

MICROPROPAGAÇÃO DE SEMPRE-VIVAS
Syngonanthus elegans E *Syngonanthus elegantulus*

ROGÉRIO GOMES PÊGO

2009

ROGÉRIO GOMES PÊGO

**MICROPROPAGAÇÃO DE SEMPRE-VIVAS *Syngonanthus elegans*
E *Syngonanthus elegantulus***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, área de concentração em Micropropagação de Plantas Ornamentais, para a obtenção do título de "Mestre".

Orientadora

Profª. Dra. Patrícia Duarte de Oliveira Paiva

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2009

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Pêgo, Rogério Gomes.

Micropropagação de sempre-vivas *Syngonanthus elegans* e
Syngonanthus elegantulus / Rogério Gomes Pêgo. – Lavras:
UFLA, 2009.

50 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2009.

Orientador: Patrícia Duarte de Oliveira Paiva.

Bibliografia.

1. Cultivo in vitro. 2. Propagação in vitro. 3. Multiplicação. 4.
Aclimatização. 5. Floricultura. I. Universidade Federal de Lavras. II.
Título.

CDD – 584.81
635.96631

ROGÉRIO GOMES PÊGO

**MICROPROPAGAÇÃO DE SEMPRE-VIVAS *Syngonanthus elegans* E
*Syngonanthus elegantulus***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, área de concentração em Micropropagação de Plantas Ornamentais, para a obtenção do título de "Mestre".

APROVADA em 28 de julho de 2009

Prof. Dr^a. Fernanda Carlota Nery

IFSMG

Dr. João Maurício Cavalcante Alves

UFLA

Profa. Dra. Patrícia Duarte de Oliveira Paiva

UFLA

(Orientadora)

LAVRAS

MINAS GERAIS – BRASIL

2009

Aos meus queridos pais, Darley Gomes Paiva e Maria Judith Gomes

Pêgo

OFEREÇO

À minha família,

Aos meus irmãos,

Aos meus amigos,

Aos meus sobrinhos,

Ao meu amigo Vander Gonçalves,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, grande e sublime por si, pelos bons caminhos que me permite trilhar e por fazer meus sonhos e pensamentos semelhantes aos Seus.

Aos meus pais, Darley Gomes Paiva (Seu Lico) e Maria Judith Gomes Pêgo (Dona Dita) espelhos meus, que me ensinaram a acreditar e seguir em frente.

A meus irmãos pela confiança, apoio e momentos de alegria.

Aos meus sobrinhos que por muitas vezes me fizeram voltar a ser criança.

Às maravilhosas amigas de Alfenas (Amanda, Carla, Fabiane e Kamila), Genaina, Michele, Aretusa, Elma e Marilsa.

Aos meus amigos Jardel, Sérgio, Expedito e Vander pelos momentos inesquecíveis que vivenciamos juntos.

A minha orientadora, Professora Patrícia Duarte de Oliveira Paiva, pelas sugestões, calma e conhecimentos transmitidos durante a pesquisa. Pelos conselhos, atenção e incentivos pessoais que me impulsionaram a seguir.

À Fernanda Carlota Nery e João Maurício Cavalcante Alves pela participação na banca de defesa.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, pela oportunidade de realização do curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

A todos os professores do curso de Fisiologia Vegetal que, de uma forma ou de outra, me ensinaram um pouco de fisiologia e de vida.

À Daiane Vargas pela atenção e compreensão.

A todos os colegas Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas pelas sugestões sempre pertinentes, auxílio na montagem e avaliação de experimentos.

Aos funcionários técnico-administrativos Joel, Lena, Tina, Celen, Barrinha e Odorêncio pelo auxílio.

E a todos que contribuíram para realização deste trabalho,

Muito obrigado.

BIOGRAFIA

Rogério Gomes Pêgo, filho de Darley Gomes Paiva e Maria Judith Gomes Pego, nasceu em Capelinha, Minas Gerais, em 18 de agosto de 1983. cursou o ensino fundamental e médio na Escola Estadual Augusto Barbosa (Angelândia-MG). Em 2003, foi aprovado no vestibular para o curso de Agronomia da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), onde foi bolsista de iniciação científica desenvolvendo trabalhos na área de produção e tecnologia de sementes olerícolas e espécies nativas com potencial ornamental além de trabalhos relacionados à nutrição mineral de plantas. Em janeiro de 2007 graduou-se em Agronomia e em fevereiro desse mesmo ano, iniciou o curso de mestrado em Agronomia - Fisiologia Vegetal pela Universidade Federal de Lavras (UFLA), sob a orientação da Prof. Dra. Patrícia Duarte de Oliveira Paiva, desenvolvendo trabalhos relacionados à micropropagação de plantas ornamentais, concluindo-o em julho de 2009.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	i
ABSTRACT	ii
1 INTRODUÇÃO	2
2 REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1 Sempre-vivas	3
2.2 Importância social e ecológica das sempre-vivas	4
2.3 Mercado de Sempre-vivas	5
2.4 Cultura de tecidos em plantas	5
2.5 Cultura de tecidos em sempre vivas.....	8
3 MATERIAIS E MÉTODOS	10
3.1 Coleta de capítulos florais e preparo das sementes	10
3.2 Experimentos	10
3.2.1 Meios de cultivo na germinação <i>in vitro</i> de sementes de sempre-vivas	10
3.2.2 Desenvolvimento <i>in vitro</i> de sempre-vivas em diferentes meios de cultura	11
3.2.3 Influência da sacarose no desenvolvimento <i>in vitro</i> de plantas de sempre-vivas	12
3.2.4 TDZ e ANA na multiplicação <i>in vitro</i> de sempre-vivas	13
3.1 Pré-aclimatização de plântulas de sempre-vivas em diferentes substratos	13
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	15
4.1 Meios de cultivo na germinação <i>in vitro</i> de sementes de sempre-vivas	15
4.2 Desenvolvimento <i>in vitro</i> de sempre-vivas em diferentes meios de cultura	22

4.3 Influência da sacarose no desenvolvimento <i>in vitro</i> de plantas de sempre-vivas	29
4.4 TDZ e ANA na multiplicação <i>in vitro</i> de sempre-vivas	34
4.5 Pré-aclimatização de plântulas de sempre-vivas em diferentes substratos	38
5 CONCLUSÕES	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

RESUMO

PÊGO, Rogério Gomes. **Miropropagação de sempre-vivas *Syngonanthus elegans* e *Syngonanthus elegantulus***. 2009. 50p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/ Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

As espécies *S. elegans* e *S. elegantulus* são importantes plantas comercializadas como flor de corte no estado de Minas Gerais, conhecidas popularmente como sempre-vivas. Por isso, objetivou-se estabelecer metodologias para a propagação *in vitro* dessas espécies. Avaliou-se a germinação de sementes, testando-se meios constituídos 0%, 25%, 50%, 75% e 100% da concentração de sais do meio WPM. Para o estabelecimento de plântulas estudou-se o meio MS com 50% e 100% e o meio de cultura WPM com 50% e 100% da concentração de sais. O nível de sacarose mais adequado para o desenvolvimento de plântulas foi avaliado em meio WPM, o qual foi acrescido de 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 g L⁻¹ de sacarose. Para a multiplicação *in vitro* de sempre-vivas foram inoculadas plântulas em meio WPM acrescidos de 0,0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹ de TDZ e 0,0; 0,5; 1,0 mg L⁻¹ de ANA em todas as combinações possíveis. Foi avaliado o efeito da pré-aclimatização de plântulas obtidas da germinação das sementes *in vitro*, utilizando os substratos areia, plantmax e vermiculita. Os resultados indicam que a germinação não é afetada pelas concentrações de sais do meio, mas a velocidade de germinação diminui com o aumento da concentração de nutrientes. O meio WPM em sua composição original proporcionou melhor estabelecimento *in vitro* dessas espécies, assim como a adição de 17 g L⁻¹ de sacarose que promoveu o melhor desenvolvimento das plântulas *in vitro*. A maior indução de calos ocorre na ausência de TDZ e adição de 0,5 e 1,0 mg L⁻¹ de ANA em ambas as espécies. As espécies respondem diferentemente à adição de TDZ e ANA quanto à formação de brotos. Não há diferença entre os substratos ou a realização de pré-aclimatização em *S. elegans*, no entanto, para *S. elegantulus* maior sobrevivência de plantas ocorreu em aclimatização direta utilizando areia.

Palavras-chave: Cultivo *in vitro*; multiplicação; aclimatização; floricultura.

* Comitê Orientador: Patrícia Duarte de Oliveira Paiva - UFLA (Orientadora) e Renato Paiva - UFLA.

ABSTRACT

PÊGO, Rogério Gomes. **Micropropagation of star flower *Syngonanthus elegans* e *Syngonanthus elegantulus***. 2009. 50p. Dissertation (Master Science in Agronomy / Plant Physiology) – Universidade Federal de Lavras, MG. *

The species *S. elegans* and *S. elegantulus*, which are important plants commercialized as cut flowers in Minas Gerais state, are popularly known as star flowers. For this reason, this research aimed at establishing methodologies for *in vitro* propagation of these species. It was evaluated the seed germination, by testing culture media made up 0%, 25%, 50%, 75% and 100% of salt concentration in the WPM culture medium. For the plantlet establishments it was studied the MS culture medium with 50% and 100% and the WPM culture medium with 50% and 100% of salt concentration. The most suitable sucrose level for plantlets growing was evaluated in WPM culture medium, adding 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 g L⁻¹ of sucrose. For star flower *in vitro* multiplication, plantlets were inoculated in WPM culture medium to which was added with 0.0; 0.5; 1.0; 2.0 and 4.0 mg L⁻¹ of TDZ and 0.0; 0.5; 1.0 mg L⁻¹ of ANA in all possible combinations. The pre-acclimatization effect of plantlet obtained from *in vitro* seed germination was evaluated by using the sand substrate sand, plantmax and vermiculite. The results show that germination is not affected by the concentrations of culture medium salts, but the germination rate decreases as the nutrients concentration increases. The WPM culture medium in its original composition provided a better *in vitro* establishment of these species, as well as the addition of 17 g L⁻¹ of sucrose which promoted the best growing of *in vitro* plantlets. The highest induction of callous occurs in the absence of TDZ and addition of 0.5 and 1.0 mg L⁻¹ of ANA in both species. The species respond differently to the addition of TDZ and ANA regarding sprout formation. There is no difference between the substrates and the pre-acclimatization in *S. elegans*, but, for *S. elegantulus* a higher survival of plants occurred in direct acclimatization with the use of sand.

Key words: *in vitro* cultivation, multiplication, acclimatization, floriculture.

*Guidance Committee: Patrícia Duarte de Oliveira Paiva - UFLA (Adviser) and Renato Paiva - UFLA.

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, as atividades ligadas à produção agrícola têm-se intensificado e a procura por produtos de qualidade no setor de floricultura têm exigido tecnologias avançadas para produção de mudas, folhagens e flores de qualidade que atendam satisfatoriamente ao mercado. O estado de Minas Gerais tem se destacado como produtor de flores e dentre as principais espécies exploradas comercialmente como flor de corte estão as rosas, orquídeas e sempre-vivas.

As sempre-vivas são espécies nativas dos campos rupestres da Serra do Espinhaço, principalmente na região de Diamantina-MG, exploradas predominantemente de forma extrativista, embora pequenos produtores possuam áreas de cultivo comercial. Suas flores e hastes são utilizadas para confecção de peças de artesanato ou exportadas em maços como flor de corte para países como Estados Unidos, Japão e países europeus.

Devido à sua considerável contribuição para o comércio de flores do Brasil, são necessários estudos sobre a propagação e estabelecimento de mudas para fins comerciais, com intuito de disseminar sua produção em outras regiões do Brasil. Uma técnica frequentemente utilizada para a propagação de plantas ornamentais em grande escala e de qualidade fitossanitária é a micropropagação. A pesquisa sobre plantas ornamentais no Brasil tem buscado desenvolver protocolos de micropropagação para diversas espécies ornamentais, entretanto, os relatos científicos do cultivo *in vitro* de sempre-vivas são incipientes e, geralmente, relacionados à germinação de sementes.

Dessa forma, e devido ao reduzido número de informações sobre o cultivo *in vitro* de sempre-vivas, objetivou-se estudar aspectos da germinação de sementes, estabelecimento, multiplicação *in vitro* e aclimatização de sempre-vivas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Sempre-vivas

A cadeia da Serra do Espinhaço, que se estende do estado de Minas Gerais até a Bahia, abriga várias espécies de plantas ornamentais da família Eriocaulaceae, conhecidas popularmente como sempre-vivas. Os gêneros *Paepalanthus* Mart., *Syngonanthus* Ruhl. e *Eriocaulon* L. somam mais de 90% das espécies conhecidas (Scatena et al., 1996; Oriani et al., 2005). As inflorescências dessas plantas são utilizadas na ornamentação de ambientes, confecção de buquês e artesanatos, composição de arranjos florais em eventos, além de se destinarem à exportação.

O gênero *Syngonanthus* é composto por grande variedade de espécies, dentre elas a *Syngonanthus elegans* (Bong.) Ruhland e a *Syngonanthus elegantulus* Ruhland, conhecidas, respectivamente, como “pé-de-ouro” e “vargeira” (Figura 1). De características morfológicas, fenológicas e ornamentais semelhantes, essas espécies são os principais alvos de coleta para fins de decoração (Bedê, 2006).

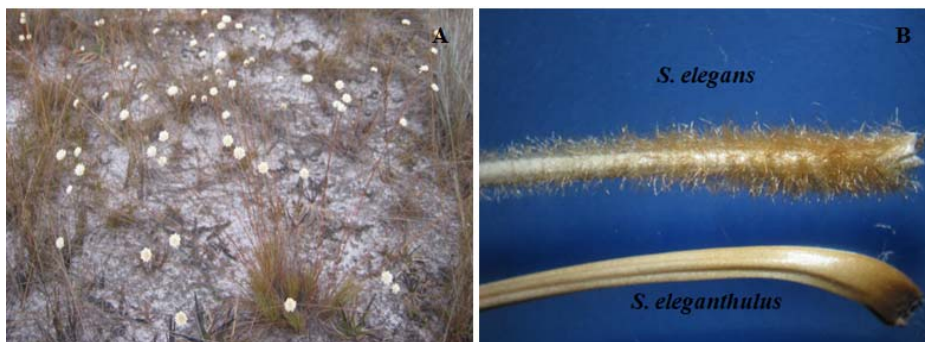


FIGURA 1 Aspecto geral de planta de *S. elegans* em campo (A) e detalhe dos escapos florais de *S. elegans* e *S. elegantulus*(B)

As espécies *S. elegans* e *S. elegantulus* são plantas perenes de pequeno porte, rizomatosas, com folhas cilíndricas e tricomas inseridas na base formando roseta e que frequentemente apresentam perfilhamento e emissão de brotação lateral originando touceiras (Bedê, 2006). Essas plantas ocorrem em solos predominantemente arenosos e de baixa fertilidade (Nunes et al., 2008a). Normalmente, os solos dos locais onde ocorre a maior população de plantas permanecem úmidos durante a maior parte do ano, embora possam ocorrer em regiões com solos alagados ou extremamente secos (Nunes et al., 2008b).

2.2 Importância social e ecológica das sempre-vivas

Algumas áreas de produção comercial de sempre-vivas do estado de Minas Gerais estão localizadas na região de Gouveia, Diamantina e Barbacena, sendo as espécies mais cultivadas as do gênero *Syngonathus* (Neri et al., 2005; Landgraf & Paiva, 2009). Nessas regiões, a atividade de produção, manejo e colheita de flores é uma importante fonte de renda para os trabalhadores envolvidos na cadeia produtiva. Entretanto, a maior parte das sempre-vivas comercializadas ainda são produtos da exploração extrativista predatória (Nunes et al., 2008a).

Para muitas famílias, a atividade de coleta, intensificada nos meses de março a junho, é uma das mais importantes fontes de renda e, muitas vezes, a única. Muitos coletores, com o objetivo de obter maior número de hastes, arrancam, juntamente com os escapos, plantas inteiras, diminuindo sua população (Neri et al., 2005; Nunes et al., 2008b). A época de coleta de flores com características adequadas à comercialização acontece três meses antes do início da maturação e dispersão de sementes. Dessa forma, a coleta das hastes limita a sementeira natural. A exploração desordenada, sem levar em consideração aspectos de manejo e ecológicos, contribuiu para colocar as sempre-vivas *S. elegans* e a *S. elegantulus* na listagem de espécies criticamente

ameaçadas de extinção (Mendonça & Lins, 2000), fato que pode resultar no encerramento dessa atividade.

2.3 Mercado de sempre-vivas

A demanda por hastes de sempre-vivas para comercialização aumentou a partir da década de 40, sendo que uma parte do produto era comercializada no mercado interno, mas o maior volume destinava-se à exportação (Neri et al., 2005). Ao final da década de 70, houve mudança na cadeia de obtenção e comercialização dessas flores; a atividade de coleta, antes livre, começou a ser controlada pelos proprietários que arrendavam as terras para coletores e recebiam o pagamento em capítulos florais. A comercialização dessas flores atingiu o auge na década de 80, porém os estoques de flores vêm diminuindo desde então (Instituto Terra Brasilis de Desenvolvimento Sócioambiental - ITB, 1999).

No estado de Minas Gerais, as sempre-vivas têm papel de destaque entre as espécies cultivadas e comercializadas como flor de corte além de comporem a listagem de exportação brasileira (Neri et al., 2005; Landgraf & Paiva, 2009). Os principais compradores de sempre-vivas, em volume, são os Estados Unidos, seguidos da Holanda, China, Itália, Canadá, Alemanha, Portugal, Japão, México, Espanha, Taiwan e Israel (Landgraf, 2006).

Nas regiões de ocorrência natural é comum a formação de associações de artesãos que utilizam hastes e capítulos para confecção de arranjos florais, peças de artesanato ou mesmo a venda *in loco* de flores.

2.4 Cultura de tecidos em plantas

A propagação *in vitro* de tecidos vegetais tem um importante papel na produção de plantas de interesse ornamental. Entre as principais vantagens da micropropagação está a produção de elevado número de plantas, num curto

espaço de tempo, ocupando uma área física reduzida, quando comparado com métodos tradicionais de multiplicação (Pasqual et al., 1998). A disponibilidade de mudas de qualidade fitossanitária, em larga escala, para o mercado, principalmente em plantas de crescimento lento ou de difícil propagação, são as principais vantagens práticas da micropropagação.

O cultivo *in vitro* permite o escalonamento da produção durante todo o ano e, conseqüentemente, a compatibilização de demandas específicas dos mercados que, até pouco tempo, era difícil ou de custo elevado (Souza et al., 2006).

O estoque de plantas *in vitro* possibilita a produção de plantas a partir de órgãos já desenvolvidos, o que, em geral, não é conseguido em condições naturais de campo (Paixão-Santos et al., 2003). Adicionalmente, programas de conservação com introdução de acessos em bancos de germoplasma é uma ferramenta que pode contribuir para a manutenção de genótipos em processo de extinção (Bertoni et al., 2006).

Os meios de cultivo baseiam-se nas exigências nutricionais das plantas e variam de acordo com as espécies e as diferentes etapas do processo (Santos-Serejo et al., 2006). Sintomas de deficiência ou toxidez minerais podem ser observados durante a micropropagação, podendo provocar um desequilíbrio fisiológico que resultará em prejuízos de desenvolvimento ou até a morte do propágulo (Hernandez, 1998).

Segundo George (1996), as soluções de sais e açúcares do meio de cultivo influenciam o crescimento celular e a morfogênese pelas propriedades osmóticas e, conseqüentemente, o estabelecimento de plantas *in vitro*. Devido à diversidade de explantes utilizados e o grande número de espécies, entre outros, diversas formulações dos meios básicos têm sido utilizadas no cultivo *in vitro* (Grattapaglia & Machado, 1998). Não há uma formulação-padrão de meio de cultivo, mas o meio MS (Murashige & Skoog, 1962) com diluições tem sido

frequentemente utilizado para muitas espécies (Nery et al., 2008). Para espécies lenhosas, o meio mais recomendado é o WPM (Wood Plant Medium) de Loyd & McCown (1980). Existem diferenças entre esses dois meios nutritivos, principalmente com relação às concentrações de íons nitrato, íons amônia, sulfato e potássio (Pasqual et al., 1998).

É comum se adicionar sacarose ao meio de cultura para suprir a demanda de carboidratos, possibilitando condições adequadas ao estabelecimento das mudas (Caldas et al., 1998). Entretanto, o excesso de sacarose no meio pode alterar a biossíntese de clorofila e, conseqüentemente, a capacidade fotossintética, afetando o desenvolvimento e causando deformações na estrutura vegetal (Pasqual et al., 1998).

A indução e regeneração de calos para obtenção de plantas é uma boa alternativa de multiplicação de espécies nativas com dificuldade de propagação, desde que as variações somaclonais não atinjam valores percentuais elevados (Paixão-Santos et al., 2008). Para a indução é necessário realizar injúrias químicas ou mecânicas e adicionar ao meio de cultivo reguladores de crescimento como ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido naftalenoacético (ANA), 6-benzilaminopurina (BAP) e Thidiazuron (TDZ), entre outros (Caldas et al., 1998; Santos-Serejo et al., 2006). Algumas plantas formam calos mesmo na ausência de reguladores na solução nutritiva, uma vez que a quantidade endógena de hormônios é suficiente para iniciar a calogênese (Paixão-Santos et al., 2008).

A aclimatização é a fase final e mais crítica da micropropagação, podendo limitar todas as outras etapas anteriores. Em produções comerciais, o alto custo e o tempo que as plantas levam para se adaptar às condições ambientais, podem tornar a técnica de propagação inviável (Souza et al., 2006).

Nessa etapa, as mudas são retiradas do meio nutritivo e transferidas para recipientes contendo substratos. A escolha do tipo de substrato, frequência de

irrigação e iluminação são importantes para a produção de mudas de qualidade (Silva Júnior, 2007). Esses substratos podem influenciar as respostas ao novo ambiente por meio de suas características bioquímicas e físicas, refletindo na percentagem de sobrevivência das mudas (Gonçalves et al., 2000). Segundo Caldas et al. (1998), é comum manter as plantas em telados por determinado período, antes de levá-las a campo, para completar a aclimatização. Essa prática diminui a perda de plantas durante o transplante devido à maior capacidade dessas de resistirem ao estresse.

2.5 Cultura de tecidos em sempre vivas

A cultura de tecidos consiste de técnicas importantes na preservação e multiplicação de espécies nativas que estejam em vias de extinção (Paixão-Santos et al., 2006), pois possibilitam a propagação a partir de explantes vegetais e a conservação de germoplasma em coleções *in vitro*. Outra vantagem é a possibilidade de propagação de sempre-vivas em condições diferentes daquelas observadas no ambiente natural de ocorrência, pois a produção de mudas a partir de sementes é inviável, mesmo quando são utilizados substratos comerciais (Paixão-Santos et al., 2003). Apesar disso, não existem relatos científicos da micropropagação de *S. elegans* e *S. elegantulus*.

Vários trabalhos foram realizados com diversas espécies de sempre-vivas, avaliando a época de dispersão, o efeito da temperatura e do armazenamento na qualidade de sementes, características fisiológicas da semente durante a germinação e frequência de irrigação do solo na emissão de plântulas (Simões et al., 2007; Nunes et al., 2008a,b,c). Entretanto, esses trabalhos foram realizados com substratos comerciais, papel Germitest® ou solo da região natural de ocorrência, mas nenhum deles foi realizado em condições *in vitro*.

Os estudos sobre a germinação *in vitro* de sementes de sempre-vivas possibilitam compreender aspectos da germinação e a qualidade de sementes, visando ao correto manejo pós-colheita e armazenamento. Dentre os estudos sobre a micropropagação de sempre-vivas encontrados, há somente relatos sobre a espécie *S. mucugensis* (Paixão-Santos et al., 2003; Silva et al., 2005a,b; Paixão-Santos et al., 2006, 2008).

Paixão-Santos et al. (2003), estudando *S. mucugensis*, verificaram que a germinação *in vitro* de sementes é inibida quando se utiliza o meio MS acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose, o que pode estar relacionado com o efeito do potencial osmótico entre a semente e o meio; por isso meios constituídos de ágar e água são frequentemente relatados para a germinação de sementes (Paixão-Santos et al., 2003; Silva et al., 2005a). Essa condição permite o estudo dos aspectos morfológicos pós-seminal de sempre-viva (Silva et al., 2005b).

O meio MS pode ser utilizado para o estabelecimento *in vitro* de sempre-vivas, entretanto, as soluções de sais devem ser diluídas à metade, pois o meio é tóxico para plantas, afetando o desenvolvimento da parte aérea, raízes e acúmulo de biomassa, mas os resultados ainda não são conclusivos (Paixão-Santos et al., 2006).

A indução de calos friáveis e a multiplicação de sempre-vivas são possíveis a partir de plantas inteiras ou segmentos nodais utilizando benzilamino-purina (BAP), podendo também ocorrer a formação de calos na ausência de reguladores de crescimento (Paixão-Santos et al., 2008).

Não há relatos de estudos com aclimatização de plantas de sempre-vivas micropropagadas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta dos capítulos florais e preparo das sementes

Capítulos florais de *Syngonanthus elegans* e *Syngonanthus elegantulus* foram coletados manualmente, no mês de julho de 2008, em parcelas de 500m², em áreas de ocorrência natural, no campus Juscelino Kubitschek da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, em Diamantina-MG.

Após a coleta, os capítulos foram secos à sombra em temperatura ambiente por sete dias e levados para o Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, setor de Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. Os capítulos florais foram armazenados em sacos de papel, à temperatura ambiente. Para extração das sementes, realizou-se fricção dos capítulos com uma espátula sobre placas de petri, sendo separadas com o auxílio de peneiras de 0,7 mm e de microscópio estereoscópico.

3.2 Experimentos

3.2.1 Meios de cultivo na germinação *in vitro* de sementes de sempre-vivas

Lotes constituídos de 50 sementes de cada espécie foram desinfetados com álcool 70% por 1 minuto, seguidos de imersão em hipoclorito de sódio 2,5% por 10 minutos (Paixão-Santos et al., 2003). Posteriormente, foram lavadas 3 vezes com água esterilizada e inoculadas em frascos de 250 mL com 20 mL de meio de cultivo. Os tratamentos consistiram de meio WPM com 25%, 50%, 75% e 100% dos sais, sendo a testemunha composta de água deionizada. A todos os meios foram adicionados 15 g L⁻¹ de sacarose e solidificados com 8 g L⁻¹ de ágar. O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem sob pressão de 1,5 atm e à temperatura de 120°C por 20 minutos. Os frascos foram mantidos em sala de crescimento sob irradiância de 43 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16

horas à temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. O número de sementes germinadas foi anotado diariamente, por um período de 30 dias. Posteriormente calculou-se a porcentagem de germinação e o índice de velocidade de germinação (IVG) foi obtido de acordo com Maguire (1962). Foram consideradas germinadas as sementes que continham o eixo embrionário clorofilado ao fim do período do teste, sendo esse o único parâmetro de avaliação viável devido ao risco de contaminação do meio, conforme Paixão-Santos et al. (2003). O número de folhas formadas, comprimento da parte aérea, número de raízes e comprimento da maior raiz das plântulas germinadas foram avaliados ao final de 30 dias.

O experimento para quantificação do IVG e da porcentagem de germinação teve o delineamento inteiramente casualizado, com cinco tratamentos (meios de cultura) e 5 repetições, sendo um frasco por parcela, contendo 50 sementes cada. Para a análise do número de folhas, comprimento da parte aérea, número de raízes e comprimento da maior raiz foram utilizadas 10 repetições, sendo cada parcela composta por uma planta. Os dados de porcentagem de germinação e IVG foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. Os resultados de número de folhas, comprimento da parte aérea, número de raízes e comprimento da maior raiz foram submetidos à regressão polinomial com auxílio do programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2000).

3.2.2 Desenvolvimento *in vitro* de sempre-vivas em diferentes meios de cultura

O experimento foi realizado com plântulas contendo 2 a 3 folhas, com 1 cm de comprimento, obtidas de sementes germinadas *in vitro* em meio constituído de apenas água e solidificado com ágar 8 g L^{-1} . Para o experimento foram testados o meio MS nas concentrações de sais de 50% e 100% (completo) e o meio WPM 50% e 100% (completo), sendo todos acrescidos de 15 g L^{-1} de

sacarose e solidificados com 8 g L⁻¹ de ágar. O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem à pressão de 1,5 atm e à temperatura de 120°C por 20 minutos. As plantas foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura e mantidas por 30 dias em sala de crescimento sob irradiância de 43 μmol m⁻² s⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas à temperatura de 25 ± 2°C.

As variáveis analisadas foram o número de folhas, número de folhas cloróticas, comprimento da parte aérea, massa fresca, número de raízes. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x2 (meios de cultura e duas concentrações de sais), com quatro repetições e três tubos por parcela (um explante por tubo). Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.2.3 Influência da sacarose no desenvolvimento *in vitro* de plântulas de sempre-vivas

Plantas obtidas da germinação *in vitro* de sementes, em meio constituído de apenas água e solidificado com ágar, apresentando 2 a 3 folhas foram inoculadas em meio WPM acrescido de 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 40 g L⁻¹ de sacarose e solidificado com 6 g L⁻¹ de ágar. Antes da autoclavagem por 20 minutos à pressão de 1,5 atm e à temperatura de 120°C, o pH do meio foi ajustado para 5,8. As plantas foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 10 mL do meio de cultura e mantidas por 30 dias em sala de crescimento sob irradiância de 43 μmol m⁻² s⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas à temperatura de 25 ± 2°C.

As análises experimentais consistiram da contagem do número de folhas, comprimento da parte aérea, número de raízes e massa fresca das plântulas. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com seis repetições e três tubos por parcela (um explante por tubo). Os dados foram submetidos à regressão polinomial com auxílio do programa estatístico Sisvar (Ferreira, 2000).

3.2.4 TDZ e ANA na multiplicação *in vitro* de sempre-vivas

Foram utilizadas como explantes, plantas micropropagadas que foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 10 mL do meio de cultura WPM acrescido de TDZ (0,0; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 mg L⁻¹), e de ANA (0,0; 0,5; 1,0 mg L⁻¹) em todas as combinações possíveis. Adicionou-se 15 g L⁻¹ de sacarose e o meio foi solidificado com 8 g L⁻¹ de ágar. O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem. O material foi mantido em sala de crescimento sob irradiância de 43 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas à temperatura de 25 \pm 2°C.

Após 30 dias da instalação do experimento foram avaliados a porcentagem do explante com indução de calos e o número de brotos formados.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em fatorial 5 (concentrações de TDZ) x 3 (concentrações de ANA), com 5 repetições e 3 tubos por parcela, sendo 1 explante por tubo. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

3.2.5 Pré-aclimatização de plântulas de sempre-vivas em diferentes substratos

Plantas obtidas da propagação *in vitro*, em meio WPM, foram submetidas a um período de pré-aclimatização. Para isso, foram retiradas do meio de cultivo original, lavadas em água destilada para retirada do excesso de meio e transferidas para frascos de vidro de 250 mL, contendo como substratos areia, plantmax® ou vermiculita umedecidas com solução de sais do meio WPM autoclavados a 121 °C e 1,05 Kg cm² de pressão durante 20 minutos. Os frascos foram mantidos em sala de crescimento sob irradiância de 43 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas à temperatura de 25°C \pm 2°C. Estes foram mantidos

vedados por três dias e, após esse período, foram abertos e mantidos nas mesmas condições, por um período de mais cinco dias.

Após a etapa de pré-aclimatização, as plantas foram transferidas para tubetes de polietileno, com 3 cm de diâmetro x 12,5 cm de altura, contendo os diferentes substratos e envoltas com sacos plásticos transparentes, para manutenção da umidade relativa no ambiente. Os tubetes foram mantidos em sala de crescimento sob irradiância de $67 \mu\text{m m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas à temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Os sacos foram perfurados semanalmente, até a sua remoção total, 30 dias após o início do processo de acclimatização.

De forma semelhante foi estudado o efeito dos substratos na acclimatização direta de plantas de sempre-vivas. As raízes das plântulas retiradas do meio de cultura foram lavadas em água corrente para retirada do excesso de meio de cultura e transplantadas para tubetes contendo os diferentes substratos. Para a manutenção da umidade relativa do ambiente, as plântulas foram envoltas por sacos plásticos e mantidas em sala de crescimento sob irradiância de $67 \mu\text{m m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas à temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Os sacos foram perfurados semanalmente, até a sua remoção total, 30 dias após o início do processo de acclimatização.

Após 30 dias da acclimatização foi avaliada a proporção de sobrevivência das plantas.

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial com 30 repetições. Foi avaliada a proporção de plantas vivas das duas espécies.

A análise estatística foi realizada utilizando a metodologia de modelos lineares generalizados (GLM) por meio do pacote estatístico R. A presença ou ausência de plântulas vivas apresenta distribuição binomial, sendo assim utilizada como preditor linear a função de ligação logística de acordo Demétrio (1993).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Meios de cultivo na germinação *in vitro* de sementes de sempre-vivas

Foi observada 89% de germinação das sementes de *S. elegantulus*, independente da concentração de sais no meio de germinação, e 73% para *S. elegans* (Figura 2).

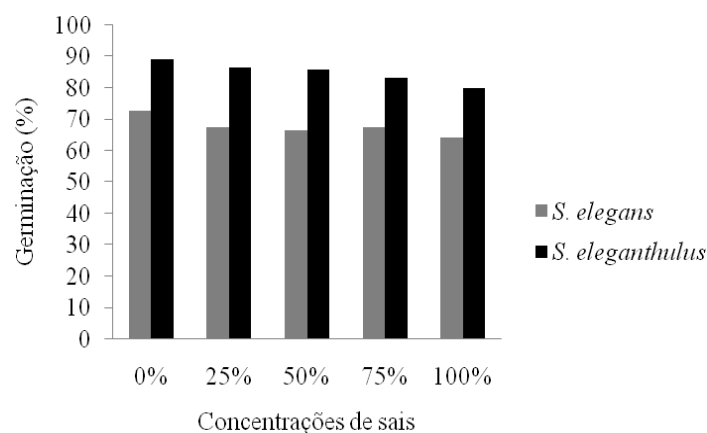


FIGURA 2 Porcentagem de germinação de sementes de *S. elegans* e *S. elegantulus* em diferentes concentrações de sais do meio WPM.

As maiores porcentagens de germinação foram observadas no meio constituído por apenas água e ágar, entretanto, para nenhuma das espécies foi observada diferença significativa das porcentagens de germinação em função da concentração de sais do meio de cultivo.

Elevadas taxas de germinação de sementes de sempre-vivas foram alcançadas quando germinadas *in vitro*. Os resultados encontrados nesse trabalho foram superiores aos observados por Nunes et al. (2008a) que obtiveram máximo de 35% de germinação em *S. elegans* quando utilizaram papel germitest umedecido como substrato e aos de Bedê (2006) que observou 36,5% de germinação de sementes de *S. elegantulus* em condições de campo.

A disponibilidade de luz e temperatura na sala de crescimento são suficientes para promover a germinação de sementes de sempre-viva (Paixão-Santos et al., 2003; Simões et al., 2007). Um fator que poderia limitar seria a disponibilidade de água durante o processo, mas esse fato não ocorre na germinação *in vitro*, pois no interior do frasco a umidade relativa atinge 98% (Arigita et al., 2002).

Paixão-Santos et al. (2003) estudando a germinação de *S. mucugensis* observaram que a concentração do meio de germinação inibiu a germinação de sementes devido à pequena diferença de potencial osmótico entre as sementes e o meio de germinação. Como nesse trabalho com *S. elegans* e *S. elegantulus* não houve diferença estatística entre as concentrações testadas, pode-se inferir que a presença de sais não interferem na germinação de sementes.

O maior índice de velocidade de germinação, para ambas as espécies estudadas, foi observado em meios na ausência de sais ou na concentração de 25% do meio WPM (Figura 3).

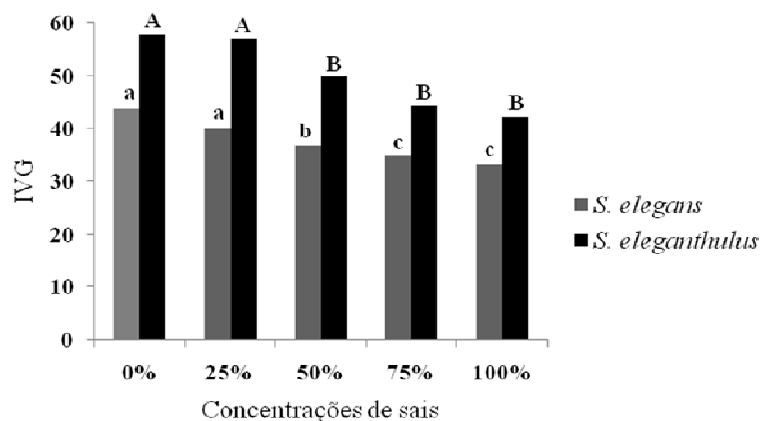


FIGURA 3 Índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de *Syngonanthus elegans* e *S. elegantulus* em meio WPM com diferentes concentrações de sais. Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas (*S. elegantulus*) e minúsculas (*S. elegans*) não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

O meio WPM com 50%, 75% e 100% dos sais afetou negativamente o índice de velocidade de germinação de sementes de *S. elegantulus*, entretanto, esse efeito foi mais acentuado em *S. elegans* nas concentrações de 75% e 100%, sendo essa espécie mais sensível à presença de nutrientes no meio de cultivo. A diferença observada entre os tratamentos deve-se ao tamanho reduzido das sementes, pois as variações das concentrações, ainda que pequenas, influenciam no potencial osmótico das sementes.

Observou-se que as sementes estabilizam a germinação 25 dias após a inoculação, independente da concentração utilizada. Desse modo as concentrações de sais não são limitantes para o processo de germinação *in vitro* de sementes de sempre-vivas.

Embora as plântulas de sempre-vivas sejam obtidas mais tardiamente quando germinadas em meios nutritivos, existem vantagens relacionadas às qualidades das plântulas obtidas ao final de 30 dias da inoculação de sementes, sendo as principais o maior número de folhas, comprimento de plântulas e maior acúmulo de massa seca.

Estudos de Nogueira et al. (2004) revelam que a constituição do meio pode afetar aspectos relacionados à germinação de sementes de murici pequeno. Bellintani et al. (2007) observaram que a presença de sais no meio de cultivo não interferem na velocidade de germinação de sementes de bromélias.

Bedê (2006) destaca que *S. elegans* e *S. elegantulus* são espécies com comportamento fenológico semelhantes, sendo que a *S. elegantulus* foi classificada por muito tempo como uma subespécie da *S. elegans*, mas pode-se observar diferenças quanto às exigências nutricionais e germinação dessas espécies.

Ao final de 30 dias da inoculação, observou-se que o maior número de folhas (Figura 4) e o maior comprimento da parte aérea de plântulas de *S. elegantulus* foram obtidos em meio WPM 100% (Figura 5).

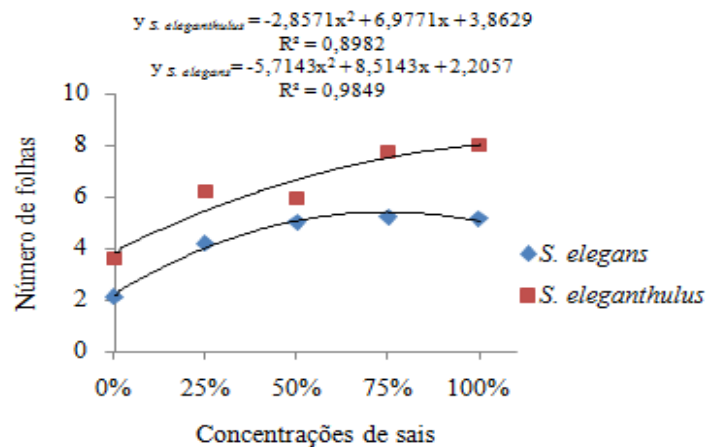


FIGURA 4 Número de folhas formadas em plântulas de *S. elegans* e *S. elegantulus* em meio composto por diferentes concentrações de sais do meio WPM, após 30 dias da inoculação de sementes.

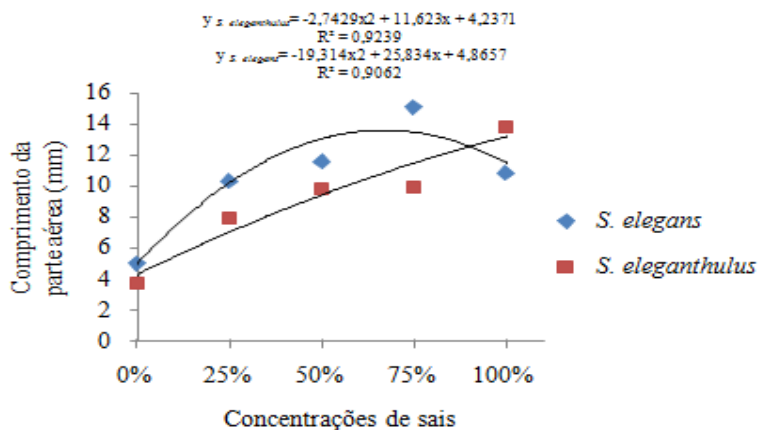


FIGURA 5 Comprimento da parte aérea (mm) de plântulas de *S. elegans* e *S. elegantulus* cultivadas em meio composto por diferentes concentrações de sais do meio WPM, após 30 dias da inoculação de sementes.

A espécie *S. elegans* é uma planta mais sensível à composição do meio de germinação, pois os maiores valores de número de folhas formadas e de comprimento da parte aérea foram observados, respectivamente, nas

concentrações de 75% e 67% da composição original do meio WPM. Para a espécie *S. elegantulus* as melhores respostas foram obtidas em meio WPM completo.

As sementes germinadas em meio constituído por apenas ágar e água tiveram menor desenvolvimento em ambas as espécie. O aumento progressivo dos nutrientes no meio de germinação possibilitou o melhor desenvolvimento das plantas de *S. elegantulus*, mas presença de sais acima de 67% do meio WPM original pode ter sido danoso ao metabolismo *S. elegans*, uma vez que houve redução tanto na produção de folhas quando no crescimento da plântula.

Silva et al. (2005a) relatam que a diluição de sais no meio de cultura afeta positivamente parâmetros do crescimento de *S. mucugensis*. Pasqual et al. (1998) relatam que é comum o ajuste de meios de germinação para favorecer o sucesso dessa etapa da micropropagação. Entretanto, esse ajuste é dependente das espécies trabalhadas (Caldas et al., 1998). Sorace et al. (2008), por exemplo, observaram que plantas de *Oncidium baueri* desenvolvem-se melhor em meio MS com 50% da composição original.

As melhores concentrações de sais do meio para a produção de raízes em *S. elegans* foi 62%, e para *S. elegantulus* a melhor concentração foi de 88% (Figura 6).

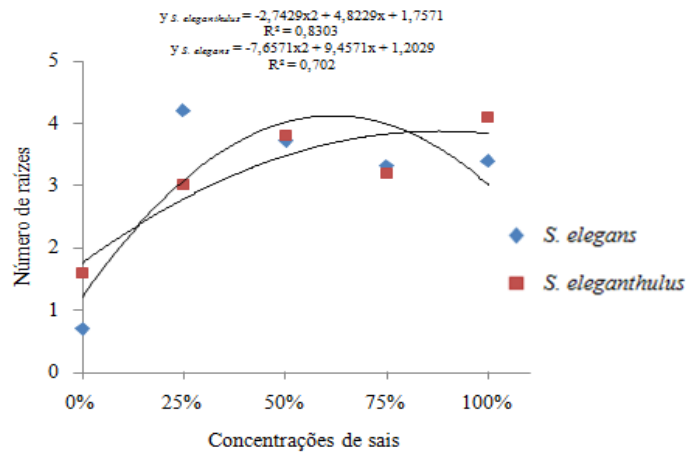


FIGURA 6 Número de raízes formadas em plântulas de *S. elegans* e *S. elegantulus* cultivadas em meio de germinação composto por diferentes concentrações de sais do meio WPM, após 30 dias da inoculação de sementes.

O comprimento de raízes é uma variável mais sensível às variações de sais, sendo que os melhores resultados foram proporcionados para plântulas desenvolvidas em meios com 50% da concentração dos sais do meio WPM para ambas as espécies (Figura 7).

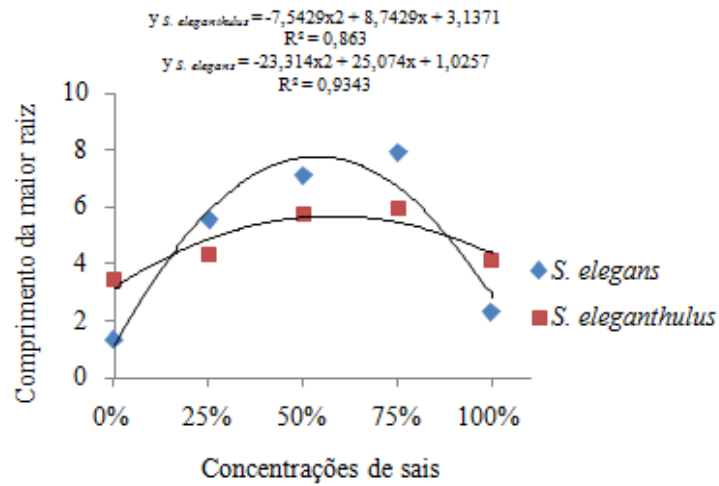


FIGURA 7 Comprimento da maior raiz formada em plântulas de *S. elegans* e *S. elegantulus* cultivadas em meio composto por diferentes concentrações de sais do meio WPM, após 30 dias da inoculação de sementes.

Silva et al. (2005a) observaram que o incremento no enraizamento da sempre-viva *S. mucugensis* ocorreu quando as concentrações do meio de cultura foram diluídas a 50%, 33% e 25% do meio MS original, resultados esses semelhantes aos observados no presente estudo. Entretanto, isso não ocorre para todas as espécies. Por exemplo, o aumento das concentrações de sais no meio de cultura não interfere no comprimento de raízes de *Cattleya walkeriana* (Dignart et al., 2009).

4.2 Desenvolvimento *in vitro* de sempre-vivas em diferentes meios de cultura

As análises de variância das duas espécies foram realizadas separadamente para cada espécie. Houve interação entre o meio de cultivo e as concentrações para a variável número de folhas, número de folhas senescentes, massa fresca e o comprimento da parte aérea para ambas as espécies estudadas.

A concentração de 100% de sais do meio WPM promoveu aumento na quantidade de folhas das plantas de *S.elegans* e *S. elegantulus*. No entanto, o meio MS, na maior concentração de sais (100%), inibiu a produção de folhas. As concentrações de 50% de sais dos meios MS e WPM diferenciam entre si somente para *S. elegantulus*. Quanto às concentrações originais (100%) dos meios de cultura, as médias foram diferentes para as duas espécies sendo que *S. elegans* apresentou maior número de folhas (Figura 8).

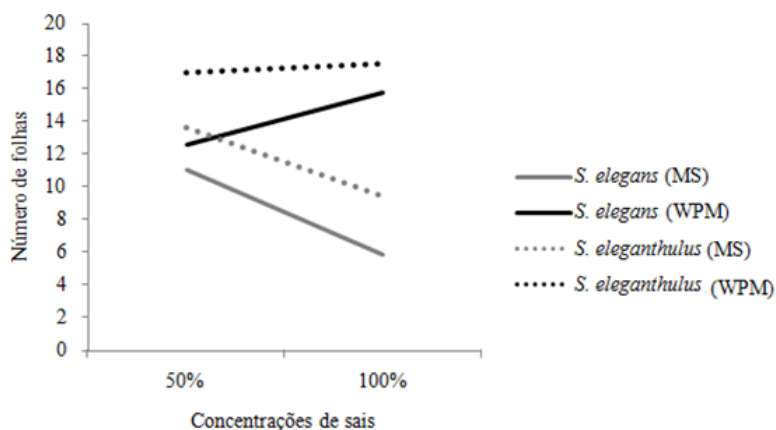


FIGURA 8 Número de folhas formadas em *S.elegans* e *S. elegantulus* em função das concentrações de sais dos meios de cultura MS e WPM.

Araujo (2007) relata que a presença de nitrato de amônio no meio de cultivo é benéfico na formação de folhas em *Cattleya loddigesii*, sendo a melhor concentração igual a 400 mg L⁻¹. Essa concentração de nitrato de amônio

corresponde à concentração original recomendada para o meio WPM. Ao contrário, Costa et al. (2007) não verificaram diferenças significativas na produção de folhas no estabelecimento *in vitro* de alecrim-pimenta quando cultivados em meio MS ou WPM. Donini et al. (2008) relatam que, embora o meio WPM tenha sido eficiente para o estabelecimento *in vitro* de plântulas de oliveira, não houve diferença na formação de folhas quando comparado com o meio MS.

Não houve diferença significativa no número de folhas formadas em plântulas cloróticas em *S.elegans* cultivadas em meio de cultivo com 50% da concentração de sais (Figura 9). Entretanto, quando plântulas de *S. elegans* foram cultivadas nos meios originais, a média foi de 5,2 e 0,1 folhas cloróticas em MS e WPM respectivamente, diferindo entre si esses meios.

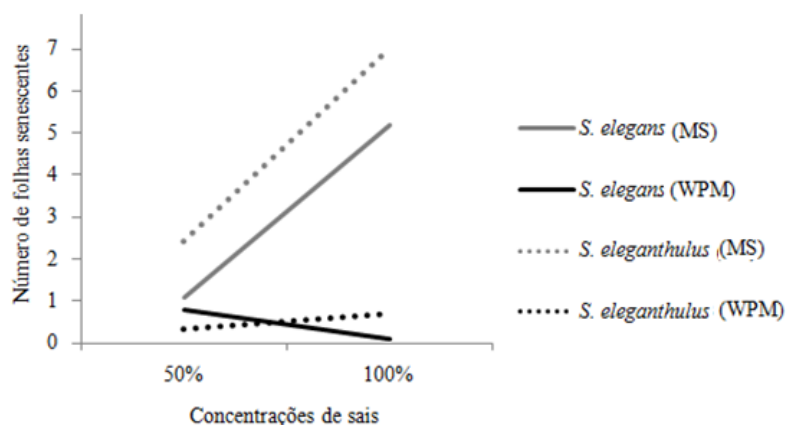


FIGURA 9 Número de folhas cloróticas formadas de *S.elegans* e *S. elegantulus* em função das concentrações de sais dos meios de cultura MS e WPM.

Resultados semelhantes foram observados em plântulas *S. elegantulus*, havendo diferença significativa apenas quando cultivadas em meios completos (100%). O maior número de folhas cloróticas 0,7 e 7,0 foi observado no meio WPM e MS respectivamente, apresentando-se diferentes valores. O maior

número de folhas cloróticas presentes no meio MS na composição original, indica que esse meio influencia negativamente no estabelecimento *in vitro* de plântulas de sempre-vivas.

Segundo Pasqual et al. (1998), o meio WPM é composto de 25% das concentrações de nitrato e amônia do meio MS. Alguns tecidos estabelecidos *in vitro* podem apresentar sintomas de toxidez quando cultivados em altos níveis de sais inorgânicos de amônio. No entanto, a disponibilidade balanceada de nitrogênio na forma de amônio e nitrato pode estimular o desenvolvimento *in vitro* (Gamborg, 1970; Gamborg & Shyluk, 1970; Sargent & King, 1974). Os baixos níveis de nitrato de amônio no meio WPM favoreceram o desenvolvimento normal das plantas de sempre-vivas, sendo possível que os sintomas de toxidez observados nas plântulas de sempre-vivas cultivadas em meio MS sejam causados pelas elevadas concentrações desse sal.

A clorose foliar foi observada aos 15 dias após a inoculação das plantas, ocorrendo manchas que evoluíram para necrose total das folhas (Figura 10). Os sintomas foram mais acentuados nas mudas propagadas em meio MS completo (100%) devido às altas concentrações de sais no meio de cultivo.

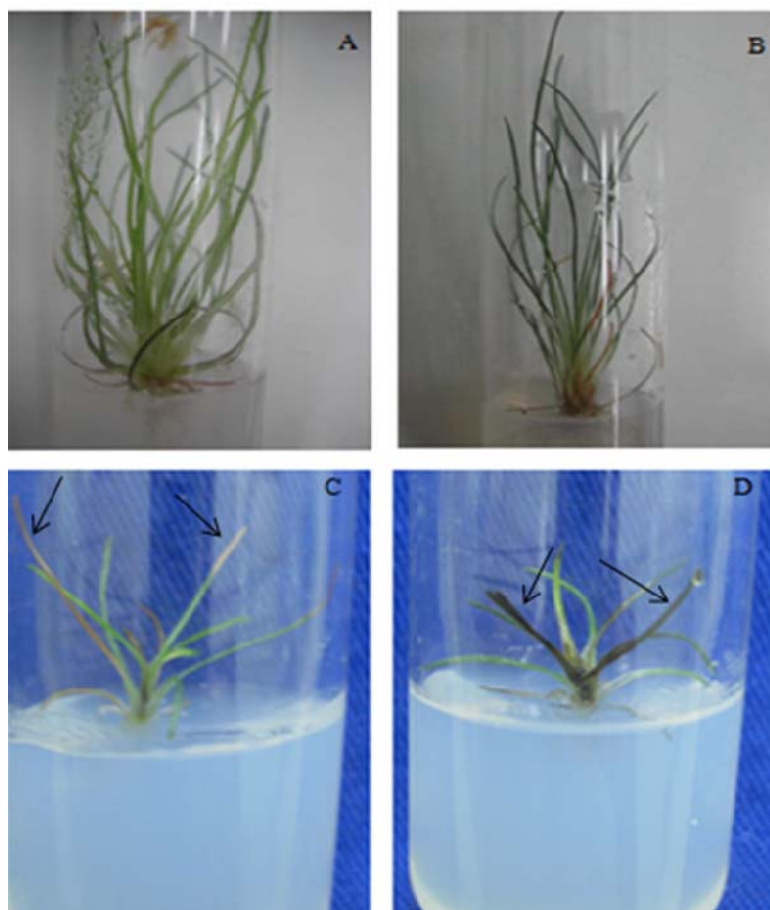


FIGURA 10 Desenvolvimento normal de plântulas cultivadas em meio WPM completo, (A) *S. elegantulus* e (B) *S.elegans*. Plântula cultivadas em meio MS completo, (C) *S.elegantulus* com clorose foliar e (D) *S. elegans* apresentando necrose

A resposta das duas espécies quanto ao comprimento da parte aérea foram semelhantes. Não houve diferença para nenhuma das espécies quando cultivadas em meios com baixas concentrações de sais. Utilizando os meios completos, o meio WPM foi o que possibilitou a maior média de comprimento da parte aérea para as *S. elegans* (3,28 cm) e *S. elegantulus* (3,5 cm), ocorrendo diferença daquelas cultivadas em meio MS (Figura 11).

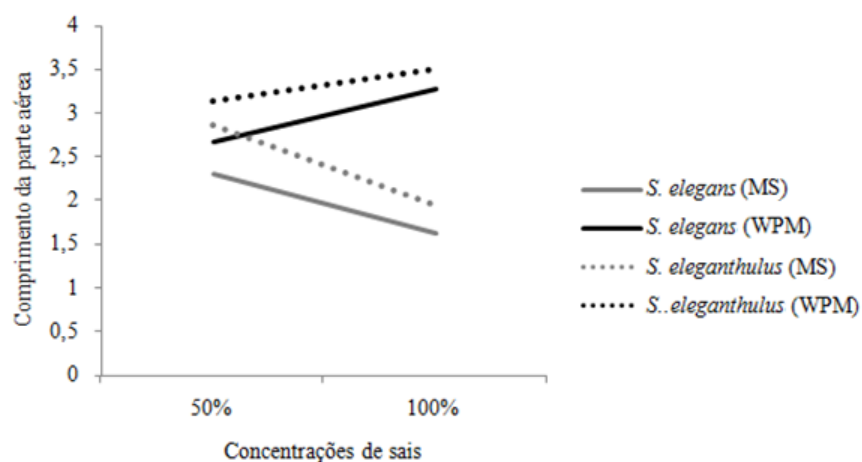


FIGURA 11 Comprimento da parte aérea (cm) de plântulas formadas de *S.elegans* e *S. elegantulus* em função das concentrações de sais dos meios de cultura MS e WPM.

Unemoto et al. (2007) verificaram que o meio MS com 50% dos macronutrientes promoveu maior desenvolvimento da parte aérea em plântulas das orquídeas *Oncidium nanum* e *Cattleya forbesii*.

Não houve diferença na massa fresca das sempre-vivas quando cultivadas em meios nutritivos com metade das concentrações dos sais, mas sim quando comparados os meios com 50% dos sais (Figura 12). Os melhores resultados foram observados no meio WPM, no qual a *S. elegans* acumulou massa fresca de 0,1 g/planta e *S. elegantulus* 0,11 g/planta.

O maior comprimento da parte aérea de plantas de *S. mucugensis* foi observado em meio MS diluído a 50% ou a 33% da concentração original (Paixão-Santos et al., 2006).

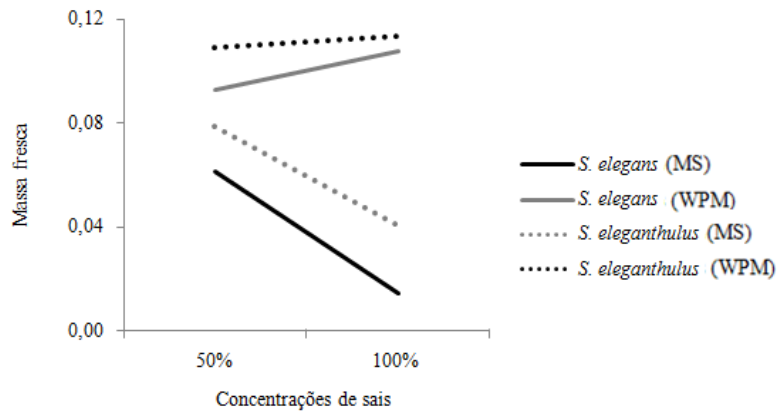


FIGURA 12 Massa fresca de plantas (g/planta) de *S.elegans* e *S. elegantulus* em função das concentrações de sais dos meios de cultura MS e WPM.

As sempre-vivas são originariamente adaptadas a solos arenosos de baixa fertilidade (Nunes et al., 2008b). Essas características podem justificar o desenvolvimento dessas plantas em meios nutritivos menos concentrados. Paixão-Santos et al. (2006), estudando o efeito do meio de cultivo no desenvolvimento *in vitro* da sempre-viva, constataram que a utilização do meio MS completo foi inadequada para o desenvolvimento *in vitro* de *S. mucugensis* quando comparado com o meio MS a 50%, possivelmente pelas altas concentrações de sais disponíveis. Esses resultados corroboram com os obtidos nesse trabalho.

O melhor meio de cultivo para as duas espécies estudadas foi o WPM 100% para todas as variáveis estudadas. Ainda observa-se que plantas de *S. elegans* emitem maior quantidade de raízes comparando-se com *S. elegantulus*, mesmo em concentrações mais altas de nutrientes no meio (Figura 13), mas a maior produção de raízes de *S. elegans* ocorreu em meio WPM com 50% de sais.

A espécie *S. eleganthulus* também apresentou maior número de raízes quando cultivadas em meio WPM na concentração de 50%, porém em valores inferiores a *S. elegans*.

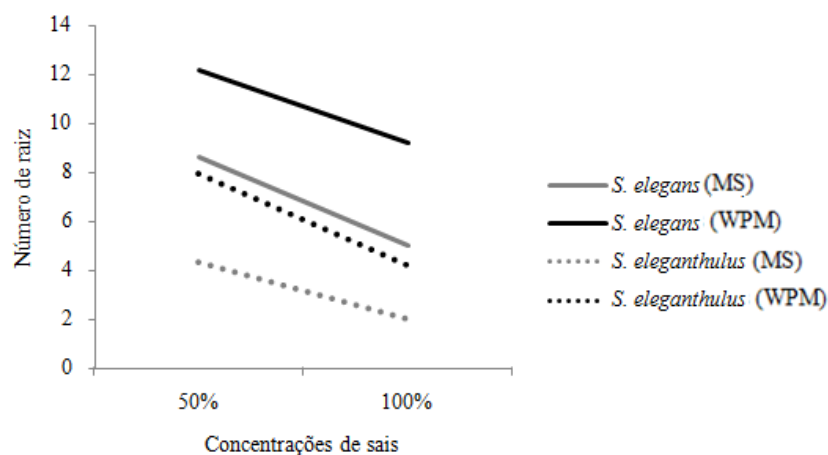


FIGURA 13 Número de raízes formadas em *S. elegans* e *S. eleganthulus* em função das concentrações de sais dos meios MS e WPM.

Paixão-Santos et al. (2006) observaram que o enraizamento da espécie *S. mucugensis* é promovido pelas menores concentrações de sais no meio MS abaixo de 50%. Paiva et al. (1996) também relatam que as concentrações de sais interferem na formação e no desenvolvimento de crisântemo.

O meio WPM foi eficiente no estabelecimento de plântulas de sempre-vivas, tendo como vantagens a menor utilização de sais, principalmente das fontes nitrogenadas, além da possibilidade de utilização de meios diluídos, minimizando os custos da micropropagação.

4.3 Influência da sacarose no desenvolvimento *in vitro* de plantas de sempre-vivas

A concentração de sacarose influenciou no desenvolvimento *in vitro* das duas espécies estudadas. O número de folhas formadas em *S. elegans* tende a aumentar com o incremento da quantidade de sacarose no meio de cultura. Entretanto, a espécie *S. elegans* apresenta maior número de folhas quando cultivada em meios acrescidos de 23 g L⁻¹ de sacarose (Figura 14).

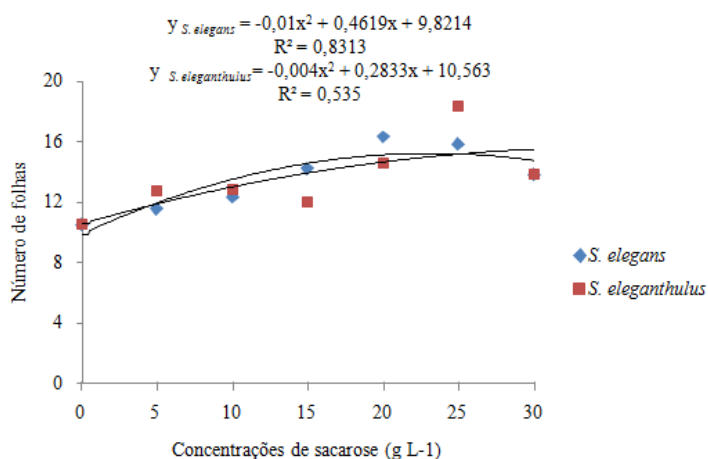


FIGURA 14 Número de folhas formadas em plântulas de *S. elegans* e *S. eleganthulus* cultivadas em meio WPM acrescido com diferentes concentrações de sacarose.

As plântulas de sempre-vivas desenvolveram-se melhor em concentrações de sacarose entre 10 e 20 g L⁻¹ (Figura 15). Ambas as espécies tiveram comportamento semelhante, sendo que a melhor média de sacarose foi de 17 g L⁻¹.

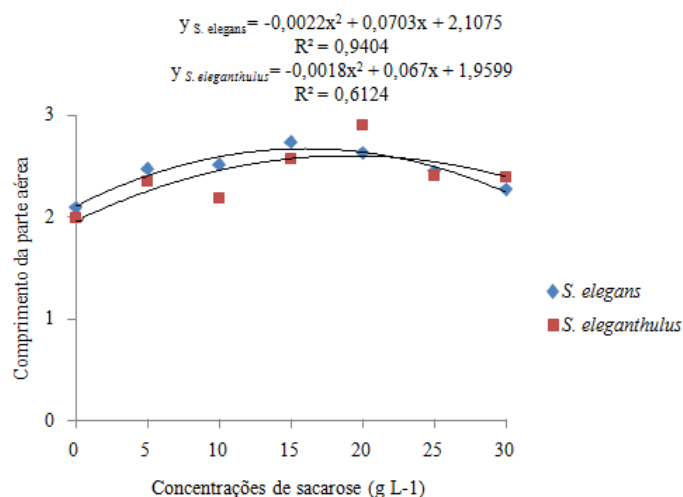


FIGURA 15 Comprimento da parte aérea (cm) de plântulas de *S. elegans* e *S. elegantulus* cultivadas em meio WPM acrescido com diferentes concentrações de sacarose.

Esses resultados corroboram com Silva et al. (2005a) que, trabalhando com *S. mucugensis*, constataram que a adição de 15 g L⁻¹ de sacarose promoveu melhor desenvolvimento da sempre-viva. As concentrações acima de 20 g L⁻¹ e abaixo de 10 g L⁻¹ não são recomendadas para o estabelecimento *in vitro* de sempre-vivas, pois há produção de mudas menores ou prolongamento do tempo da micropropagação.

Arigita et al. (2002) relatam que baixas quantidades de sacarose no meio de cultura podem limitar o desenvolvimento de plântulas de *Actinidia deliciosa*. O ajuste da sacarose no meio de cultivo pode otimizar processos metabólicos, além de ser uma alternativa para menor utilização de reguladores de crescimento, podendo diminuir os custos na micropropagação (Calamar & Kleber, 2002). A adição de sacarose no meio nutritivo é uma técnica comum na cultura de tecidos, mas deve-se levar em consideração aspectos relacionados ao

potencial osmótico da plântula e do meio de estabelecimento (Paixão-Santos et al., 2003).

A crescente adição de sacarose inibiu o enraizamento das plântulas, sendo que o maior número de raízes foi obtido quando adicionou-se ao meio de cultura 5 g L⁻¹ de sacarose. Nessa concentração, as plântulas de *S. elegans* apresentaram 4,7 raízes e de *S. elegantulus* 3,3 raízes (Figura 16).

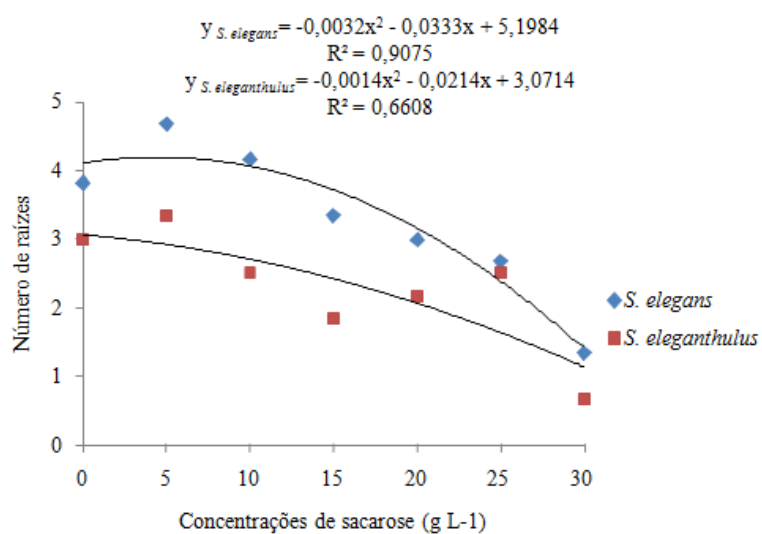


FIGURA 16 Número de raízes de plântulas de *S. elegans* e *S. elegantulus* em meio WPM acrescido com diferentes concentrações de sacarose.

A utilização de 30 g L⁻¹ de sacarose foi a mais prejudicial ao enraizamento das espécies estudadas. Segundo Bedê (2006), essas plantas possuem sistema radicular fasciculado, frequentemente apresentando rizomas. Sendo assim, a menor produção de raízes pode interferir em outras etapas da micropropagação, como por exemplo, a produção de explantes radiculares para a indução de calogênese.

Os resultados observados concordam com Silva et al. (2005a) que, estudando o efeito da sacarose no enraizamento de *S. mucugensis*, verificaram que o aumento dos níveis de sacarose no meio prejudicou a rizogênese. Esses

autores justificam que a quantidade reduzida desse carboidrato pode influenciar a competência e a diferenciação de células para formação de raízes. No entanto, outras espécies ornamentais podem necessitar de níveis mais elevados de sacarose para a produção de raízes, como no caso de crisântemo e orquídeas como a *Cattleya loddigesii* e *Cattleya walkeriana* (Paiva et al., 1996; Araujo, 2007; Dignart et al., 2009)

A produção de massa fresca foi afetada pelas concentrações de sacarose e ambas as espécies tiveram comportamento semelhante, sendo observadas para essa característica, curvas de regressão polinomial de terceiro grau em ambas as espécies (Figura 17).

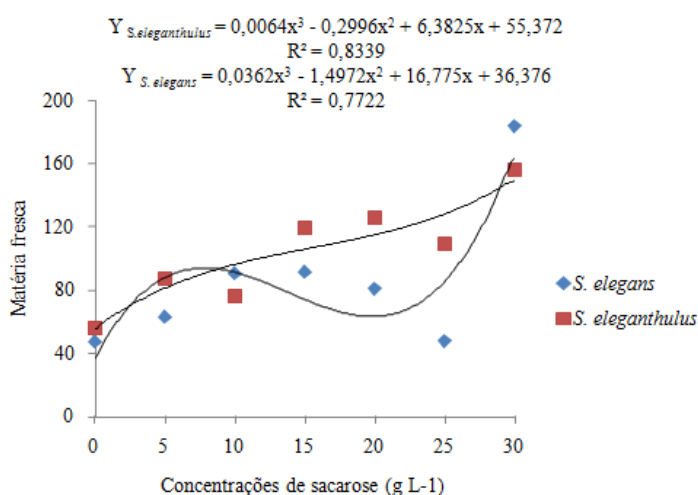


FIGURA 17 Massa fresca (mg) de plântulas de *S. elegans* e *S. elegantulus* em meio WPM acrescido com diferentes concentrações de sacarose.

Em ambas as espécies foi verificada uma tendência de acúmulo da massa fresca à medida que as concentrações de sacarose foram aumentadas, ocorrendo maiores teores na concentração de 30 g L⁻¹. As maiores concentrações de sacarose favoreceram a produção de folhas, o que contribuiu para o acúmulo de massa fresca. Na concentração de 30 g L⁻¹ ocorreu entumescimento e

proliferação celular no colo das plântulas, fato decorrente do estresse celular nessa região, sendo esse o principal fator para acúmulo de massa fresca nas plântulas (Figura 18).

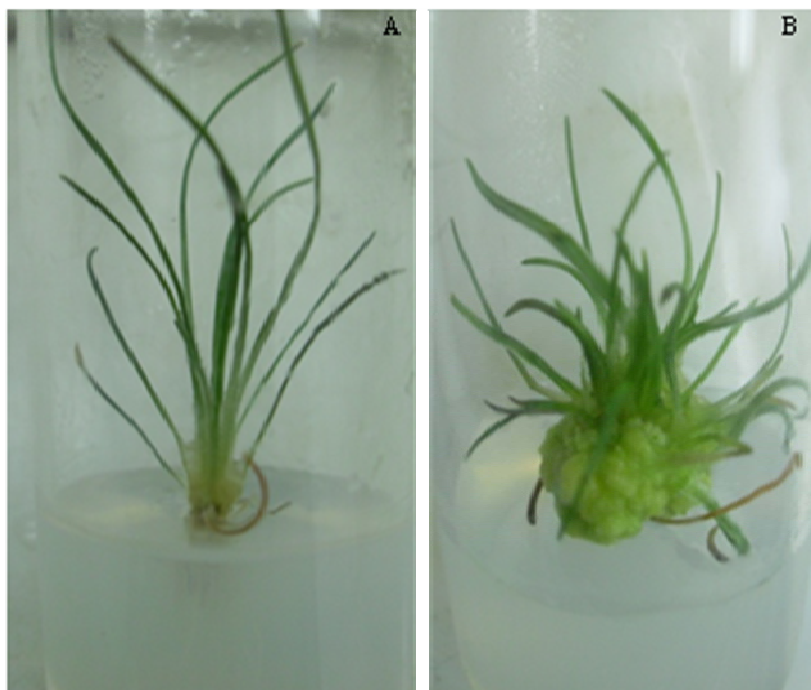


FIGURA 18 Aspecto geral de plântulas de *S. elegans* com desenvolvimento normal em meio acrescido de 15 g L^{-1} de sacarose (A) e formação de calos em meio acrescido de 30 g L^{-1} de sacarose (B) aos 20 dias após a repicagem.

As estruturas formadas no colo da planta eram semelhantes a calos. Aproximadamente de 20 dias após a repicagem das plântulas, foi observada a proliferação de gemas basais. Algumas plantas foram mantidas em sala de crescimento por mais 40 dias, sendo observado que grande parte dessas gemas originaram folhas, enquanto que uma pequena porção deu origem a brotações laterais.

A formação de folhas ou brotações não pode ser atribuída à multiplicação natural da espécie, pois plantas mantidas em sala de crescimento por períodos acima de 60 dias não formam folhas ou brotações na região do colo. Pode-se então inferir que as estruturas formadas, presença de folhas e brotações na região do colo, são efeito direto do estresse provocado pelos altos níveis de sacarose.

Segundo Pasqual et al. (1998), algumas plantas são muito sensíveis à manipulação e pequenas injúrias. Além disso, o estresse químico ou osmótico pode levar à calogênese, como foi observado para as duas espécies deste estudo. Em algumas plantas é possível a ocorrência de calos de forma espontânea, sendo esse fato observado na sempre-viva *S. mucugensis* (Paixão-Santos et al., 2006).

4.4 TDZ e ANA na multiplicação *in vitro* de sempre-vivas vivas

O uso de diferentes concentrações de TDZ e ANA não foi eficiente para indução de brotações, mas permitiu a formação de calos. Observou-se que a indução de calos em ambas as espécies ocorria exclusivamente nas raízes. Não houve formação de calos em nenhuma das espécies estudadas quando não foram acrescentados reguladores de crescimento no meio de cultura (Figura 19). A presença de 0,5 mg L⁻¹ e 1,0 mg L⁻¹ de ANA no meio de indução foram eficientes para formação de calos em ambas as espécies. As combinações de TDZ e ANA 0,5+0,5; 1,0+1,0 e 4,0+1,0 mg L⁻¹, respectivamente, também foram eficientes na indução de calos para *S. elegans*, enquanto as combinações de 0,5+1,0; 1,0+0,0; 1,0+0,5 e 2,0+0,0 mg L⁻¹ de TDZ e ANA foram mais efetivos para *S. elegantulus*.

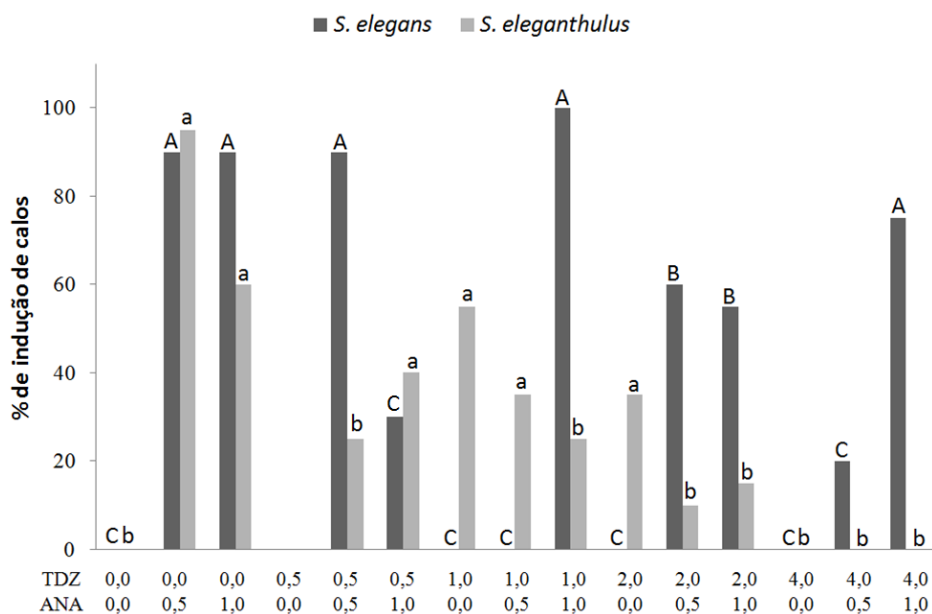


FIGURA 19 Percentual dos explantes com indução em função da adição de TDZ e ANA ao meio de cultura para cultivo de sempre-vivas. Médias seguidas das mesma letra maiúscula (*S. elegans*) e minúscula (*S. elegantulus*) não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Ebrahime et al. (2003) observaram que a combinação de reguladores de crescimento favorece a calogênese em *Cuminum cyminum* L., No entanto, outros trabalhos evidenciam que esse balanço nem sempre é necessário (Erig & Schuch, 2005; Villa et al., 2008; Castro et al., 2009).

Paixão-Santos et al. (2006), trabalhando com *S. mucugensis*, relatam que a formação de calos em sempre-vivas pode ocorrer espontaneamente, mesmo em plantas no estágio de desenvolvimento pós-seminal.

Os calos formados em ambas as espécies apresentavam colorações diferentes que variaram entre branco, amarelo e verdes (Figura 20).

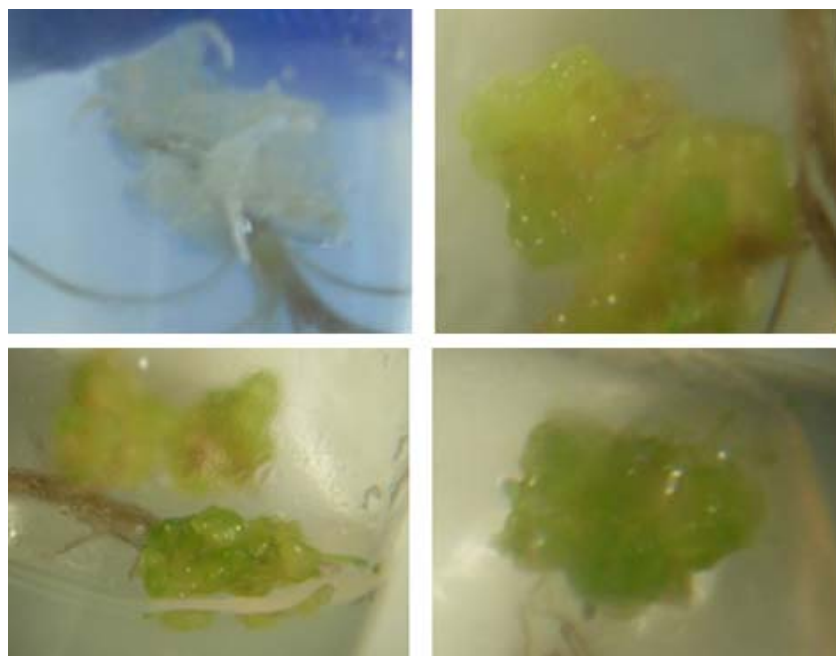


Figura 20 Aspecto geral da coloração dos calos de *S. elegans* e *S. elegantulus*

Os calos de coloração branca foram formados na ausência de TDZ e na presença de ANA, independente da concentração adicionada. As demais colorações foram evidenciadas na presença de TDZ. A coloração dos calos varia em função do regulador de crescimento utilizado, o que pode estar relacionado com a produção de metabólitos secundários (Subroto & Doran, 1994, Cerqueira et al. 2002).

Cerqueira et al. (2002) observaram que o uso das auxinas 2,4-D e AIB e ANA produziram calos de coloração verde e amarela a partir de segmentos de caule e folhas de erva-de-touro (*Tridax procumbens* L.). Naseem & Jha (1994), trabalhando com ANA e BAP, também observaram a formação de calos de coloração verde escura em segmentos foliares de *Cleome viscosa* L.

Foi possível observar organogênese direta, que ocorreu em repetições isoladas e em frequência reduzida. A organogênese é caracterizada pela

formação de um novo órgão a partir de uma pequena proliferação do tecido do explante (Costa et al., 2006). Em trabalho realizado por Soares et al. (2007) foi verificado que o uso de BAP no meio de cultivo possibilitou a obtenção de brotações e formação de calos na base de segmentos caulinares de mangabeira, mas a presença de ANA não induziu a produção de raízes.

Aos 30 dias após a inoculação dos explantes, observou-se nos calos de coloração verde o surgimento de novos brotos. Entretanto esse fato não ocorreu nos tratamentos com ausência de TDZ ou na combinação de 0,5 mg L⁻¹ de TDZ e 1,0 mg L⁻¹ de ANA, respectivamente, em nenhuma das espécies. Para *S. elegans*, a melhor produção de brotos ocorreu quando proporções iguais de TDZ e ANA foram adicionadas, que equivalem a 0,5+0,5 e 1,0+1,0 mg L⁻¹. Quanto à produção de brotos em *S. elegantulus*, os melhores resultados ocorreram quando se utilizou 1,0 mg L⁻¹ de TDZ ou combinando 1,0 mg L⁻¹ de TDZ com 0,5 mg L⁻¹ de ANA (Figura 21).

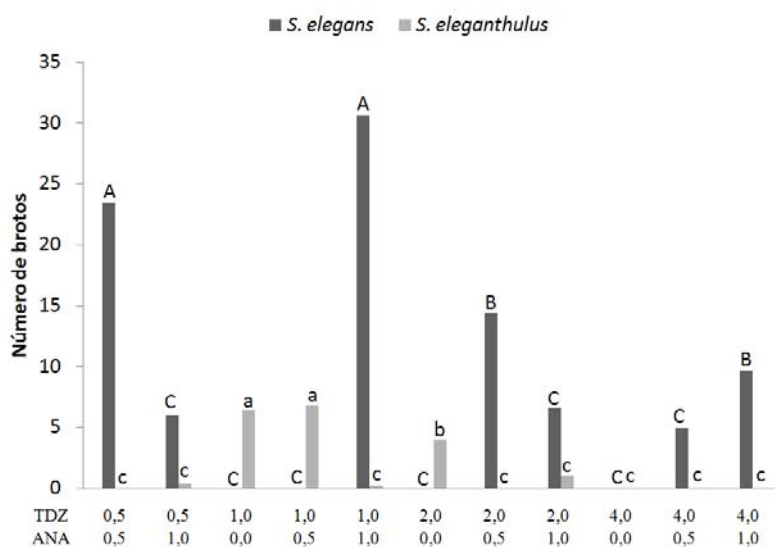


FIGURA 21 Número de brotos produzidos em função da adição de TDZ e ANA ao meio de cultura para cultivo de sempre-vivas. Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas (*S. elegans*) e minúsculas (*S. elegantulus*) não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Maiores números de brotações em *S. elegans* ocorreram quando a razão TDZ/ANA era igual a 1 e nas concentrações de 0,5 e 1,0 mg L⁻¹. Já em *S. elegantulus* o maior número de brotações foi observado em meios com concentrações onde a quantidade de TDZ foi maior (1,0+0,5 mg L⁻¹ e 1,0+0,5 mg L⁻¹). O controle no crescimento e na diferenciação de explantes micropropagados requer um adequado balanço entre auxinas e citocininas (Wagner Júnior et al., 2003) sendo, normalmente, necessárias quantidades mais baixas de auxinas quando comparadas às citocininas, mantendo uma baixa razão auxina/citocinina (Pierik, 1990). No entanto, nesse trabalho foi observado um comportamento diferente para as espécies estudadas.

4.5 Pré-aclimatização e substratos na aclimatização de plântulas de sempre- vivas

Avaliando-se a pré-aclimatização e o uso de diferentes substratos, não se observou diferença para a espécie *S. elegans*, mas os tratamentos afetaram as plântulas de *S. elegantulus*.

Em média, 25,55% de plantas de *S. elegans* sobreviveram à aclimatização. A metodologia adotada para aclimatização de *S. elegans* não foi eficiente, face à baixa proporção de plântulas sobreviventes obtidas na avaliação ao final de 30 dias.

Para *S. elegantulus*, a aclimatização foi afetada pelos substratos testados e também pelo processo de pré-aclimatização, isoladamente. O melhor resultado para a aclimatização de plântulas de *S. elegantulus* foi a areia, onde a proporção foi de 0,739 plantas sobreviventes, seguido do substrato Plantmax®, com 0,464 plantas sobreviventes. Resultados inferiores foram obtidos com plantas aclimatizadas em vermiculita (Figura 22).

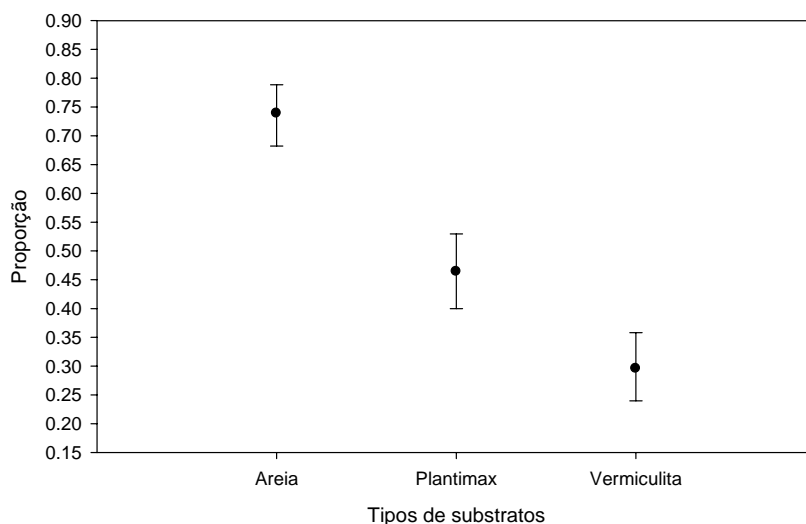


Figura 22 Proporção de plantas sobreviventes de *S. elegantulus* aclimatizadas em função dos diferentes substratos. Nível nominal de 5%.

Os resultados relativos ao uso de substratos para a aclimatização são bastante variáveis. Souza Sobrinho et al. (2007) não observaram diferenças entre os substratos areia e Plantimax® na aclimatização de capim-elefante. Porto (2009) não observou diferença na sobrevivência de plantas de ipê-branco submetidas à aclimatização quando utilizou areia, plantmax ou vermiculita como substratos.

Paixão-Santos et al. (2003) relatam que a propagação de plântulas de sempre-vivas em substratos diferentes daqueles encontrados no ambiente natural não é viável. A maior proporção de aclimatização observada em areia deve-se ao fato das plantas de sempre-vivas serem adaptadas a solos arenosos (Nunes et al., 2008c).

Analisando o uso da pré-aclimatização ou não, observa-se que a aclimatização direta apresentou maior proporção (0,655 plântulas sobreviventes)

comparando-se plantas que passaram pela pré-aclimatização (0,348 de plantas sobreviventes) (Figura 23).

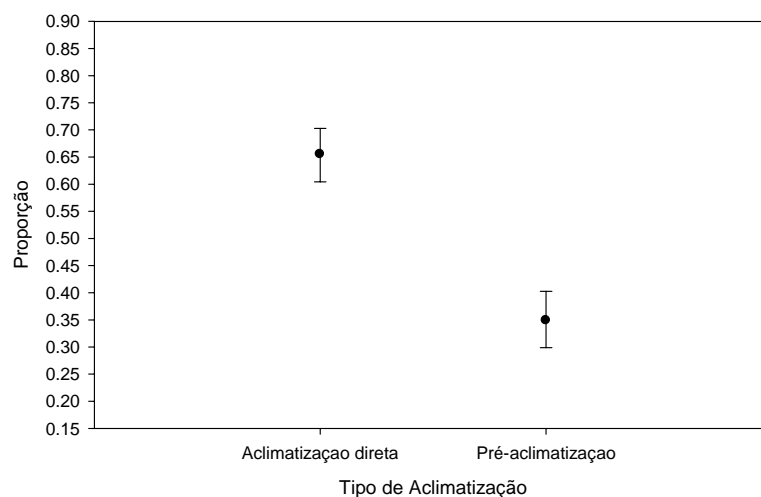


Figura 23 Proporção de plantas sobreviventes de *S. elegantulus* em função do tipo de aclimatização. Nível nominal de 5%.

Com o uso da pré-aclimatização, as plântulas foram manipuladas com maior frequência, passando por diferentes etapas, o que pode ter aumentado o estresse e o número de plantas mortas. Paixão-Santos et al. (2003), estudando *S. mucugensis*, observaram que a sobrevivência de plantas de sempre-vivas é muito baixa quando submetidas ao transplântio.

Também ocorreu alta frequência de contaminação por fungos nas plantas submetidas à pré-aclimatização. Como nesse processo os frascos ficaram abertos por cinco dias, é possível que esporos de fungos tenham afetado as plantas que, após serem transplantadas para os tubetes e envoltas com saco de polietileno, se desenvolveram. As plantas submetidas à aclimatização direta não apresentaram contaminação por fungos.

Resultados relativos ao uso da aclimatização são controversos. Nascimento et al. (2008) não observaram diferenças entre a pré-aclimatização e

a aclimatização direta em plantas de uvaieira. Hoffmann et al. (2001) verificaram melhores resultados na pré-aclimatização de porta enxertos de macieira quando comparados com a aclimatização direta.

5 CONCLUSÕES

A concentração do meio de cultura não influencia a porcentagem de germinação das sementes de sempre-vivas.

A velocidade de germinação *in vitro* de sementes de sempre-vivas é inversamente proporcional à adição de nutrientes no meio de germinação

O desenvolvimento inicial das plântulas é afetado pelas concentrações do meio de cultura; *S. elegans* é mais sensível a altas concentrações de sais.

O melhor meio de cultura para o estabelecimento das espécies *S. elegans* e *S. elegantulus* é o meio WPM com a concentração original de sais.

A melhor concentração e sacarose para produção de mudas de *S. elegans* e *S. elegantulus* é 17 g L⁻¹.

A melhor concentração para indução de calogênese em sempre-vivas é 0,5 e 1,0 mg L⁻¹ de ANA e ausência de TDZ.

As plantas da espécie *S. elegantulus* apresentam 73,9% de sobrevivência quando aclimaizadas em areia, enquanto *S. elegans* apresenta 25,5%.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO, A. G. **Micropropagação de *Cattleya loddigessi* ‘Tipo’**: fontes de nitrogênio, qualidade de luz, sacarose e ácido giberélico. 2007. 74 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- ARIGITA, L.; GONZÁLEZ, A.; TAMÉS, R. S. Influence of CO₂ and sucrose on photosynthesis and transpiration of *Actinidia deliciosa* explants cultured *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 115, n. 1, p. 166-173, May 2002.
- BEDÊ, L. C. **Alternativas para o uso sustentado de sempre-vivas**: efeitos do manejo extrativista sobre *Syngonanthus elegantulus* Ruhland (Eriocaulaceae). 2006. 184 p. Tese (Doutorado em Ecologia, Conservação e Manejo de Vida Silvestre) - Instituto de Ciências Biológicas, Belo Horizonte.
- BELLINTANI, M. C.; LIMA, C. C.; BRITO, A. L.; SANTANA, J. R. F.; DORNELLES, A. L. C. Estabelecimento *in vitro* de *Orthophytum mucugense* e *Neoregelia mucugensis*, bromélias endêmicas da Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 1101-1103, jul. 2007. Suplemento.
- BERTONI, B. W.; DAMIÃO FILHO, C. F.; MORO, J. R.; FRANÇA, S. C.; PEREIRA, A. M. S. Micropropagação de *Calendula officinalis* L. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 8, n. 2, p. 48-54, 2006.
- CALAMAR, A.; KLERK, G. J. de. Effect of sucrose on adventitious root regeneration in apple. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 70, n. 2, p. 207-212, Aug. 2002.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; PEREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPq, 1998. v. 1, p. 87-132.
- CASTRO, A. H. F.; PAIVA, R.; ALVARENGA, A. A.; VITOR, S. M. M. Calogênese e teores de fenóis e taninos totais em barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville]. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 2, p. 385-390, mar./abr. 2009.

CERQUEIRA, E. S.; PINTO, J. E. B. P.; MORAIS, A. R.; CASTRO, N. E. A.; CARDOSO, M. G.; LAMEIRA, O. A. Indução de calos em erva-de-touro (*Tridax procumbens* L.) utilizando diferentes reguladores de crescimento e tipos de explantes. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 2, p. 301-308, mar./abr. 2002.

COSTA, A. S.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; BLANK, A. F.; MENDONÇA, A. B.; AMANCIO, V. F.; LEDO, A. S. Estabelecimento de alecrim-pimenta *in vitro*. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 1, p. 88-93, jan./mar. 2007.

COSTA, M. A. P. C.; SOUZA, A. S.; ALMEIDA, W. A. B. Morfogênese *in vitro*. In: SOUZA, A. da S.; JUNHANS, T. G. (Org.). **Introdução a micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: EMBRAPA Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. v. 1, p. 131-140.

DEMÉTRIO, C. G. B. Métodos lineares na experimentação agronômica. In: SIMPÓSIO DE ESTATÍSTICA APLICADA A EXPERIMENTAÇÃO AGRONÔMICA, 1., 1993, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: UFRGS, 1993. p. 125.

DIGNART, S. L.; CASTRO, E. M.; PASQUAL, M.; FERRONATO, A.; BRAGA, F. T.; PAIVA, R. Luz natural e concentrações de sacarose no cultivo *in vitro* de *Cattleya walkeriana*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 3, p. 780-787, maio/jun. 2009.

DONINI, L. P.; SCHUCH, M. W.; RIBEIRO, M. F.; SOUZA, J. A.; SOARES, G. C. Estabelecimento *in vitro* de oliveira cv. "Arbequina" para início da micropropagação. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 6, p. 1769-1772, set. 2008.

EBRAHIMIE, E.; HABASHI, A. A.; GHAREYAZIE, B.; GHANNADHA, M.; MOHAMMADIE, M. A rapid and efficient method for regeneration of plantlets from embryo explants of cumin (*Cuminum cyminum*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 75, n. 1, p. 19-25, Oct. 2003.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Morfogênese *in vitro* de brotos de macieira (*Malus domestica* Borkh.) a partir de fragmentos delgados de folhas. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 3, p. 575-581, maio/jun. 2005.

FERREIRA, D. F. Análise estatística por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 255-258.

GAMBORG, O. L. The effects of amino acids and ammonium on the growth of plant cells in suspension culture. **Plant Physiology**, Washington, v. 45, n. 4, p. 372-375, Apr. 1970.

GAMBORG, O. L.; SHYLUK, J. P. The culture of plant cells with ammonium salts as the sole nitrogen source. **Plant Physiology**, Washington, v. 45, n. 5, p. 598-600, May 1970.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: in practice**. 2. ed. Edington: Exegetics, 1996. 1361 p.

GONÇALVES, J. C.; DIOGO, G.; COELHO, M. T.; AMÂNCIO, S. Changes in leaf morphology and anatomy of in vitro-cultured chestnut plantlets during acclimatisation. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 1, n. 31, p. 183-193, 2000.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, A. M. Micropropagação. In: TORRES, L.; CALDAS, S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA/CNPH, 1998. v. 1, p. 183-260.

HERNANDEZ, R. J. M. **Efeito da aplicação de fosfato monoamônico e sulfato de zinco sobre a nutrição mineral do cafeeiro (*Coffea arabica* L) em condições de dois níveis de saturação de bases**. 1998. 131 p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba.

HOFFMANN, A.; CHALFUN, N. N. J.; PASQUAL, M. Efeito do ácido giberélico e do frio na sobrevivência de plântulas micropropagadas de macieira 'Marubakaido' durante a aclimatização. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 1, p. 31-37, jan./fev. 2001.

INSTITUTO TERRA BRASILIS DE DESENVOLVIMENTO SOCIOAMBIENTAL. **Projeto Sempre-Viva: perspectivas de seu uso sustentado**. Belo Horizonte, 1999. 123 p.

LANDGRAF, P. R. C. **Diagnóstico da floricultura no estado de Minas Gerais**. 2006. 111 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

LANDGRAF, P. R. C.; PAIVA, P. D. O. Produção de flores cortadas no estado de Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 1, p. 120-126, jan./fev. 2009.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of Mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **International Plant Propagation Society Proceedings**, Washington, v. 30, p. 421-427, 1980.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigour. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 1, p. 176-177, 1962.

MENDONÇA, M. P.; LINS, L. V. **Lista vermelha das espécies ameaçadas de extinção da flora de Minas Gerais**. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas/Fundação Zoo-Botânica de Belo Horizonte, 2000. 157 p.

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

NASCIMENTO, A. C.; PAIVA, R.; ABBADE, L. C.; VARGAS, D. P.; SOARES, F. P. Micropropagação de uvaieira (*Eugenia pyriformis* Cambess): efeito do BAP e AIB. **Revista Verde**, Mossoró, v. 3, n. 2, p. 20-26, abr./jun. 2008.

NASEEM, M.; JHA, K. K. Differentiation and regeneration in *Cleome viscosa* leaves cultured *in vitro*. **Egyptian Journal of Botany**, Cairo, v. 34, n. 1, p. 37-47, Sept. 1994.

NERI, E. C. S.; PAIVA, P. D. O.; BORÉM, R. A. T. Produção e comercialização de sempre-vivas. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 26, n. 27, p. 56-61, 2005.

NERY, M. C.; CARVALHO, M. L. M.; OLIVEIRA, L. M.; NERY, F. C.; SILVA, D. G. Germinação *in vitro* e *ex vitro* de embriões de embriões: semente de *Tabebuia serratifolia* (VAHL) NICH. **Revista Cerne**, Lavras, v. 14, n. 1, p. 1-8, jan./mar. 2008.

NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, R.; CASTRO, A. H.; VIEIRA, C. V.; ABBADE, L. C.; ALVARENGA, A. A. Germinação *in vitro* de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 5, p. 1053-1059, set./out. 2004.

NUNES, S. C. P.; NUNES, U. R.; FONSECA, P. G.; GRAZZIOTTI, P. H.; PEGO, R. G.; MARRA, L. M. 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, 2008a.

NUNES, U. R.; NUNES, S. C. P.; ANDRADE JÚNIOR, V. C.; ASSIS JÚNIOR, S. L.; BISPO, F. H. A. Época de maturação, dispersão, colheita e qualidade fisiológica de sementes de sempre-vivas (*Syngonanthus elegans* (Bong.) Ruhland). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 6, p. 1775-1780, nov./dez. 2008b.

NUNES, U. R.; NUNES, S. C. P.; FONSECA, P. G.; PEGO, R. G. Efeito da época de colheita, irrigação e permanência de sementes em solo seco no desenvolvimento inicial de plântulas de *Syngonanthus elegans* (Bong.) Ruhland. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 30, n. 3, p. 64-70, 2008c.

ORIANI, A.; SCATENA, V. L.; SANO, P. T. Anatomia das folhas, brácteas e escapos de *Actinocephalus* (Koern.) Sano (Eriocaulaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 28, n. 2, p. 229-240, abr./jun. 2005.

PAIVA, P. D. O.; PASQUAL, M.; PAIVA, R. Efeito de diferentes concentrações do meio MS, nitrogênio e sacarose na micropropagação de crisântemo 'Orange reagen'. **Bragantia**, Campinas, v. 55, n. 1, p. 9-18, jan./jun. 1996.

PAIXÃO-SANTOS, J.; DORNELLES, A. L. C.; PEREIRA, F. D.; OLIVEIRA, L. M. Indução de calos em sempre-viva (*Syngonanthus mucugensis* Giulietti), utilizando diferentes tipos de explantes e concentrações de BAP. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 30, n. 2, p. 127-131, mar./abr. 2008.

PAIXÃO-SANTOS, J.; DORNELLES, A. L. C.; SILVA, J. R. S.; RIOS, A. P. Germinação *in vitro* de *Syngonanthus mucugensis* Guilietti. **Sitientibus Série Ciências Biológicas**, Feira de Santana, v. 3, n. 1, p. 120-124, dez. 2003.

PAIXÃO-SANTOS, J.; DORNELLES, A. L. C.; SILVA, J. R. S.; SANTANA, J. R. F.; BRITO, L. A. Ajuste do meio MS para o cultivo “*in vitro*” de *Syngonanthus mucugensis* Giulietti, espécie ameaçada de extinção. **Sitientibus Série Ciências Biológicas**, Feira de Santana, v. 6, n. 1, p. 36-39, jan./mar. 2006.

PASQUAL, M.; RAMOS, J. D.; HOFFMAN, A.; CARVALHO, G. R. **Principais meios de cultura**: meio de cultura. Lavras: UFLA/FAEPE, 1998. 127 p.

PIERIK, R. L. M. **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores**. Madri: Mundi, 1990. 295 p.

PORTO, J. M. P. **Potencial embriogênico e organogênico em explantes de Ipê-branco**. 2009. 74 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SANTOS-SEREJO, J. A.; JUNGHANS, T. G.; SOARES, T. L.; SILVA, K. M. Meios nutritivos para micropropagação de plantas. In: SOUZA, A. S.; JUNGHANS, T. G. (Ed.). **Introdução à micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: EMBRAPA Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. v. 1, p. 79-98.

SARGENT, P. A.; KING, J. Investigations of growth-promoting factors in conditioned soybean root cells and in the liquid medium in which they grow: ammonium, glutamine, and amino acids. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 52, p. 1747-1755, July 1974.

SCATENA, V. L.; LEMOS FILHO, J. P.; LIMA, A. A. A. Morfologia do desenvolvimento pós-seminal de *Syngonanthus elegans* e *S. niveus* (Eriocaulaceae). **Acta Botanica Brasílica**, São Paulo, v. 10, n. 1, p. 85-91, 1996.

SILVA, J. R. S.; BRITO, A. L.; SANTANA, J. R. F.; DORNELLES, A. L. Efeito da sacarose sobre o enraizamento e desenvolvimento *in vitro* de *Syngonanthus mucugensis* Giul. **Sitientibus Série Ciências Biológicas**, Feira de Santana, v. 5, n. 2, p. 56-59, jul./dez. 2005a.

SILVA, J. R. S.; PAIXÃO SANTOS, J.; RIOS, A. P. S.; SANTANA, J. R. F.; DORNELLES, A. L. C. Estudo da germinação e morfologia do desenvolvimento pós-seminal de *Syngonanthus mucugensis* Giul. “*in vitro*”. **Sitientibus Série Ciências Biológicas**, Feira de Santana, v. 5, n. 2, p. 60-62, jul./dez. 2005b.

SILVA JÚNIOR, J. M. *Etiligera elatior* (Jack) R. M. Smith: propagação *in vitro*, anatomia e obtenção de protoplastos. 2007. 118 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SIMÕES, F. C.; PAIVA, P. D. O.; CARVALHO, M. L. M.; TAVARES, T. S.; PAIVA, R. Germinação de sementes de sempre-vivas (*Syngonanthus elegans* e *S. venusthus*). **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 13, n. 1, p. 78-83, 2007.

SOARES, F. P.; PAIVA, R.; ALVARENGA, A. A.; NOGUEIRA, R. C.; EMRICH, E. B.; MARTINOTTO, C. Organogênese direta em explantes caulinares de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 4, p. 1048-1053, jul./ago. 2007.

SORACE, M.; FARIA, R. T.; DAMASCENO JÚNIOR, C. V.; GOMES, G. P.; BARBOSA, C. M.; VIEIRA, F. G. N.; SILVA, G. L.; TAKAHASHI, L. S. A.; SCHNITZER, J. A. Crescimento *in vitro* de *Oncidium baueri* (Orchidaceae) em diferentes concentrações de macronutrientes e sacarose. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n. 4, p. 775-782, out./dez. 2008.

SOUZA, F. V. D.; COSTA, M. A. P. C.; SOUZA NETO, H. P. Aclimatização. In: SOUZA, A. S.; JUNGHANS, T. G. (Ed.). **Introdução à micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: EMBRAPA Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. v. 1, p. 79-98.

SOUZA SOBRINHO, F.; PEREIRA, A. V.; LÉDO, F. J. S.; OLIVEIRA, J. S.; VARGAS, S. M. Aclimatização de germoplasma de capim-elefante, pós-cultivo *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 1, p. 11-15, jan./fev. 2007.

SUBROTO, M. A.; DORAN, P. M. Production of steroid alkaloid by hairy roots of *Solanum aviculare* and the effect of gibberellic acid. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 38, n. 2, p. 93-102, Aug. 1994.

UNEMOTO, L. K.; FARIA, R. T.; VIEIRA, A. O. S.; DALIO, R. J. D. Propagação *in vitro* de orquídeas brasileiras em meio de cultura simplificado. **Revista Brasileira Agrocência**, Pelotas, v. 13, n. 2, p. 267-269, abr./jun. 2007.

VILLA, F.; PASQUAL, M.; ASSIS, F. A.; PIO, L. A. S.; ASSIS, G. A. Crescimento *in vitro* de amoreira-preta: efeito de reguladores de crescimento e da cultivar. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 6, p. 1754-1759, nov./dez. 2008.

WAGNER JÚNIOR, A.; COUTO, M.; QUEZADA, A. C. Multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de ameixeira 'Julior'. **Revista Brasileira de Agrocência**, Pelotas, v. 9, n. 2, p. 121-124, abr./jun. 2003.