



Artigo Original / Original Paper

Propagação *in vitro* de *Angelonia integerrima*

In vitro propagation of Angelonia integerrima

Mara Cíntia Winhelmann^{1,2}, Marília Tedesco¹, Júlio Rieger Lucchese¹, Claudimar Sidnei Fior¹
& Gilmar Schafer¹

Resumo

Devido à dificuldade de obtenção de mudas de *Agelonia integerrima*, espécie com potencial ornamental, a partir de sementes, por métodos convencionais, foram desenvolvidos estudos com o objetivo de testar a viabilidade da 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 MS; b) multiplicação com benzilaminopurina (BAP) (0,0, 0,5 e 1,0 mg L⁻¹) e ácido naftalenoacético (ANA) (0,0, 0,1 e 0,5 mg L⁻¹); c) enraizamento *in vitro* com ácido indolbutírico (AIB) (0; 0,25; 0,50; 0,75 e 1,0 mg L⁻¹); d) aclimatização das mudas. Sementes armazenadas sob ambiente refrigerado apresentaram maior porcentagem de germinação, índice de velocidade de germinação e de plântulas formadas. A germinação não foi afetada pela concentração de sais do meio. Para a multiplicação, houve interação entre as concentrações de BAP e ANA, recomendando-se utilizar 1,0 mg L⁻¹ de BAP e 0,1 mg L⁻¹ de ANA. No enraizamento, foi ajustada uma equação quadrática para as variáveis: porcentagem de formação de calo e enraizamento, sendo que a concentração de 0,83 mg L⁻¹ é o ponto de máxima resposta para a porcentagem de enraizamento. A espécie apresentou 50,8% de aclimatização.

Palavras-chave: bioma Pampa, germinação, micropropagação, ornamental nativa.

Abstract

Due to the difficulty of obtaining seedlings of *Agelonia integerrima*, species with ornamental potential, from seeds, by conventional methods, studies were carried out to test the viability of *in vitro* seedling production. 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 MS medium; b) multiplication using benzylaminopurine (BAP) (0.0, 0.5 and 1.0 mg L⁻¹) and naphthalene acetic acid (NAA) (0.0, 0.1 and 0.5 mg L⁻¹); c) *in vitro* rooting using indolebutyric acid (IBA) (0, 0.25, 0.50, 0.75 and 1.0 mg L⁻¹) 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⁻¹ of BAP and 0.1 mg L⁻¹ 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⁻¹ results in the maximum response point for rooting. The species presented 50.8% of acclimatization.

Key words: Pampa biome, germination, micropropagation, native ornamental.

¹ Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Faculdade de Agronomia, Depto. Horticultura e Silvicultura, Av. Bento Gonçalves 7712, Bairro Agronomia, 91540-000, Porto Alegre, RS, Brasil.

² Autor para correspondência: marawinhelmann@yahoo.com.br

Introdução

O gênero *Angelonia* Bonpl. ocorre em toda região Neotropical que vai do México ao sul do Brasil (Boff *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. 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 potencial ornamental, podendo ser cultivada em canteiros, floreiras e vasos, bem como pode ser utilizada em arranjos florais (Stumpf *et al.* 2009). Não existem relatos na literatura descrevendo a propagação de *A. integerrima*, estudos preliminares realizados com germinação de sementes em substrato, não foram bem sucedidos, visto que nenhuma semente germinou (dados não publicados). Desse modo são necessários estudos nessa área, a fim de definir protocolos adequados para que se obtenha êxito, sendo que a propagação *in vitro* é uma técnica promissora.

A propagação *in vitro* ou micropropagação é uma alternativa 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). Para muitas espécies difundidas comercialmente, como orquídeas, antúrios, gérbas 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). A germinação *in vitro* está sendo utilizada para espécies nativas ameaçadas de extinção como a rainha-do-abismo [*Sinningia leucotricha* (Hoehne) H.E.Moore] (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).

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). Nesse sentido, faz-se necessário testar métodos, a fim de adaptar protocolos que possibilitem a propagação de cada espécie, otimizando a produção de mudas sadias em larga escala, com sanidade e identidade genética garantidas. *Angelonia integerrima* é um exemplo de espécie que precisa ser estudada quanto a esses aspectos, a fim de se conhecer as formas viáveis de propagação, de modo que seja explorada comercialmente de maneira sustentável e evitar o extrativismo indiscriminado.

Em trabalhos preliminares, utilizando-se diversos substratos e recipientes, verificou-se elevada dificuldade de obtenção de mudas de *A. integerrima* através de sementes (dados não publicados). Em função disso, foram desenvolvidos estudos com o objetivo de testar a viabilidade da produção de mudas *in vitro* dessa espécie, de forma a permitir dar segmento a estudos de exploração do seu potencial ornamental.

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 ± 1 °C, 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 g L⁻¹ de sacarose e 2,3 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 (240 sementes por tratamento). Os frascos com as sementes 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 μmol m⁻² 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 1 (adaptada por Santana & 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.

Equação 1:

$$ERI_{mod} = \frac{\sum_{n=n_0}^{c-1} X_n (c - n)}{\sum_{n=n_0}^{c-1} X_n}$$

Onde:

X_n : número de plântulas emergidas por metro linear contado no dia n ;

c : número de dias contados da semeadura até o fim da emergência;

n : dia no qual a contagem é feita e expresso como número de dias após a semeadura;

n_0 : dias no qual a emergência começou e expresso como número de dias após a semeadura;

Experimento 2: multiplicação *in vitro*

Inicialmente as plantas do experimento 1 (Fig. 1a) 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⁻¹ de sacarose e 7 g L⁻¹ 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 explantes caulinares com aproximadamente 1 cm de comprimento e duas gemas foram utilizados para o experimento 2 (Fig. 1b).

Para este estudo foi utilizado o meio MS, acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose e 7 g L⁻¹ de ágar, pH corrigido para 5,8, antes da autoclavagem. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial (3 × 3), com oito repetições, seis frascos por parcela e cinco explantes em cada frasco (240 explantes por tratamento). Foi testada a combinação de benzilaminopurina (BAP) (0,0, 0,5 e 1,0 mg L⁻¹) e ácido naftalenoacético (ANA) (0,0, 0,1 e 0,5 mg L⁻¹). 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.

Experimento 3: enraizamento *in vitro*

Neste estudo comparou-se o enraizamento de explantes caulinares de *A. integerrima* utilizando diferentes concentrações de ácido indolbutírico (AIB) no meio de cultivo MS. 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⁻¹), cinco repetições, dois frascos por parcela e cinco explantes em cada frasco (50 explantes por tratamento). 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 (sendo medido o comprimento da maior raiz).

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 6 de junho a 27 de setembro de 2016 (113 dias).



Figura 1 – a. Plantas obtidas a partir da germinação *in vitro* de sementes *Angelonia integerrima* Sprengel; b. padronização dos explantes para 1 cm de comprimento.

Figure 1 – a. Plants obtained from *in vitro* seeds germination of *Angelonia integerrima* Sprengel; b. standardization of the explants to 1 cm in length.

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 (sendo medido o comprimento da maior raiz), 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 (50 mudas por tratamento).

Análise estatística

Nos quatro experimentos os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo *software* SigmaPlot 11.0. Nos experimentos 1 e 2 as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro pelo mesmo *software*. No experimento 1 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 e no experimento 2 os dados de número de brotos por explante e massa seca da parte aérea foram transformados para raiz (x). Já no experimento 3 os dados foram submetidos à regressão polinomial pelo *software* citado anteriormente. No experimento 4 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 $x+1$.

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 (Tab. 1). As sementes armazenadas sob ambiente refrigerado apresentaram maior porcentagem de germinação, de plântulas formadas (Fig. 2a), menor TMG (Fig. 2b) e maior IVG (Fig. 2c). A germinação não foi afetada pelas diferentes concentrações de sais do meio MS, somente o TMG (Fig. 2d), que foi maior para sementes germinadas em meio MS contendo 100% da concentração de sais.

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,

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

Table 1 – Analysis of variance of seed germination of *Angelonia integerrima* under different concentrations of salts from MS medium and different storage locations (experiment 1); and multiplication under different concentrations of BAP (benzylaminopurine) and NAA (naphthaleneacetic acid) (experiment 2).

Variáveis Analisadas Experimento 1	LA valor p	CS MS valor p	Interação valor p	Média Geral
G (%)	< 0,01	0,73	0,55	39,03
TMG (dias)	< 0,01	< 0,01	0,80	17,52
IVG	< 0,01	0,07	0,47	0,99
PLF (%)	< 0,01	0,69	0,73	37,85
Variáveis Analisadas Experimento 2	BAP valor p	ANA valor p	Interação valor p	Média Geral
Comp. PA (cm)	0,07	0,30	0,09	1,66
Nº Brotos	< 0,01	0,09	0,01	9,29
MS PA (g)	0,01	0,38	0,09	0,026

LA = local de armazenamento; CS MS = concentração de sais do meio MS; 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 por explante; MS PA = massa seca da parte aérea; *5% de significância.

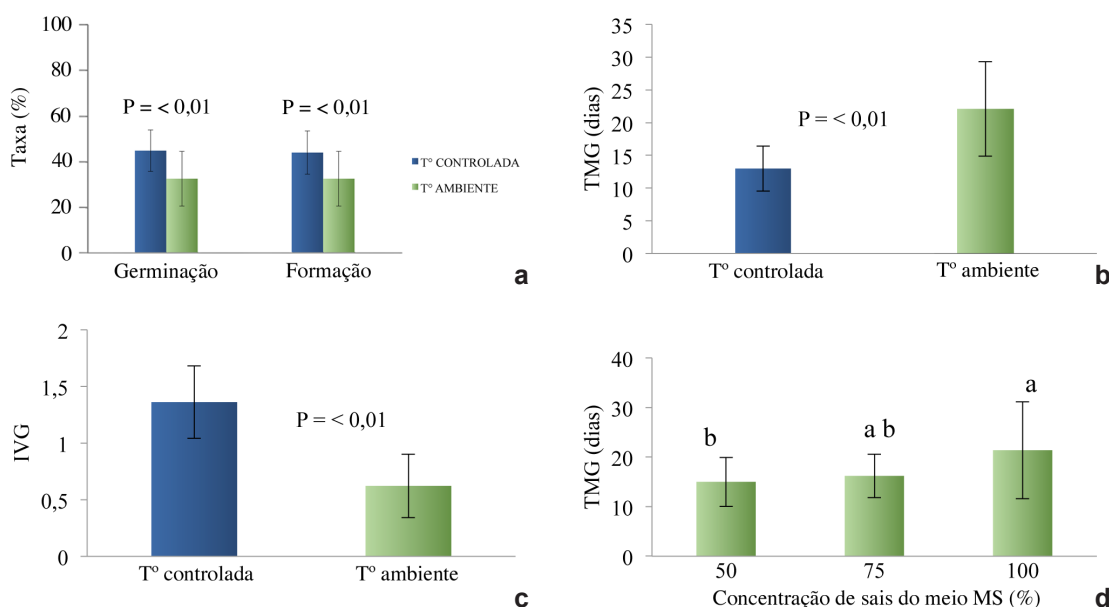


Figura 2 – a. Porcentagem de germinação e formação de plântulas; b. tempo médio de germinação (TMG); c. índice de velocidade de germinação (IVG) para diferentes locais de armazenamento; d. tempo médio de germinação (TMG) de sementes de *Angelonia integerrima* sob concentrações de sais do meio MS; médias seguidas por letras iguais não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Figure 2 – a. Percentage of germination and seedling formation; b. average germination time (TMG); c. germination speed index (IVG) for different storage locations; d. average germination time (TMG) of seeds of *Angelonia integerrima* under concentrations of salts of MS medium; averages followed by equal letters do not differ significantly by the Tukey test at 5% of error probability.

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 & Vilella 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 a dificuldade de coleta *in situ*, pois se conseguiu coletar poucas sementes, as quais foram suficientes somente para este trabalho.

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 (Kampf 2005) 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 a 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.

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 $\frac{1}{2}$, 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 polinização de angelônia é dependente de um agente biológico, visto que as sementes da casa de vegetação apresentaram valores muito inferiores de germinação quando comparado às sementes coletadas a campo, já que esta apresenta barreiras para a entrada de polinizadores (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 (Fig. 2d). A quantidade de sais presente no meio afetou negativamente o TMG, pois as sementes levaram mais tempo para germinarem, pois a salinidade, consequente da alta concentração de sais pode afetar a germinação das sementes, devido o excesso de sais solúveis, que 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 (Tab. 1). A concentração de BAP teve efeito significativo sobre a massa seca da parte aérea, já o ANA não influenciou significativamente as variáveis analisadas (Tab. 1). Na Figura 3 podemos visualizar a multiplicação para os diferentes tratamentos.



Figura 3 – Multiplicação *in vitro* de *Angelonia integerrima* para os diferentes tratamentos com BAP e ANA (experimento 2): T1: sem ANA e BAP, T2: 0,5 mg L⁻¹ BAP , T3: 1,0 mg L⁻¹ BAP, T4: 0,1 mg L⁻¹ ANA, T5: 0,1 mg L⁻¹ ANA e 0,5 mg L⁻¹ BAP, T6: 0,1 mg L⁻¹ ANA e 1,0 mg L⁻¹ BAP, T7: 0,5 mg L⁻¹ ANA, T8: 0,5 mg L⁻¹ ANA e 0,5 BAP mg L⁻¹ e T9: 0,5 mg L⁻¹ ANA e 1,0 mg L⁻¹ BAP.

Figure 3 – *In vitro* multiplication of *Angelonia integerrima* for the different treatments with BAP and NAA (experiment 2): T1: without NAA and BAP, T2: 0.5 mg L⁻¹ BAP , T3: 1.0 mg L⁻¹ BAP, T4: 0.1 mg L⁻¹ NAA, T5: 0.1 mg L⁻¹ NAA e 0.5 mg L⁻¹ BAP, T6: 0.1 mg L⁻¹ NAA e 1.0 mg L⁻¹ BAP, T7: 0.5 mg L⁻¹ NAA, T8: 0.5 mg L⁻¹ NAA e 0.5 BAP mg L⁻¹ e T9: 0.5 mg L⁻¹ NAA e 1.0 mg L⁻¹ BAP.

Para a principal variável, número de brotos, observa-se que a concentração de BAP de 0,5 mg L⁻¹ foi a que proporcionou maior efeito, já quando combinado com 0,1 ou 0,5 mg L⁻¹ ANA, a concentração que apresentou as maiores médias foi de 1,0 mg L⁻¹ de BAP (Tab. 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⁻¹ de BAP e 0,1 ou 0,5 mg L⁻¹ de ANA. Com o resultado obtido com a taxa de multiplicação nestas doses (Tab. 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.

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 *Mecardonia tenella* (Chamisso & Schlechtendal) Pennell, 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⁻¹ de BAP no meio de cultivo (Fig. 4).

Tabela 2 – Número de brotos por explante *in vitro* de *Angelonia integerrima* sob concentrações BAP (benzilaminopurina) e ANA (ácido naftalenoacético) (média ± desvio padrão).

Table 2 – Number of shoots per explant *in vitro* of *Angelonia integerrima* under BAP (benzylaminopurine) and NAA (naphthaleneacetic acid) concentrations (average ± standard deviation).

BAP	ANA		
	0 mg L ⁻¹	0,1 mg L ⁻¹	0,5 mg L ⁻¹
0 mg L ⁻¹	1,67 ± 0,48 c A*	2,38 ± 0,97 b A	2,16 ± 0,56 c A
0,5 mg L ⁻¹	13,72 ± 3,75 a A	10,17 ± 3,68 a A	11,84 ± 2,71 b A
1,0 mg L ⁻¹	9,05 ± 3,98 b B	15,17 ± 6,09 a A	17,47 ± 4,10 a A

BAP = benzilaminopurina; ANA = ácidonaftalenoacético; *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.

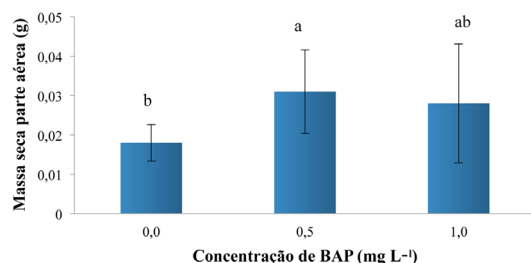


Figura 4 – Massa seca da parte aérea (g) de multiplicação *in vitro* de *Angelonia integerrima* sob concentrações de BAP (benziaminopurina); médias seguidas por letras iguais não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Figure 4 – Shoot dry mass (g) of *in vitro* multiplication of *Angelonia integerrima* under concentrations of BAP (benziaminopurine); averages followed by equal letters do not differ significantly by the Tukey test at 5% of error probability.

Experimento 3:

As variáveis comprimento de parte aérea e do sistema radicular não diferiram estatisticamente entre as diferentes concentrações de AIB (Tab. 3), já a porcentagem de calo e enraizamento apresentaram diferença entre os tratamentos e foi possível ajustar uma equação quadrática (Fig. 5a e

Fig. 5b). Através do cálculo do ponto de máxima, a concentração de 0,83 mg L⁻¹ de AIB foi a mais eficiente para que os explantes apresentem 84% de enraizamento (Fig. 5a e Fig. 6).

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 mesma responde à aplicação de auxina (Hartmann *et al.* 2002; Fachinello *et al.* 2005).

Na maior concentração pode-se verificar 100% de formação de calo (Fig. 5b), conforme já relatado por Lemos (2014), em algumas espécies, a presença de auxina no meio favorece o aparecimento de calos e a posterior formação

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).

Table 3 – Analysis of variance of *in vitro* rooting (experiment 3) and acclimatization (experiment 4) of *Angelonia integerrima* Sprengel under different concentrations of indolebutyric acid (IBA).

Variáveis Analisadas Experimento 3	AIB p valor	Média Geral
Comp. PA (cm)	0,07	2,26
Comp. SR (cm)	0,27	1,57
Raiz (%)	< 0,01*	66,8
Calo (%)	< 0,01*	79,6
Variáveis Analisadas Experimento 4	AIB p valor	Média Geral
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; 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.

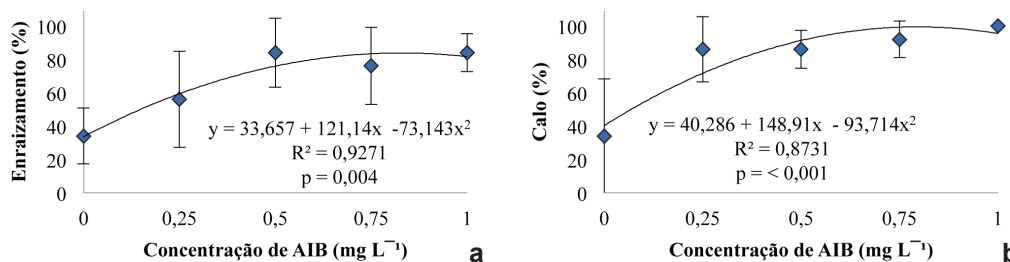


Figura 5 – a-b. Cultivo *in vitro* de *Angelonia integerrima* sob diferentes concentrações de ácido indolbútrico (AIB) – a. percentual de enraizamento; b. percentual de formação de calos.

Figure 5 – a-b. *In vitro* culture of *Angelonia integerrima* under different concentrations of indolebutyric acid (IBA) – a. percentage of rooting; b. percentage of callus formation.



Figura 6 – a-e. Enraizamento *in vitro* de *Angelonia integerrima* (experimento 3) – a. sem AIB; b. 0,25 mg L⁻¹; c. 0,50 mg L⁻¹; d. 0,75 mg L⁻¹; e. 1,0 mg L⁻¹ de AIB. Barras de escala = 1 cm.

Figure 6 – a-e. *In vitro* rooting of *Angelonia integerrima* (experiment 3) – a. without IBA; b. 0.25 mg L⁻¹; c. 0.50 mg L⁻¹; d. 0.75 mg L⁻¹; e. 1.0 mg L⁻¹ of IBA. Scale bars = 1 cm.

de raízes. É o que foi constatado na espécie em questão, pois o ponto de máxima é de $0,79 \text{ mg L}^{-1}$ de AIB, o que favorece 99% de formação de calos nos explantes.

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* (Fig. 7).

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), sendo que nesse processo aproximadamente metade das plantas não sobrevivem (Pompelli & Guerra 2005). 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*.

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* (Mart. ex DC.) Mattos, não foi verificado enraizamento em meio cultivado com BAP, já quando cultivada



Figura 7 – a-e. Aclimatização de *Angelonia integerrima* (experimento 4) – a. controle: sem AIB; b. T1: $0,25 \text{ mg L}^{-1}$; c. T2: $0,50 \text{ mg L}^{-1}$; d. T3: $0,75 \text{ mg L}^{-1}$; e. T4: $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de AIB. Barras de escala = 5 cm.

Figure 7 – a-e. Acclimatization of *Angelonia integerrima* (experiment 4) – a. control: without IBA; b. T1: 0.25 mg L^{-1} ; c. T2: 0.50 mg L^{-1} ; d. T3: 0.75 mg L^{-1} ; e. T4: 1.0 mg L^{-1} of IBA. Scale bars = 5 cm.

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* Bonpl. (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.

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

Agradecimentos

Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo de Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), o apoio financeiro, sem o qual não teria sido possível a realização deste estudo.

Referências

- Albuquerque MMS, Brito AL, Lima APPS, Alvim BFM & Santana JRF (2016) *In vitro* establishment of *Comanthera curralensis*, “sempre viva” native of Chapada Diamantina - Bahia. *Ciência Rural* 46: 991-995.
- Alderete LM, Mori M, Kato A & Salvio Escandón A (2006) Establishment of an *in vitro* micropropagation protocol for *Mecardonia tenella*. *Electronic Journal of Biotechnology* 9: 263-266.
- Assis TF & Teixeira SL (1998) Enraizamento de plantas lenhosas. *In: Torres AC, Caldas LS & Buso JA* (eds.) *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Vol. 1. Embrapa, Brasília. Pp. 261-296.
- Barroso CM, Delwing AB, Klein GN, Barros IBI & Franke LB (2007) 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* 13: 91-94.
- Boff S, Demarco D, Marchi P & Alves-dos-Santos I (2014) Perfume production in flowers of *Angelonia salicariifolia* attracts males of *Euglossa annectans* which do not promote pollination. *Apidologie* 46: 84-91.
- Burkart A (1979) Parte V: Dicotiledoneas Metaclamideas. *Flora Ilustrada de Entre Rios* (Argentina). INTA, Buenos Aires. 554p.
- Carvalho NM & Nakagawa J (2000) Maturação de sementes. *In: Carvalho NM & Nakagawa J* (eds.) *Sementes: ciência, tecnologia e produção*. 4ª ed. FUNEP, Jaboticabal. Pp. 98-127.
- Datta K & Datta SK (1984) Rapid clonal multiplication of *Angelonia salicariifolia* through tissue culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 3: 215-220.
- Debergh PC & Maene LJ (1981) A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Scientia Horticulturae* 14: 335-345.
- Fachinello JC, Hoffmann A & Nachtigal JC (2005) *Propagação de plantas frutíferas*. Embrapa, Brasília. 221p.
- Fior CS, Rodrigues LR, Nilson AD & Leonhardt C (2007) Aspectos da propagação de *Persea willdenovii* Kosterm. (Lauraceae). *Rodriguésia* 58: 27- 44.
- Grattapaglia D & Machado MA (1998) Micropropagação. *In: Torres AC, Caldas LS & Buso JA* (ed.) *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. 2v. Embrapa, Brasília. Pp.183-260.
- Hartmann HT, Kester DE, Davies FT & Geneve RL (2002) *Plant propagation: principles and practices*. 7ª ed. Englewood Clippis, New York. 896p.
- Hossel JSAO, Hossel C, Júnior AW, Fabiane KC & Citadin I (2016) Viabilidade de sementes de guabijuzeiro em armazenamento. *Applied Research & Agrotechnology* 9: 79-85.
- Kampf AN (2005) *Produção comercial de plantas ornamentais*. Agrolivros, Guaíba. 256p.
- Labbé LMB & Villela FA (2012) Armazenamento de sementes. *In: Peske ST, Villela FA & Meneguello GE* (eds.) *Sementes: fundamentos científicos e tecnológicos*. 3ª ed. rev. e ampl. Ed. Universitária/UFPEL, Pelotas. Pp.481-528.
- Lemos EEP (2014) Organogênese. *In: Cid LPB* (ed.) *Cultivo in vitro de plantas*. 3ª ed. ampl. Embrapa, Brasília. 325p.
- Lima MGS, Lopes NF, Moraes DM & Abreu CM (2005) Qualidade fisiológica de sementes de arroz submetidas a estresse salino. *Revista Brasileira de Sementes* 27: 54-61.
- Lopes JC, Dias PC & Pereira MD (2005) Maturação fisiológica de sementes de quaresmeira. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 40: 811-816.
- Mantovani N, Grandio MF, Suzin M, Augustin L &

- Calvete EO (2008) Micropropagação de plantas ornamentais. In: Petry C (org.) Plantas ornamentais - aspectos para a produção. 2ª ed. Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo. Pp.70-91.
- Marino C, Ponce MT, Videla ME, Fioretti S & Cirrincione M (2003) Micropropagation of *Glandularia perakii* Cov. et Schn. (Verbenaceae): a native species with ornamental potential. *Biocell* 27: 57-60.
- Martins L, Lago AA & Cicero SM (2012) Conservação de sementes de ipê-roxo. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* 16: 108-112.
- Moura GCM, Júnior AW, Zanella J, Mazaro SM, Otalakoski G & Lima LP (2015) Método de armazenamento de sementes de gaiabeira paluma. *Agrarian Academy*. Centro Científico Conhecer, Goiânia 2: 51-59.
- Murashige T & Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Nunes SCP, Nunes UR, Fonseca PG, Graziotti PH, Pego RG & Marra LM (2008) Época, local de colheita e armazenamento na qualidade fisiológica da semente de sempre-viva (*Syngonanthus elegans* (Bong.) Ruhland - Eriocaulaceae). *Revista Brasileira de Sementes* 30: 32-39.
- Pêgo RG, Paiva PDO & Paiva R (2014) Micropropagation protocol for *Syngonanthus elegans* (Bong.) Ruhland: an ornamental species. *Acta Scientiarum*. Agronomy 36: 347-353.
- Pereira MO, Navroski MC & Reiniger LRS (2015) Multiplicação *in vitro* de ipê-amarelo (*Handroanthus chrysotrichus*). *Nativa* 3: 59-63.
- Pompelli MF & Guerra MP (2005) Enraizamento *in vitro* e *ex vitro* de *Dyckia distachya* Hassler, sob diferentes concentrações de AIB. *Floresta & Ambiente* 12: 42-49.
- Rodrigues PHV, Gato AMG, Dutra MFB & Pereira JO (2013) Micropropagação de Helicônia. In: Junghans TG & Souza AS (eds.) Aspectos práticos da micropropagação de plantas. 2ª ed. rev. e ampl. Embrapa, Brasília. Pp.309-344.
- Santana DG & Ranal MA (2004) Análise da germinação: um enfoque estatístico. Editora da Universidade de Brasília, Brasília. 247p.
- Segeren MI (2011) Micropropagação *in vitro* de flores e plantas ornamentais. In: Gerald LTS (org.) Biofábrica de plantas: produção industrial de plantas *in vitro*. Antiqua, São Paulo. Pp. 134-147.
- Silva CG, Debiase C & Pescador R (2007) Enraizamento *in vitro* e aclimatização de mudas micropropagadas de *Aloe vera* L. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 9: 29-35.
- Souza AV & Pereira AMS (2007) Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 9: 103-117.
- Souza FVDS, Souza AS, Santos-Serejo JA, Souza EH, Junghans TG & Silva MJ (2013) Micropropagação do Abacaxizeiro e outras Bromeliáceas. In: Junghans TG & Souza AS (eds.) Aspectos práticos da micropropagação de plantas. 2ª ed. rev. e ampl. Embrapa, Brasília. 407p.
- Stumpf ERT, Barbieri RL & Heiden G (2009) Cores e formas no Bioma Pampa: plantas ornamentais nativas. Embrapa Clima Temperado, Pelotas. 276p.
- Unemoto LK, Faria RT, Meneguete B & Assis AM (2006) Estabelecimento de um protocolo para a propagação *in vitro* de rainha-do-abismo, *Sinningia leucotricha* (Hoehne) Moore- (Gesneriaceae). *Acta Scientiarum*. Agronomy 28: 503-506.
- Winhelmann MC, Tedesco M, Fior CS & Schafer G (2016) Germinação de sementes de *Angelonia integerrima* Sprengel sob diferentes temperaturas. *Revista da Jornada de Pós-Graduação e Pesquisa-Congrega Urcamp* 1: 1-10.
- Zonta JB, Araujo EF, Araujo RF, Zonta JH, Dias LAS & Ribeiro PH (2014) Armazenamento de sementes de pinhão manso em diferentes embalagens e ambientes. *Bioscience Journal* 30: 599-608.