticulture**, Campinas, v. 10, n. 1, p.15-19, 4 jun. 2004.

GOSCH, C et al. Isolation of dihydroflavonol 4-reductase cDNA clones from *Angelonia x angustifolia* and heterologous expression as GST fusion protein in *Escherichia coli*. **PLOS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 9, p. e107755, 19 set. 2014.

GRANDO, M. F. et al. Micropropagation of globe artichoke “nobre-upf”, a brazilian cultivar used for industrial purpose. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n. 923, p. 147-154, dez. 2011.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa – SPI/Embrapa – CNPH, 1998. 2 v. p. 183-260.

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

HARTMANN, H.T. et al. **Plant propagation: principles and practices**. 7. ed. New York: Englewood Clippis, 2002. 896 p.

HOSSEL, J. S. A. O. et al. Viabilidade de sementes de guabijuzeiro em armazenamento. **Applied Research & Agrotechnology**, Guarapuava, v. 9, n. 2, p. 79-85, 17 out. 2016.

KÄMPF, A. N. **Produção comercial de plantas ornamentais**. Guaíba: Agropecuária, 2000. 254 p.

LABBÉ, L. M. B.; VILLELA, F. A. Armazenamento de sementes. In: PESKE, S. T.; VILLELA, F. A.; MENEGUELLO, G. E. (Ed.). **Sementes: Fundamentos Científicos e tecnológicos**. 3. ed. rev. e ampl. Pelotas: Ed. Universitária/UFPel, 2012.

LEMOS, E. E. P. de. Organogênese. In: CID, L. P. B. (Editor técnico) **Cultivo *in vitro* de plantas**. 3. ed. ampl. Brasília, DF: Embrapa, 2014, 325 p.

LIMA, M. da G. de S.; LOPES, N. F.; MORAES, D. M. de; ABREU, C. M. Qualidade fisiológica de sementes de arroz submetidas a estresse salino. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 27, n. 1, p. 54-61, jun. 2005.

LOPES, J. C.; DIAS, P. C.; PEREIRA, M. D. Maturação fisiológica de sementes de quaresmeira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 8, p. 811-816, ago. 2005.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination – aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 2, p. 176-177, 1962.

MANTOVANI, N. et al. Micropropagação de plantas ornamentais. In: PETRY, C. (Org.). **Plantas ornamentais - aspectos para a produção**. 2 ed. Passo Fundo: Universidade de Passo Fundo, 2008. p. 70-91.

MARINO, C. et al. Micropropagation of *Glandularia perakii* Cov. et Schn. (Verbenaceae): a native species with ornamental potential. **Biocell**, Mendoza, v. 27, n. 1, p. 57-60, abr. 2003.

- MARTINS, A. C.; AGUIAR, A. J. C.; ALVES-DOS-SANTOS, I. Interaction between oil-collecting bees and seven species of Plantaginaceae. **Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, [S.l.], v. 208, n. 7, p. 401-411, jul. 2013.
- MARTINS, A. C. et al. Floral-oil-producing Plantaginaceae species: geographical distribution, pollinator rewards and interactions with oil-collecting bees. **Biota Neotropica**, Campinas, v. 13, n. 4, p. 77-89, dez. 2013.
- MARTINS, A. C.; SCHERZ, M. D.; RENNER, S. S. Several origins of floral oil in the Angelonieae, a Southern Hemisphere disjunct clade of Plantaginaceae. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 101, n. 12, p. 2113-2120, dez. 2014.
- MARTINS, L.; LAGO, A. A.; CÍCERO, S. M. Preservation of *Tabebuia heptaphylla* (Vell.) Toledo seeds. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 16, n. 1, p. 108-112, jan. 2012.
- MORAES, C. F. et al. Germinação *in vitro* de sementes de alcachofra. **Horticultura Brasileira**, Campinas, v. 28, n. 1, p. 64-69, mar. 2010.
- MOURA, G. C. M. et al. Método de armazenamento de sementes de goiabeira paluma. **Agrarian Academy**, Goiânia, v. 2, n. 4, p. 51-59, 2015.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1 jul. 1962.
- NUNES, S. C. P. et al. Época, local de colheita e armazenamento na qualidade fisiológica da semente de sempre-viva (*Syngonanthus elegans* (Bong.) Ruhland - Eriocaulaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 30, n. 1, p. 32-39, 2008.
- PÊGO, R. G.; PAIVA, P. D. de O.; PAIVA, R. Micropropagation Protocol for *Syngonanthus elegans* (Bong.) Ruhland: An Ornamental Species. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 36, n. 3, p. 347-353, 7 jul. 2014.
- PEREIRA, M. de O.; NAVROSKI, M. C.; REINIGER, L. R. S. Multiplicação *in vitro* de ipê-amarelo (*Handroanthus chrysotrichus*). **Nativa**, [S.l.], v. 3, n. 1, p. 59-63, jan./mar. 2015.
- PLASCHIL, S.; OLBRICHT, K. Histogenetic Variation in Flowers of *Angelonia* Humb. et Bonpl. **Journal of Applied Botany and Food Quality**, [S.l.], v. 82, n. 1, p. 41-46, 28 nov. 2008.
- POMPELLI, M. F.; GUERRA, M. P. Enraizamento *in vitro* e *ex vitro* de *Dyckia distachya* Hassler, sob diferentes concentrações de AIB. **Floresta & Ambiente**, [S.l.], v. 12, n. 2, p. 42-49, nov/dez. 2005.

RADMANN, E. B.; GONÇALVES, E. D.; FORTES, G. R. de L. Concentrações de ácido indolbutírico e períodos de escuro, no enraizamento "in vitro" de amoreira-preta (*Rubus* sp.), cv. ébano. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 25, n. 1, p. 124-126, abr. 2003.

RODRIGUES, P. H. V. et al. Micropropagação de Helicônia. IN: JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. da S. (Ed.) **Aspectos práticos da micropropagação de plantas**. 2. ed. rev. e ampl. Brasília, DF: Embrapa, 2013. 407 p.

ROSA, F. C. et al. Superação da dormência e germinação *in vitro* de sementes de bracatina (*Mimosa scabrella* Benth). **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 3, p. 1021-1026, 28 jun. 2012.

SANTANA, D. G.; RANAL, M. A. **Análise da germinação: um enfoque estatístico**. Brasília: Editora da Universidade de Brasília, 2004. 247 p.

SANTA-ROSA, S. et al. Micropropagation of the ornamental vulnerable bromeliads *Aechmea blanchetiana* and *Aechmea distichantha*. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 1, p. 112-118, mar. 2013.

SEGEREN, M. I. Micropropagação *in vitro* de flores e plantas ornamentais. In: GERALD, L. T. S. (Org.). **Biofábrica de plantas: Produção industrial de plantas in vitro**. São Paulo: Antiqua, 2011. p. 134-147.

SILVA, C. G.; DEBIASI, C.; PESCADOR, R. Enraizamento *in vitro* e aclimatização de mudas micropropagadas de *Aloe vera* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 9, n. 1, p. 29-35, 1 fev. 2007.

SIQUEIRA, J.; FREITAS, E. M. de; PÉRICO, E. Influência de reguladores de crescimento no cultivo *in vitro* de *Dolichandra unguiscati* (L.) L.G. Lohmann a partir de estacas caulinares. **Iheringia. Série Botânica**, Porto Alegre, v. 69, n. 2, p. 341-346, 19 dez. 2014.

SOUZA, A. V.; PEREIRA, A. M. S. Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 9, n. 4, p. 103-116, 1 nov. 2007.

SOUZA, F. V. D. S. et al. Micropropagação do Abacaxizeiro e Outras Bromeliáceas. IN: JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. da S. (Ed.) **Aspectos práticos da micropropagação de plantas**. 2. ed. rev. e ampl. Brasília, DF: Embrapa, 2013, 407 p.

STUMPF, E. R. T.; BARBIERI, R. L.; HEIDEN, G. **Cores e formas no Bioma Pampa: plantas ornamentais nativas**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2009. 276 p.

UNEMOTO, L. K. et al. Estabelecimento de um protocolo para a propagação *in vitro* de rainha-do-abismo, *Sinningia leucotricha* (Hoehne) Moore- (Gesneriaceae) **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 28, n. 4, p. 503-506, 28 fev. 2006.



VICTÓRIO, C. P.; LAGE, C. L. S. Germinação e desenvolvimento pós-germinativo *in vitro* de *Calendula officinalis* L. sob diferentes qualidades de luz. **BioFar Revista de Biologia e Farmácia**, [S.l.], v. 3, n. 1, p. 81-87, 2009.

WINHELMANN, M. C. et al. Germinação de sementes de *Angelonia integerrima* Sprengel sob diferentes temperaturas. **Revista da Jornada de Pós-Graduação e Pesquisa-Congrega Urcamp**, Campinas, nov. 2016.

ZANDONÁ, A. P.; FARIA, R. T. de; LONE, A. B.; HOSHINO, R. T. Substratos alternativos ao esfagno na aclimatização de plântulas de *Arundina graminifolia* “alba” (Orchidaceae). **Ornamental Horticulture**, Campinas, v. 20, n. 1, p. 7-12, 21 set. 2014.

ZONTA, J. B. et al. Armazenamento de sementes de pinhão manso em diferentes embalagens e ambientes. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 30, supplement 2, p. 599-608, Oct./14.

#### **4 ARTIGO 2**

### **LIMPEZA CLONAL E MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE *Angelonia***

***integerrima* SPRENGEL<sup>2</sup>**

---

<sup>2</sup> Artigo formatado segundo as normas da Revista Bioscience Journal

## LIMPEZA CLONAL E MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE *Angelonia integerrima*

SPRENGEL

### RESUMO

O objetivo do trabalho foi testar tamanhos de ápices caulinares no estabelecimento *in vitro* de *Angelonia integerrima*, a fim de obter explantes sem contaminações por fungos e bactérias para posterior multiplicação. Os tratamentos consistiram de tamanhos de ápices caulinares: 1,0; 3,0; 5,0; 7,0; 9,0 e 11,0 mm. Após 45 e 90 dias de cultivo foi realizada a contagem de explantes contaminados e o número de brotos formados por explante. Em um segundo experimento, explantes foram cultivados em meio contendo diferentes concentrações de benzilaminopurina (BAP): 0,0; 0,05; 0,10; 0,15 e 0,20 mg L<sup>-1</sup>. Após 56 dias de cultivo foram avaliados: comprimento e massa fresca da parte aérea e número de brotos. Durante a fase de estabelecimento (45 dias), somente explantes com 1,0 mm não apresentaram contaminação, já no segundo subcultivo (aos 90 dias) somente brotações oriundas de explantes com tamanho inicial igual ou superior a 7 mm apresentaram contaminação. Com relação à multiplicação, a presença de BAP apresentou comportamento linear positivo para todas as variáveis analisadas. É possível obter mudas de *A. integerrima* livres de contaminações *in vitro* por fungos e bactérias, utilizando explantes iniciais menores ou iguais a 5 mm. O BAP proporcionou incremento linear para a multiplicação da espécie.

**Palavras-chave:** Bioma Pampa, ápice caulinar, ornamental nativa, Plantaginaceae.

## CLONAL CLEANING AND *IN VITRO* MULTIPLICATION OF *Angelonia*

*integerrima* SPRENGEL

### ABSTRACT

The objective of this study is to test stem apex sizes in the *in vitro* establishing of *Angelonia integerrima* in order to obtain explants without by fungi and bacteria contamination for further multiplications. The treatments consisted of different stem apex sizes (1.0, 3.0, 5.0, 7.0, 9.0 and 11.0 mm). At 45 and 90 days of cultivation, a count of contaminated explants and a count of shoots per explant formed were performed. In a second experiment, explants were cultivated in a medium containing different concentrations of benzylaminopurine (BAP) (0.0, 0.05, 0.10, 0.15 and 0.20 mg L<sup>-1</sup>). After 56 days of cultivation, the following variables were evaluated: shoot length, shoot fresh mass and number of shoots. During the explant establishment phase (45 days), only stem apexes with 1.0 mm in size were not contaminated. However, in the second subculture (at 90 days), only shoots from initial explants, with 7 mm in size or larger, were contaminated. Regarding multiplication, the presence of BAP showed a positive linear behavior for all variables. It is possible to obtain *A. integerrima* seedlings free of contamination *in vitro* by fungi and bacteria, using initial

explants less than or equal to 5 mm. IBA provided a linear increment for the multiplication of this species.

**Keywords:** Pampa biome, stem apex, native ornamental, Plantaginaceae.

## INTRODUÇÃO

O gênero *Angelonia* pertence à família Plantaginaceae (anteriormente Scrophulariaceae), com ocorrência do México ao sul do Brasil (região Neotropical) (Boff *et al.*, 2014), mas com registros principalmente na América do Sul (Martins *et al.*, 2014). Suas flores apresentam coloração que varia entre azul, violeta, branco e pink, as anteras e o estigma estão localizados na parte superior da corola e o fruto é uma cápsula globosa e elipsoide, geralmente deiscente (Burkart, 1979; Plaschil & Olbricht, 2008; Gosch *et al.*, 2014). Este gênero se destaca por apresentar espécies produtoras de óleo floral, com flores altamente especializadas para a atração de polinizadores (Martins & Alves dos Santos, 2013).

*Angelonia integerrima* Sprengel pode ser encontrada em áreas de campo aberto, geralmente em populações densas e agregadas, nos campos do sul do Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai (Martins *et al.*, 2013). É conhecida por violeta-do-campo ou angelônia, sendo uma espécie herbácea e perene, com folhas oblongas e opostas, caule bordô e atinge em média 40 cm de altura (Burkart, 1979; Stumpf *et al.*, 2009).

O florescimento ocorre de outubro a março, sendo que as flores se encontram em racemos bem definidos, com coloração branca a lilás claro e algumas manchas púrpuras (Burkart, 1979; Stumpf *et al.*, 2009). É uma espécie promissora que possui potencial ornamental podendo ser utilizada em arranjos florais, bem como pode ser cultivada em canteiros, floreiras e vasos (Stumpf *et al.*, 2009).

Com intuito de domesticar a espécie, há necessidade de gerar informações referentes aos métodos de propagação mais adequados. Dentre estes métodos a propagação *in vitro* pode reduzir a disseminação de doenças (Moraes *et al.*, 2010), porém o estabelecimento *in vitro* da cultura constitui numa fase crítica, visto que cada espécie tem suas particularidades com relação a fatores genéticos, fisiológicos ou ambientais e conseqüentemente, a necessidade de se ajustar protocolos específicos (Grattapaglia & Machado, 1998).

Durante a fase de estabelecimento *in vitro* da cultura podem ocorrer perdas consideráveis dos explantes, devido às contaminações microbianas, principalmente por fungos e bactérias, que se encontram na superfície dos tecidos ou mesmo no sistema vascular (endofíticos) (Moraes *et al.*, 2010). Na prática, quando não se tem um conhecimento prévio da espécie, são incubados ápices caulinares de tamanhos maiores, através da análise das contaminações obtidas. Nesta fase é que se define qual é o melhor explante a ser utilizado (Rodrigues *et al.*, 2013). É o que foi realizado no caso da angelônia, que através de testes preliminares no estabelecimento *in vitro* de explantes com aproximadamente 1 cm foi verificada a existência de uma bactéria endofítica: *Methylobacterium aquaticum*, a qual foi identificada através de análises moleculares. Essa bactéria foi detectada em todos os explantes, e quando não se manifestava de forma visível na primeira fase *in vitro*, surgiam colônias sobre o meio logo após a transferência para um meio novo.

Para a obtenção de plantas livres de patógenos *in vitro*, pode-se fazer uso de métodos convencionais como a cultura de ápices caulinares, ou seja, a excisão do meristema apical com primórdios foliares subjacentes, com tamanho de 0,3 a mais de 20 mm. O ápice caulinar é uma estrutura que contém o meristema, o qual é recoberto por diversos primórdios foliares, que, quando colocado em meio de cultura adequado, desenvolve-se formando uma planta completa (Torres *et al.*, 1998).

Contudo, o tamanho do explante tem relação direta com a sobrevivência e a capacidade de regeneração, porém quanto menor, maiores são as chances de se obter plantas livres de patógenos *in vitro*. Por isso o tamanho ideal do explante a ser utilizado para cada espécie depende do objetivo e da finalidade (Nehra e Kartha, 1998).

A planta matriz deve ser mantida numa condição de ambiente protegido, de modo que a mesma não esteja disposta ao ataque de pragas e doenças (Sharma *et al.*, 2015), também pode ser submetida a estiolamento, através da manutenção da mesma em ambiente desprovido de luz, dessa forma não ocorre a formação de clorofila, isso faz com que a taxa de replicação do agente não acompanhe o alongamento do ápice, dessa forma esse explante tem maiores chances de não estar contaminado (Torres *et al.*, 1998). Essa prática também é utilizada, porque reduz a formação de calo e evita lesões na zona de regeneração (Carvalho *et al.*, 2013).

Com relação ao meio de cultura, várias são as opções a serem utilizadas, bem como podem ser feitas adaptações de protocolos para as diferentes espécies. O uso de reguladores de crescimento é opcional, sendo que na fase de estabelecimento não é necessário, porém para algumas espécies o uso de citocininas e auxinas, quando utilizadas em baixas concentrações favorecem o crescimento e desenvolvimento dos ápices caulinares (Nehra & Kartha, 1998). Já, após o estabelecimento da cultura, na fase de multiplicação, a necessidade de adicionar uma citocinina sintética ao meio, é de fundamental importância, sendo que a benzilaminopurina (BAP) é a mais utilizada (Nehra & Kartha, 1998).

A fim de obter explantes de *Angelonia integerrima*, livres de contaminação bacterianas e fúngicas *in vitro*, o objetivo do trabalho foi testar diferentes tamanhos de ápices caulinares e a posterior multiplicação das brotações *in vitro*.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os estudos foram conduzidos no laboratório de Biotecnologia do Departamento de Horticultura e Silvicultura da Faculdade de Agronomia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS.

Plantas matrizes oriundas de sementeira *in vitro*, de material propagativo coletado *in situ*, no município de Barão do Triunfo (RS), foram cultivadas em vasos com capacidade de 5L, contendo substrato comercial Carolina Soil®, em ambiente protegido no Departamento de Horticultura e Silvicultura da Faculdade de Agronomia da UFRGS, em Porto Alegre, RS. Essas plantas foram adubadas quinzenalmente com 2 g L<sup>-1</sup> de uma fórmula NPK - 6-12-36 (Kristalon® amarelo), aplicado via fertirrigação na dose de 50 mL por vaso. Foi realizada poda drástica nas plantas para estimular suas brotações, e após as mesmas foram colocadas em câmara escura, a fim de obter brotações estioladas. Decorridos 30 dias, foi realizada a coleta de brotações apicais, as quais foram mantidas submersas em água deionizada com 1 g L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico para evitar a desidratação e oxidação do material vegetal.

Na bancada do laboratório, foi realizada a desinfestação dos explantes, com 1 minuto em álcool 70%, após 10 minutos em hipoclorito de sódio a 1%, posteriormente, na câmara de fluxo laminar, foi realizada a tríplice lavagem em água deionizada e autoclavada. Os explantes foram mantidos em água deionizada e autoclavada durante todo o processo de preparo dos mesmos. Com auxílio de uma lupa foi realizada a extração de diferentes tamanhos de ápices caulinares: 1,0; 3,0; 5,0; 7,0; 9,0 e 11,0 mm, que consistiram nos tratamentos.

Os explantes foram colocados em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio Murashige e Skoog (1962) (MS), acrescido de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 7 g L<sup>-1</sup> de ágar e 0,1 mg

$L^{-1}$  de benzilaminopurina (BAP), pH corrigido para 5,8, antes da autoclavagem. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições de seis tubos e um explante em cada tubo. Os tubos foram colocados no escuro durante o período de sete dias, após foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 24 a 29°C e intensidade luminosa de 27 a 33,75  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Decorridos 45 dias do início do experimento foi realizada a contagem de explantes contaminados por fungos e bactérias, bem como o número de brotos formados por explante. Neste momento foi realizado o descarte dos explantes que estavam contaminados, os demais foram retirados dos tubos, individualizados e estabelecidos em meio de cultivo, idêntico ao utilizado anteriormente. Aos 90 dias foi realizada uma nova avaliação, onde procedeu-se a contagem de contaminados e do número de brotos formados por explante.

Os dados foram submetidos à regressão exponencial pelo programa estatístico SigmaPlot 11.0.

Em um segundo experimento, os explantes oriundos do experimento anterior foram colocados para multiplicar em meio MS acrescido de 30 g  $L^{-1}$  de sacarose e 7 g  $L^{-1}$  de ágar, contendo diferentes concentrações de BAP: 0,0; 0,05; 0,10; 0,15 e 0,20 mg  $L^{-1}$ . O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 19 repetições, um frasco por parcela e cinco explantes em cada frasco. Os frascos foram mantidos na sala de crescimento descrita anteriormente. Após 56 dias de cultivo foram avaliados: comprimento da parte aérea, número de brotos e massa fresca da parte aérea. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e regressão polinomial pelo *software* SigmaPlot 11.0. O comprimento da parte aérea e o número de brotos não atenderam os pressupostos da ANOVA, por isso foram transformados para  $\log(x/10)$ .



## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na figura 1 é apresentado o comportamento dos diferentes tamanhos de explantes com relação a presença de contaminação. Pode-se observar que na leitura feita aos 45 dias, à medida que aumenta o tamanho do ápice caulinar, aumenta a porcentagem de contaminação. Todos os tamanhos de explantes apresentaram contaminações *in vitro*, com exceção do menor. No segundo subcultivo, ou seja, na avaliação aos 90 dias, observa-se que as brotações oriundas dos explantes menores não apresentaram contaminação, mas os maiores apresentaram, demonstrando que estes ainda tinham microorganismos endofíticos e que se expressaram somente neste subcultivo. Resultados semelhantes a esses foram apresentados por Lima e Moraes (2006), os quais trabalharam com multiplicação *in vitro* de quatro variedades de bananeira. Os autores verificaram que a maior taxa de contaminação ocorreu logo após o estabelecimento (subcultivo 0), reduzindo nos cultivos subsequentes.

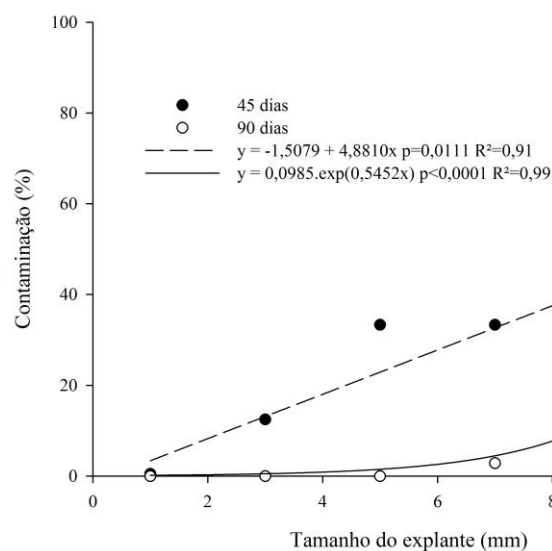


Figura 1. Contaminação *in vitro* de diferentes tamanhos de explante de *Angelonia integerrima* Sprengel aos 45 e 90 dias.

A presença de microorganismos endofíticos já foi relatada num grande número de espécies vegetais, sendo que a presença de fungos, leveduras e bactérias podem ser identificados no início do processo de cultivo (Pasqual *et al.*, 2010). O meio de cultura é apropriado para o desenvolvimento da maioria dos microorganismos, mas muitos podem permanecer latentes, principalmente as bactérias, podendo não apresentar sintomas nos primeiros subcultivos, bem como não manifestar crescimento visível no meio. Esses microorganismos vão competir por espaço e nutrientes com os explantes (Pasqual *et al.*, 2010). Testes preliminares realizados com essa espécie (dados não apresentados), com a utilização de explantes de 1 cm, quando não apresentavam contaminação visual, aos 45 dias de cultivo eram transferidos para um meio de cultivo novo, com a mesma composição inicial. Contudo, no segundo subcultivo manifestaram a presença da bactéria, não sendo possível obter explantes sem contaminação *in vitro*, fato este motivador da execução deste experimento.

O tamanho do explante também tem relação com a regeneração do mesmo *in vitro*, ou seja, a capacidade de organogênese *in vitro* de cada espécie, sendo que quanto menor o explante, menor a taxa de regeneração, porém isso é inversamente proporcional à eliminação dos microorganismos endofíticos, é o que os autores verificaram no cultivo de *Manihot esculenta crantz*, onde 44,44% dos explantes com 1,0 mm de tamanho não regeneraram e desses conseguiu-se eliminar o vírus em 88,2% (Mwangangi1 *et al.*, 2014). No presente trabalho foi verificado que 12,5 e 4,17% dos explantes com tamanho de 1 e 3 mm respectivamente, não regeneraram, valor este que pode ser considerado baixo.

O processo de desinfestação foi eficiente e comprova que, quanto menor o explante menos contaminação, pois os microorganismos se abrigam dentro dos primórdios foliares que recobrem o meristema (Rodrigues *et al.*, 2013). Propágulos vegetativos de plantas são

propensos a alojar microorganismos, quanto maior o explante, mais tecido vegetal, maiores as chances de serem transmitidos para a nova planta (Kaya & Gokdogan, 2015).

Na Figura 2 pode-se observar que mesmo com a utilização de uma concentração baixa de BAP ( $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ ), já foi verificada multiplicação no estabelecimento inicial, com média de 2,93 brotos formados por explante, não apresentando diferença para os diferentes tamanhos de ápices. Porém, no segundo subcultivo, pode-se observar que quanto menor o tamanho do explante inicial, mais brotos são formados. Estes resultados são contraditórios em relação a outros trabalhos citados na literatura, como por exemplo, no estabelecimento *in vitro* de *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes os autores verificaram que explantes maiores (1 e 1,5 cm) apresentaram maior número de brotos (2,64 vezes), quando comparados com o de menor tamanho (0,5 cm) (Reis *et al.*, 2004). No estudo de duas cultivares de *Catharanthus roseus*, os autores verificaram maior regeneração de brotos nos explantes maiores (7 a 9 mm) na cultivar ‘Sunstorm Rose’, já para a cultivar ‘Pacific Coral’ foi para o tamanho intermediário (5 a 7mm) (Swanberg & Dai, 2008). Poucos são os estudos que levam em consideração o tamanho do explante na multiplicação *in vitro*, visto que o tamanho tem relação com a idade do explante (Swanberg & Dai, 2008). Diante dos resultados obtidos supõe-se que os explantes de tamanho menor, durante a fase de estabelecimento tiveram maior estímulo do BAP, devido à proximidade desse regulador com o meristema, já nos explantes maiores o mesmo estava mais protegido por primórdios foliares, isso pode ter contribuído para maior formação de brotos posteriormente.

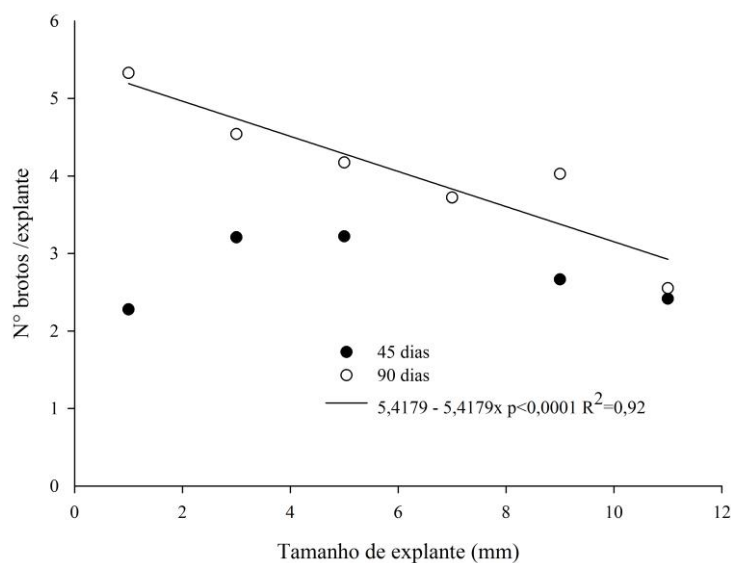


Figura 2. Número de brotos por explante aos 45 e 90 dias de cultivo *in vitro* de diferentes tamanhos de ápices caulinares de *Angelonia integerrima* Sprengel.

Com relação ao segundo experimento, as variáveis analisadas responderam positivamente às concentrações de BAP testadas (Figura 3). Pode-se observar que o BAP incrementou o número de brotos por explante, o mesmo foi verificado para as variáveis comprimento e massa fresca da parte aérea. Foram testadas concentrações reduzidas de BAP nesse trabalho, pois no estabelecimento *in vitro* com  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP, a espécie já apresentou elevada taxa de multiplicação, no segundo subcultivo (avaliação dos 90 dias) (Figura 2).

Mesmo sem a utilização de BAP (Figura 3.B) pode-se verificar que ocorreu a formação de brotos. A presença de concentrações de citocinina endógena, bem como a exógena que foi utilizada no estabelecimento e no segundo subcultivo, pode ter auxiliado na indução e posterior formação de brotos. Para saber qual a concentração ótima de BAP para a multiplicação da espécie, de modo que favoreça a produção de um número máximo de

brotos por explante, é necessário que sejam testadas concentrações de BAP superiores às que foram utilizadas nesse trabalho.

As citocininas têm efeito benéfico sobre a multiplicação até determinada concentração, sendo variável de espécie para espécie, valores superiores à concentração ótima podem ser até tóxicos (Grattapaglia & Machado, 1998). No presente trabalho, até a máxima concentração utilizada não foi verificado efeito tóxico e alcançou-se até 5,12 brotos por explantes, na comparação com outras espécies, como por exemplo, *Bouchea fluminensis* (Vell.) Mold. os autores obtiveram 6,85 brotos por explante (Resende *et al.*, 2014), em *Mentha x piperita* L. 5,75 (Asmar *et al.*, 2011) e em *Etilingera elatior* Jack RM Sm. 3,3 (Colombo *et al.*, 2010), mostrando que isso é muito variável entre espécies, mas já pode ser considerado um valor aceitável.

Com relação à altura da parte aérea, o BAP pode causar efeito inibitório e entufamento dos brotos formados (Malik *et al.* 2005), mesmo que o BAP estimule a formação de um número maior de brotações, esses brotos podem apresentar um número reduzido de segmentos nodais e folhas (Araújo *et al.*, 2004). Neste trabalho, a máxima concentração de BAP testada teve incremento positivo sobre as variáveis analisadas, não se confirmando o que foi descrito anteriormente.

A fase inicial, ou seja, de estabelecimento da cultura *in vitro*, foi considerada a mais complexa, devido à presença de microrganismos endofíticos, necessitando, dessa forma, do uso de estratégias que sejam viáveis, pois somente o processo de desinfestação não consistiu numa técnica eficiente, pois nos estudos preliminares se obteve 100% de contaminação. Porém, quando a desinfestação foi associada à extração de ápices caulinares com tamanho reduzido, explantes com tamanho menor ou igual a 5 mm não apresentaram mais contaminação visível da bactéria. Bem como, explantes com um tamanho um pouco maior

(5 mm) apresentaram maiores taxas de regeneração e são mais fáceis de serem extraídos com sucesso quando comparados aos tamanhos menores.

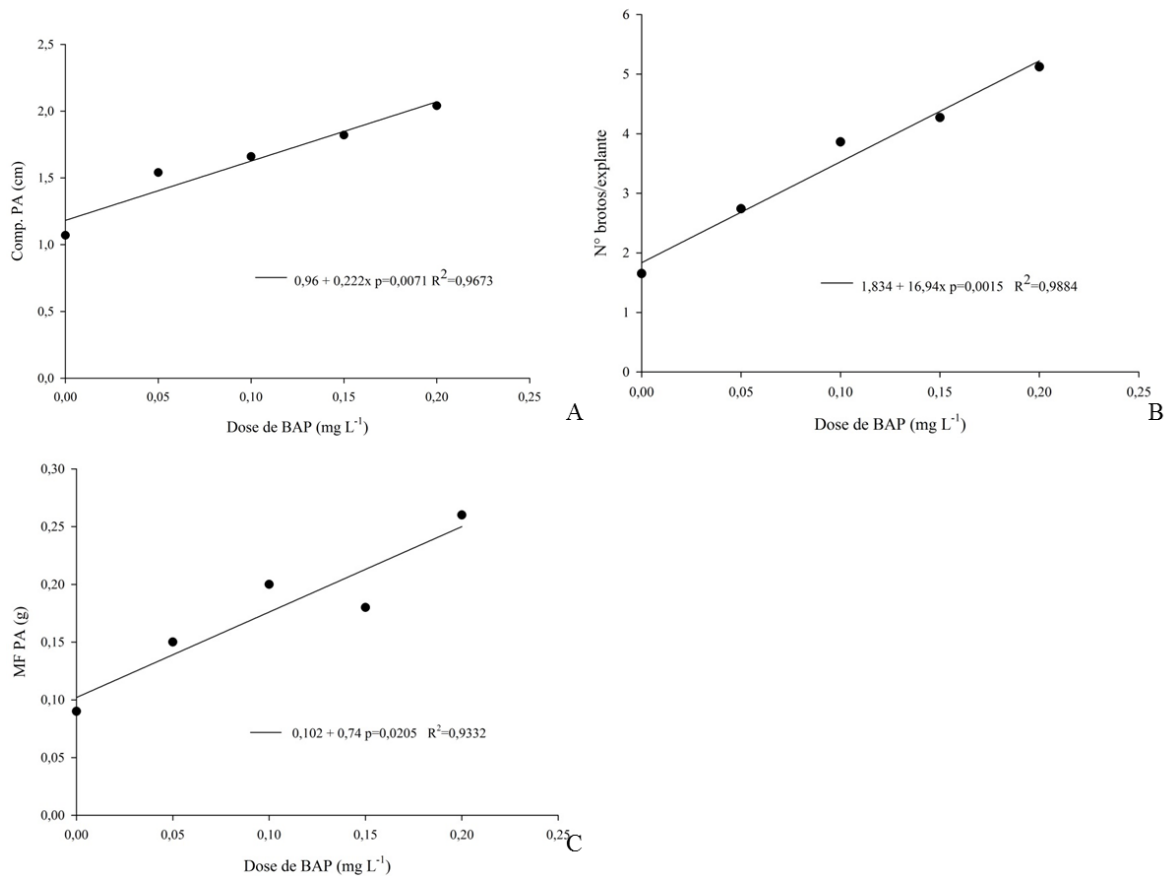


Figura 3. A) Comprimento da parte aérea (cm); B) número médio de brotos formados por explante; C) massa fresca da parte aérea (g) na propagação *in vitro* de *Angelonia integerrima* Sprengel sob concentrações de benzilaminopurina (BAP).

## CONCLUSÃO

É possível obter plantas de *A. integerrima* livres de contaminações *in vitro* por fungos e bactérias, utilizando-se explantes iniciais com tamanho menor ou igual a 5 mm. O BAP proporcionou incremento linear para a multiplicação da espécie.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, A. G. et al. Multiplicação *in vitro* de gloxínia (*Sinningia speciosa* Lood. Hiern.). **Revista Ceres**, Viçosa, vol. 51, n. 293, p. 117-127, 2004.

ASMAR, S. A. et al. Citocininas na multiplicação *in vitro* de hortelã-pimenta (*Mentha x piperita* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 13, n. SPE, p. 533-538, 2011.

BOFF, S. et al. Perfume production in flowers of *Angelonia salicariifolia* attracts males of *Euglossa annectans* which do not promote pollination. **Apidologie**, Paris, v. 46, n. 1, p. 84-91, 18 jul. 2014.

BURKART, A. Parte V: Dicotiledoneas Metaclamideas. In: FLORA Ilustrada de Entre Rios (Argentina). Buenos Aires, 1979. Tomo VI, parte 5ª, p. 481-484.

CARVALHO, A. C. P. P. de et al. Micropropagação de Antúrio. IN: JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. da S. (Ed. **Aspectos práticos da micropropagação de plantas**. 2. ed. rev. e ampl. Brasília, DF: Embrapa, 2013. 407 p.

COLOMBO, L. A. et al. Estabelecimento de protocolo para a multiplicação *in vitro* de Bastão-do-imperador (*Etilingera elatior*) Jack RM Sm. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 32, n. 4, p. 695-700, dez. 2010.

GOSCH, C et al. Isolation of dihydroflavonol 4-reductase cDNA clones from *Angelonia x angustifolia* and heterologous expression as GST fusion protein in *Escherichia coli*. **PLOS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 9, p. e107755, 19 set. 2014.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa – SPI/Embrapa – CNPH, 1998. 2 v. p. 183-260.

KAYA, E.; GOKDOGAN, E. Y. Virus eradication from plants via novel biotechnological processes: one step freezing methods based on vitrification of cryotherapy techniques. **Mugla Journal of Science and Technology**, [S.l.], v. 1, n. 2, p. 34-40, 2015.

LIMA, J. D.; MORAES, W. da S. Concentração de benzilaminopurina e avaliação de protocolo para multiplicação *in vitro* de genótipos de bananeira. **Pesquisa Agropecuária Tropical (Agricultural Research in the Tropics)**, Goiânia, v. 36, n. 1, p. 13-19, 27 out. 2006.

MALIK, S. K.; CHAUDHURY, R.; KALIA, R. K. Rapid *in vitro* multiplication and conservation of *Garcinia indica*: a tropical medicinal tree species. **Scientia Horticulturae**, New York, v. 106, n. 4, p. 539-553, 1 nov. 2005.

MARTINS, A. C.; AGUIAR, A. J. C.; ALVES-DOS-SANTOS, I. Interaction between oil-collecting bees and seven species of Plantaginaceae. **Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, [S.l.], v. 208, n. 7, p. 401-411, jul. 2013.

MARTINS, A. C. et al. Floral-oil-producing Plantaginaceae species: geographical distribution, pollinator rewards and interactions with oil-collecting bees. **Biota Neotropica**, Campinas, v. 13, n. 4, p. 77-89, dez. 2013.

MARTINS, A. C.; SCHERZ, M. D.; RENNER, S. S. Several origins of floral oil in the Angelonieae, a Southern Hemisphere disjunct clade of Plantaginaceae. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 101, n. 12, p. 2113-2120, dez. 2014.

MORAES, C. F. et al. Germinação *in vitro* de sementes de alcachofra. **Horticultura Brasileira**, Campinas, v. 28, n. 1, p. 64-69, mar. 2010.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1 jul. 1962.

MWANGANGI, M. et al. Elimination of Cassava Brown Streak Virus from Infected Cassava. **Journal of Biology, Agriculture and Healthcare**, New york, v. 4, n. 13, p. 34-40, 2014.

NEHRA, N. S.; KARTHA, K. Meristem and shoot tip culture: requirements and applications. IN: VASIL, I. K.; THORPE, T. A.(Ed.). **Plant cell and Tissue Culture**. Dordrecht: Kluwer, c1994. p. 37-70.

PASQUAL, M. et al. Prevenção de contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas. In: SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. (Ed.). **Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2010. 446 p.

PLASCHIL, S.; OLBRICHT, K. Histogenetic variation in flowers of *Angelonia* Humb. et Bonpl. **Journal of Applied Botany and Food Quality**, [S.l.], v. 82, n. 1, p. 41-46, 28 nov. 2008.

REIS, É. S. et al. Tamanhos e posições de explantes e volumes de meio de cultivo na multiplicação de ipeca (*Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes) *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 3, p. 703-709, jun. 2004.

RESENDE, C. F. et al. An efficient system for *in vitro* propagation of *Bouchea fluminensis* (Vell.) Mold. (Verbenaceae). **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 28, n. 2, p. 184-189, jun. 2014.

RODRIGUES, P. H. V. et al. Micropropagação de Helicônia. IN: JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. da S. (Ed.) **Aspectos práticos da micropropagação de plantas**. 2. ed. rev. e ampl. Brasília, DF: Embrapa, 2013. 407 p.



SHARMA, G. K.; JAGETIYA, S.; DASHORA, R. **General techniques of plant tissue culture**. Pharmaceutical Research Book. North Carolin; Lulu Press Inc. Raleigh, 2015.

STUMPF, E. R. T.; BARBIERI, R. L.; HEIDEN, G. **Cores e formas no Bioma Pampa: plantas ornamentais nativas**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2009. 276 p.

SWANBERG, A.; DAI, W. Plant regeneration of periwinkle (*Catharanthus roseus*) via organogenesis. **HortScience**, Alexandria, v. 43, n. 3, p. 832-836, 1 jun. 2008.

TORRES, A. C.; TEIXEIRA, S. L.; POZZER, L. Cultura de ápices caulinares e recuperação de plantas livres de vírus. In: **CULTURA de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: EMBRAPA, 1998. p. 133-146.

## **5 ARTIGO 3**

### **ENRAIZAMENTO DE ESTACAS APICAIS DE *Angelonia integerrima* SPRENGEL: CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO INDOL-3-BUTÍRICO E SUBSTRATOS<sup>3</sup>**

---

<sup>3</sup> Artigo formatado segundo as normas da Revista Ornamental Horticulture

**ENRAIZAMENTO DE ESTACAS APICAIS DE *Angelonia integerrima* SPRENGEL:  
CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO INDOL-3-BUTÍRICO E SUBSTRATOS**

**RESUMO**

O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito da concentração de ácido indol-3-butírico (AIB) e substratos no enraizamento de estacas apicais de *Angelonia integerrima*. Utilizou-se AIB em pó, nas concentrações de zero, 500, 1000, 2000 e 4000 mg kg<sup>-1</sup> e dois substratos: casca de arroz carbonizada (CAC) e substrato comercial a base de turfa de *Sphagnum*. Avaliou-se: número de estacas enraizadas, comprimento da parte aérea e do sistema radicular, número de folhas novas, volume do sistema radicular, formação de calo na base da estaca, massa seca da parte aérea e do sistema radicular. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial (5 concentrações de AIB x 2 substratos). Não houve interação entre as concentrações de AIB e substratos, somente houve diferença para o fator substrato. As estacas apresentaram enraizamento médio de 79%, com formação de calo em 59,4%. O substrato CAC apresentou maior comprimento da parte aérea e maior número de folhas novas. O substrato comercial proporcionou maior volume médio de raiz, maior comprimento de raiz e maior incremento de massa seca radicular. No enraizamento por estaquia de *Angelonia integerrima* não é necessário usar AIB e pode-se utilizar o substrato comercial à base de turfa ou a CAC.

**Palavras-chave:** Propagação vegetativa, floricultura, espécie ornamental nativa.

**ROOTING OF APICAL CUTTINGS OF *Angelonia integerrima* SPRENGEL:  
CONCENTRATIONS OF INDOLE-3-BUTYRIC ACID AND SUBSTRATES**

**ABSTRACT**

The objective of this study was to evaluate the effect of the concentration of indole-3-butyric acid (IBA) and substrates on the rooting of apical cuttings of *Angelonia integerrima*. Powder IBA was used at the concentrations 0, 500, 1,000, 2,000 and 4,000 mg kg<sup>-1</sup>, and two substrates containing carbonized rice husks (CRH) and commercial substrate based on *Sphagnum* peat were used. The number of rooted cuttings, shoot length, root system length, number of new leaves, root system volume, callus formation at the cutting base, and shoot and root dry matter were evaluated. The experimental design was completely randomized with a (5 IBA concentrations x 2 substrates) factorial design. There were no interactions between the concentrations of IBA and the substrates. There was a difference only for the factor substrate. The cuttings presented an average rooting of 79%, with callus formation in 59.4% of them. The (CRH) substrate presented the highest shoot length and the highest number of new leaves. The commercial substrate resulted in a high average root volume, a large root length and a great increase in root dry matter. In the rooting by cutting of *Angelonia integerrima* is not necessary to use IBA and the commercial substratum based on peat or CAC can be used.

**Keywords:** Vegetative propagation, floriculture, native ornamental specie.

## INTRODUÇÃO

O gênero *Angelonia* tem origem na região neotropical, que vai desde o centro do México até o extremo sul da América do Sul (Boff *et al.*, 2014). Não estando totalmente esclarecido o surgimento das diferentes espécies (Plaschil & Olbricht, 2008; Gosch *et al.*, 2014), sendo relatadas aproximadamente 50 espécies (Tropicos, 2017), que têm diferenças relacionadas ao formato e coloração da flor, variando entre azul, violeta, branco e pink (Gosch *et al.*, 2014).

As espécies do gênero *Angelonia* pertencem à família Plantaginaceae (anteriormente Scrophulariaceae), sendo registradas 18 espécies no Brasil. O gênero pode ser encontrado em todos os biomas brasileiros e nos mais diversos tipos de vegetação: Caatinga, Campo de Altitude, Campo Limpo, Campo Rupestre, Cerrado, Floresta de Terra Firme, Floresta Ombrófila e Restinga (Lista de Espécies da Flora do Brasil, 2017).

*Angelonia integerrima* Sprengel é conhecida pelo nome popular de violeta-do-campo ou angelônia, sendo uma espécie herbácea e perene, com até 40 cm de altura, com ocorrência em afloramentos rochosos e campos pedregosos. O caule apresenta coloração bordô, com folhas oblongas e opostas. As flores estão dispostas em ramos terminais, com coloração branca a lilás claro, com alguma tonalidade púrpura. O florescimento ocorre de outubro a março. Esta espécie possui potencial ornamental, pois pode ser cultivada em canteiros, floreiras e vasos, assim como pode ser utilizada como complemento em arranjos florais (Burkart, 1979; Stumpf *et al.*, 2009).

A propagação assexuada, também denominada vegetativa, ocorre através da multiplicação de plantas a partir de qualquer estrutura vegetal capaz de formar raízes

(Kämpf, 2000), consiste na multiplicação de plantas pelo processo que não envolve gametas, mas a partir da potencialidade da célula de regenerar uma planta (Barbosa & Lopes, 2007).

Com relação à produção de mudas por via assexuada tem-se como vantagens a possibilidade de obtenção de indivíduos com maior fidelidade às características fenotípicas da planta-matriz, maior rapidez na produção de mudas, conferindo maior precocidade às plantas produzidas, eventual fixação de variações somáticas desejáveis (Kämpf, 2000; Neves *et al.*, 2006; Grolli, 2008). Porém, para a utilização de plantas matrizes para o fornecimento de material propagativo, há a necessidade de manutenção das mesmas em local apropriado com manejo adequado. Algumas espécies propagadas por estaquia apresentam algumas desvantagens, como menor taxa de multiplicação, maior risco de transmissão de doenças vasculares, bacterianas e viroses (Kämpf, 2000; Grolli, 2008).

Em muitas espécies é difícil induzir a formação de raízes adventícias, o que diminui a porcentagem de enraizamento, visto que estacas em diferentes pontos de maturação fisiológica apresentam comportamento diferenciado com relação ao enraizamento. Nesse contexto, o uso de auxinas pode auxiliar esse processo, sendo esta uma prática muito comum (Neves *et al.*, 2006). O enraizamento de estacas é um fenômeno controlado geneticamente e requer a presença de auxina, a qual induz a formação dos primórdios radiculares. Muitas vezes ocorre um desbalanço nos níveis naturais desse hormônio, por isso se faz necessário o uso de reguladores exógenos à planta, como por exemplo, as auxinas sintéticas como o ácido indolbutírico (AIB) e o ácido naftalenoacético (ANA) (Paiva *et al.*, 2005).

Estacas mais jovens apresentam maiores concentrações de auxina natural, por isso pode-se fornecer menor quantidade exógena de reguladores para induzir o processo de enraizamento. A poda pode ser utilizada como uma forma de rejuvenescimento a fim de

obter estacas mais novas, pois ocorre o processo de desdiferenciação com a formação de gemas (Neves *et al.*, 2006).

Na produção de mudas por estaquia, a escolha de um substrato adequado é de fundamental importância, de maneira que o mesmo disponibilize água suficiente para evitar a desidratação da estaca, mas que também facilite o fornecimento de oxigênio, com adequado espaço poroso, a fim de iniciar o processo de formação de raízes (Yamamoto *et al.*, 2013).

Outro fato, que também é importante ressaltar, é o hábito de crescimento de muitas espécies de angelônias, como por exemplo, a *Angelonia cornigera* Hook., que além de ser uma espécie herbácea, suas brotações ocorrem logo acima do solo, sendo que a emissão do caule acima do nível do solo ocorre na ocasião do florescimento, ou seja, esse caule dá origem à inflorescência, após senescem e morrem, contudo novas, brotações surgem da base da planta que novamente irão florescer (Machado *et al.*, 2002), este mesmo comportamento foi verificado para *A. integerrima*, embora isso não tenha sido encontrado descrito na literatura científica. Neste sentido, avaliar técnicas de propagação dessas espécies é de fundamental importância para a conservação das mesmas e também é uma forma de divulgação do patrimônio natural de uma região (Barroso *et al.*, 2009), bem como pode servir de informação à técnicos e produtores para a produção de mudas.

Nos últimos anos, há uma constante busca por novas espécies com potencial ornamental (Beckmann-Cavalcante *et al.*, 2014). Até o momento não existem informações sobre a exploração comercial de *Angelonia integerrima*, bem como na literatura também não foram encontradas informações sobre sua propagação. Visto que é uma espécie promissora para ser utilizada na floricultura é importante saber como propaga-la, pois suas sementes não germinaram através de métodos convencionais, em bandejas multicelulares com substrato,

sendo que estes testes foram realizados anteriormente à este trabalho. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da concentração de ácido indol-3-butírico e substratos no enraizamento de estacas apicais de *A. integerrima*.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Plantas matrizes oriundas de sementeira *in vitro*, de material propagativo coletado *in situ* no município de Barão do Triunfo (RS), foram cultivadas em vasos com capacidade de 5L, contendo substrato comercial Carolina Soil®. Os vasos foram mantidos na casa de vegetação do Departamento de Horticultura e Silvicultura da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), em Porto Alegre, RS. As plantas foram mantidas em um sistema de irrigação por gotejamento, sendo adubadas quinzenalmente com 2 g L<sup>-1</sup> de uma fórmula NPK 6-12-36 (Kristalon® amarelo), aplicado via fertirrigação, na dose de 50 mL por planta.

Aos cinco meses de cultivo foi realizada poda drástica nas plantas para estimular a brotação, após 30 dias procedeu-se a coleta das estacas apicais que foram padronizadas, para 6±0,5 cm de comprimento, duas gemas e cada uma protegida por uma folha, as quais foram cortadas permanecendo com a metade do tamanho inicial. Durante e após o preparo das estacas, as mesmas foram mantidas submersas em água para evitar a desidratação e oxidação do material vegetal. A extremidade basal de cada estaca foi cortada em formato de bisel e em seguida foram colocadas em contato com AIB em pó, diluído com talco (Pó Pelotense®) para as concentrações de zero (testemunha), 500, 1000, 2000 e 4000 mg kg<sup>-1</sup>. Após foram imediatamente transferidas para bandejas multicelulares de polipropileno com 50 células, com 100 mL de volume em cada célula, as quais foram preenchidas por dois diferentes

substratos: a) casca de arroz carbonizada (CAC); e, b) substrato comercial, contendo turfa de *Sphagnum*, vermiculita expandida, CAC, calcário dolomítico, gesso agrícola e fertilizante NPK (Carolina Soil®). A análise física e química dos substratos foi realizada pelo Laboratório de Análise de Substratos do Departamento de Horticultura e Silvicultura da Faculdade de Agronomia da UFRGS, conforme IN n° 17, de 21 de maio de 2007 (Brasil, 2007).

As estacas foram inseridas no substrato a aproximadamente 1 cm de profundidade e em seguida foram levadas para câmara de nebulização, localizado na Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), em Porto Alegre, RS, com sistema de irrigação por nebulização intermitente, controlado por temporizador, em ciclos de nebulização de 15 segundos a cada 5 minutos, com umidade relativa superior a 90%.

O período do experimento foi de 26 de janeiro a 11 de abril de 2016, sendo que as estacas permaneceram todo o tempo na câmara de nebulização. As temperaturas médias do período registradas foram de 25,1°C para a média, 29,6°C para a máxima e 20,7°C para a mínima.

Aos 76 dias após a instalação do experimento foram realizadas as seguintes avaliações: número de estacas enraizadas, comprimento da parte aérea e do sistema radicular, número de folhas novas, volume do sistema radicular, formação de calo na base da estaca, massa seca da parte aérea e do sistema radicular. O comprimento da parte aérea e do sistema radicular foram obtidos com o auxílio de uma régua milimetrada. O volume de raiz foi obtido através do volume de água deslocado, a partir de um volume conhecido. O sistema radicular e a parte aérea foram secos em estufa a  $65\pm 5^{\circ}\text{C}$ , até peso constante, e posteriormente pesagem em balança de precisão.



O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial (5 concentrações de AIB x 2 substratos), com cinco repetições de dez estacas por parcela. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e após as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro, pelo *software* SigmaPlot 11.0. Os dados de % de calo não atenderam os pressupostos da ANOVA e foram transformados para  $X^2$ .

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A análise de variância mostrou que, para todas as variáveis analisadas, não houve interação entre as concentrações de AIB e os substratos testados (Tabela 1). Também não houve diferença estatística para as diferentes variáveis analisadas com relação às concentrações de AIB, tendo diferença somente para o fator substrato (Tabela 1).

As estacas apresentaram enraizamento médio de 79%, sem diferença estatística para os substratos e as concentrações de reguladores de crescimento utilizados (Tabela 2), mostrando que a *angelônia* possui enraizamento em taxas elevadas de estacas apicais. Isso sugere que esta espécie possui níveis endógenos suficientes de auxina, visto que a formação de raízes adventícias, através do processo de estaquia, ocorre a partir de células diferenciadas que se dividem e posteriormente desenvolvem o meristema apical da raiz (Taiz & Zeiger, 2013). Folhas ou estacas caulinares começam a formar raízes adventícias próxima à região do corte, devido ao acúmulo de AIA que ocorre no local, devido à interrupção no transporte polar dessa auxina (Kerbaui, 2013).

Tabela 1. Análise de variância da estaquia de *Angelonia integerrima* Sprengel, submetida a diferentes concentrações de AIB e substratos.

VARIÁVEIS ANALISADAS	SUBSTRATO VALOR P	CONCENTRAÇÃO AIB VALOR P	INTERAÇÃO VALOR P	CV (%)
% ENRAIZAMENTO	0,53	0,22	0,46	8,6
% CALO	<0,01	0,33	0,45	31,4
COMP. PA (cm)	<0,01	0,88	0,88	23,4
COMP. SR (cm)	0,01	0,73	0,32	6,4
Nº FOLHAS NOVAS	<0,01	0,85	0,52	39,4
VOLUME SR (mL)	0,01	0,57	0,85	22,9
MS PA (g)	0,81	0,72	0,90	11,5
MS SR (g)	<0,01	0,56	0,96	31,8

CV = coeficiente de variação; COMP. PA = comprimento da parte aérea; COMP. SR = comprimento do sistema radicular; Nº FOLHAS NOVAS = número de folhas novas; VOLUME SR = volume do sistema radicular; MS PA = massa seca da parte aérea; MS SR = massa seca do sistema radicular.

No cultivo de *Podranea ricasoliana* (Tanfani) Sprague os autores também não verificaram diferença no enraizamento por estaquia quando da utilização de AIB, alcançando enraizamento médio de 45,2% (Tedesco *et al.*, 2016). Já no cultivo de *Sinningia lineata* (Hjelmq.) Chautems foi verificado 100% de enraizamento das estacas (Barroso *et al.*, 2009), mostrando que essa variável depende da espécie.

O enraizamento de uma estaca tem influência de fatores endógenos e também das condições ambientais durante essa fase, visto que a formação de raízes tem relação com a interação de fitohormônios e a translocação de substâncias, como carboidratos, compostos nitrogenados, vitaminas e hormônios, que estão presentes nas folhas e gemas das estacas (Fachinello *et al.*, 2005). No enraizamento de estacas caulinares herbáceas de *Erythrina falcata* Benth., sem a presença de folhas, foi verificada alta mortalidade das estacas e ausência de enraizamento (Betanin & Nienow, 2010), e em *Ixora coccinea* L. a presença de folhas afetou significativamente a formação de raízes (Silva *et al.*, 2015).

Tabela 2. Influência de concentrações de ácido indol-3-butírico (AIB) e de substratos no percentual de enraizamento (% E), no percentual de formação de calo (% Calo), no comprimento da parte aérea (PA), no comprimento do sistema de radicular (SR), no número de folhas novas (N° folhas), no volume do sistema radicular (VSR), na massa seca da parte aérea (MS PA) e das raízes (MS SR) de estaquia de *Angelonia integerrima* Sprengel.

<b>Concentração</b>								
<b>AIB</b>	<b>%</b>	<b>%</b>	<b>PA</b>	<b>SR</b>	<b>N° folhas</b>	<b>VSR</b>	<b>MS PA</b>	<b>MS SR</b>
<b>(mg kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>E</b>	<b>Calo</b>	<b>(cm)</b>	<b>(cm)</b>	<b>novas</b>	<b>(mL)</b>	<b>(g)</b>	<b>(g)</b>
0	71 <sup>ns</sup>	70 <sup>ns</sup>	9,16 <sup>ns</sup>	9,89 <sup>ns</sup>	8,49 <sup>ns</sup>	0,33 <sup>ns</sup>	0,13 <sup>ns</sup>	0,04 <sup>ns</sup>
500	83	58	9,79	9,90	8,81	0,30	0,12	0,04
1000	77	49	9,02	9,73	8,30	0,26	0,10	0,03
2000	86	55	10,12	9,70	9,40	0,33	0,14	0,04
4000	80	65	9,51	10,35	9,01	0,28	0,12	0,04
<b>Média</b>	79,4	59,4	9,52	9,91	8,80	0,30	0,12	0,04
<b>Substrato</b>								
<b>CAC<sup>1</sup></b>	78,1 <sup>ns</sup>	34,7 b	11,56 a	9,49 b	12,02 a	0,24 b	0,12 <sup>ns</sup>	0,03 b
<b>Comercial<sup>2</sup></b>	80,7	84,1 a	7,48 b	10,34 a	5,59 b	0,36 a	0,12	0,05 a
<b>Média</b>	79,4	-	-	-	-	-	0,12	-

<sup>1</sup>CAC = casca de arroz carbonizada; <sup>2</sup>Substrato comercial; ns = não significativo; médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Na estaquia de *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Tronc. foi verificada maior porcentagem de enraizamento de estacas herbáceas, já que as mesmas apresentaram maior retenção de folhas, quando comparadas com estacas semilenhosas, sendo as folhas uma fonte de auxina endógena (Santos *et al.*, 2009). Como neste trabalho, se manteve a mesma quantidade de gemas e folhas por estaca, isso talvez explique o fato de não haver diferença para a porcentagem de enraizamento, mesmo com o fornecimento de auxina exógena, provavelmente porque a espécie possui esse fitohormônio em níveis suficientes, pois apresentou enraizamento sem a necessidade de utilização de AIB.

Para o fator substrato, na propagação vegetativa de *Oncimum selloi* (Benth), uma espécie medicinal nativa, os autores também não verificaram diferença na porcentagem de enraizamento, quando da utilização de CAC, areia lavada e um substrato comercial (Costa *et al.*, 2007). Em estaquia de *Baccharis trimera* (Less.), também foram testados diferentes substratos, dentre eles a CAC, sendo que os mesmos não apresentaram diferenças com relação à porcentagem de enraizamento (Bona *et al.*, 2005). Resultados esses que vão de acordo com o presente trabalho, indicando que a espécie não é exigente perante as características dos substratos.

Outra variável relevante é o volume do sistema radicular, nesse trabalho o mesmo não apresentou diferença para as diferentes concentrações de AIB, porém é importante ressaltar que os reguladores podem, também, influenciar a qualidade do sistema radicular (Fachinello *et al.*, 2005), que terá relação direta com o desenvolvimento das mudas, bem como a sobrevivência das mesmas no momento do transplante (Lima & Ohashi, 2016), conseqüentemente apresentando crescimento mais rápido e vigoroso (Reis *et al.*, 2000). Resultados semelhantes foram obtidos no enraizamento de estacas de *Campomanesia aurea*, onde o AIB também não teve influência na qualidade do sistema radicular (Emer *et al.*, 2016). Já em estaquia de *Mikania micrantha* Kunth (Ferriani *et al.*, 2007) e *Jasminum mesnyi* Hanceos (Althaus *et al.*, 2007) os autores verificaram que o uso de auxina sintética aumentou o comprimento das raízes formadas, influenciando a qualidade das mesmas.

A formação de calo ocorreu em 59,4% das estacas, sendo que o substrato a base de turfa promoveu 2,4 vezes maior formação de calo, quando comparado ao CAC (Tabela 2). Em algumas espécies, a formação de calo na base das estacas pode servir de barreira física para o desenvolvimento de raízes, já em outras pode ser o início da formação de raízes

adventícias (Fachinello *et al.*, 2005), neste trabalho o calo pode ter sido o precursor na formação das raízes, pois se obteve estacas enraizadas com a presença de calo.

O substrato CAC promoveu maior incremento do comprimento da parte aérea (11,56 cm), quando comparado com o substrato à base de turfa (7,48 cm) (tabela 2). O primeiro substrato também favoreceu o maior número de folhas novas (12,02), quando comparado ao comercial à base de turfa (5,59) (Tabela 2). Já a variável massa seca da parte aérea não apresentou diferença estatística, com média geral 0,12g (tabela 2). Mesmo que o substrato CAC favoreceu maior comprimento da parte aérea, isso não refletiu no acúmulo de massa seca, visto que o mesmo apresenta baixa concentração de sais, o que pode ter influência no desenvolvimento inicial das estacas.

A CAC pode ser utilizada pura no enraizamento de estacas ou em mistura com outros materiais, pois apresenta baixa densidade e baixa capacidade de retenção de água, oferece boa aeração, devido à alta porcentagem de macroporos (Kämpf, 2000). Propicia uma drenagem rápida e eficiente (Kämpf, 2000), já que órgãos como as raízes apresentam respiração intensa (Kerbaui, 2013), por isso a necessidade de fornecer um substrato que apresente adequadas características físicas, o qual leva em consideração o espaço de aeração (EA).

A análise física da CAC (Tabela 3) mostrou que a mesma apresenta porosidade total (PT) de 71,6% e EA de 47,7%, já o substrato comercial apresenta 82,8 e 33,3, respectivamente. A PT compreende os micro e macroporos, sendo que os primeiros retêm a água e os últimos são responsáveis pela infiltração e posterior drenagem desta, com consequente aeração do meio (Drzal *et al.*, 1999), sendo que o substrato ideal deve apresentar PT de 85% (De Boodt & Verdonck, 1972). Com relação às características químicas, a CAC apresentou valor de pH próximo da neutralidade (7,49) e CE de 0,13 mS cm<sup>-1</sup>.

Tabela 3. Análise química e física dos substratos utilizados no enraizamento de estacas de *Angelonia integerrima* Sprengel.

VARIÁVEIS	CAC <sup>1</sup>	Comercial <sup>2</sup>
<b>pH</b>	7,49	6,15
<b>CE (mS cm<sup>-1</sup>)</b>	0,13	0,35
<b>PT (%)</b>	71,56	82,78
<b>EA (%)</b>	47,72	33,26
<b>AD (%)</b>	14,57	19,52
<b>AR (%)</b>	9,28	30,00

<sup>1</sup>CAC = casca de arroz carbonizada; <sup>2</sup>Substrato comercial; pH = potencial hidrogeniônico; CE = condutividade elétrica; DU = densidade úmida; DS = densidade seca; UA = umidade atual; PT = porosidade total; EA = espaço de aeração; AFD = água facilmente disponível; AT = água tamponante; AR = água remanescente.

No enraizamento de estacas de *Rhododendron simsii* Planch., quando da utilização de diferentes substratos, foi verificado que a CAC e a vermiculita proporcionaram maior número de folhas, já a fibra de coco apresentou os menores valores para essa variável (Lone *et al.*, 2010). O mesmo pode ser observado para esse trabalho, pois a CAC apresentou maior número de folhas quando comparada com o substrato comercial.

O substrato à base de turfa proporcionou volume médio de raiz de 0,36 mL, contra 0,24 mL da CAC (Tabela 2). Visto que para comprimento do sistema radicular, o substrato à base de turfa teve o maior valor (10,34 cm), quando comparado com o CAC (9,39 cm). Bem como, para a variável massa seca radicular o substrato comercial apresentou 0,05g de média, comparado com o CAC que teve 0,03g (Tabela 2).

A turfa pode ser usada pura ou em misturas, para auxiliar na melhoria de características físicas ou químicas dos substratos (Kämpf, 2000). O substrato pode ter efeito sobre a qualidade das raízes formadas (Fachinello *et al.*, 2005). No presente trabalho foi observado que o substrato comercial a base de turfa proporcionou maior volume médio, comprimento e massa seca do sistema radicular. Este substrato possui adubação de base com

NPK em sua composição, com uma e CE 0,35 mS cm<sup>-1</sup> e pH de 6,15. Fato que pode ter contribuído para uma melhor qualidade do sistema radicular, sendo que estas apresentam relação direta com a sobrevivência das mudas no transplante e posterior desenvolvimento, devido à maior aptidão em absorver água e nutrientes (Santoro *et al.*, 2010).

A clonagem é um método que pode ser utilizado pelos produtores para a produção de mudas, sendo que os mesmos podem manter plantas matrizes selecionadas na casa de vegetação, as quais vão fornecer o material necessário para a propagação. Este trabalho é precursor, pois foi verificado que é possível realizar a clonagem de *A. integerrima*, através do método de estaquia, mesmo que as estacas apicais irão originar inflorescências. Não é necessária a utilização de AIB, visto que a espécie apresentou um enraizamento satisfatório.

## CONCLUSÃO

O processo de enraizamento por estaquia de *Angelonia integerrima* é viável para as condições deste trabalho, não sendo necessário usar AIB e pode-se utilizar o substrato comercial à base de turfa ou a casca de arroz carbonizada.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTHAUS, M. M. et al. Influência do ácido naftaleno acético e dois tipos de substrato no enraizamento de estacas de jasmim-amarelo. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 38, n. 3, p. 322-326, 14 nov. 2007.

BARBOSA, J. C.; LOPES, L. C. **Propagação de plantas ornamentais**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2007.

BARROSO, C. M. et al. Propagação vegetativa de *Sinningia lineata* (Hjelmq.) Chautems, rainha-do-abismo. **Ornamental Horticulture**, Campinas, v. 14, n. 2, 21 jul. 2009.

BECKMANN-CAVALCANTE, M. Z et al. Propagação de *Alternanthera dentata* pelo processo de estaquia em função de tipo de estaca, AIB e época do ano. **Comunicata Scientiae**, [S.L.], v. 5, n. 2, p. 170-177, 30 jun. 2014.

BETANIN, L.; NIENOW, A. A. Propagação vegetativa da corticeira-da-serra (*Erythrina falcata* Benth.) por estaquia caulinar e foliar. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 4, p. 871-880, 20 dez. 2010.

BOFF, S. et al. Perfume production in flowers of *Angelonia salicariifolia* attracts males of *Euglossa annectans* which do not promote pollination. **Apidologie**, Paris, v. 46, n. 1, p. 84-91, 18 jul. 2014.

BONA, C. M. de; BIASI, L. A.; ZANETTE, F.; NAKASHIMA, T. Estaquia de três espécies de *Baccharis*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 1, p. 223-226, fev. 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e abastecimento (MAPA). Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA). Instrução Normativa SDA Nº 17 de 21 de maio de 2007. Métodos Analíticos Oficiais para Análise de Substratos e Condicionadores de Solos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 24 de maio 2007. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=14783>>. Acesso em: 25 de outubro de 2016.

BURKART, A. Parte V: Dicotiledoneas Metaclamideas. In: FLORA Ilustrada de Entre Rios (Argentina). Buenos Aires, 1979. Tomo VI, parte 5ª, p. 481-484.

COSTA, L. C. B.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V. Comprimento da estaca e tipo de substrato na propagação vegetativa de atroveran. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 4, p. 1157-1160, ago. 2007.

DE BOODT, M.; VERDONCK, O. The physical properties of the substrates in horticulture. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n. 26, p. 37-44, dez. 1972.

DRZAL, M. A.; FONTENO, W. C., CASSEL, D. K. Pore fraction analysis: a new tool for substrate testing. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n. 481, v.1, p. 43-54, 1999.

EMER, A. A. et al. Influence of indolebutyric acid in the rooting of *Campomanesia aurea* semihardwood cuttings. **Ornamental Horticulture**, Campinas, v. 22, n. 1, p. 94-100, 3 maio 2016.

FACHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. C. **Propagação de plantas frutíferas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. 221 p.

FERRIANI, A. P. et al. Influência da época do ano e das diferentes formas de aplicação de ácido naftaleno acético (ANA) no enraizamento de *Mikania micrantha* Kunth. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 9, n. 2, p. 102-107, 2007.



- GOSCH, C et al. Isolation of dihydroflavonol 4-reductase cDNA clones from *Angelonia x angustifolia* and heterologous expression as GST fusion protein in *Escherichia coli*. **PLOS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 9, p. e107755, 19 set. 2014.
- GROLLI, P. R. Propagação de plantas ornamentais. In: PETRY, C. (Org.). **Plantas ornamentais - aspectos para a produção**. 2 ed. Passo Fundo: Universidade de Passo Fundo, 2008. p. 59-69.
- KÄMPF, A. N. **Produção comercial de plantas ornamentais**. Guaíba: Agropecuária, 2000. 254 p.
- KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal**. 2 ed. RJ: Guanabara Koogan, 2013.
- LIMA, C. C. L.; OHASHI, S. T. Substratos no enraizamento de estacas provenientes de mudas de *Schizolobium parahyba* var. *amazonicum*. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 13, n. 23, p. 1270-1282, 2016.
- LISTA de espécies da flora do Brasil. Rio de Janeiro, 2017. Disponível em <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>; Acesso em 05 jan. 2017.
- LONE, A. B. et al. Enraizamento de estacas de azaléia (*Rhododendron simsii* Planch.) no outono em AIB e diferentes substratos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 8, p. 1720-1725, ago. 2010.
- MACHADO, I. C.; VOGEL, S.; LOPES, A. V. Pollination of *Angelonia cornigera* Hook. (Scrophulariaceae) by long-legged, oil-collecting bees in NE Brazil. **Plant Biology**, London, v. 4, n. 3, p. 352-359, 1 maio 2002.
- NEVES, T. S. ; et al. A. Enraizamento de corticeira-da-serra em função do tipo de estaca e variações sazonais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 12, p. 1699-1705, dez. 2006.
- PAIVA, R. et al. Aspectos fisiológicos da produção de flores e plantas ornamentais. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 26, n. 227, p. 73-84, 2005.
- PLASCHIL, S.; OLBRICHT, K. Histogenetic Variation in flowers of *Angelonia* Humb. et Bonpl. **Journal of Applied Botany and Food Quality**, [S.l.], v. 82, n. 1, p. 41-46, 28 nov. 2008.
- REIS, D. J. et al. Efeito do estiolamento e do ácido indolbutírico no enraizamento de estacas do porta-enxerto *Pyrus calleryana* Dcne. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n. 4, p. 931-938, out./dez. 2000.
- SANTORO, P. H. et al. Influência de folhas e lesões na base de estacas herbáceas no enraizamento de goiabeira da seleção 8501-9. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina v. 31, n. 2, p. 289-294, 30 jul. 2010.

SANTOS, F. M. et al. Produção de mudas de *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Tronc. por meio da propagação sexuada e assexuada. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 11, n. 2, p. 130-136, 2009.

SILVA, A. D. S. et al. Enraizamento de estacas caulinares de ixora. **Ornamental Horticulture**, Campinas, v. 21, n. 2, p. 201-208, 31 ago. 2015.

STUMPF, E. R. T.; BARBIERI, R. L.; HEIDEN, G. **Cores e formas no Bioma Pampa: plantas ornamentais nativas**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2009. 276 p.

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

TEDESCO, M. et al. Propagação de *Podranea ricasoliana* (Tanfani) Sprague por estaquia. **Enciclopedia Biosfera**, Goiânia, v. 13, n. 24, p. 855-862, 2016.

TROPICOS. **Missouri Botanical Garden**. St. Louis, 2017. Disponível em <<http://www.tropicos.org/NameSearch.aspx?name=Angelonia&commonname>>; Acesso em 05 jan. 2017.

YAMAMOTO, L. Y. et al. Substratos no enraizamento de estacas herbáceas de amora-preta Xavante. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 43, n.1, p. 15-20, jan, 2013.

## 6 CONCLUSÃO GERAL

Para a germinação de *Angelonia integerrima in vitro*, recomenda-se utilizar 50% da concentração de sais do meio MS e armazenar as sementes em ambiente refrigerado ( $5^{\circ}\text{C}\pm 1$ ). Para a multiplicação é recomendado utilizar  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP e  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA, a fim de obter um maior número de brotos. O AIB na concentração de  $0,83 \text{ mg L}^{-1}$  aumenta a porcentagem de enraizamento *in vitro*. A espécie teve 50,8% de aclimatização para as condições deste trabalho.

É possível obter plantas de *A. integerrima* livres de contaminações *in vitro* por fungos e bactérias, utilizando-se explantes iniciais com tamanho menor ou igual a 5 mm. O BAP proporcionou incremento linear para a multiplicação da espécie.

O processo de enraizamento por estaquia de *Angelonia integerrima* para as condições deste trabalho apresentou 79,4% de enraizamento, não sendo necessário usar AIB e pode-se utilizar o substrato comercial à base de turfa ou a casca de arroz carbonizada.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste estudo confirmam a viabilidade da propagação da angelônia (*Angelonia integerrima* Sprengel), pois foi possível obter dados referentes à propagação sexuada e assexuada. Através da germinação de sementes *in vitro*, micropropagação a partir de plântulas germinadas *in vitro* e através do estabelecimento de diferentes tamanhos de ápices caulinares. Também é viável o processo de estaquia.

Esses estudos servem de aporte para técnicos e produtores do setor de floricultura, que constantemente estão em busca de novidades para o setor, bem como é uma forma de auxiliar na conservação da espécie, de modo que a viabilidade da produção de mudas evita o extrativismo, contribuindo com a conservação da flora nativa.

Estudos básicos de propagação servem de auxílio a futuros programas de melhoramento, pois é necessária a compreensão do modo de propagação da espécie para, quem sabe futuramente lançar novas variedades comerciais ou híbridos.

Angelônia é uma espécie promissora para ser utilizada como planta ornamental, porém sugere-se que pesquisas futuras sejam realizadas para verificar o desempenho da espécie tanto em vasos e canteiros, bem como a utilização das inflorescências em arranjos florais.

Dessa forma o presente trabalho disponibiliza informações sobre a propagação de *Angelonia integerrima* Sprengel, a qual pode ser propagada por via sexuada e assexuada.

## 8 APÊNDICES

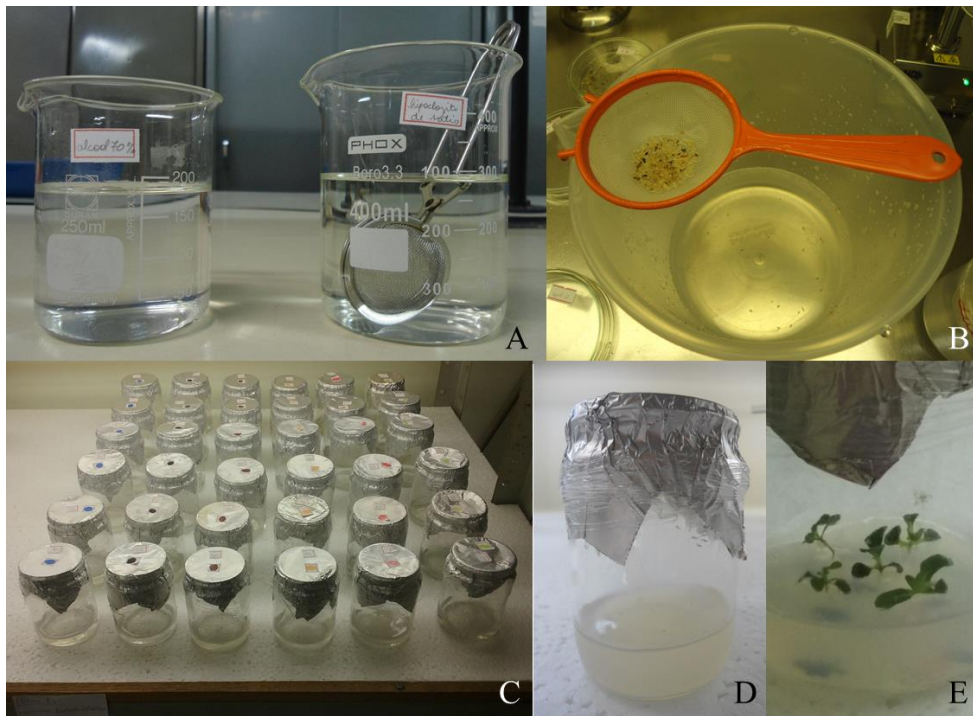


APÊNDICE 1. Plantas de *Angelonia integerrima* Sprengel *in situ*: Morro Santana (A e C) e Parque Natural Morro Osso (B) com inflorescências e frutos.



APÊNDICE 2. Plantas de *Angelonia integerrima* Sprengel na casa de vegetação do Departamento de Horticultura e Silvicultura (DHS) da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul: desenvolvimento das mudas (A), plantas matrizes (B) com inflorescências (C).





APÊNDICE 3. Artigo 1, referente ao experimento 1 - germinação *in vitro* de sementes de *Angelonia integerrima* Sprengel: A) desinfestação das sementes em álcool 70% e hipoclorito de sódio, B) tríplce lavagem com água deionizada em fluxo laminar; C e D) Frascos com as sementes em sala de crescimento e E) posterior desenvolvimento.

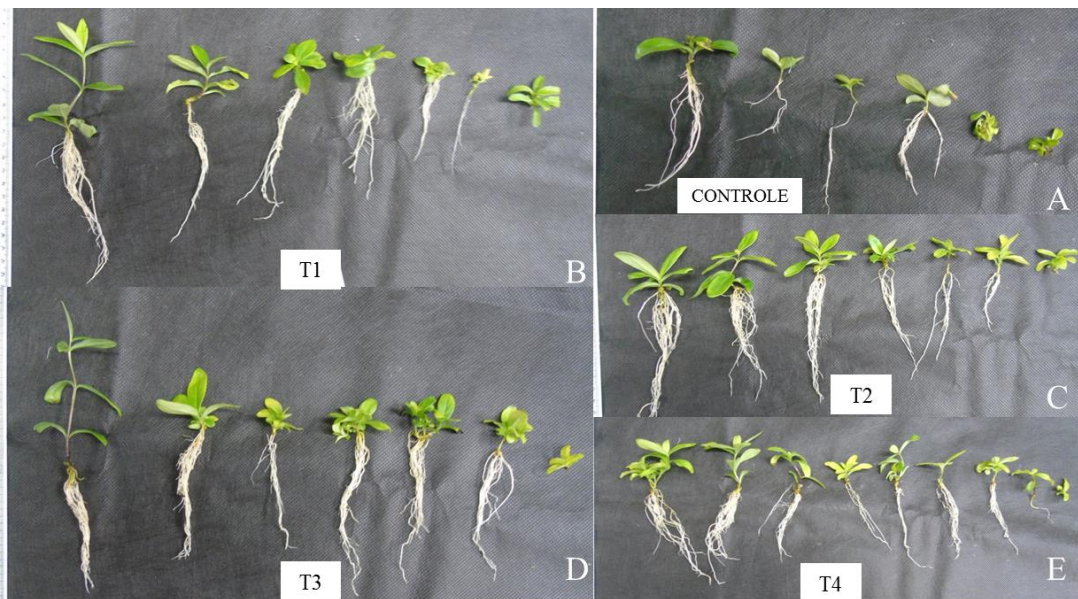


APÊNDICE 4. Artigo 1, referente ao experimento 2 - multiplicação *in vitro* de *Angelonia integerrima* Sprengel: A) mudas germinadas *in vitro*; B) padronização dos explantes para 1 cm de comprimento; C) explantes nos frascos e D) desenvolvimento na sala de crescimento; E) multiplicação para os diferentes tratamentos com BAP e ANA.





APÊNDICE 5. Artigo 1, referente ao experimento 3 e 4 - enraizamento *in vitro* de *Angelonia integerrima* Sprengel e aclimatização das mudas: A) mudas enraizadas *in vitro* e transferidas para bandejas com substrato casca de arroz carbonizada; B e C) mudas aclimatizadas; D) disposição das bandejas e sala de aclimatização.

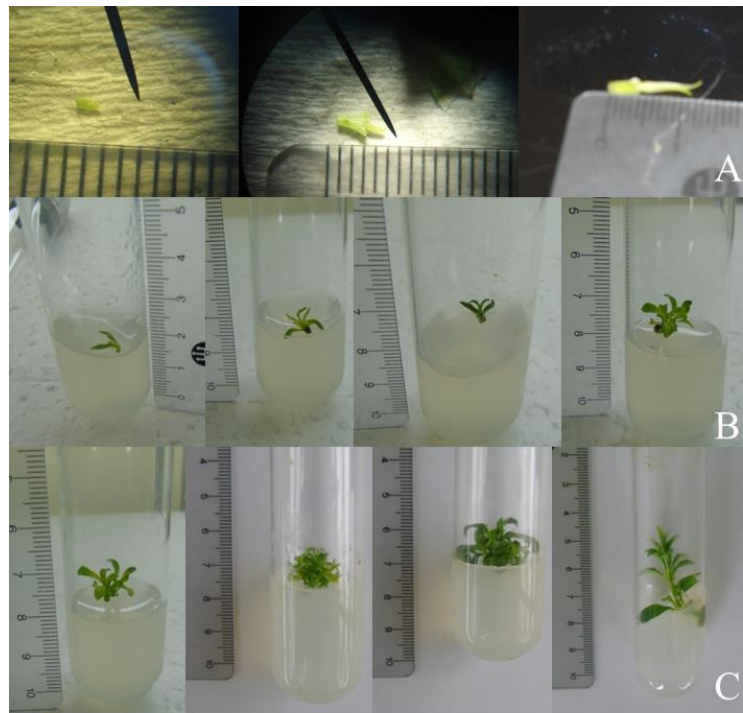


APÊNDICE 6. Artigo 1, referente ao experimento 4 – aclimatização de *Angelonia integerrima* Sprengel: A) controle: sem AIB; B) T1: 0,25 mg L<sup>-1</sup> de AIB; ; C) T2: 0,50 mg L<sup>-1</sup> de AIB; D) T3: 0,75 mg L<sup>-1</sup> de AIB; e E) T4: 1,0 mg L<sup>-1</sup> de AIB.

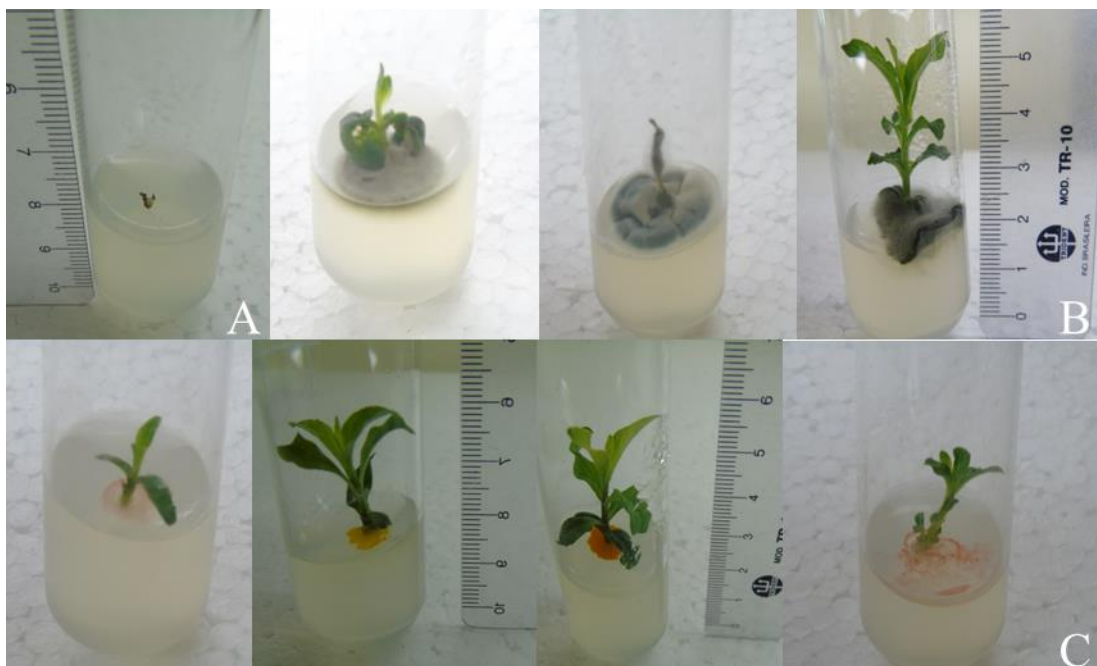


APÊNDICE 7. Artigo 2 - plantas de *Angelonia integerrima* Sprengel em vasos em ambiente protegido: A) sem poda; B) poda drástica e D) colocação em câmara escura para estiolamento; C e E) brotações estioladas.

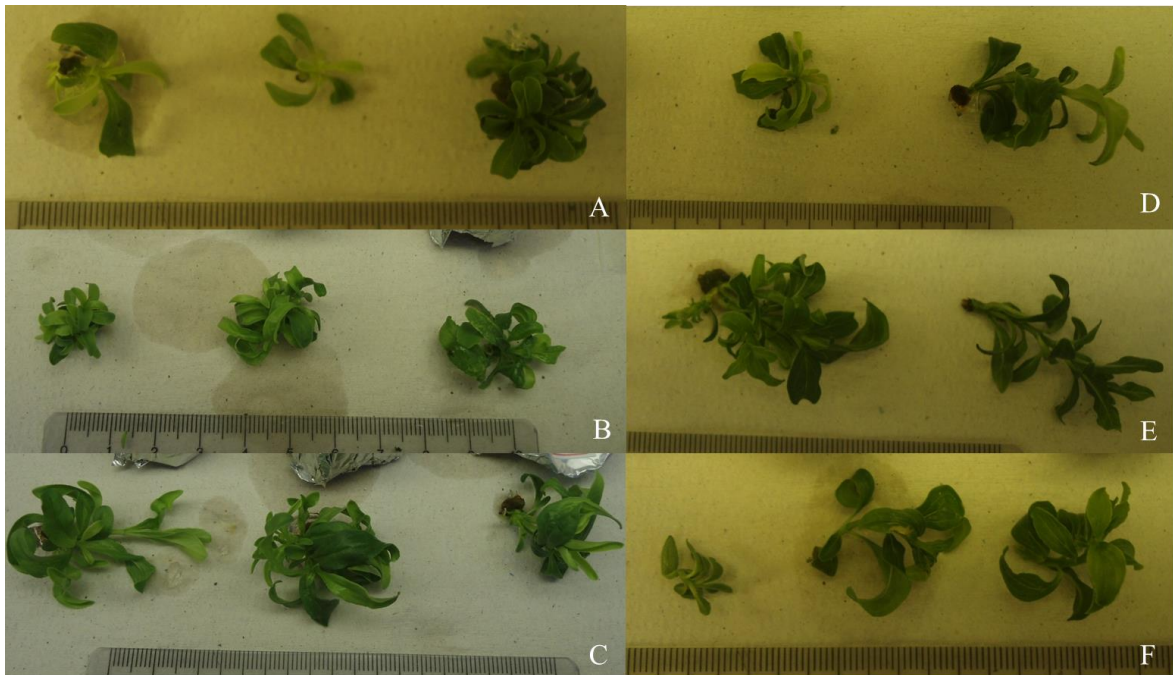




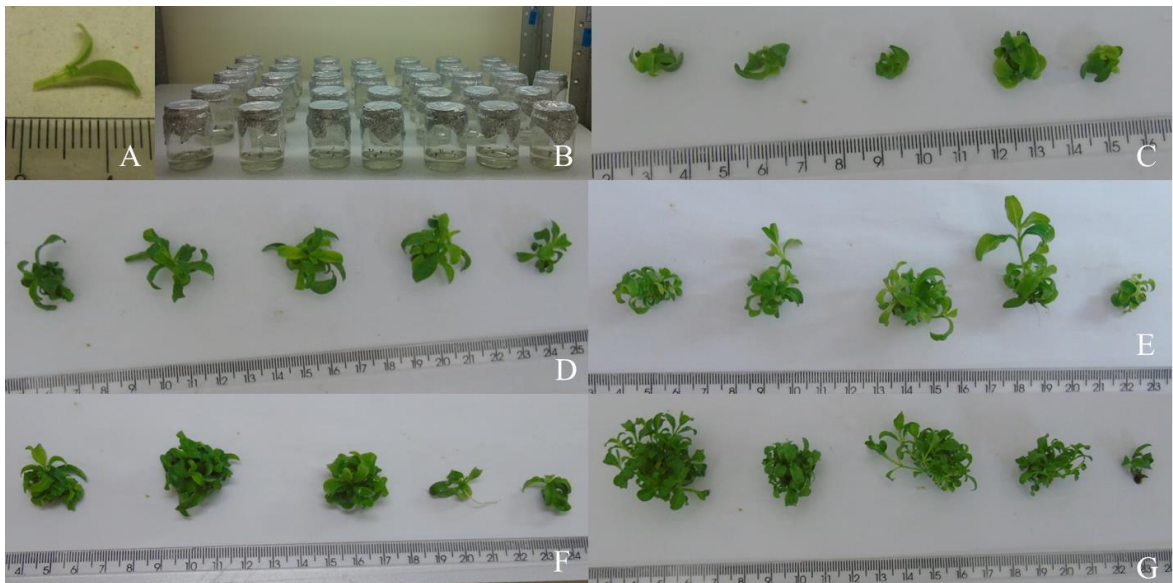
APÊNDICE 8. Artigo 2 - estabelecimento *in vitro* de ápices caulinares de *Angelonia integerrima* Sprengel: A) ápices com 1,0, 5,0 e 11 mm; B e C) desenvolvimento dos ápices *in vitro*.



APÊNDICE 9. Artigo 2 - estabelecimento *in vitro* de ápices caulinares de *Angelonia integerrima* Sprengel: A) ápice caulinar oxidado; B) contaminação por fungos; C) contaminação bacteriana.



APÊNDICE 10. Artigo 2 - estabelecimento *in vitro* de ápices caulinares e multiplicação de *Angelonia integerrima* Sprengel: A) 1,0 mm; B) 3,0 mm; C) 5,0 mm; D) 7,0 mm; E) 9,0 mm e F) 11,0 mm.

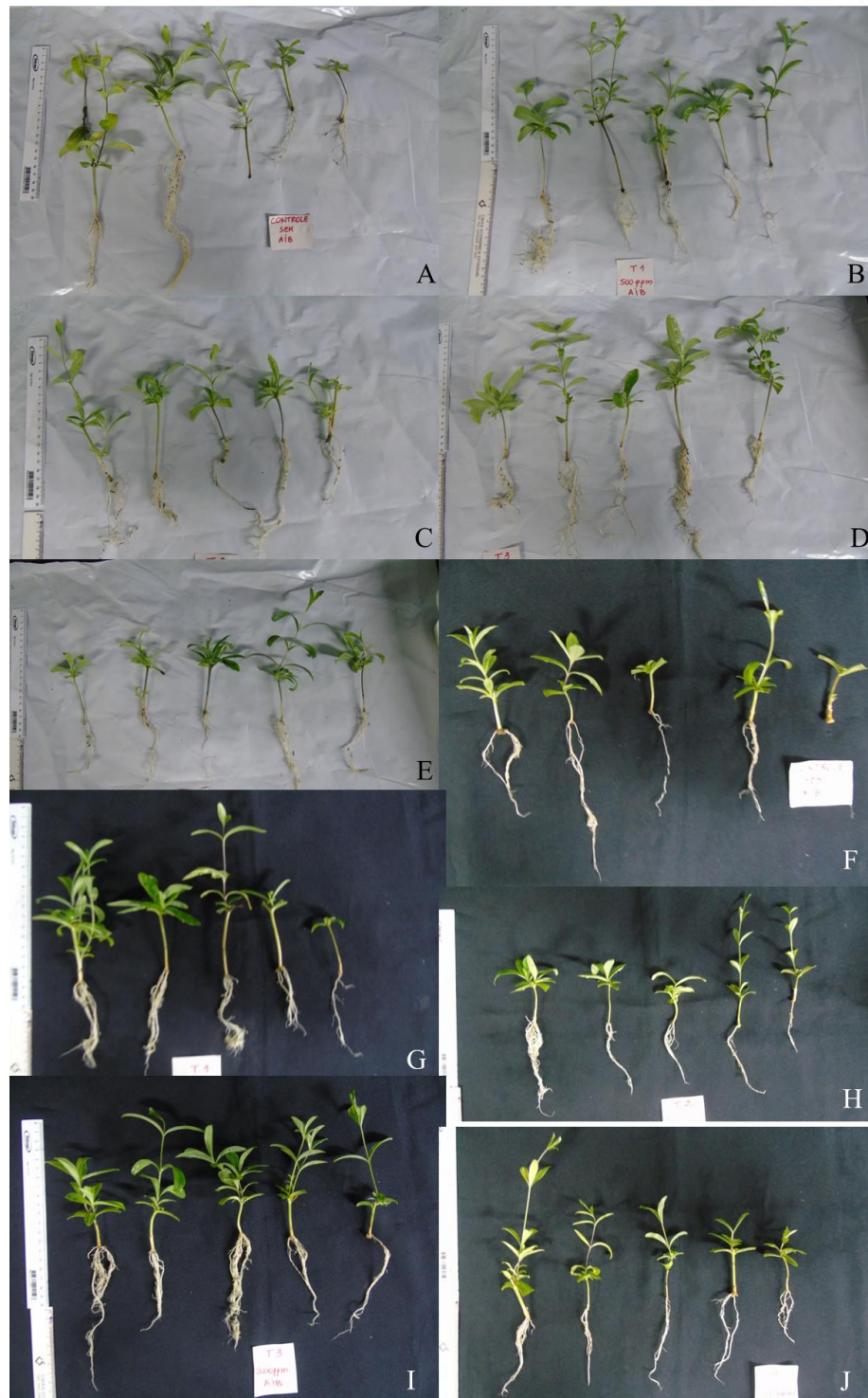


APÊNDICE 11. Artigo 2 - multiplicação *in vitro* de ápices caulinares de *Angelonia integerrima* Sprengel: A) explante padronizado para aproximadamente 1 cm; B) disposição dos frascos na sala de crescimento; C) controle: sem BAP; D) T1: 0,05 mg L<sup>-1</sup> de BAP; E) T2:0,10 mg L<sup>-1</sup> de BAP e F) T3:0,15 mg L<sup>-1</sup> de BAP e G) T4: 0,20 mg L<sup>-1</sup> de BAP.



APÊNDICE 12. Artigo 3 - estaquia de *Angelonia integerrima* Sprengel em diferentes substratos: A) ramo de angelônia; B) estaca com  $6\pm 0,5$  cm de comprimento; C) estacas no substrato casca de arroz carbonizada; e D) em substrato comercial à base de turfa.





APÊNDICE 13. Artigo 3 - enraizamento de estacas apicais de *Angelonia integerrima* Sprengel: concentrações de AIB e substratos: A e F) controle: sem AIB; B e G) T1: 500 mg kg<sup>-1</sup> AIB; C e H) T2: 1000 mg kg<sup>-1</sup> AIB; D e I) 2000 mg kg<sup>-1</sup> AIB; E e J) 4000 mg kg<sup>-1</sup> AIB; A à E) substrato casca de arroz carbonizada e F à J) substrato comercial à base de turfa.