



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Botânica
Programa de Pós-Graduação em Botânica

**ESTRATÉGIAS DE PROPAGAÇÃO PARA ESPÉCIES
SUBARBUSTIVAS DE ACANTHACEAE JUSS. COM
POTENCIAL ORNAMENTAL**

Mayara Rodrigues Lima

Brasília, DF

2012



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Botânica
Programa de Pós-Graduação em Botânica

Estratégias de propagação para espécies subarbustivas de Acanthaceae Juss. com potencial ornamental

Mayara Rodrigues Lima

Orientadora: Conceição Eneida dos Santos Silveira

Dissertação apresentada ao Departamento de
Botânica, Instituto de Ciências Biológicas,
Universidade de Brasília, como parte dos
requisitos necessários à obtenção do título de
Mestre em Botânica.

Brasília, DF
Junho de 2012

Membros da banca examinadora:

Dr^a. Conceição Eneida dos Santos Silveira
Departamento de Botânica/UnB
Presidente

Dr. Jonny Everson Scherwinski Pereira
Centro de Recursos Genéticos e Biotecnologia/Embrapa
Membro titular

Dr. Wagner Campos Otoni
Departamento de Biologia Vegetal/UFV
Membro titular

Dr^a. Sueli Maria Gomes
Departamento de Botânica/UnB
Suplente

AGRADECIMENTOS

A Deus, que é princípio e fim de tudo. Por me dar a graça da saúde, perseverança e inteligência para realizar todas as coisas na minha vida.

À minha mãe Lourdes, meu pai Paulo, minha irmã Talita, meu irmão Fábio, minha cunhada Luciane e minha sobrinha Pietra, por me apoiarem sempre durante todo o curso com compreensão e com palavras de ânimo, além de atos concretos como me ajudar nas coletas de campo.

À professora Eneida, minha orientadora, que me deu a oportunidade de conhecer a Cultura de Tecidos Vegetais e de desenvolver este trabalho, além dos ensinamentos e carinho para comigo.

Aos amigos que fiz durante o curso, Bruno, Raíssa, Izabely, Eliana, Daniel, Alan, Renata, Tatiana, Estevão, que me ajudaram nas saídas de campo, no laboratório e compartilharam comigo momentos de alegria e dificuldade.

Aos estagiários Douglas e Mateus pela colaboração nas coletas e atividades de laboratório.

À UnB e aos professores do Mestrado em Botânica, meu reconhecimento.

Aos técnicos Fábio, Jéssica, Daiane e Mendes pela amizade e por me ajudarem algumas vezes na preparação de meio, repicagem, coletas ou nos cortes anatômicos.

Aos amigos Vanessa Lara, Suzana Almeida, Rodrigo Felippes, Rafael Taniguchi, Luiz Gontijo, Gabrielle Sapucaia, toda a Trupe de Frassati e muitos outros pelo companheirismo.

Aos jardineiros Antônio e Florisvaldo, pela ajuda e amizade.

Ao Leonardo Aguirre, pela revisão da análise estatística.

Ao André Bertran, por ceder a propriedade Memorial das Idades do Brasil para a realização do estudo.

Às instituições CNPq e, posteriormente, CAPES pela concessão da bolsa de estudos durante a realização do trabalho.

A todos que de alguma forma colaboraram para o sucesso desse trabalho.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE TABELAS.....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
ABREVIACÕES.....	viii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Floricultura.....	3
2.1.2 O uso de espécies nativas.....	7
2.2 Acanthaceae Juss.	10
2.2.1 <i>Ruellia</i> L.	11
2.2.1.1 <i>Ruellia nitens</i> (Nees) Wassh.	13
2.2.1.2 <i>Ruellia incompta</i> (Nees) Lindau.	15
2.2.2 <i>Justicia</i> L.	17
2.2.2.1 <i>Justicia lanstykii</i> Rizz.	18
2.3 Propagação.....	19
2.3.1 Sementes.....	19
2.3.2 Micropropagação.....	21
2.3.3 Estaquia.....	23
3. OBJETIVOS	24
3.1 Objetivo geral.....	24
3.2 Objetivos específicos.....	24
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
CAPÍTULO I - Germinação <i>in vitro</i> e micropropagação de <i>Justicia lanstykii</i> Rizz., <i>Ruellia nitens</i> (Nees) Wassh. e <i>Ruellia incompta</i> (Nees) Lindau.	36
RESUMO	37
ABSTRACT	38
1. INTRODUÇÃO	39
2. MATERIAL E MÉTODOS	41
2.1 Origem e coleta dos explantes.....	41

2.2	Biometria de sementes.....	42
2.3	Desinfestação das sementes, germinação e desenvolvimento da plântula <i>in vitro</i>	43
2.4	Micropropagação de explantes provenientes de matrizes adultas.....	44
2.5	Enraizamento dos brotos.....	46
2.6	Estudo anatômico.....	45
3.	RESULTADOS	47
3.1	Biometria das sementes.....	47
3.2	Desinfestação das sementes, germinação e desenvolvimento da plântula <i>in vitro</i>	49
3.3	Micropropagação de brotos provenientes de matrizes adultas.....	63
4.	DISCUSSÃO	72
5.	CONCLUSÕES	83
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
7.	ANEXOS	92

CAPÍTULO II – Estaquia de <i>Justicia lanstyakii</i> Rizz., <i>Ruellia nitens</i> (Nees) Wassh. e <i>Ruellia incompta</i> (Nees) Lindau.		104
	RESUMO	105
	ABSTRACT	106
1.	INTRODUÇÃO	107
2.	MATERIAL E MÉTODOS	109
	2.1 Origem e coleta das estacas.....	109
	2.2 Tratamentos.....	110
	2.3 Estudo anatômico.....	111
3.	RESULTADOS	112
4.	DISCUSSÃO	130
5.	CONCLUSÕES	134
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	135
7.	ANEXOS	139

ÍNDICE DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1. Principais flores e plantas ornamentais consumidas no Brasil, em 2003...	7
Tabela 2. Gêneros plantados nos canteiros públicos de Brasília.....	10

CAPÍTULO I

Tabela 1. Material coletado, número de matrizes (N°), local de coleta, coordenada geográfica e fitofisionomia do local das espécies <i>Justicia lansyakii</i> Rizz., <i>Ruellia nitens</i> (Nees) Wassh. e <i>Ruellia incompta</i> (Nees) Lindau.....	42
Tabela 2. Biometria das sementes de <i>Justicia lansyakii</i> Rizz., <i>Ruellia nitens</i> (Nees) Wassh. e <i>Ruellia incompta</i> (Nees) Lindau.....	47
Tabela 3. Porcentagens de contaminação, germinação, tempo médio de germinação (TMG) de sementes de <i>Justicia lansyakii</i> Rizz., inoculadas em ágar-água, em relação ao tempo de exposição ao hipoclorito de sódio, aos 30 dias de cultivo.....	50
Tabela 4. Porcentagem de plântulas normais e médias do comprimento da parte aérea e raiz principal de sementes de <i>Justicia lansyakii</i> Rizz., inoculadas em ágar, em relação ao tempo de exposição ao hipoclorito de sódio, aos 30 dias de cultivo...	50
Tabela 5. Porcentagem de descontaminação de sementes de <i>Ruellia nitens</i> (Nees) Wassh., cultivadas em MS 100%, MS 50% e ágar-água, em relação ao tempo de exposição ao hipoclorito de sódio, aos 30 dias de cultivo.....	52
Tabela 6. Efeito do tempo de imersão no hipoclorito de sódio e do meio de cultura na porcentagem de germinação de <i>Ruellia nitens</i> (Nees) Wassh., aos 30 dias de cultivo.....	52
Tabela 7. Efeito do tempo de imersão em hipoclorito de sódio no tempo médio de germinação de sementes de <i>Ruellia nitens</i> (Nees) Wassh., cultivadas em ágar-água, MS 100% e MS 50%.....	54
Tabela 8. Efeito do meio de cultura e dos dias de cultivo sobre a média do comprimento da parte aérea de <i>Ruellia nitens</i> (Nees) Wassh., cujas sementes foram imersas em hipoclorito de sódio (NaClO).....	55
Tabela 9. Efeito do meio de cultura na média do comprimento da raiz de plântulas <i>in vitro</i> de <i>Ruellia nitens</i> (Nees) Wassh.	55

Tabela 10. Efeito do tempo de hipoclorito e meio de cultura na porcentagem de plântulas normais de <i>Ruellia nitens</i> (Nees) Wassh.....	56
Tabela 11. Efeito do meio de cultura e do tempo de imersão em hipoclorito de sódio (NaClO) na porcentagem de descontaminação para sementes de <i>Ruellia incompta</i> (Nees) Lindau, aos 30 dias de cultivo.....	57
Tabela 12. Efeito do meio de cultura e tempo de imersão em hipoclorito de sódio (NaClO) na porcentagem de germinação e no tempo médio de germinação para sementes de <i>Ruellia incompta</i> (Nees) Lindau., aos 30 dias de cultivo.....	58
Tabela 13. Efeito do meio de cultura e tempo de imersão em hipoclorito de sódio (NaClO) na média do comprimento da parte aérea e da raiz de <i>Ruellia incompta</i> (Nees) Lindau, durante dois subcultivos.....	60
Tabela 14. Efeito do meio de cultura e tempo de imersão em hipoclorito de sódio (NaClO) na média do comprimento da raiz de <i>Ruellia incompta</i> (Nees) Lindau, durante dois subcultivos.....	60
Tabela 15. Efeito do tempo de imersão em hipoclorito de sódio (NaClO) na porcentagem de plântulas normais de <i>Ruellia incompta</i> (Nees) Lindau, cultivadas por dois subcultivos em ágar-água, MS 100% e MS 50%.....	61
Tabela 16. Efeito do meio de cultura na porcentagem de oxidação da plântula de <i>Ruellia incompta</i> (Nees) Lindau.....	61
Tabela 17. Efeito do meio de cultura e do tempo de imersão em hipoclorito na porcentagem de formação de lenticelas nas raízes das plântulas de <i>Ruellia incompta</i> (Nees) Lindau.....	62
Tabela 18. Efeito do tipo de hipoclorito e tempo de imersão na porcentagem de contaminação de brotos de matrizes adultas de <i>Justicia lanstykii</i> Rizz., cultivados em meio MS com 0,0; 0,01 e 0,1 mg.L ⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP), aos 30 dias de cultivo.....	63
Tabela 19. Efeito do tipo de hipoclorito e tempo de imersão, na porcentagem de sobrevivência de brotos de matrizes adultas de <i>Justicia lanstykii</i> Rizz., cultivados em meio MS com 0,0; 0,01 e 0,1 mg.L ⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP), aos 30 dias de cultivo.....	64
Tabela 20. Efeito do subcultivo na média do número de segmentos nodais produzidos em cada subcultivo. Os explantes foram retirados de matrizes adultas de <i>Justicia lanstykii</i> Rizz. e cultivados em meio MS e 0,0; 0,01; 0,1 mg.L ⁻¹ de 6-	

benzilaminopurina (BAP).....	64
Tabela 21. Efeito das concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) na porcentagem de explantes com calo na base, provenientes matrizes adultas de <i>Justicia lanstykii</i> Rizz., cultivados em meio MS.....	65
Tabela 22. Efeito das concentrações de ácido indolbutírico (AIB) na porcentagem de enraizamento <i>in vitro</i> de brotos de <i>Justicia lanstykii</i> Rizz., cultivados em meio MS, aos 30 dias de cultivo.....	66
Tabela 23. Efeito das concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) e subcultivo na porcentagem de brotos com raiz durante a fase de multiplicação de <i>Justicia lanstykii</i> Rizz., cultivados em meio MS, em dois subcultivos sucessivos de 30 dias.....	68
Tabela 24. Efeito do tipo de hipoclorito e tempo de imersão na porcentagem de descontaminação de brotos de <i>Ruellia nitens</i> (Nees) Wassh., cultivados em meio MS, aos 30 dias de cultivo.....	68
Tabela 25. Efeito do tipo de hipoclorito e tempo de imersão na porcentagem de sobrevivência de brotos de <i>Ruellia nitens</i> (Nees) Wassh., cultivados em meio MS, aos 30 dias de cultivo.....	69
Tabela 26. Efeito do subcultivo em relação ao número de segmentos nodais novos formados de <i>Ruellia nitens</i> (Nees) Wassh., cultivados em meio MS e três concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP).....	69
Tabela 27. Efeito das concentrações de ácido indolbutírico (AIB) no enraizamento de <i>Ruellia nitens</i> (Nees) Wassh., cultivados em meio MS, aos 60 dias de cultivo.....	70
Tabela 28. Efeito do tempo de imersão no hipoclorito de sódio e cálcio na porcentagem de descontaminação de brotos de <i>Ruellia incompta</i> (Nees) Lindau., cultivados em meio MS, aos 30 dias de cultivo.....	71
Tabela 29. Efeito do tipo de hipoclorito na porcentagem de sobrevivência de brotos de <i>Ruellia incompta</i> (Nees) Lindau, cultivados em meio MS e desinfestados em 15, 30 e 60 min de hipoclorito, aos 30 dias de cultivo.....	71

CAPÍTULO II

Tabela 1. Efeito da época de coleta, das concentrações de ácido indolbutírico (AIB) e do substrato sobre a porcentagem de enraizamento, porcentagem de calo, média do número de raízes e média do comprimento da maior raiz de ramos de

<i>Justicia lanstykii</i> Rizz., aos 60 dias de cultivo.....	114
Tabela 2. Efeito da época de coleta e concentrações de ácido indolbutírico (AIB) sobre o número de raízes em estacas de <i>Justicia lanstykii</i> Rizz. cultivadas em dois substratos, aos 60 dias de cultivo.....	114
Tabela 3. Efeito das concentrações de ácido indolbutírico (AIB) e do substrato sobre a porcentagem de brotação, sobrevivência e média do número de nós de estacas de dezembro e setembro de <i>Justicia lanstykii</i> Rizz. aos 60 dias de cultivo.....	116
Tabela 4. Efeito da época de coleta, das concentrações de ácido indolbutírico (AIB) e do substrato sobre a porcentagem de enraizamento, porcentagem de calo e média do número de raízes e média do comprimento da maior raiz em <i>Ruellia nitens</i> (Nees) Wassh., aos 60 dias de cultivo.....	119
Tabela 5. Efeito da época de coleta e do substrato sobre a porcentagem de enraizamento de <i>Ruellia nitens</i> (Nees) Wassh. aos 60 dias de cultivo.....	120
Tabela 6. Efeito da época de coleta e das concentrações de ácido indolbutírico (AIB) no número de raízes em estacas de <i>Ruellia nitens</i> (Nees) Wassh., cultivadas em dois substratos, aos 60 dias de cultivo.....	120
Tabela 7. Efeito do substrato sobre a média do comprimento da maior raiz em estacas de dezembro e setembro de <i>Ruellia nitens</i> (Nees) Wassh., cultivadas em quatro concentrações de ácido indolbutírico (AIB), aos 60 dias de cultivo.....	120
Tabela 8. Efeito da época de coleta, das concentrações de ácido indolbutírico (AIB) e do substrato sobre a porcentagem de brotação, porcentagem de sobrevivência e média do número de nós de estacas de <i>Ruellia nitens</i> (Nees) Wassh., aos 60 dias de cultivo.....	122
Tabela 9. Efeito da época de coleta e do substrato sobre a porcentagem de brotação de estacas de <i>Ruellia nitens</i> (Nees) Wassh., aos 60 dias de cultivo.....	122
Tabela 10. Efeito do substrato e concentrações de ácido indolbutírico (AIB) sobre a média do número de nós de estacas de dezembro e de setembro de <i>Ruellia nitens</i> (Nees) Wassh. aos 60 dias de cultivo.....	123
Tabela 11. Efeito das concentrações de ácido indolbutírico (AIB) sobre a porcentagem de sobrevivência de estacas de dezembro e setembro de <i>Ruellia nitens</i> (Nees) Wassh., cultivadas em vermiculita em areia, aos 60 dias de cultivo....	123
Tabela 12. Efeito da época de coleta e substrato sobre a porcentagem de	

sobrevivência de estacas de <i>Ruellia nitens</i> (Nees) Wassh., cultivadas com 0, 1000, 2000 e 4000 ppm de ácido indolbutírico (AIB), aos 60 dias de cultivo.....	123
Tabela 13. Efeito da época de coleta, das concentrações de ácido indolbutírico (AIB) e do substrato sobre a porcentagem de enraizamento, porcentagem de sobrevivência, de estacas de <i>Ruellia incompata</i> (Nees) Lindau, aos 60 dias de cultivo.....	126
Tabela 14. Efeito da época de coleta, das concentrações de ácido indolbutírico (AIB) e do substrato sobre a média do número de raízes e média do comprimento da maior raiz de estacas de <i>Ruellia incompata</i> (Nees) Lindau, aos 60 dias de cultivo	127
Tabela 15. Efeito da época de coleta, das concentrações de ácido indolbutírico (AIB) e do substrato sobre a porcentagem de brotação, de calo e média do número de nós de estacas de ramos herbáceos de <i>Ruellia incompata</i> (Nees) Lindau, aos 60 dias de cultivo.....	128

ÍNDICE DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1. Distribuição percentual da área cultivada no Brasil por categoria.....	4
Figura 2. <i>Ruellia nitens</i> (Nees) Wassh. A. Hábito. B. Detalhe da flor. C. Ramos com flores. D. Rebrotas (seta) E. Frutos imaturos (seta).....	14
Figura 3. <i>Ruellia incompata</i> (Nees) Lindau A. Indivíduo no Campo sujo. B. Detalhe da inflorescência. C. Detalhe do fruto verde. D. Detalhe da flor.....	16
Figura 4. <i>Justicia lanstykii</i> Rizz. A. Indivíduo no Cerrado <i>stricto sensu</i> . B. Inflorescência C. Detalhe da inflorescência.....	18

CAPÍTULO I

Figura 1. Frutos e sementes de <i>Justicia lanstykii</i> Rizz, <i>Ruellia nitens</i> (Nees) Wassh. e <i>Ruellia incompata</i> (Nees) Lindau.	48
Figura 2. Germinação e desenvolvimento de plântulas de <i>Justicia lanstykii</i> Rizz. <i>in vitro</i>	51
Figura 3. Germinação e desenvolvimento de plântulas de <i>Ruellia nitens</i> (Nees)	

Wassh.	53
Figura 4. Germinação e desenvolvimento de plântulas de <i>Ruellia incompta</i> (Nees) Lindau.....	59
Figura 5. Micropropagação de brotos provenientes de plantas adultas de <i>Justicia lanstyakii</i> Rizz.	67
Figura 6. Multiplicação de brotos provenientes de plantas adultas de <i>Ruellia nitens</i> (Nees) Wassh.	70

CAPÍTULO II

Figura 1. Estaquia de ramos apicais de <i>Justicia lanstyakii</i> Rizz.	117
Figura 2. Estaquia de ramos apicais de <i>Ruellia nitens</i> (Nees) Wassh.	124
Figura 3. Estaquia de ramos apicais de <i>Ruellia incompta</i> (Nees) Lindau.....	129

ABREVIACÕES

AIB	Ácido indolbutírico
Anova	Análise de variância
BAP	6-benzilaminopurina
MS	Meio de cultura formulado por Murashige e Skoog (1962)
ppm	Partes por milhão
CV	Coeficiente de variação

RESUMO

O Cerrado apresenta grande diversidade vegetal e múltiplos potenciais de uso, inclusive o ornamental. O emprego de espécies nativas no mercado regional de plantas ornamentais pode tornar esse mercado mais competitivo, pois as espécies são adaptadas ao ambiente do Cerrado, reduzindo os custos de produção e manutenção. Além disso, a propagação de espécies nativas é uma forma de conservação desse bioma, que tem sofrido redução da biodiversidade em função de vários fatores, tais como a agricultura, mineração e invasão de exóticas. No entanto, conhecimento sobre propagação de espécies nativas do estrato herbáceo-arbustivo do Cerrado ainda é escasso. Uma técnica vantajosa para o cultivo dessas mudas é a cultura *in vitro*, que possibilita a produção de grande quantidade de plantas de alta qualidade fitossanitária e em qualquer época do ano. Já a estaquia é uma das técnicas mais tradicionais e de menor custo para produção de mudas. O objetivo do trabalho foi o de verificar o potencial germinativo *in vitro*, a micropropagação e o enraizamento de estacas de *Justicia lanstykii*, *Ruellia nitens* e *Ruellia incompta*. Para a germinação *in vitro*, sementes foram desinfestadas com etanol 70% por 1 min, hipoclorito de sódio comercial (NaClO), 2 a 2,5% de cloro ativo, por 5, 15 e 30 min e inoculadas em ágar-água, MS 50% e MS 100%, todos sem sacarose. Na micropropagação, brotos coletados de matrizes adultas foram imersos em fungicida (Carbendazim) por 60 min, etanol 70% por 1 min e testou-se dois tipos de solução comercial de hipoclorito: cálcio (Ca(ClO)₂) e sódio (NaClO), por 15, 30 e 60 min. Os brotos foram inoculados em meio MS, com 0,0; 0,01; 0,1 mg.L⁻¹ de BAP por dois subcultivos. No enraizamento *in vitro*, os brotos foram inoculados em meio MS com 0,0 e 0,01 mg.L⁻¹ de AIB. Para a estaquia, foram coletadas estacas apicais de cerca de 10 cm em setembro (estação seca) e dezembro (estação chuvosa) de 2011. As estacas foram dispostas em dois substratos (areia e vermiculita) e quatro concentrações de AIB, em talco, (0, 1000, 2000 e 4000 ppm). Sementes de *J. lanstykii* foram 100% descontaminadas e germinadas nos três tempos de imersão; mas 15 min (3,8 dias) e 30 min (3,6 dias) reduziram o tempo médio de germinação (TMG). Sementes de *R. nitens* tiveram acima de 50% de descontaminação e maior germinação em 15 min de exposição ao hipoclorito (88,9%) e MS 50% (90,3%). O TMG foi retardado pelo hipoclorito por 30 min (5,1 dias). O comprimento de parte aérea e raiz foram maiores em MS 50%. Sementes de *R. incompta* foram descontaminadas e germinadas acima de 90%. O comprimento de parte aérea e raiz não diferiram entre os tratamentos. Na micropropagação, o hipoclorito de cálcio por 30 min é mais indicado para a desinfestação de brotos de *J. lanstykii* e *R. nitens* pois propiciou maior sobrevivência, mas em *R. incompta* o protocolo apresentou menor descontaminação (40,5%). As concentrações de BAP não diferiram no número de segmentos nodais das espécies, mas o segundo subcultivo apresentou maior média do número de nós em *J. lanstykii* (2,5 nós). Sucedeu enraizamento em *J. lanstykii*, tanto em 0,0 (60%) quanto 0,01 mg.L⁻¹ de AIB (40%), mas não ocorreu em *R. nitens*. As estacas das três espécies coletadas em dezembro tiveram melhores resultados (p<0,05) do que estacas coletadas em setembro em todas as variáveis, exceto em sobrevivência, cujas porcentagens foram semelhantes. O enraizamento das estacas de dezembro ficou em cerca de 94% em *J. lanstykii* e 70% em *R. nitens*. Os tratamentos com 1000 ppm (6,2 raízes) e 4000 ppm (7,1 raízes) de AIB elevaram significativamente o número de raízes de *J. lanstykii*. A concentração 1000 ppm de AIB elevou o enraizamento e número de raízes de *R. nitens* (3,7 raízes) em relação ao controle e 4000 ppm. Em *R. incompta*, o substrato vermiculita produziu melhores resultados de enraizamento (76,0%) e número de raízes (3,0 raízes), mas menor sobrevivência (35,8%). Os resultados evidenciam que a reprodução das plantas de espécies ornamentais não domesticadas de *Justicia* e *Ruellia*, através de cultura *in vitro* e estaquia, apresenta eficiência elevada.

Palavras-chave: Cerrado, germinação *in vitro*, micropropagação, estaquia, ornamental

ABSTRACT

The Cerrado presents great diversity of vegetation and multiple potential uses, including the ornamental one. The use of native species in the regional market of ornamental plants can make it more competitive, because the species are adapted to the savanna environment, reducing production costs and maintenance. Furthermore, the propagation of native species is a form of conservation this biome, which has suffered a reduction of biodiversity due to several factors, such as agriculture, mining and invasion of exotic species. However, knowledge about propagation of native species of herbaceous and shrubs from Cerrado is still scarce. A technique for production of seedlings is the *in vitro* culture, which allows the production of large quantities of high quality plants at any time of the year. Cutting is one of the most traditional and low cost technique for production of seedlings. The objective of this study was to determine the *in vitro* germination potential, micropropagation and rooting of *Justicia lanstyakii*, *Ruellia nitens* and *Ruellia incompta*. Seeds were sterilized with 70% ethanol for 1 min, commercial sodium hypochlorite (NaClO), 2 to 2.5% active chlorine for 5, 15 and 30 minutes and inoculated into agar-water, 50% MS and MS 100% , all without sucrose. In micropropagation, shoots collected from mature matrices were immersed in fungicide (Carbendazim) for 60 min, 70% ethanol for 1 min and tested for two types of commercial hypochlorite solution, calcium (Ca (ClO)₂), and sodium (NaClO) for 15, 30 and 60 min. At the multiplication phase, the shoots were inoculated on MS medium with 0.0, 0.01, 0.1 mg.L⁻¹ BAP for two subcultures. During rooting, the shoots were inoculated on MS medium with 0.0 and 0.01 mg.L⁻¹ IBA. For cuttings, apical cuttings were collected from 10 cm in September (woody cuts) and December (herbaceous cuts) of 2011. The cuttings were arranged in two substrates (sand and vermiculite) and four concentrations of IBA in talc, (0, 1000, 2000 and 4000 ppm). Seeds *J. lanstyakii* were 100% decontaminated and germinated in the three immersion times, but 15 min (3.8 days) and 30 min (3.6 days) reduced the mean germination time (MGT). Seeds of *R. nitens* above had 50.0% higher for the decontamination and germination by 15 min of exposure to hypochlorite (88.9%) and 50% MS (90.3%). The MGT was delayed by hypochlorite for 30 min (5.1 days). The length of shoot and root were higher in MS 50%. Seeds of *R. incompta* decontaminated were germinated and above 90%. The length of shoot and root did not differ between treatments. In micropropagation, sodium hypochlorite over 30 min was most suitable for the disinfection of sprouts *J. lanstyakii*, *R. nitens* because it gave better survival. But *R. incompta* decontamination protocol had the lowest (40.5%). The BAP concentrations did not differ in the number of nodes of the species, but the second subculture had a higher average number of nodes in *J. lanstyakii* (2.5 nodes). Rooting was found in *J. lanstyakii* both to 0.0 (60%) and 0.01 mg L⁻¹ IBA (40%), but not found in *R. nitens*. Cuttings of three species, collected in December, had better results ($p < 0.05$) than cuttings collected in September in all variables, except survival, whose percentages were similar. The rooting of December stood at around 94.0% in *J. lanstyakii* and 70.0% in *R. nitens*. The treatments with 1000 ppm (6.2 roots) and 4000 ppm (7.1 roots) of IBA significantly increased the number of roots in *J. lanstyakii*. The concentration of 1000 ppm increased the number of IBA roots in *R. nitens* (3.7 roots) against control and 4000 ppm. In *R. incompta*, vermiculite produced the best results of rooting (76.0%) and number of roots (3.0 roots), but lower survival (35.8%). The results show that the reproduction of plants for ornamental domesticated *Justicia* and *Ruellia* species, through *in vitro* culture and cuttings, has high efficiency.

Keywords: Cerrado, *in vitro* germination, micropropagation, cutting, ornamental

1. INTRODUÇÃO GERAL

A vegetação do Cerrado possui expressiva riqueza de plantas, que pode ser aproveitada para os mais diversos fins, tais como, alimentação, aromatização, formulação de corantes, produção de cortiça, tanino, óleos e gorduras, mel, substâncias terapêuticas, artesanato e para ornamentação (Pereira 1996; Vieira *et al.* 2006; Pinho *et al.* 2012).

O bioma Cerrado é dotado de grande potencial ornamental, pois as espécies oferecem diversas variedades de formas, texturas e cores das flores, assim como diferentes hábitos (ervas, lianas, arbustos, subarbustos e árvores), que podem ser explorados de diferentes maneiras pelo paisagismo (Mello Filho 1988; Junqueira *et al.* 2002). Neste contexto, pode-se citar as famílias Acanthaceae Juss., Bignoniaceae Juss., Combretaceae R. Br., Convolvulaceae Juss. e Malpighiaceae Juss. (Mendonça *et al.* 2008; Ramalho & Proença 2004).

Acanthaceae possui 165 espécies presentes no Cerrado (Mendonça *et al.* 2008) e destaca-se por apresentar vários gêneros ornamentais já utilizados pela floricultura mundial, como *Acanthus* L., *Aphelandra* R. Br., *Fittonia* Coem., *Justicia* L., *Pachystachys* Nees, *Ruellia* L. e *Thunbergia* Retz. (Guimarães *et al.* 2009). *Ruellia* e *Justicia*, ambos de distribuição pantropical, são gêneros expressivos em termos de número de espécies, apresentando cerca de 250 e 600 espécies, respectivamente (Wasshausen & Wood 2004; Graham 1988). As flores de *Ruellia* são apreciadas, pois são grandes, vistosas e coloridas. Em *Justicia*, além das flores belas e delicadas, algumas espécies possuem inflorescências com brácteas chamativas como em *Justicia brandegeana* Wassh. & L.B.Sm., camarão-vermelho (Ezcurra 1993; Graham 1988).

Embora haja essa diversidade e interesse ornamental, as espécies nativas de *Ruellia* e *Justicia* do Cerrado ainda não são empregadas, devido à falta de conhecimento sobre os métodos mais adequados para sua propagação sexuada e assexuada. De acordo com a literatura, *Ruellia* produz entre quatro e dez sementes e *Justicia*, no máximo quatro sementes (Barroso *et al.* 1999). Esses números, considerados reduzidos em relação ao restante da família, que pode produzir até 30 sementes por fruto, limitam a propagação sexuada. A redução do número de sementes ocorre porque a porção do terço médio-inferior do fruto é, geralmente, estéril (Barroso *et al.* 1999).

Uma alternativa para a produção de mudas é através da propagação vegetativa, na qual a planta é propagada de forma assexuada, obtendo indivíduos geneticamente iguais à planta matriz, na grande maioria dos casos (Hartmann *et al.* 2002). A propagação vegetativa pode ser feita de várias formas, sendo a estaquia uma das técnicas mais usadas, tanto para plantas ornamentais, como ipê-mirim, *Tecoma stans* (L.) Juss. *ex* Kunth (Biondi *et al.* 2008) e azaléia, *Rhododendron thomsonii* Hook. f. (Lone *et al.* 2010), quanto para frutíferas, como por exemplo, carambola, *Averrhoa carambola* L. (Bastos *et al.* 2009) e maracujá-azedo, *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg. (Santos *et al.* 2010).

As características genéticas dos novos indivíduos também permanecem iguais à matriz na técnica de micropropagação, desde que observadas as condições adequadas de temperatura, luminosidade e meio de cultura. Na micropropagação, o tamanho do material retirado da planta-mãe para propagação é muito menor do que na estaquia e as condições de cultivo são mais controladas, pois o cultivo é realizado em laboratório. Com a micropropagação, gera-se grande quantidade de mudas livres de microorganismos endofíticos, no entanto, o custo para manter a infraestrutura e capacitação dos funcionários é maior (Grattapaglia & Machado 1998).

Na produção de mudas por semente, cada muda possui um conjunto de genes específicos, provenientes da combinação das matrizes parentais. Esse conjunto de genes é refletido nas características fenotípicas, que difere em cada muda, o que não propicia plantas com atributos homogêneos para comercialização em grande escala (Meletti *et al.* 2003). Além do mais, algumas sementes necessitam de um longo período para atingir a maturidade, atrasando a venda (Ferrari *et al.* 2004).

Pesquisas sobre a propagação de espécies nativas com potencial ornamental poderão subsidiar a escolha de novas espécies para a utilização no paisagismo e na floricultura regional. Fatores, como o mercado consumidor disponível, infraestrutura para produção e escoamento das espécies, já em desenvolvimento, propiciarão um campo favorável para o crescimento da floricultura no Distrito Federal (Buainain & Batalha 2007).

Embora a prospecção de novas espécies seja um dos pontos para o desenvolvimento da floricultura no DF, a coleta das matrizes para propagação é cada vez mais difícil, pois se tem verificado a crescente fragmentação e deterioração do Cerrado, diretamente ligada ao desmatamento e uso acelerado das terras para atividades agrícolas (Aquino & Miranda 2008).

Em virtude do exposto, este trabalho visa a desenvolver protocolos de propagação de mudas das espécies de Acanthaceae, presentes no Distrito Federal, com potencial ornamental,

contribuindo para a conservação da flora local e o incentivar o crescimento da floricultura da região com a inclusão de novas espécies ornamentais.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Floricultura

O uso das plantas em jardins com finalidade ornamental, incluindo plantas alimentícias, medicinais e aromáticas é um costume muito antigo, iniciado pelos egípcios, cerca de 2000 a.C (Lima & Machado 2003). No século XV, a descoberta da América pelos europeus trouxe ao Velho Mundo uma nova fonte de plantas ornamentais diferentes das que se cultivava. Bromélias, orquídeas, aráceas e muitas outras foram levadas à Europa e se tornaram populares. A colonização do Sudeste Asiático, a partir do século XVI, revelou aos europeus outra grande fonte de espécies desconhecidas e exóticas (Hartmann *et al.* 2002).

A produção de flores e plantas ornamentais está presente em quase todos os países do mundo, movimentando cerca de 100 bilhões de dólares ao ano (Oliveira & Brainer 2007). Em 2002, a horticultura ornamental ocupava, no mundo, uma área estimada em 424 mil hectares (ha), com o Canadá possuindo a maior área total plantada, seguido da China e da Índia. Entretanto, considerando o cultivo de áreas protegidas em estufa, os Estados Unidos apresentam a maior extensão, com 8.700 ha, seguido do Japão e da Holanda, nesse mesmo ano (Oliveira & Brainer 2007).

A área cultivada nem sempre é proporcional ao volume de produção de flores e plantas ornamentais. Os Estados Unidos, Japão e Holanda lideram esse cenário, com aproximadamente 50% do valor da produção mundial. A Holanda, considerada sede do comércio de flores, se destacando com 49,3% das exportações mundiais, totalizou cerca de US\$ 9 bilhões em 2008 (COMTRADE 2008a).

A proporção do consumo de flores reflete a renda *per capita* da região. Os maiores consumidores são a União Européia, a América do Norte e o Japão. Outras economias

emergentes também têm contribuído para a dinamização deste setor, tais como Colômbia, que é o segundo maior exportador mundial, com renda de US\$ 1,1 bilhões em exportações no ano de 2008 (COMTRADE 2008b), além de Europa Oriental, África do Sul, México, Argentina, Equador e Brasil (Buainain & Batalha 2007).

A floricultura comercial no Brasil iniciou-se vinculada ao segmento da fruticultura, especialmente em São Paulo e em Santa Catarina. A partir de 1950, teve crescimento constante e expressivo, com a articulação entre os setores da cadeia produtiva (Aki & Perosa 2002). Com o desenvolvimento desse ramo, diversos programas foram implementados pelo Governo Federal e Estadual, assim como por empresas privadas para aumentar a competitividade do setor, quais sejam, o Programa de Apoio à Produção e Exportação de Frutas, Hortaliças, Flores e Plantas Ornamentais para Exportação e o Programa Setorial Integrado de Promoção e Exportação de Flores e Plantas Ornamentais.

Apesar dos incentivos, o Brasil ainda possui uma área reduzida, de 100.108 h, direcionados para cultivo de flores em viveiros de mudas, estufas de plantas e casas de vegetação, contrastando com um total de quase nove milhões de hectares utilizados para lavouras (IBGE 2006). Em todo o país, a distribuição da área cultivada com flores e plantas é, sua maioria, voltada para produção de mudas, conforme a Figura 1 (IBRAFLOR 2008).

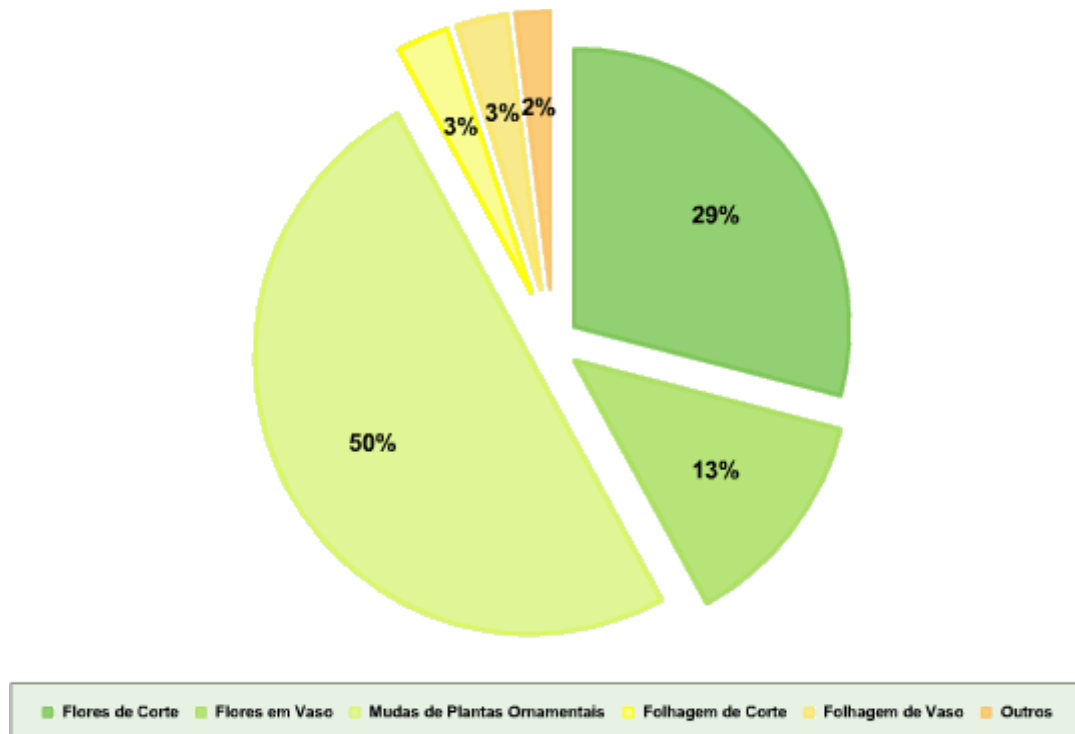


Figura 1. Distribuição percentual da área cultivada no Brasil por categoria. Fonte: <http://www.aprendendoaexportar.gov.br/flores/setor/perfil.asp>. Acesso: 15 junho 2010.

Os produtos exportados pelo Brasil são muito variados. Não somente flores são comercializadas, mas também botões frescos e secos, folhagens secas e frescas, mudas de plantas, bulbos, tubérculos, rizomas em repouso vegetativo, musgos e líquens (MDIC 2010). Embora seja diversificada, a exportação do Brasil não chega a ultrapassar U\$ 35 milhões em vendas anuais, o equivalente a 2,7% do valor total da produção, com crescente destinação para a Holanda, EUA, Japão, Espanha, França, dentre outros 30 diferentes destinos em todo o mundo. Esses dados indicam que a sustentação econômica da atividade é garantida fundamentalmente pelo mercado interno (Kiyuna *et al.* 2009).

Diversas instituições têm contribuído para o crescimento desse setor, como por exemplo, o Serviço Brasileiro de Apoio as Micro e Pequenas Empresas (SEBRAE) e a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). Unidades da EMBRAPA estão trabalhando com plantas tropicais em vários campos de pesquisas, desde a propagação das espécies até estudos dos fitopatógenos que as infestam. Como exemplo, tem-se espécies de *Heliconia* (Heliconiaceae); bastão do imperador, *Etilingera elatior* (Jack) R. M. Sm. (Zingiberaceae); bananeira vermelha, *Musa coccinea* Ander (Musaceae) e bananeira ornamental, *Musa ornata* Roxb. (Musaceae); cana-de-macaco, *Costus spicatus* Susseng (Costaceae); sorvete, *Zingiber spectabiles* Griff. (Zingiberaceae); panamá, *Alpinia purpurata* (Vieill) Schum. (Zingiberaceae), entre outras (Rodrigues 2007; Lemos *et al.* 2007).

A floricultura brasileira oferece uma alternativa econômica importante, uma vez que proporciona alto valor agregado de seus produtos e muitos empregos. Em toda a cadeia produtiva, são gerados 120 mil empregos dos quais 58 mil (48,3%) estão localizados na produção; quatro mil (cerca de 3%) na distribuição; 51 mil (42,5%) no comércio varejista e sete mil (quase 6%) em outras funções, principalmente nos segmentos de apoio (IBRAFLOR 2008).

A produção de flores e plantas ornamentais propicia rendimentos entre R\$ 50 mil a R\$ 100 mil/ha, gerando, na média nacional, 3,8 empregos diretos/ha, que vêm a equivaler a 14,2 empregos numa propriedade dedicada à floricultura. Aproximadamente 95% desses empregos são preenchidos com mão-de-obra permanente, essencialmente contratada (81,3%), enquanto que o trabalho familiar responde por 18,7% do total empregado, o que evidencia seu inquestionável papel e importância sócio-econômica (IBRAFLOR 2008).

O setor ainda está centralizado no Estado de São Paulo, que arrecadou no total mais de 18 milhões de dólares em exportações em 2004 (Oliveira & Brainer 2007). Em Holambra encontram-se as principais empresas de mudas, bulbos e sementes (Graziano 2010). Todavia,

tem se verificado a tendência de descentralização produtiva e comercial pelas demais regiões do país. Atualmente, assiste-se ao crescimento e consolidação de importantes pólos florícolas na região Sul, Sudeste (Minas Gerais e Rio de Janeiro) e Centro-Oeste (Goiás e Distrito Federal) e na maioria dos estados do Norte e do Nordeste (Junqueira & Peetz 2008). No Ceará, Rio Grande do Sul e Goiás vem aumentando a produção de plantas tropicais (Gondim *et al.* 2005).

No Distrito Federal (DF) a floricultura é uma atividade recente. Ela começou há menos de 20 anos e ainda é pouco expressiva em nível nacional. Até 2005, a produção local compreendia 57 pequenos e médios produtores em uma área de mais de 420 ha, que atendia a somente 15% da demanda interna (Junqueira & Peetz 2005). O DF é considerado o mercado consumidor mais promissor do país, uma vez que tem a maior renda *per capita* e possui grande número de eventos que demandam arranjos florais (Alonso & Silva 2009).

Conquanto em franca expansão, o mercado de plantas ornamentais do DF é essencialmente dependente do Estado de São Paulo, na medida em que o seu abastecimento é garantido, na sua expressiva maioria, por produtos da Cooperativa Veiling Holambra e pelos produtores da Central de Abastecimento (CEASA) de Campinas - SP, principalmente quando se trata de flores de corte e envasadas. Já as plantas destinadas à jardinagem e paisagismo são provenientes de Goiás, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, Minas Gerais e Rio de Janeiro (Duval 2008). A qualidade e disponibilidade dos produtos desses estados ainda não permitem aos produtores locais poder de barganha às condições impostas, o que inibe um maior desenvolvimento da produção local (Duval 2008).

A produção de flores nativas do Cerrado pode se configurar em um dos diferenciais do mercado, trazendo mais rentabilidade para o Distrito Federal. Destarte, para a consolidação da floricultura na região, é necessário maior incentivo em pesquisas, tanto na investigação e desenvolvimento de novos produtos para o setor, considerando o potencial nativo, quanto agronômicas, considerando as condições edafoclimáticas de cultivo no Cerrado (Alonso & Silva 2009).

2.1.2 O uso de espécies nativas

O Cerrado abriga grande biodiversidade, sendo reconhecido entre os 25 *hotspots* da biodiversidade global (Myers *et al.* 2000). Possui flora rica, com cerca de 400 espécies de pteridófitas, quatro de gimnospermas e 11238 para angiospermas, somando cerca de 12 mil espécies nativas (Mendonça *et al.* 2008), muitas das quais são ornamentais, como representantes nas famílias Rubiaceae Juss., Anacardiaceae Lindl., Apocynaceae Juss., Bignoniaceae Juss., Bombacaceae Kunth, entre outras (Matteucci *et al.* 1995; Palazzio Junior & Both 1993; Pereira 1984). Malgrado a grande diversidade da flora, o comércio de flores e plantas ornamentais concentra-se numa reduzida lista de espécies (Tabela1).

Tabela 1. Principais flores e plantas ornamentais consumidas no Brasil, em 2003.

Flores em vaso	Flores de corte	Plantas verdes
Crisântemo (<i>Dendranthema grandiflorum</i> Ramat. Kitam.)	Rosa (<i>Rosa</i> spp.)	Fícus (<i>Ficus benjamina</i> L.)
Violeta (<i>Saintpaulia ionantha</i> H. Wendl.)	Crisântemo (<i>Dendranthema</i> <i>grandiflorum</i> Ramat. Kitam.)	Cheflera (<i>Schefflera arboricola</i> Hayata)
Calanchoe (<i>Kalanchoe blossfeldiana</i> Poelln.)	Lírio (<i>Lilium</i> spp.)	Singônio (<i>Syngonium angustatum</i> Schott.)
Begônia (<i>Begonia</i> spp.)	Gérbera (<i>Gerbera jamesonii</i> Bolus ex Hook.)	Samambaia (<i>Nephrolepis</i> spp.)
Azaléia (<i>Rhododendron</i> spp.)	Tango (<i>Solidago</i> spp.)	Tuia (<i>Chamaecyparis</i> spp.)
Orquídea (vários gêneros)	Gladíolo (<i>Gladiolus hortulanus</i> L. H. Bailey)	
Bromélia (vários gêneros)	Áster (<i>Aster</i> spp.)	
Lírio (<i>Lilium</i> spp.)	Gipsofila (<i>Gypsophila</i> spp.)	

Fonte: Câmara Setorial da Cadeia Produtiva de Flores e Plantas Ornamentais do Brasil, 2003 *apud* Junqueira & Peetz (2005).

A produção de mudas de espécies nativas do Cerrado pode propiciar a conservação *ex situ* da diversidade do bioma, pois o desmatamento, a agropecuária moderna e ocupação desordenada têm degradado o bioma de forma acelerada (Ratter *et al.* 1997). A propagação em viveiros permite o acesso da população às plantas nativas, diminuindo a pressão por coletas na natureza, que tem contribuído para restringir a sobrevivência das espécies (Dias 1990).

O emprego de plantas nativas tem obtido sucesso em projetos de arborização urbana, podendo citar os exemplos das propostas de Santos & Teixeira (2001) ou dos trabalhos com Bromeliaceae Juss. por Burle Marx (1987). O projeto arquitetônico de Brasília incorpora grandes jardins e áreas verdes como um dos fortes pontos de integração e harmonização da paisagem construída, porém utilizam-se espécies exóticas, na grande maioria (Junqueira & Peetz 2005).

Não obstante a produção de mudas de espécies arbóreas nativas esteja em expansão, o emprego de espécies exóticas é ainda muito expressivo (Santos & Teixeira 2001). O ingresso de plantas exóticas é considerado a segunda maior ameaça à conservação da biodiversidade mundial, perdendo apenas para a destruição de habitats pela exploração humana direta (Ziller 2001). A introdução de espécies concentrou-se no comércio de plantas ornamentais, muitas das quais se tornaram invasoras. As atividades relacionadas às plantas ornamentais podem ser de alto risco, sob grande pressão antrópica ou em ambientes sensíveis, pois as espécies introduzidas podem extinguir espécies nativas pela competição e alterar o “pool” gênico mediante a ocorrência de híbridos (Ziller 2001; Delariva & Agostinho 1999).

Silva Júnior *et al.* (2001) mostraram que 48% das espécies arbóreas encontradas no perímetro urbano de Brasília são consideradas exóticas de diversas procedências. O restante são 28% são nativas do Cerrado *stricto sensu*, 1,6% do cerradão, 12% de matas ciliares do Brasil Central. Para alterar esse panorama, o Departamento de Parques e Jardins da Companhia Urbanizadora da Nova Capital do Brasil (NOVACAP), empresa responsável pela urbanização de Brasília, vem produzindo cada vez mais espécies arbóreas nativas do Cerrado, como sucupira preta (*Bowdichia nitida* Spruce *ex* Benth.) e angico (*Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan, chegando a um percentual de 74% de nativas (NOVACAP 2009).

As características de solo e clima do Cerrado favorecem o emprego de espécies nativas em detrimento das exóticas, uma vez que as nativas estão adaptadas condições edafoclimáticas locais (Carmona *et al.* 1998). O bioma apresenta mais de 20 tipos de solo, dos quais cerca de 50% são classificados como latossolo, que se caracteriza por ser intemperizado,

mineral, ácidos, ricos em alumínio e com alta permeabilidade à água (Reatto *et al.* 2008). O Domínio do Cerrado está sob influência de clima tropical sazonal (Klein 2000), com alta luminosidade e períodos de chuva e seca definidos.

De acordo com o Censo Agropecuário de 1995-1996 (IBGE 1996), dos estabelecimentos que trabalham com horticultura ornamental no Brasil, 89,2% usavam adubos e/ou corretivos de solo. Os adubos químicos eram utilizados por 73,8% dos estabelecimentos e os orgânicos, por 70,6%. Quanto à irrigação, 46,6% dos estabelecimentos faziam uso dessa tecnologia, enquanto que, para a totalidade das unidades agropecuárias, era de apenas 4,9%.

Esses dados demonstram que esse ramo usa muito as tecnologias de cultivo. Os custos da produção e os impactos causados pela alteração do solo devido ao uso desses insumos podem ser reduzidos com o cultivo das espécies ornamentais nativas do Cerrado, as quais já são adaptadas às condições ambientais do bioma (Carmona *et al.* 1998). No caso de jardins públicos, a escolha das espécies nativas pode resultar em economia de recursos, pois se reduziria os gastos com caminhões-pipa, água e trabalhadores, já que, estes últimos poderiam estar direcionados para outras atividades.

No Cerrado, embora a proporção de plantas do estrato herbáceo-arbustivo em relação às árvores esteja entre 4:1 e 5:1, demonstrando a riqueza em diversidade desse estrato, poucas espécies ornamentais nativas herbáceas ou arbustivas são propagadas comercialmente, pois são pouco conhecidas do público (Mendonça *et al.* 2008). Nos canteiros e jardins de Brasília, destacam-se espécies herbáceas (Tabela 2) de gêneros cuja maioria é originária do México, Estados Unidos, Argentina, Ásia e Europa (Barreto 2007; Souza & Lorenzi 2001). Os canteiros, na época da seca, são regados diariamente. As flores duram, em média, de 90 a 180 dias. No período chuvoso há redução significativa de opções, onde as plantas mais resistentes são: camomila, dália, cravo, sálvia e zínia (Pereira Júnior *et al.* 2003).

A propagação de plantas nativas é uma forma de colocá-las ao alcance da população, de maneira a divulgar a sua existência e evitar extração diretamente da natureza. A EMBRAPA - Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN) desenvolve o projeto intitulado “Bancos Ativos de Germoplasma de Plantas Ornamentais”, cujo objetivo é realizar diagnóstico sobre a ocorrência de espécies ornamentais no Brasil. Para o bioma Cerrado, possui um plano de ação que visa a desenvolver protocolos de propagação de espécies nativas das famílias Amaryllidaceae, Gesneriaceae e Piperaceae com potencial ornamental (Medeiros *et al.* 2010).

Tabela 2. Gêneros de ervas e arbustos plantados nos canteiros públicos de Brasília.

Gênero	Família
<i>Catharanthus</i> G. Don	Apocynaceae
<i>Dahlia</i> Cav.	Asteraceae
<i>Impatiens</i> L.	Balsaminaceae
<i>Petunia</i> Juss.	Solanaceae
<i>Phlox</i> L.	Polemoniaceae
<i>Rudbeckia</i> L.	Asteraceae
<i>Salvia</i> L.	Lamiaceae
<i>Tagetes</i> L.	Asteraceae
<i>Viola</i> L.	Violaceae
<i>Zinnia</i> L.	Asteraceae

Fonte: Tabela adaptada de Pereira Júnior *et al.* 2003

2.2 Acanthaceae Juss.

Acanthaceae Juss. (Asteridae, Lamiales) é representada por 240 gêneros e 3250 espécies, com distribuição predominantemente pantropical (Wasshausen & Wood 2004). Está dividida em quatro subfamílias: Acanthoideae, Thunbergioideae, Avicennioideae e Nelsionioideae.

No Brasil, ocorrem 44 gêneros e 500 espécies, sendo a maior família das Lamiales no Brasil (Souza & Lorenzi 2008). Já no Cerrado existem 165 espécies (Mendonça *et al.* 2008). É um grupo monofilético, sustentado por caracteres genéticos, mas a posição da família dentro da ordem ainda não foi completamente esclarecida (McDade *et al.* 2008).

São plantas herbáceas, subarborescentes ou arbustivas. Suas folhas são simples, sem estípulas, opostas, muitas vezes oposta cruzada. As flores são grandes, vistosas, dispostas em inflorescências, muitas com brácteas coloridas. Apresentam flores pentâmeras, diclamídeas, hermafroditas, zigomorfas, com corola bilabiada. O androceu é formado por quatro estames didínamos, às vezes só dois, nesse caso, com estaminódios. O pólen apresenta a exina muito ornamentada. O ovário é súpero, bicarpelar, bilocular, com 2-10 óvulos por lóculo. Fruto

seco, capsular, muitas vezes com ejaculador (ausente em *Thunbergia Retz.* e outros), raramente drupa (*Mendoncia Vell. ex Vand.*) (Joly 2002; Souza & Lorenzi 2008).

A família tem importância ecológica, pois as flores produzem néctar e pólen para abelhas, beija-flores e morcegos. A espécie *Avicennia schaueriana* Stapf & Leechm. ex Moldenke é uma árvore de manguezal, com grande relevância para o ecossistema à que pertence. Várias espécies também são importantes pelo seu valor medicinal, como em *Phaulopsis fascisepala* C.B.Cl., que apresenta compostos antioxidantes que ajudam na defesa contra o câncer (Adesegun *et al.* 2009). *Adhatoda vasica* Nees possui alcalóides que combatem problemas respiratórios (Nath & Buragohain 2005). *Graptophyllum pictum* L. é utilizada na Índia para cura de doenças cutâneas e a infusão das folhas é usada para prisão de ventre (Koilpillai & Wilson 2010). *Asteracantha longifolia* (L.) Nees reduz os níveis de glicose no sangue, tem propriedades antioxidantes e antimicrobianas (Chauhan & Dixit 2010).

A família apresenta significativo valor econômico devido ao grande número de plantas cultivadas como ornamentais. Os gêneros *Aphelandra* R.Br., *Justicia* L., *Ruellia* L. e *Thunbergia Retz.*, *Eranthemum* L., *Hemigraphis* Nees, *Hypoestes* Sol. ex R.Br., *Odontonema* Nees são muito utilizados para ornamentação no mundo todo. Algumas espécies arbustivas como *Pachystachys lutea* Nees e *Justicia brandegeana* Wassh. & L.B.Sm são usadas frequentemente no Brasil (Souza & Lorenzi 2008). Palazzo Junior & Both (1993) sugerem para ornamentação duas espécies nativas do Brasil, *Aphelandra chamissoniana* Nees., que apresentam flores vermelhas quase todo o ano e *Aphelandra mirabilis* Rizz., que possui inflorescências chamativas para o paisagismo.

2.2.1 *Ruellia* L.

Ruellia L., pertencente à subfamília Acanthoideae, é um dos maiores gêneros de Acanthaceae, com 250 espécies distribuídas nos trópicos e subtropicais. O centro de diversidade está na América, sendo, provavelmente, o continente que tem maior número de espécies (Ezcurra 1993).

Muitas espécies têm valor ornamental devido às suas flores coloridas e vistosas, e, também, em combinação com a coloração das folhagens. *Ruellia brevifolia* (Pohl) C. Ezcurra,

Ruellia elegans Poir. são exemplos de espécies cultivadas com frequência pelos horticultores em regiões quentes do mundo, enquanto que *Ruellia angustiflora* (Ness) Lindau ex Rambo e *Ruellia ciliatiflora* Hook. são também utilizadas, porém mais raramente (Ezcurra 1989).

As espécies têm hábito herbáceo ou arbustivo ereto ou decumbente. O caule jovem é frequentemente quadrangular ou subtereto. As folhas, pubescentes ou glabras, possuem margem inteira, crenulada ou crenada, raro dentada. São pecioladas ou subsésseis, e algumas poucas espécies formam roseta. Possuem tricomas do tipo glandulares e tectores, sendo este simples e uniseriados. Cistólitos também estão presentes na folhas (Ezcurra 1993).

O padrão básico de inflorescência é dicásio simples ou composto. A coloração das flores varia de azul, malva, rosa, vermelha, amarelada a branca. A corola possui vários formatos desde tubular, infundibuliforme, hipocrateriforme até campanulada. As brácteas e bractéolas geralmente são pequenas e não imbrincadas. O pólen tem grandes variações na ornamentação. O fruto é capsular, bivalvar, loculicida, com número variável de sementes (1-14) por lóculo. As sementes são planas, orbiculares e mais ou menos cobertas por tricomas que formam mucilagem ao entrar em contato com a água. Essa mucilagem é muito pegajosa, podendo aderir fortemente ao corpo dos animais, que pode propiciar a dispersão (Ezcurra 1993). A mucilagem também pode servir de proteção, pois Lester & Ezcurra 1991 verificaram que ela é resistente à ação enzimática.

Estudos focando biologia reprodutiva e polinização de espécies de *Ruellia* no Brasil mostram que há uma predominância na polinização por beija-flores, na autocompatibilidade e na autopolinização (Faria & Araújo 2010; Lima *et al.* 2005; Sigrist & Sazima 2002; Braz *et al.* 2000).

2.2.1.1 *Ruellia nitens* (Nees) Wassh.

Ervas a subarbustos 0,15-1m de altura (Figuras 2A-E); caule glabro, às vezes com tricomas glandulares. Folhas 4-7x1-3 cm, lanceoladas a elípticas, ápice agudo, base acuneada, glabrescente, distintamente glandulosas, tricomas dispersos ou glabras; nervação proeminente em ambas as faces, nervuras 7-9 pares; pecíolo ca. 0,8 mm compr. Espigas com flores solitárias ou em pares, axilares ou terminais; pedicelo ca. 1,2 mm compr.; brácteas 12-22 mm compr., elípticas, similar às folhas; sépalas 10-15 mm compr., unidas na base, lineares, glabrescente; corola em forma de trombeta, roxa; tubo basal 2 cm compr., fauce 25 mm compr., lobos ca. 2 cm compr., arredondados; estames didínamos. Cápsulas 14-15 mm compr., glabras (Vilar 2009).

É encontrada em várias fitofisionomias do Cerrado como Mata de Galeria, Campo Sujo, Cerrado *lato sensu* (Mendonça *et al.* 2008). No DF, floresce de abril a setembro (Vilar 2009).

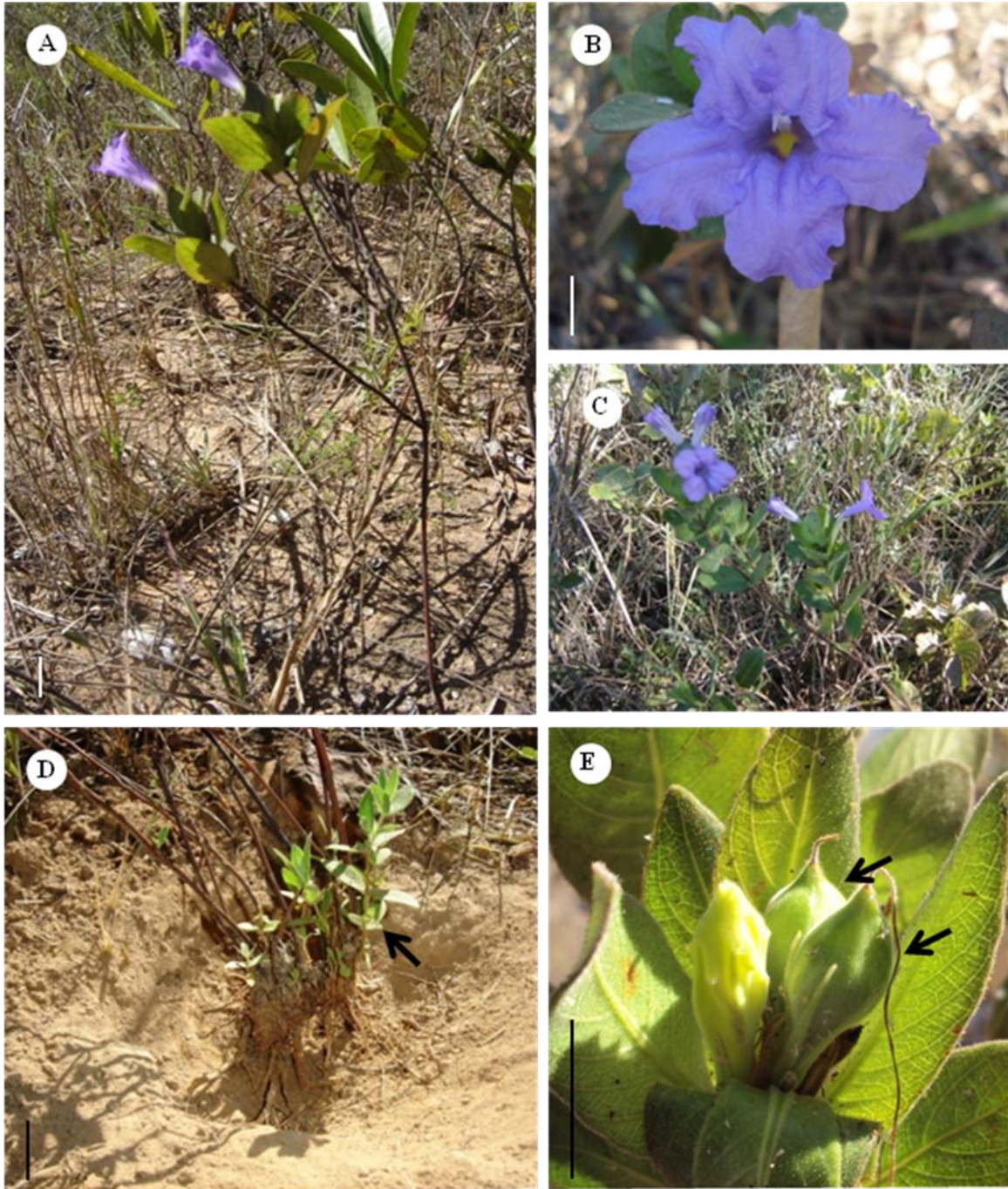


Figura 2. *Ruellia nitens* (Nees) Wassh. **A.** Hábito. **B.** Detalhe da flor. **C.** Ramos com flores. **D.** Rebrotas (seta) **E.** Frutos imaturos (seta). Escalas: A: 3 cm; B, E: 1cm; D: 2 cm;

2.2.1.2 *Ruellia incompta* (Nees) Lindau

Subarbustos 20-80 cm de altura (Figura 3A-C).; caule jovem glabrescente, tricomas glandulares. Folhas elípticas, pegajosas, ápice arredondado obtuso, base aguda a atenuada, pubescentes, nervação proeminente em ambas as faces, às vezes tricomas densos e escuros, peciolada. Panículas terminais ramificadas e axilares; brácteas lanceoladas; bractéolas lineares, glandular-pubescentes; sépalas unidas na base, lineares, glandular-pubescentes; flor cleistogâmica, corola infundibuliforme, branca, roxa ou amarela. Cápsulas pubescentes (Vilar 2009).

Freqüente no DF, ocorre em Cerrado *stricto sensu* e Campo, em solo arenoso. No DF, floresce e frutifica de fevereiro a setembro (Vilar 2009).

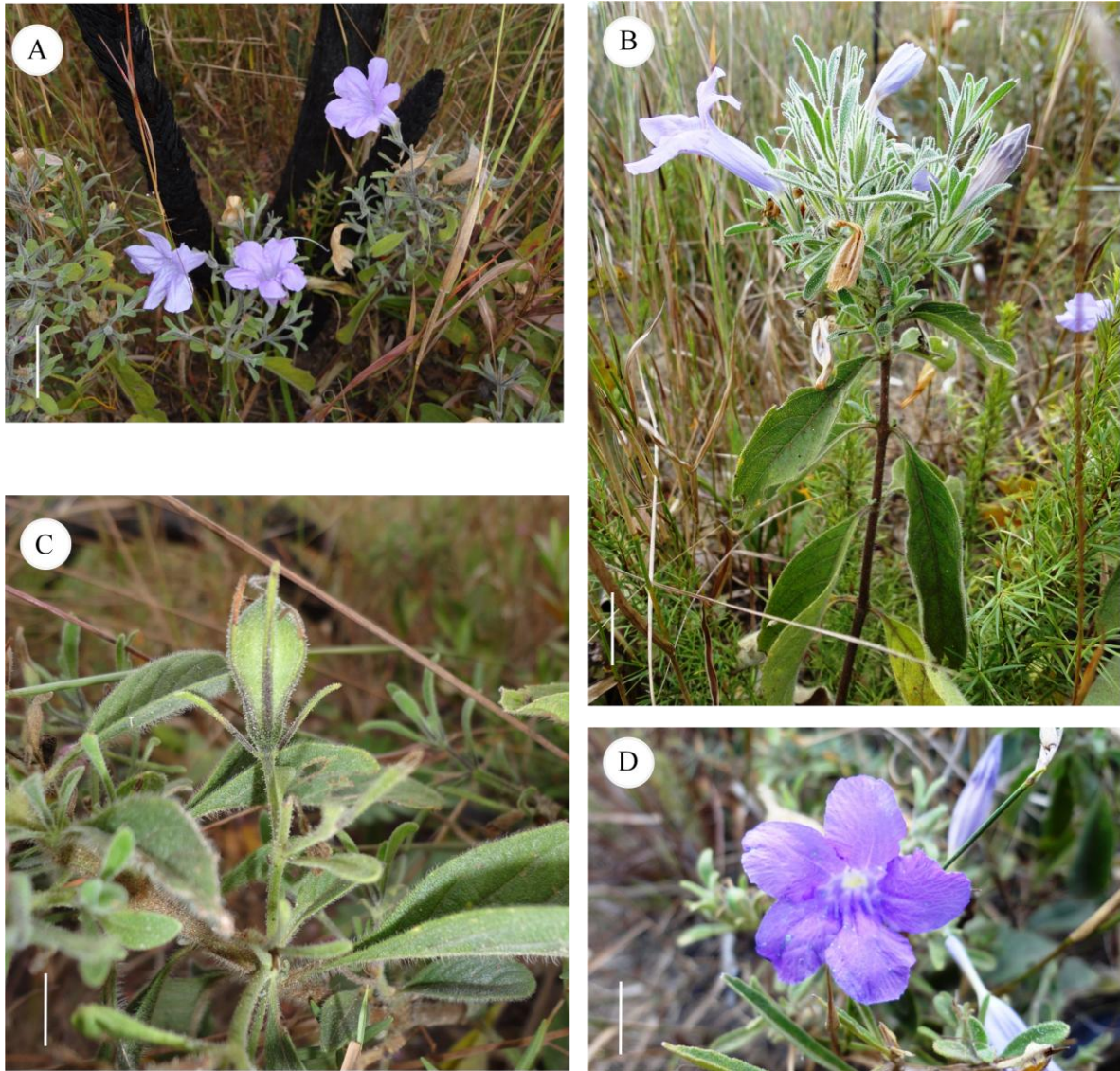


Figura 3. *Ruellia incompta* (Nees) Lindau **A.** Indivíduo no Campo sujo. **B.** Detalhe da inflorescência. **C.** Detalhe do fruto verde. **D.** Detalhe da flor. Barra: A: 5 cm; B: 7 cm; C:0,5 c; D: 1,4 cm.

2.2.2 *Justicia* L.

Justicia L. é o maior e taxonomicamente mais complexo gênero de Acanthaceae, contendo cerca de 600 espécies distribuídas, principalmente, nos trópicos, subtropicais, mas ocorrendo também em regiões temperadas (Graham 1988). São espécies herbáceas e arbustivas perenifólias, das quais várias delas são usadas para forrageamento e ornamentação. Destacam-se, também, pela importância ecológica, uma vez que são abundantes em sub-bosques de florestas e bosques úmidos, além de locais semi-áridos (Ezcurra 2002). No Brasil, algumas espécies são usadas na medicina tradicional, como *Justicia pectoralis* Jacq. e *Justicia gendarussa* Burm. e que vem sendo confirmadas suas propriedades analgésicas e antiinflamatórias por meio de estudos de cromatografia, com essas propriedades atribuídas a vários tipos de cumarinas e flavonóides (Oliveira *et al.* 2000).

A variedade de forma e cor (roxa, vermelha, lilás, branca, raro amarela ou laranja) das flores de *Justicia* indica que são polinizadas tanto por beija-flores, como por abelhas e borboletas (Ezcurra 2002).

O gênero é composto por espécies que possuem folhas geralmente inteiras, raramente crenadas ou crenuladas, com cistólito. Inflorescências são do tipo espigas, panículas ou cimeiras, raro solitárias. Corola com o lábio superior bilobado e o inferior trilobado. Androceu com dois estames e sem estaminódios. Brácteas e bractéolas variadas. Cálice profundamente partido. Anteras bitecas, com as tecas inseridas em alturas diferentes no conectivo. O fruto é do tipo cápsula loculicida bivalvar, composto por quatro sementes, podendo reduzir o número por aborto. As sementes variam de esférica a discóide, com mais de 20 tipos de ornamentação da testa (Graham 1988; Ezcurra 2002).

2.2.2.1 *Justicia lanstyakii* Rizz.

Ervas a subarbustos 0,3-1,3 m de altura (Figura 4A-C); caule glabrescente. Folhas sésseis, lanceoladas, ápice agudo, base obtusa, glabrescente em ambas as faces. Espigas terminais e axilares; brácteas com ápice agudo, base obtusa, indumento denso, bractéolas lanceoladas, indumento denso; sépalas ciliadas, unidas pela base, corola vermelha ou roxa, lábio superior discretamente bilobado e inferior trilobado. Cápsulas 13 mm de comprimento (Vilar 2009).

É restrita ao bioma Cerrado, ocorrendo em quase todos os ambientes, entre eles, mata de galeria, campo limpo, campo sujo. Floresce de maio a agosto (Vilar 2009).



Figura 4. *Justicia lanstyakii* Rizz. **A.** Indivíduo no Cerrado *sensu strictu*. **B.** Inflorescência. **C.** Detalhe da inflorescência. Escala B,C: 1 cm

2.3 Propagação

2.3.1 Sementes

A biometria da semente, aliada ao estudo do desenvolvimento da plântula é importante para a detecção das espécies no campo nos estágios juvenis, além de oferecer subsídios para a interpretação correta dos testes de germinação em laboratório, identificação e certificação da qualidade fisiológica (Amorim *et al.* 1997; Monteiro *et al.* 2011).

Mudas propagadas por sementes são cada vez mais procuradas para recuperação de áreas degradadas, pois cada muda possui genótipo diferente, o que aproxima da diversidade original do local. A propagação via sementes é interessante para a conservação do germoplasma das populações fornecedoras das sementes, o que é importante para diminuir a extinção de espécies vegetais, devido à crescente degradação do Cerrado (Junqueira *et al.* 2008).

Grolli (1999) apresenta como vantagens da propagação de plantas por sementes: o baixo custo, a facilidade de transporte e armazenamento em função do tamanho reduzido das sementes, a economia de espaço físico e a baixa disseminação de doenças no sistema vascular das plantas, que podem facilmente ser transmitida às mudas obtidas por multiplicação vegetativa.

Até 2003, trabalhos com 55 famílias de espécies nativas Cerrado foram feitos para identificar o comportamento fisiológico das sementes, sendo que as mais estudadas são Leguminosae, com total de 66 espécies, seguido de Bignoniaceae, com 14 espécies (Salomão *et al.* 2003). Percebe-se, ainda, que existem poucos estudos sobre germinação de espécies do Cerrado. Para as espécies de Acanthaceae, a revisão de literatura revela a inexistência de estudos nessa área.

Muitos fatores afetam a germinação e o estabelecimento da plântula. O fator inicial e que determina a germinação de sementes viáveis e não dormentes é a disponibilidade de água para a embebição (Larcher 2000). Segundo Bewley & Black (1994), as sementes apresentam três fases de absorção de água e hidratação. Na primeira fase, as sementes absorvem água devido ao seu baixo potencial hídrico, mais especificamente, devido ao potencial matricial.

Sendo assim, a água entra por um processo puramente físico. Após a turgescência da semente, segue-se a fase de preparação e ativação do metabolismo. Aqui a absorção de água é reduzida, iniciando o processo de crescimento do embrião. E na terceira fase, ocorre um aumento do conteúdo de água devido ao acúmulo de macromoléculas e o crescimento do embrião. Essa última fase é um dos pontos críticos ao desenvolvimento das plântulas, pois elas são suscetíveis à desidratação (Leprince *et al.* 2000).

Para a ativação dos processos metabólicos durante a germinação a temperatura precisa estar numa faixa ótima, que é diferente para cada espécie. Sementes de muitas espécies tropicais expressam seu máximo potencial germinativo em temperaturas na faixa de 20 a 30°C, como em *Gallesia integrifolia* (Spreng.) Harms, pau-d'álho (Barros *et al.* 2005). Outras espécies germinam sob temperaturas alternadas, como em *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer, araticum-de-terra-fria, que apresentou maior porcentagem de germinação quando mantidas em 20/30°C (Costa *et al.* 2011).

A sensibilidade das sementes à luz também varia com a espécie. *Vernonia polyanthes* Less., assa-peixe, é uma espécie fotoblástica preferencial, ou seja, apresenta maior porcentagem de germinação na presença de luz (Fonseca *et al.* 2012). Mas a luz nem sempre é um fator imprescindível e limitante para a germinação, como em *Campomanesia pubescens* (DC.) O. Berg., conhecida como gabioba de arbusto, a qual apresentou maior porcentagem e velocidade de germinação no escuro (Dousseau *et al.* 2011).

Há os fatores internos à semente que interferem na germinação, tais como os inibidores e promotores de germinação (Delgado & Barbedo 2011; Lopes & Souza 2008). Existem vários tipos de inibidores, por exemplo, ácidos fenólicos, cumarinas, mas o ácido abscísico está entre os mais comuns (Bewley & Black 1994). As substâncias inibidoras podem se localizar em diferentes porções na semente, como em *Coffea arabica* L., onde a substância está presente no espermoderma (Pereira *et al.* 2002). Já os promotores podem ser ácido giberélico, nitrato de potássio, tiouréia entre outros (Ferreira & Borghetti 2004).

Há espécies que, mesmo em condições ideais, não germinam, o que caracteriza sua dormência. Esse é um mecanismo que inibe a germinação em ambientes onde a sobrevivência da plântula poderia estar em risco (Ferreira & Borghetti 2004). A dormência pode ocorrer devido ao balanço hormonal, aos inibidores e promotores químicos ou à resistência dos envoltórios da semente (Baskin & Baskin 1998).

Várias são as formas para se analisar a germinação. Dentre elas pode-se citar a germinabilidade, que é a porcentagem de sementes germinadas e o tempo médio de germinação (Labouriau 1983), que corresponde à média do tempo necessário para uma

amostra de sementes germinar, dando um caráter cinético ao processo (Ferreira & Borghetti 2004).

A germinação *in vitro* é muito utilizada para espécies que possuem sementes muito pequenas, sem reservas ou que dependem de relação simbiótica com fungos para obter nutrientes, como as orquídeas, sendo difíceis de germinar em condições naturais (Vujanovic *et al.* 2000; Paul *et al.* 2012). Pode-se também fazer a cultura de embriões, que estariam imaturos no ambiente natural, viabilizando seu desenvolvimento (Nunes *et al.* 2008). A germinação *in vitro* também pode ser usada para seleção de genótipos e desenvolvimento de novas cultivares (Alcântara *et al.* 2011).

Outra vantagem reside na possibilidade das plântulas serem fontes de explantes para a micropropagação, tendo em vista que sementes são menos contaminadas que de brotos retirados do campo e resistem melhor aos tratamentos de desinfestação (Martins *et al.* 2011).

Vários tipos de meio de cultura são empregados para germinação *in vitro*, tais como meio MS (Murashige & Skoog 1962) ou WPM (Lloyd & McCown 1981), podendo ser diluído (Castro *et al.* 2011; Larraburu *et al.* 2012). A escolha da concentração de sais no meio de cultura é importante, pois o meio pode influenciar na passagem de água durante a fase inicial de embebição (Fermino Junior & Scherwinski-Pereira 2012). A adição de sacarose pode favorecer ou, dependendo da espécie, pode até prejudicá-la em concentrações iguais ou maiores que 20 g. L⁻¹ (Pinheiro *et al.* 2001).

2.3.2 Micropropagação

A micropropagação consiste, de modo geral, em inocular e cultivar pequenos segmentos de caule contendo gema apical ou axilar em meio nutritivo previamente esterilizado (Grattapaglia & Machado 1998).

Quando as sementes são escassas, não há sua disponibilidade durante todo o ano ou, ainda, quando o material vegetativo é limitado, a cultura de tecidos *in vitro* é uma alternativa que permite a produção de mudas em larga escala, principalmente àquelas ameaçadas de extinção (Wochok 1981). O benefício da micropropagação reside na possibilidade de controle de fatores ambientais para a produção dos brotos, como luz, umidade, nutrientes e assepsia, propiciando mudas livres de patógenos. Outro fator importante está na maior quantidade de

brotos formados em um curto espaço de tempo e em qualquer época do ano (Melo *et al.* 2008).

Murashige (1974) separou os procedimentos para a micropropagação em três fases. A primeira delas refere-se à desinfestação e estabelecimento. A segunda é a multiplicação dos brotos, cuja duração dependerá da quantidade de brotos desejada. E a terceira fase é a transferência dos brotos para meio de enraizamento ou enraizamento *ex vitro* e aclimatização. Deberg & Maene (1981) incluíram mais fases, totalizando cinco, onde a fase inicial ocorre com a seleção da matriz e do tipo de explante, e há uma fase de alongamento dos brotos após a realização da multiplicação.

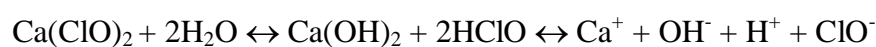
Um dos momentos mais críticos para a micropropagação é a fase de estabelecimento, na qual é imprescindível a obtenção de explantes livres de microorganismos endofíticos, pois o crescimento de fungos e bactérias podem comprometer o desenvolvimento dos cultivos *in vitro* (Srivastava *et al.* 2010). A efetividade dos tratamentos de descontaminação depende da substância usada, da concentração e dos períodos de exposição do explante aos agentes, além de ser dependente do nível de tolerância da espécie a esses produtos, pois quanto maior a dosagem, maior o dano dos tecidos da planta (Hartmann *et al.* 2002). Muitas substâncias são utilizadas na descontaminação, entre eles, etanol 70%, cloreto de mercúrio e compostos inorgânicos derivados do cloro, sendo os mais usados o hipoclorito de sódio e hipoclorito de cálcio (Donini *et al.* 2005; Rego *et al.* 2009; Ulisses *et al.* 2010).

O hipoclorito de sódio tem efeito oxidativo e tem a seguinte dinâmica de reação:



O hidróxido de sódio (NaOH) reage com ácidos graxos do material orgânico, que reduz a tensão superficial. O ácido hipocloroso (HClO) reage com os aminoácidos hidrolizando-os e formando cloroaminas, que interfere no metabolismo celular das bactérias, pois o cloro leva a uma oxidação irreversível do grupo sulfidrila (Estrela *et al.* 2002).

O mecanismo de ação do hipoclorito de cálcio também é baseado no ácido hipocloroso (HClO), como consta na reação:



Na fase de multiplicação, são usados reguladores de crescimento vegetais, principalmente as citocininas, nas quais o BAP (6-benzilaminopurina) apresenta bons resultados na propagação de parte aérea e de indução de gemas adventícias em diversas espécies (Ugraiyah *et al.* 2011; Shahzad *et al.* 2012). Já o AIB (ácido indolbutírico) é uma auxina muito eficaz para a fase posterior de enraizamento e pode estar associada ao carvão ativado e à redução dos sais do meio de cultura, dependendo da espécie (Gomes *et al.* 2010; Fermino Junior & Scherwinski-Pereira 2012).

A produção de espécies do Cerrado via micropropagação tem crescido, tendo como exemplo as espécies *Alibertia edulis* (Rich.) A. Rich. *ex DC.* (Silva *et al.* 2008), *Hancornia speciosa* Gomes (Pereira-Netto & McCown 1999), *Macrosyphonia velame* (St. Hil.) Muell. Arg., Apocynaceae (Martins *et al.* 2011), *Sinningia allagophylla* (Martius) Wiehler (Gesneriaceae) (Gomes & Shepherd 2000).

2.3.3 Estaquia

A propagação vegetativa por estacas consiste em destacar da planta original um ramo, uma folha ou raiz e colocá-los em um meio adequado para que se forme um sistema radicular e desenvolva a parte aérea. A propagação por estacas baseia-se na capacidade de regeneração dos tecidos e emissão de raízes (Heede & Lecourt 1991).

Dentre os métodos de propagação vegetativa, a estaquia é uma técnica de grande viabilidade econômica para o estabelecimento e plantios clonais, pois permite a multiplicação de genótipos selecionados, plantios uniformes, em curto período de tempo e a um custo menor (Melo *et al.* 2008). Além disso, a estaquia tem a vantagem de não apresentar o problema de incompatibilidade que ocorre na enxertia (Melo *et al.* 2008).

As estacas podem ser herbáceas, lenhosas e semilenhosas, foliares ou radiculares. Diversas espécies ornamentais são propagadas por meio da estaquia, tais como, *Rhododendron Thomsonii* Hook. f., azaléia arbórea (Ferriani *et al.* 2006) e *Ixora coccinea* “Compacta”, mini-ixora (Almeida *et al.* 2008). No Cerrado, muitas espécies da Mata de Galeria têm sido estudadas para a recuperação dessas áreas (Rios *et al.* 2001).

Para a formação de raízes adventícias em estacas, são necessários determinados níveis de reguladores de crescimento na planta, sendo um tipo mais favorável que outro. Há vários

grupos de tais substâncias, dentre eles as auxinas, as citocininas e as giberelinas, sendo que as auxinas, tais como AIA (ácido indol acético), AIB (ácido indolbutírico) e ANA (ácido naftalenoacético) são as de maior interesse no enraizamento de estacas (Ohland *et al.* 2009; Bordin *et al.* 2003; Laubscher & Ndakidemi 2008).

O tipo de auxina, a concentração e o método de aplicação devem ser estabelecidos, pois para algumas espécies a aplicação pode não ter efeito ou até inibir a formação de novas raízes (Müller *et al.* 1990; Hou *et al.* 2004, Scalon *et al.* 2009).

Fatores ambientais podem afetar a estaquia, tais como luz, temperatura, umidade, pragas, doenças, deficiências nutricionais dos substratos (Rios *et al.* 2001). Algumas espécies apresentam dificuldade para a regeneração de raízes, que pode inviabilizar esse método. Para tanto, muitas formas de enraizamento complementares podem de utilizadas, com pré-tratamento das plantas matrizes com ausência de luz (Biasi 1996).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Propagar *Justicia lanstyakii*, *Ruellia nitens* e *Ruellia incompta* (Acanthaceae), espécies ornamentais de ocorrência no Cerrado, visando o uso comercial e sustentável dessas espécies.

3.2 Objetivos específicos

- Estabelecer protocolo de desinfestação para as sementes;
- Verificar o potencial de germinação e o desenvolvimento *in vitro* das plântulas;
- Estabelecer protocolo de micropropagação a partir de microestacas;
- Verificar a capacidade de enraizamento e brotação de estacas;
- Verificar anatomicamente se há conexão das raízes adventícias com o caule das estacas.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amorim, I. L. de; Dadive, A. C.; Chaves, M. M. F. 1997. Morfologia do fruto e da semente, e germinação da semente de *Trema micrantha* (L.) Blum. **Cerne** 3 (1):138-152.
- Adesegun, S. A.; Fajana, A.; Orabueze, C. I.; Coker, H. A. B. 2009. Evaluation of antioxidant properties of *Phaulopsis fascisepala* C.B.Cl. (Acanthaceae). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine** 6(2): 227–231.
- Aki, A. & Perosa, J. M. Y. 2002. Aspectos da produção e consumo de flores e plantas ornamentais no Brasil. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental** 8: 13-23.
- Almeida, E. F. A.; Luz, P. B. da; Lessa, M. A.; Paiva, P. D. de O.; Albuquerque, C. J. B.; Oliveira, M. V. C. de. 2008. Diferentes substratos e ambientes pra enraizamento de mini-ixora (*Ixora coccinea* “compacta”). **Ciência e Agrotecnologia** 32 (5): 1449-1453.
- Alcântara, B. K.; Brondani, G. E.; Gonçalves, A. N.; Almeida, M. de; Azevedo, R. A. 2011. Methods of asepsis for in vitro establishment and germination of *Eucalyptus grandis*. **Journal of Biotechnology and Biodiversity** 2 (3): 7-13.
- Alonso, A. M. & Silva, J. C. S. 2009. Floricultura no Distrito Federal: perspectivas para o fortalecimento da cadeia produtiva de flores e plantas ornamentais. **Anais do XVII Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais; IV Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas - Ciência, Inovação e Sustentabilidade**, Aracaju-SE. CD-ROM.
- Aquino, F. G. & Miranda, G. H. B. 2008. Consequências ambientais da fragmentação de habitats no Cerrado. In: **Cerrado: Ecologia e Flora**. Sano, S. S. M.; Almeida, S. P. de; Ribeiro, J. F. Planaltina, DF: EMBRAPA. pp.385-387.
- Barreto, S. da S. 2007. **Fungos associados às sementes e plantas ornamentais herbáceas do Distrito Federal**. Dissertação em Fitopatologia, Brasília, UnB. 167p.
- Barros, S. S. U.; Silva, A.; Aguiari, I. B. 2005. Germinação de sementes de *Gallesia integrifolia* (Spreng.) Harms (pau-d'alho) sob diferentes condições de temperatura, luz e umidade do substrato. **Revista brasileira de Botânica** 28 (4): 727-733.
- Barroso, G. M.; Morim, M. P.; Peixoto, A. L.; Ichaso, C. L. F. 1999. **Frutos e sementes – Morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas**. Viçosa: UFV, 443p
- Baskin, C. C.; Baskin, J. M. 1998. **Seeds: ecology, biogeography and evolution of dormancy and germination**. San Diego: Academic Press, 666p.

- Bastos, D. C.; Scarpore, J. A. F.; Libardi, M. N.; Pio, R. 2009. Estiolamento, incisão na base da estaca e uso do ácido indolbutírico na propagação da caramboleira por estacas lenhosas. **Ciência e Agrotecnologia** 33 (1): 313-318
- Bewley, J. D. & Black, M. 1994. Seeds: physiology of development and germination. 2ed. Plenum Press, Nova York.
- Biasi, L. A. 1996. Emprego do estiolamento na propagação de plantas. **Ciência Rural** 26(2): 309-314.
- Biondi, D.; Bredow, E. A.; Leal, L. 2008. Influência do diâmetro de estacas no enraizamento de *Tecoma stans* (L.) Juss. ex Kunth. **Semina: Ciências Agrárias** 29 (2): 277-282
- Bordin, I.; Roberto, S. R.; Neves, C. S. V. J.; Stenzel, N. M. C.; Furlaneto, T. L. R. 2003. Enraizamento de estacas de acerola sob concentrações de ácido indol-butírico. **Semina: Ciências Agrárias** 24 (2): 261-264
- Braz, D. M., Vieira, M. F., Carvalho-Okano, R. M., 2000. Aspectos reprodutivos de espécies de Acanthaceae Juss. de um município de Viçosa, Minas Gerais. **Revista Ceres** 47 (270): 229–239.
- Buainain, A. M. & Batalha, M. O. 2007. Cadeias produtivas de flores e mel. **Série agronegócios**, v 9. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 142p.
- Burle Marx, R. 1987. **Arte & paisagem: Conferências escolhidas**. São Paulo: Nobel. 103p.
- Carmona, R. Martins, C. R.; Fávero, A.P. 1998. Fatores que afetam a germinação de sementes gramíneas nativas do Cerrado. **Revista Brasileira de Sementes** 20 (1): 16-22.
- Castro, J. P.; Araújo, E. R.; Rego, M. M.; Rego, E. R. 2011. Germination and disinfestation of sweet cactus *Nopalea cochenillifera* (L.) Salm Dyck). **Acta Scientiarum**. Agronomy 33 (3): 509-512.
- Chauhan, N. S. & Dixit, V. K. 2010. *Asteracantha longifolia* (L.) Nees, Acanthaceae: chemistry, traditional, medicinal uses and its pharmacological activities - a review. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 20 (5): 812-817
- COMTRADE. 2008a. Comodity Trade Statistis Database. **United Nation Statistics**. Disponível em: <<http://comtrade.un.org/db/ce/ceSnapshotd.aspx?gt=ss&cc=06&px=H1&y=2008>> Acesso em: 24fev2010.
- COMTRADE. 2008b. Comodity Trade Statistis Database. **United Nation Statistics**. Disponível em: <<http://comtrade.un.org/db/ce/ceSnapshot.aspx?px=H1&cc=06&r=170>> Acesso em: 27abr2010

- Costa, P. N.; Bueno, S. S.C.; Ferreira, G. 2011. Fases da germinação de sementes de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer em diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Fruticultura** 33 (1): 253-260
- Deberg, P.C. & Maene, L.V. 1981. A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. **Scientia Horticulturae** 14: 335-345.
- Delariva, R. L. & Agostinho, A. A. 1999. Introdução de espécies: uma síntese comentada. **Acta Scientiarum** 21(2): 255-262.
- Delgado, L. F. & Barbedo, C. J. 2011. Atividade inibidora da germinação em extratos de sementes *Eugenia uniflora* L. **Revista Brasileira de Sementes** 33 (3): 463 - 471
- Dias, B. F. S. 1990. Conservação da natureza no Cerrado brasileiro. In: **Cerrado: Caracterização, ocupação e perspectivas**. Pinto, M. N. UnB/ SEMATEC. 657p.
- Donini, L. P.; Ferreira-Moura, I.; Guisso; A. P., Souza, J. A. de, Viégas J. 2005. Preparo de lâminas foliares de aráceas ornamentais: desinfestação com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. **Arquivos do Instituto Biológico** 72 (4): 517-522.
- Dousseau, S.; Alvarenga, A. A.; Guimarães, R. M.; Lara, T. S.; Custódio, T. N.; Chaves, I. de S. 2011. Ecofisiologia da germinação de sementes de *Campomanesia pubescens*. **Ciência Rural** 41 (8): 1362-1368.
- Duval, C. M. **Programa de floricultura**. 2008. EMATER-DF, Brasília, DF. 130p.
<<http://www.embrapa.br/pnrg/redevegetal/projetoscomponentes/pc8/planos-deacao/pa5-conservacao-e-propagacaode-plantas-nativas-do-Cerrado-com-potencial-ornamental>>
Acesso em: 24fev2010.
- Estrela C.; Estrela C. R. A.; Barbin E. L.; Spanó J. C. E.; Marchesan M. A.; Pécora J. D. 2002. Mecanismo de ação do hipoclorito de sódio. **Brazilian Dentist Journal** 13(2):113-117.
- Ezcurra, C. 1993. Systematics of *Ruellia* (Acanthaceae) in Southern South America. **Annals of the Missouri Botanical Garden** 80 (4): 787-845
- Ezcurra, C. 1989. *Ruellia sanguinea* (Acanthaceae) y especies relacionadas en Argentina, Uruguay y sur de Brasil. **Darwiniana** 29: 269-287.
- Ezcurra, C. 2002. El género *Justicia* (Acanthaceae) em sudamérica austral. **Annals of the Missouri Botanical Garden** 89: 225-280.
- Faria, R. R. & Araujo, A. C. 2010. Pollination ecology of *Ruellia angustiflora* (Ness) Lindau ex Rambo (Acanthaceae) in the Serra da Bodoquena, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Flora** 205: 106-111.

- Fermino Junior, P. C. P. & Scherwinski-Pereira, J. E. 2012. Germinação e propagação *in vitro* de cerejeira (*Amburana acreana* (Ducke) A.C. Smith - Fabaceae). **Ciência Florestal** 22 (1): 1-9.
- Ferrari, M. P.; Grossi, F.; Wendling, I. 2004. Propagação vegetativa de espécies florestais. **Documento 94**. Colombo, PR: Embrapa Florestas. 22p
- Ferreira, A. G. & Borghetti, F. 2004. **Germinação: do básico ao aplicado**. Artmed. 324p.
- Ferriani, A. P.; Bortolini, M. F.; Zuffellato-Ribas, K. C.; Koehler, H. S. 2006. Propagação vegetativa de estaquia de azaléia arbórea (*Rhododendron thomsonii* Hook. f.). **Semina: Ciências Agrárias** 27 (1): 35-42.
- Fiszon, J. T. 2003. Causas da Fragmentação: Causas antrópicas. In: **Fragmentação de Ecossistemas: Causas e efeitos sobre a biodiversidade e recomendações de Políticas Públicas**. Rambaldi, D. M, Oliveira D. A. S. de (orgs). Série Biodiversidade 6. Brasília: Ministério do Meio Ambiente/Secretaria de Biodiversidade e Florestas. 510p.
- Fonseca, P. G.; Nunes, U. R.; Nunes, S. C. P. 2012. Aspectos da germinação de sementes de assa-peixe (*Vernonia polyanthes* Less.). **Ciência Rural** 42 (4): 633-637.
- Gomes, M. A. N. & Shepherd, S. L. K. 2000. Estudo de nutrição mineral *in vitro* relacionado à adaptação de *Sinningia allagophylla* (Martius) Wiehler (Gesneriaceae) às condições de Cerrado. **Revista brasileira de Botânica** 23 (2): 153-159.
- Gomes, G. A. C.; Paiva, R.; Herrera, R. C.; Paiva, P. D. O. 2010. Micropropagation of *Maclura tinctoria* L.: An endangered woody species. **Revista Árvore** 34 (1):25-30.
- Gondim, A.; Gondim, P.; Lage, M.; Bonelli, A.; Fraga, F.; Teixeira, G.; Tavares, K. 2005. Jardim de Oportunidades. **Revista SEBRAE de Agronegócios**. n1. 64p.
- Grattapaglia, D. & Machado, M. A. 1998. Micropropagação. In: **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Torres, A.; Caldas, S.; Buso, J. A. EMBRAPA-SPI/ EMBRAPA – CNPH. v 1. Brasília. 508p.
- Graziano, T. T. 2010. **Aprendendo a exportar flores e plantas ornamentais**. Secretaria de Comércio Exterior. SECEX/MDCI. Disponível em: <<http://www.aprendendoaexportar.gov.br/flores/>> Acesso em: 24fev2010
- Graham, V. A. W. 1988. Delimitation and Infra-Generic Classification of *Justicia* (Acanthaceae). **Kew Bulletin** 43 (4): 551-624.
- Grolli, P. R. 1999. Propagação das plantas ornamentais. In: Petry, C. (Ed.). **Plantas ornamentais: aspectos para a produção**. Passo Fundo: Ediupf. p.41-51.
- Guimarães, P. J. F.; Harris, S.; Proença, C. E. B.; Mansano, V. de F.; Zanatta, M. R. V. 2009. **Sistemática das Angiospermas**. UnB. CD-ROM.

- Hartmann, H. T; Kester, D. E; Davies, F. T; Geneve, R. L. 2002. **Plant propagation**. Prentice Hall. 7^oed. 873p.
- Heede, V. D.; Lecourt, M. 1991. **L'Art de Bouturer**. La Maison Rustique. 8^oed. Paris. 159p.
- Hou, G.; Hill, J. P.; Blanca, E. B. 2004. Developmental anatomy and auxin response of lateral root formation in *Ceratopteris richardii*. **Journal of Experimental Botany** 55 (397): 685-693
- IBGE, 1996. Censo Agropecuário de 1995-1996. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/1995_1996/default.shtm>. Acesso em 09fev2010
- IBGE, 2006. Censo Agropecuário de 2006. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/horti/default.asp?t=1&z=t&o=19&u1=1&u2=1&u3=1>>. Acesso em 09fev2010.
- IBRAFLOR, 2008. Floricultura no Brasil: Apontamentos mais relevantes sobre o papel sócio-econômico recente da atividade. **Instituto Brasileiro de floricultura**. Campinas, SP. 5p. Disponível em: <<http://www.ibraflor.org/userfiles/file/Floricultura%20no%20Brasil%20-%20atualizado%2006.2008.pdf>>. Acesso em 09fev2010.
- Joly, A. B. 2002. **Botânica: Introdução à taxonomia vegetal**. 778p.
- Junqueira, K. P.; Junqueira, N. T. V.; Ramos, J. D. 2002. Informações preliminares sobre uma espécie de *Pitaya* do Cerrado. **Documentos** 62. 18p. Planaltina, DF: EMBRAPA
- Junqueira, A. H. & Peetz, M. da S. 2005. **Perfil da Cadeia Produtiva das Flores e Plantas Ornamentais do Distrito Federal**. SEBRAE-DF. Brasília. 118p.
- Junqueira, A. H. & Peetz, M. S. 2008. Exportações de flores e plantas ornamentais superam US\$ 35 milhões em 2007: Recorde e novos desafios para o Brasil - Análise conjuntural da evolução das exportações de flores e plantas ornamentais do Brasil no período de janeiro a dezembro de 2007. São Paulo. Disponível em: <http://www.hortica.com.br/artigos/Balanc_Floricultura_2007.pdf>. Acesso em 15fev2010.
- Junqueira, N. T. V.; Faleiro, F. G. Braga, M. F.; Peixoto, J. R. 2008. Domesticação de espécies da flora nativa do Cerrado. In: Parron, L. M.; Aguiar, L. M. S; Duboc, E.; Oliveira-Filho, E. C.; Camargo, A. J. A.; Aquino, F. G. (eds). **Cerrado - desafios e oportunidades para o desenvolvimento sustentável**. Planaltina, DF. EMBRAPA Cerrados. 464p.
- Kiyuna, I.; Ângelo, J. A.; Coelho, P. J. 2009. Comércio Exterior da Floricultura Brasileira em 2008: lições para o setor. **Análises e Indicadores do Agronegócio** 4 (3): 1-5 .

- Klein, A. L. 2000. **Eugen Warmim e o Cerrado Brasileiro: um século depois.** Unesp/FAPESP. 156p.
- Koipillai, Y. J. & Wilson, S. 2010. *In vitro* propagation of *Graptophyllum pictum* L. (Acanthaceae) - A medicinal plant. **Journal of Pharmacy Research** 3(9): 2201-2202.
- Labouriau, L. G. **A germinação de sementes.** 1983. Organização dos Estados Americanos. Programa Regional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Série de Biologia. Monografia 24: 174.
- Larcher, W. 2000. **Ecofisiologia vegetal.** São Carlos: RiMa, 531p.
- Larraburu, E. E.; Apóstolo, N. M.; Llorente, B. E. 2012. *In vitro* propagation of pink Lapacho: response surface methodology and factorial analysis for optimization of medium components. **International Journal of Forestry Research** 2012:1-9.
- Laubscher, C. P. & Ndakidemi, P. A. 2008. Rooting success using IBA auxin on endangered *Leucadendron laxum* (Proteaceae) in different rooting mediums. **African Journal of Biotechnology** 7 (19): 3437-3442
- Lemos, W. de P.; Ribeiro, R. C.; Oliveira, E. L. A.; Souza, M. T. de; Costa, M. B. de O. 2007. Inimigos naturais de pragas em cultivos de helicônia e bastão-do-imperador no nordeste paraense. **Comunicado Técnico 203.** EMBRAPA Amazônia Oriental.
- Leprince, O.; Harren, F. J. M.; Buitink, J.; Alberba, M.; Hoekstra, F.A. 2000. Metabolic dysfunction and unabated respiration precede the loss of membrane integrity during dehydration of germinating radicles. **Plant Physiology** 122 (2):597-608.
- Lester, R. N. & Ezcurra, C. 1991. Enzyme etching treatment as an aid in the study of seed surface sculpture in *Justicia* and *Ruellia* (Acanthaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society** 105: 285-288.
- Lima, N. S., Vieira, M. F., Carvalho-Okano, R. M., Azevedo, A. A., 2005. Cleistogamia em *Ruellia menthoides* (Nees) Hiern e *Ruellia brevifolia* (Pohl) C. Ezcurra (Acanthaceae) em fragmento florestal do Sudeste brasileiro. **Acta Botânica Brasilica** 19: 443- 449.
- Lima, S. C. de & Machado, E. 2003. A história dos Jardins. *In: Manual de jardinagem e produção de mudas do departamento de parques e jardins.* Francisco Ozanan Correia Coelho de Alencar (coord.). NOVACAP, Brasília- DF. 136p.
- Lloyd, G. & McCown, B. 1981. Commercially feasible micropropagation of mountains laurel, *Kalmia latifolia* by use of shoot tip culture. **Combined Proceedings of the International Plant Propagators Society** 30: 327- 421.
- Lone, A. B.; Unemoto, L. K.; Yamamoto, L. Y.; Costa, L.; Schnitzer, J. A.; Sato, A. J.; Ricce, W. da S.; Assis, Adriane M. de; Roberto, S. R. 2010. Enraizamento de estacas de azaléia

- (*Rhododendron simsii* Planch.) no outono, em AIB e diferentes substratos. **Ciência Rural** 40 (8): 1720-1725.
- Lopes, H. M. & Souza, C. M. 2008. Efeitos da giberelina e da secagem no condicionamento osmótico sobre a viabilidade e o vigor de sementes de mamão (*Carica papaya* L.). **Revista Brasileira de Sementes** 30 (1): 181-189.
- Martins L. M.; Pereira, A. M. S.; França, S. de C.; Bertoni, B. W. 2011. Micropropagação e conservação de *Macrosyphonia velame* (St. Hil.) Muell. Arg. em banco de germoplasma *in vitro*. **Ciência Rural** 41 (3): 454-458
- Matteucci, M. B. de A.; Guimarães, N. N. R.; Tiveron, D. F.; Santos, C. 1995. A flora do Cerrado e suas formas de aproveitamento. **Anais da Escola de Agronomia e Veterinária** 25(1): 13-30.
- Mcdade, L. A.; Daniel, T. F.; Kiel, C. A. 2008. Toward a comprehensive understanding of phylogenetic relationships among lineages of Acanthaceae (Lamiales). **American Journal of Botany** 95(9): 1136-1152.
- MDIC. 2010. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. **Tarifa externa comum**. Sessão 2, capítulo 6. Disponível em: <<http://www.desenvolvimento.gov.br/sitio/interna/interna.php?area=5&menu=109>>. Acesso em 06fev2010.
- Medeiros, M. B. de; Favero, A. P.; Salomão, A. N.; Buso, G. S. C.; Cavalcanti, T. B. 2010. **Conservação e Propagação de Plantas Nativas do Cerrado com Potencial Ornamental**. EMBRAPA - Cenargen. Disponível em: <<http://plataformarg.cenargen.embrapa.br/pnrg/redevegetal/projetoscomponentes/pc8/planos-de-acao/pa5-conservacao-e-propagacaode-plantas-nativas-do-Cerrado-com-potencial-ornamental>> acesso em: 24fev2010.
- Meletti, L. M. M.; Bernacci, L. C.; Soares-Scott, M. D.; Azevedo Filho, J.A.; Martins, A. L. M. 2003. Variabilidade genética em caracteres morfológicos, agrônômicos e citogenéticos de populações de maracujazeiro-doce (*Passiflora alata* Curtis). **Revista Brasileira de Fruticultura** 25 (2): 275-278.
- Mello Filho, L. E. 1988. Plantas ornamentais em paisagismo. In: **Anais do Encontro Nacional sobre floricultura e plantas ornamentais**. Porto Alegre. p.55- 63.
- Melo, J. T. de; Torres, R. A. de A.; Silveira, C. E. S. Caldas, L. S. 2008. Coleta, Propagação e Desenvolvimento Inicial de Plantas do Cerrado. In: **Cerrado: ecologia e flora**. Sano, S.M.; Almeida, S. P. de; Ribeiro, J. F. (eds). EMBRAPA Cerrados. EMBRAPA Informação Tecnológica. Brasília, DF. pp.319-342

- Mendonça, R. C.; Felfili, J. M.; Walter, B. M. T.; Silva Júnior, M. C.; Rezende, A. R.; Filgueiras, T. S.; Nogueira, P. E. Fagg, C. W. 2008. Flora vascular do bioma Cerrado. In: **Cerrado: ecologia e flora**. Sano, S. M.; Almeida, S. P. de; Ribeiro, J. F. (edt). EMBRAPA-Cerrados. EMBRAPA-Informação Tecnológica. Brasília, DF.v2. 1279 p.
- Monteiro, K. L.; Oliveira, C. de; Silva, B. M. da S.; Moro, F. V.; Carvalho, D. A. de. 2011. Caracterização morfológica de frutos, de sementes e do desenvolvimento pós-seminal de *Licania tomentosa* (Benth.) Fritsch. **Ciência Rural** 42(1): 90-97.
- Murashige, T. & Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum** 15 (3): 473-497.
- Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue cultures. **Annual Review of Plant Physiology** 25: 135-166.
- Müller, C. H.; Oliveira, R. P.; Castro, N. H. C.; Calzavara, B. B. G.; Menezes, I. C. 1990. Enraizamento de estacas de urucuzeiro *Bixa orellana* L. **Circular Técnica** 55. EMBRAPA-CPATU. 15p.
- Myers, N. R.; Mittermeier, R. A.; Mittermeier, C. G.; Fonseca, G. A. B. Kent, J. 2000. Biodiversity hotspot for conservation priority. **Nature** 403: 853-858.
- Nath, S. & Buragohain, A. K. 2005. Micropropagation of *Adhatoda vasica* Nees – A woody medicinal plant by shoot tip culture. **Indian Journal of Biotechnology** 4: 396-399.
- NOVACAP. 2009. **Programa de arborização 2008/2009 – Relatório de plantio**. Departamento de Parques e Jardins / NOVACAP. 139p.
- Nunes, C. F.; Pasqual, M.; Santos, D. N. dos; Custódio, T. N.; Araújo, A. G. de. 2008. Diferentes suplementos no cultivo *in vitro* de embriões de pinhão-mansão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 43 (1): 9-14.
- Ohland, T.; Pio, R.; Chagas, E. A.; Barbosa, W.; Dalastra, I. M.; Kotz, T. E. 2009. Enraizamento de estacas apicais lenhosas de figueira ‘roxo de valinhos’ com aplicação de AIB e cianamida hidrogenada. **Revista Brasileira de Fruticultura** 31 (1): 273-279.
- Oliveira, A. F. M.; Xavier, H. S.; Silva, N. H.; Andrade, L. H. C. 2000. *Screening* cromatográfico de Acantáceas medicinais: *Justicia pectoralis* Jacq. e *Justicia gendarussa* Burm. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais** 3 (1):37-41
- Oliveira, A. A. P. & Brainer, M. S. de C. P. 2007. **Floricultura: caracterização e mercado**. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil – ETENE, n.16. 180p.
- Palazzo Junior, J. T. & Both, M. do C. 1993. **Flora ornamental brasileira: um guia para o paisagismo ecológico**. Porto Alegre: Sagra-Dc Luzzato. 183p.

- Paul, S.; Kumaria, S.; Tandon, P. 2012. An effective nutrient medium for asymbiotic seed germination and large-scale *in vitro* regeneration of *Dendrobium hookerianum*, a threatened orchid of northeast India. **AoB Plants**: plr032; doi:10.1093/aobpla/plr032.
- Pereira, B. A. 1984. Rubiáceas ornamentais do Distrito Federal. **Rodriguésia** 36 (59): 73-78.
- Pereira, A. da S. 1996. Flora Nativa. In: **Alternativas de desenvolvimento de Cerrados: manejo e conservação dos recursos naturais renováveis**. Dias, B. F. S. (coord.). Brasília, DF: Fundação Pró-natureza. 97p.
- Pereira-Netto, A. B. de & McCown, B. H. 1999. Thermally induced changes in shoot morphology of *Hancornia speciosa* microcultures: evidence of mediation by ethylene. **Tree Physiology** 19: 733-740.
- Pereira, C. E.; Pinho, E.V.R.V.; Oliveira, D. F.; Kikuti, A. L. P. 2002. Determinação de inibidores da germinação no espermoderma de sementes de café (*Coffea arabica* L.). **Revista Brasileira de Sementes** 24 (1): 306-311.
- Pereira Júnior, A. A.; Nascimento, A. J. do, Machado, E.; Araújo, G. H. M. F. de; Pacheco, L. G. A.; Silva, M. A.; Rodrigues, M. das G. R.; Cordeiro, R. G.; Ulhoa, S. C.; Gonzalez, S.; Lima, S. C. de. 2003. **Manual de jardinagem e produção de mudas do departamento de parques e jardins**. NOVACAP, Brasília, DF. 136p.
- Pinheiro, C. S. R.; Medeiros, D. N. de; Macedo, C. E. C. de; Alloufa, M. A. I. 2001. Germinação *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomez) em diferentes meios de cultura. **Revista Brasileira de Fruticultura** 23 (2): 413-416.
- Pinho, L.; Souza, P. N. S.; Sobrinho, E. M.; Almeida, A. C. de; Martins, E. R. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoolicos das folhas de alecrim-pimenta, aroeira, barbatimão, erva baleeira e do farelo da casca de pequi. **Ciência Rural** 42 (2): 326-331.
- Ramalho, C. L. & Proença, C. E. B. 2004. **Trepadeiras Ornamentais do Cerrado**. Planaltina: Embrapa Cerrados, Brasília: UnB. 59p.
- Ratter, J. A.; Ribeiro, J. F.; Bridgewater, S. 1997. The Brazilian Cerrado vegetation and threats to its biodiversity. **Annals of Botany** 80: 223-230.
- Rego, M. M.; Araújo, E. R.; Rego, E. R.; Castro, J. P. 2009. *In vitro* seed germination of mandacaru (*Cereus jamacaru* DC.). **Revista Caatinga** 22 (4): 34-38.
- Reatto, A.; Correia, J. R.; Spera, S. T.; Martins, E. S. 2008. Solos do bioma Cerrado: Aspectos pedológicos. In: **Cerrado: Ecologia e Flora**. Sano, S. S. M.; Almeida, S. P. de; Ribeiro, J. F. Planaltina, EMBRAPA. pp 107-134.
- Rios, M. N.; Ribeiro, J. F.; Rezende, M. E. 2001. Propagação vegetativa: enraizamento da estacas de espécies nativas de Mata de Galeria. In: Ribeiro, J. F.; Silva, J. C. S.; Fonseca,

- C. E. L. (eds.). **Cerrado: caracterização e recuperação de matas de galeria**. Planaltina, DF. EMBRAPA Cerrados. p. 455-491.
- Rodrigues, V. G. S. 2007. Recomendações técnicas para a propagação de flores tropicais em Rondônia. **Comunicado Técnico 328**. EMBRAPA Rondônia.
- Salomão, A. N.; Sousa-Silva, A. C.; Davide, A. C.; Gonzáles, S.; Torres, R. A. A.; Wetzel, M. M. V.S.; Firetti, F. Caldas, L. S. 2003. **Germinação de sementes e produção de mudas de plantas do Cerrado**. Rede de sementes do Cerrado. Brasília. 96p.
- Santos, N. R. Z. dos & Teixeira, I. F. 2001. **Arborização de vias urbanas: ambiente x vegetação**. Instituto Souza Cruz. 1ªed. 135p.
- Santos, H. A. dos; Mello, S. C. M.; Peixoto, J. R. 2010. Associação de isolados de *Trichoderma* spp. e ácido indol-3butírico (AIB) na promoção de enraizamento de estacas e crescimento de maracujazeiro. **Bioscience Journal** 26 (6): 966-972.
- Scalon, S. P. Q.; Mussury, R. M.; Rosa, G. T. S.; Moraes, K. C.; Scalon Filho, H. 2009. Enraizamento e germinação na propagação de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (ginseng-brasileiro). **Ciência e Agrotecnologia** 33 (5): 1249-1254.
- SEBRAE, Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. Disponível em: <<http://www.sebrae.com.br/setor/floricultura>>. Acesso em 17fev2010
- Shahzad, A.; Faisal, M.; Ahmad, N.; Anis, M.; Alatar, A.; Hend, A. A. 2012. An efficient system for *in vitro* multiplication of *Ocimum basilicum* through node culture. **African Journal of Biotechnology** 11(22): 6055-6059.
- Sigrist, M. R. & Sazima, M. 2002. *Ruellia brevifolia* (Pohl) Ezcurra (Acanthaceae): fenologia da floração, biologia da polinização e reprodução. **Revista Brasileira de Botânica** 25: 35-42.
- Silva Júnior, M. C.; Farias, S. B.; Sanchez, M.; Souza, R. C. P. F. 2001. Avaliação da arborização urbana em Brasília: contribuição para a reestruturação do Cerrado. In: **9º Encontro Nacional de Arborização Urbana**. Resumo. Brasília, DF, p. 37.
- Silva, F. A. B. da; Pereira, L. A. R.; Silveira, C. E. dos S. 2008. Micropropagation of *Alibertia edulis* Rich. **Brazilian Archives of Biology and Technology** 51(6): 1103-1114
- Souza, H. M. & Lorenzi, H. 2001. **Plantas ornamentais no Brasil: arbustivas herbáceas e trepadeiras**. 3ªed. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum. 1120p.
- Souza, V. C. & Lorenzi, H. 2008. **Botânica Sistemática - Guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II**. 2ªed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum. 640p.

- Srivastava, N.; Kamal, B.; Sharma, V.; Negi, Y. K.; Dobriyal, A. K.; Gupta, S.; Jadon, V. S. 2010. Standardization of sterilization protocol for micropropagation of *Aconitum heterophyllum* - an endangered medicinal herb. **Academic Arena** 2(6):37- 42.
- Ugraiah, A.; Karuppusamy; S.; Pullaiah, T. 2011. Micropropagation of *Marsdenia brunoniana* Wight & Arn. a rare antidiabetic Plant. **Plant Tissue Culture & Biotechnology** 21(1): 89-93.
- Ulisses, C.; Camara, T. R.; Willadino, L.; Albuquerque, C. C. de; Brito, J. Z. de. 2010. Early somatic embryogenesis in *Heliconia chartacea* Lane ex Barreiros cv. Sexy Pink ovary section explants. **Brasilian Archives of Biology and Technology** 53(1): 11-18.
- Vieira, R. F.; Costa, T. da S. A.; Silva, D. B.; Ferreira, F. R.; Sano, S. M. 2006. **Frutas nativas da região Centro-Oeste**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 320 p.
- Vilar, T. S. 2009. **Acanthaceae Juss. no Distrito Federal, Brasil**. Dissertação em Botânica, UnB, Brasília. 125p.
- Vujanovic, V.; St-Arnaud; M.; Barabeâ, D.; Thibeault, G. V. 2000. Viability testing of orchid seed and the promotion of colouration and germination. **Annals of Botany** 86: 79-86.
- Wasshausen, D. C. & Wood, J. R. I. 2004. Acanthaceae of Bolivia. **Contributions from the United States National Herbarium** 49: 1-152.
- Wochok, Z. S. 1981. The role of tissue culture in preserving threatened and endangered plant species. **Biological Conservation** 20: 83-89.
- Ziller, S. R. 2001. Plantas exóticas invasoras: a ameaça da contaminação biológica. **Ciência Hoje** 178: 77-79.

CAPÍTULO I

**Germinação *in vitro* e micropropagação de
Justicia lanstyakii Rizz., *Ruellia nitens* (Nees) Wassh.
e *Ruellia inkompta* (Nees) Lindau**

Germinação *in vitro* e micropropagação de *Justicia lanstykii* Rizz., *Ruellia nitens* (Nees) Wassh. e *Ruellia incompta* (Nees) Lindau

RESUMO

O emprego de espécies nativas no mercado regional de plantas ornamentais pode tornar o mercado mais competitivo, pois as espécies são adaptadas ao ambiente do Cerrado, reduzindo os custos de produção e manutenção. Além disso, a propagação de espécies nativas é uma forma de conservação desse bioma, que tem sofrido redução da biodiversidade em função de vários fatores, tais como a agricultura. O conhecimento sobre propagação de espécies nativas do Cerrado ainda é escasso, principalmente para o estrato herbáceo-arbustivo. Uma técnica utilizada para a produção dessas mudas é a cultura *in vitro*, que possibilita a produção de grande quantidade de plantas de alta qualidade fitossanitária e em qualquer época do ano. O objetivo do trabalho foi o de verificar o potencial germinativo *in vitro* e a micropropagação de *Justicia lanstykii*, *Ruellia nitens* e *Ruellia incompta*. Sementes foram desinfestadas com etanol 70% por 1 min, hipoclorito de sódio comercial (NaClO), 2 a 2,5% de cloro ativo, por 5, 15 e 30 min e inoculadas em ágar-água, MS 50% e MS 100%, todos sem sacarose. Foram avaliados o número de sementes desinfestadas, germinadas, tempo médio de germinação (TMG), número de plântulas normais, o comprimento da parte aérea e da raiz primária. Na micropropagação, brotos coletados de matrizes adultas foram imersos em fungicida (Carbendazim) por 60 min, etanol 70% por 1 min e testou-se dois tipos de solução comercial de hipoclorito: cálcio (Ca(ClO)₂), e sódio (NaClO), por 15, 30 e 60 min. Os brotos foram inoculados em meio MS, com 0,0; 0,01; 0,1 mg.L⁻¹ de BAP por dois subcultivos. No enraizamento, brotos foram inoculados em meio MS com 0,0 e 0,01 mg.L⁻¹ de AIB. Avaliou-se o número de explantes descontaminados, de segmentos nodais novos e presença de raízes. Sementes de *J. lanstykii* foram 100% descontaminadas e germinadas nos três tempos de imersão; mas 15 min (3,8 dias) e 30 min (3,6 dias) aceleraram o TMG. Sementes de *R. nitens* tiveram acima de 50,0% de descontaminação e maior germinação em 15 min de exposição ao hipoclorito (88,9%) e MS 50% (90,3%). O TMG foi retardado pelo hipoclorito por 30 min (5,1 dias). O comprimento de parte aérea e raiz foram maiores em MS 50%. Sementes de *R. incompta* foram descontaminadas e germinadas acima de 90%. O comprimento de parte aérea e raiz não diferiram entre os tratamentos. Na micropropagação, o hipoclorito de cálcio por 30 min é mais indicado para a desinfestação de brotos de *J. lanstykii*, *R. nitens* pois propiciou maior sobrevivência, mas em *R. incompta* o protocolo teve menor descontaminação (40,5%). As concentrações de BAP não diferiram no número de segmentos nodais das espécies, mas o segundo subcultivo apresentou maior média do número de nós em *J. lanstykii* (2,5 nós). Ocorreu enraizamento em *J. lanstykii*, tanto em 0,0 (60%) quanto 0,01 mg.L⁻¹ de AIB (40%), mas não ocorreu em *R. nitens*.

Palavras-chave: Cerrado, espécies nativas, cultura *in vitro*, BAP

***In vitro* germination and micropropagation of *Justicia lanstykii* Rizz., *Ruellia nitens* (Nees) Wassh. e *Ruellia incompta* (Nees) Lindau**

ABSTRACT

The use of native species in regional market of ornamental plants can make the trade more competitive. These species are adapted to the savanna's environment, reducing production costs and maintenance. Furthermore, the propagation of native species is a form of conservation of this biome, which has suffered a reduction of biodiversity due to several factors, such as agriculture. Knowledge about the propagation of native species of the Cerrado is still scarce, especially for the herbaceous and shrub. A technique for production of seedlings is the *in vitro* culture, which allows the production of large quantities of high quality plants and phytosanitary at any time of the year. The objective was to determine the potential of *in vitro* germination and micropropagation of *Justicia lanstykii*, *Ruellia nitens* e *Ruellia incompta*. Seeds were disinfected with 70% alcohol for 1 min. Additionally, the seeds were soaked in commercial bleach with 2-2.5% of active chlorine for 5, 15, 30 min and inoculated in agar solution, MS medium and MS diluted to 50%, all without sucrose. It was evaluated the number of disinfected seeds, germinated seeds, mean of germination time (MGT), number of normal seedlings, the length of shoot and primary root. Shoots collected from adult matrices were immersed in fungicide (Carbendazim) for 60 min, 70% ethanol for 1 min and tested for two types of commercial solution of hypochlorite: calcium ($\text{Ca}(\text{ClO})_2$), 6 g.L^{-1} , and NaClO, 6%, for 15, 30 and 60 min. For multiplication, shoots were inoculated in MS medium with 0.0, 0.01, 0.1 mg.L^{-1} BAP in two subcultures. During rooting, shoots were placed on MS with 0.0 and 0.01 mg.L^{-1} IBA. It was evaluated number of disinfested explants, number of new nodal segments and presence of roots. The percentage of highest germination and disinfestation (100%) in *J. lanstykii* was obtained in all three hypochlorite immersion times. But 15 min (3.8 days) and 30 min (3.6 days) accelerated the MGT. The percentage of *R. nitens*'s disinfestation was up to 50% and the highest germination was at 15 min (88,9%) of hypochlorite and MS 50% (90,3%). The MGT was delayed by hypochlorite 30 min (5.1 days). The length of aerial part and root was bigger at MS 50%. The percentage of disinfestation and germination of *R. incompta* was up to 90 %. The length of aerial part and root did not differ among treatments. Calcium hypochlorite for 30 min is best indicated for shoot disinfestation of shoots de *J. lanstykii* and *R. nitens*. But the disinfestations protocol needs to be improved for *R. incompta*. The BAP concentrations did not differ at number of new nodal segments from three species. Rooting was positive for *J. lanstykii* in both 0.0 and 0.01 mg.L^{-1} IBA, but it did not occur at *R. nitens*.

Key-words: Cerrado, native species, *in vitro* culture, BAP

1. INTRODUÇÃO

A produção de flores e plantas ornamentais é um setor econômico importante no mundo, pois movimentada cerca de US\$ 100 bilhões ao ano (Kiyuna *et al.* 2009). Embora o Brasil exporte apenas 2,7% do que é produzido no país, esse mercado está em expansão e tem grande potencial devido à presença de condições favoráveis de cultivo e da grande biodiversidade da flora (Junqueira & Peetz 2002; Joly *et al.* 2011).

Dentre as famílias importantes para esse setor Acanthaceae Juss. é reconhecida por ter representantes de considerável beleza. Em razão disso muitas espécies exóticas são empregadas na ornamentação, tais como *Graptophyllum pictum* Griff., *Hypoestes phyllostachya* Baker, *Pachystachys lutea* Nees, *Pseuderanthemum carruthersii* (Seem.) Guillaumin e *Thunbergia mysorensis* (Wight) T. Anderson (Meyer & Lavergne 2004). No Cerrado, foram catalogadas 165 espécies dessa família, que possuem grande potencial para ampliar o leque de espécies ornamentais (Wasshausen & Wood 2004; Mendonça *et al.* 2008).

Justicia L. e *Ruellia* L. são os maiores gêneros da família, possuindo, respectivamente, 600 e 250 espécies, entre ervas, subarbustos e arbustos distribuídas nos trópicos e subtropicais (Graham 1988; Wasshausen & Wood 2004). Devido às semelhanças filogenéticas, esses gêneros são considerados irmãos (McDade *et al.* 2008). Em *Justicia*, além das flores delicadas, algumas espécies possuem inflorescências com brácteas de tonalidades marcantes, como em *Justicia brandegeana* Wassh. & L. B. Sm., camarão-vermelho (Ezcurra 1993; Graham 1988). Nichols (2005) afirma que espécies desse gênero são pioneiras em ambiente natural, sendo essa característica interessante para recomposição de áreas degradadas.

As flores de *Ruellia* chamam atenção por serem grandes, vistosas e coloridas (Ezcurra 1993). *Ruellia nitens* (Nees) Wassh. e *Ruellia incompta* (Nees) Lindau, são atrativas pela coloração das flores, de tom azulado e pelo período de floração relativamente prolongado, de abril a setembro (Vilar 2009), além do porte subarborescente, que é adequado para a formação de maciços (Padilha, com.pess. 2011*).

*Dr. Fábio Alessandro Padilha. Professor visitante do Departamento de Agronomia da UnB. Especialista em Paisagismo. Comunicação pessoal em 20 setembro 2011.

Visando à comercialização, a propagação sexuada de *Ruellia* e *Justicia* apresenta restrições. Os frutos desses gêneros são modificados do restante da família, pois a porção do terço médio-inferior é estéril, geralmente, o que reduz o número de sementes disponíveis, restando entre quatro e dez sementes por fruto em *Ruellia* e no máximo quatro em *Justicia* (Barroso *et al.* 1999). Além do número relativamente reduzido de sementes, outro problema que atinge tais espécies é a fragmentação do Cerrado, bioma em que estão presentes e que tem sofrido perda da diversidade em razão abertura de áreas para atividades agropecuárias e da invasão de gramíneas africanas (Klink & Machado 2005; Sano *et al.* 2010).

Para as espécies que não disponibilizam sementes o ano todo, ou ainda quando o material vegetativo é limitado para uso na propagação tradicional, a cultura de tecidos *in vitro* é uma alternativa que permite a produção de mudas em larga escala, principalmente para aquelas ameaçadas de extinção (Wochok 1981; Sarasan *et al.* 2011). Dentro da cultura *in vitro*, existem várias subáreas, tais como a germinação (Paul *et al.* 2012) e a micropropagação (Northcutt *et al.* 2012).

Uma das vantagens da germinação *in vitro* é a possibilidade das plântulas serem fontes de explantes para a micropropagação, tendo em vista que sementes são, geralmente, menos contaminadas que brotos retirados do campo e resistem melhor aos tratamentos de desinfestação (Melo *et al.* 2008; Martins *et al.* 2011). Com a micropropagação, produz-se grande quantidade de brotos em qualquer época do ano, em um reduzido espaço físico e com maior qualidade fitossanitária do material cultivado (Grattapaglia & Machado 1998; Erig & Schuch 2005).

Algumas espécies de Acanthaceae exóticas já foram micropropagadas, entre elas *Adhatoda vasica* Nees (Nath & Buragohain 2005), *Andrographis paniculata* Nees (Prathanturarug *et al.* 1996) e *Justicia gendarusa* Burm. f. (Thomas & Yoichiro 2010), onde foram produzidos brotos a partir de nós. Em *Crossandra infundibuliformis*, obteve-se maior taxa de multiplicação de brotos em meio MS com 1,0 mg.L⁻¹ de BAP (Girija *et al.* 1999).

A regeneração *in vitro*, por meio da embriogênese somática e organogênese direta foi observada em *Hygrophila spinosa* T. Anders (Varshney *et al.* 2009) e *Beloperone plumbaginifolia* (Jacq.) Nees. (Shameer *et al.* 2009), esta última espécie nativa do Brasil.

A propagação de plantas ornamentais nativas do Cerrado proporciona ganhos ambientais em relação às espécies ornamentais exóticas, pois é uma forma de manutenção *ex situ* da biodiversidade. Além disso, as espécies nativas exigem menos recursos para a sua manutenção, pois são mais adaptadas às condições edafo-climáticas desse bioma. Dentro deste contexto, o objetivo do trabalho foi estudar a germinação *in vitro* e estabelecer um

protocolo de micropropagação a partir de microestacas de *R. nitens*, *R. incompta* e *J. lanstyakii*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Origem e coleta dos explantes

Foram coletadas sementes e plantas adultas com sistema subterrâneo de *Justicia lanstyakii*, *Ruellia nitens* e *Ruellia incompta* (Tabela 1).

As sementes foram retiradas de frutos maduros, coletados em Cerrado *stricto sensu* ou Campo Sujo, durante os meses de setembro e outubro. Para a coleta, ramos contendo os frutos ainda fechados, foram previamente envolvidos em sacos (5,0 x 8,0 cm) feitos de tule (poliamida), para conter as sementes depois da abertura do fruto. Os ramos com os sacos foram coletados após a deiscência dos frutos. As sementes foram armazenadas em envelopes de papel, até a chegada ao laboratório de Cultura de Tecidos da UnB, para serem imediatamente utilizadas nos experimentos.

Indivíduos inteiros com sistema subterrâneo das três espécies foram retirados do Memorial das Idades do Brasil - MI trecho 11 chácara 258, Setor de Mansões do Lago Norte – DF (15°46'47,4''S e 47°50'2,4''W), colocados em vasos de plástico preto (26,0x19,0x22,0 cm) com solo do local e transferidos para estufa da prefeitura da UnB. A estufa, não climatizada automaticamente, possui cobertura de plástico (polietileno), temperatura média de 40 °C, umidade relativa 95%.

Ramos férteis de *J. lanstyakii*, *R. nitens* e *R. incompta* foram herborizados e depositados no Herbário da Universidade de Brasília (UB), sob o número de registro respectivamente UB27-Lima, M.R, UB25-Lima, M.R, UB 24 e 26-Lima, M.R,

2.2 Biometria das sementes

Uma amostra de 30 sementes do lote coletado de *R. nitens*, *R. incompta* e 20 de *J. lanstyakii* foi utilizada para determinar o comprimento, a largura e a espessura por meio de paquímetro digital (Starret®). O comprimento foi considerado como a maior distância entre as extremidades da semente e a largura como sua maior extensão na perpendicular do comprimento. O peso foi medido por meio de balança de precisão (Ohaus®), com quatro casas decimais.

Tabela 1. Material coletado, número de matrizes (N°), local de coleta e respectiva coordenada geográfica e fitofisionomia do local das matrizes de *Justicia lanstyakii*, *Ruellia nitens* e *Ruellia incompta*.

Espécie	Material coletado	N°	Local de coleta	Coordenada Geográfica	Fitofisionomia
<i>J. lanstyakii</i>	sementes/ matrizes	4/7	Memorial das Idades do Brasil	15°46'47,4''S e 47°50'2,4''W	Cerrado <i>stricto sensu</i>
<i>J. lanstyakii</i>	sementes	8	Poço Azul - DF	15°35'26,3''S e 48°03'0,2''W	Campo sujo
<i>R. nitens</i>	sementes	32	Poço Azul - DF	15°35'20,0''S e 48°02'0,2''W	Campo sujo
<i>R. nitens</i>	matrizes	9	Memorial das Idades do Brasil	15°46'47,4''S e 47°50'2,4''W	Cerrado <i>stricto sensu</i>
<i>R. incompta</i>	sementes	5	Fazenda Água Limpa (UnB)	15°56'47,5''S e 47°57'16,8''W	Cerrado <i>stricto sensu</i>
<i>R. incompta</i>	sementes	12	Centro Olímpico (UnB)	15°45'59,7''S e 47°51'20,6''W	Cerrado <i>stricto sensu</i>
<i>R. incompta</i>	sementes	10	Jardim Botânico de Brasília	15°52'34,2''S e 47°49'35,0''W	Campo Sujo
<i>R. incompta</i>	matrizes	5	Memorial das Idades do Brasil	15°46'47,4''S e 47°50'2,4''W	Cerrado <i>stricto sensu</i>

2.3 Desinfestação das sementes, germinação e desenvolvimento da plântula *in vitro*

Para a germinação e desenvolvimento *in vitro*, grupos de 12 sementes de *R. nitens*, *R. incompta* e *J. lanstykii* foram envolvidos em gaze e desinfestadas por imersão, sob agitação manual, em álcool etílico a 70% por 1 min, solução comercial de hipoclorito de sódio (NaClO) com 2 a 2,5% de cloro ativo (Qboa[®]), em três períodos de imersão: 5, 15 e 30 min. Logo após, seguiu-se com três enxágües de 1 min em água destilada, deionizada e autoclavada.

As sementes de *R. nitens*, *R. incompta* foram colocadas para germinar em tubos de ensaio (2,5 x 15,0 cm), fechados com tampas plásticas e vedados com filme de PVC (película de polivinilcloreto). Os tubos continham três tipos de meio de cultura: ágar-água, MS 100% (Murashige & Skoog 1962) e MS com metade da concentração de macro e micronutrientes (MS 50%), sem sacarose, sendo que em todos foi adicionado 7,5 g.L⁻¹ de ágar, com pH dos meios ajustado para 5,7-5,8 e autoclavados por 20 min, a 121°C e 105 KPa. Todo o procedimento foi realizado em câmara de fluxo laminar horizontal. As sementes de *J. lanstykii*, devido à pequena quantidade coletada (20 sementes), foram colocadas somente no ágar-água.

O experimento foi inteiramente casualizado, contendo quatro repetições de seis sementes por tratamento para *R. nitens* e *R. incompta*, além de uma repetição de cinco sementes para *J. lanstykii*, sendo que cada tubo de ensaio (2,5 x 15,0 cm) continha uma semente. As sementes foram colocadas na sala de crescimento do Laboratório de Cultura de Tecidos da UnB, com temperatura 25±2 °C, fotoperíodo de 16h e irradiância de 41µmoles.m².s⁻¹. O efeito da desinfestação foi observado no 30º dia, as observações da germinação foram encerradas aos 30 dias de cultivo, e as observações do desenvolvimento da plântula foram feitas com 30 e 60 dias.

As sementes que não foram contaminadas e não germinaram foram submetidas ao teste de tetrazólio (2,3,5 trifeniltetrazólio) para verificar a viabilidade. Para isso, as sementes foram seccionadas longitudinalmente e colocadas em solução de tetrazólio a 1%, por 24h, no escuro e em temperatura ambiente (Grabe 1976). Ao fim do período foi examinada a coloração dos embriões, onde a indicação de viabilidade foi observada pela coloração vermelha.

O critério de germinabilidade utilizado foi o surgimento da raiz primária, os quais foram observados diariamente. Foram admitidas como plântulas normais àquelas que possuísem todas as suas estruturas essenciais (sistema radicular, parte aérea e cotilédones) bem desenvolvidas, completas e sadias (MAPA 2009).

Foi observado o número de sementes descontaminadas, germinadas, e tempo médio de germinação (t), que foi calculado segundo a equação abaixo (Ferreira & Borghetti 2004):

$$t = \frac{\sum n_i t_i}{\sum n_i}$$

em que:

n_i – número de sementes germinadas por dia

t_i – tempo de incubação em dias

Para analisar o desenvolvimento das plântulas foi observado o número de plântulas normais, o comprimento da parte aérea e da raiz primária em 30 e 60 dias. Foi realizado teste Anova e teste de comparação de médias, Tukey, a 5% de probabilidade, através do pacote estatístico SAS (versão 9.1) (Herath *et al.* 2008). Os dados de porcentagem foram transformados para arco-seno $\sqrt{x/100}$. Quando não houve interação entre os fatores, ou quando houve influência dos fatores independentemente, os dados foram agrupados para facilitar a compreensão dos resultados.

2.4 Micropropagação de explantes provenientes de matrizes adultas

Devido à dificuldade de desinfestação de material retirado diretamente do campo, indivíduos adultos de *R. nitens*, *R. incompta* e *J. lanstykii* foram coletados inteiros do campo, acondicionados em recipientes de cultivo com solo do local e cultivados em estufa não climatizada (ambiente menos propenso a contaminação) com cobertura de plástico polietileno, com média de 40°C, e irrigação três vezes ao dia. Depois de um mês, as plantas foram transferidas para o laboratório de cultura de tecidos da UnB para a retirada dos brotos recém formados.

As jovens brotações axilares ou apicais foram retiradas das matrizes e cortadas em segmentos com cerca de 6,0 cm para lavagem em água corrente por 10 min, visando à remoção superficial de partículas e poeira dos tecidos. Posteriormente, as folhas dos segmentos foram cortadas pela metade. Após, os segmentos foram excisados para 1,0 cm de comprimento, contendo uma par de gemas. Os segmentos foram submetidos à imersão, sob agitação manual, em fungicida Derosal[®] (princípio ativo Carbendazim 500 g.L⁻¹), 250 mL.L⁻¹ por 60 min e álcool etílico 70% por 1 min. Testaram-se dois tipos de solução comercial de hipoclorito: de cálcio, Ca(ClO)₂ (Hidroazul[®]) o qual foi dissolvido 6 g.L⁻¹ em água destilada e filtrado; e de sódio, NaClO (Start[®]), a 12% de cloro ativo, que foi diluído a 6%. Três tempos de imersão nos hipocloritos foram avaliados, 15, 30 e 60 min, seguidos de três enxágües de 1 min em água destilada, deionizada e autoclavada.

O experimento foi inteiramente casualizado, contendo quatro repetições de seis explantes por repetição, totalizando 24 explantes por tratamento, sendo que cada explante permaneceu em um tubo de ensaio (2,5 x 15,0 cm), mantidos com temperatura 25±2 °C, fotoperíodo de 16h e intensidade luminosa de 41 µmoles.m⁻².s⁻¹.

A avaliação do tratamento de desinfestação foi feita no 30º dia de cultivo, com a contagem de explantes descontaminados e de sobreviventes. Realizou-se o teste Anova e teste de comparação de médias, Tukey, a 5% de probabilidade, com o programa estatístico SAS (versão 9.1). Os dados em porcentagem foram transformados em arco-seno $\sqrt{(x)/100}$.

Para verificar o potencial de multiplicação, os segmentos previamente desinfestados de *R. nitens*, *R. incompta* e *J. lanstykii* foram inoculados no meio de cultura MS, adicionado de 0; 0,01; 0,1 mg.L⁻¹ de BAP (6-benzilaminopurina) (Sigma[®]), sacarose (Sigma[®]) 20 g.L⁻¹, ágar 7,5 g.L⁻¹. O pH dos meios foi ajustado a 5,7-5,8 e os meios, antes da inoculação, foram autoclavados por 20 min, a 121°C e 105 KPa. Aos 30 dias, os brotos que atingiram comprimento de cerca de 1,5m foram excisados, contendo um par de gemas (filotaxia oposta-cruzada), e repicados para meio novo. Em cada explante inoculado, foi feita a contagem somente do número de segmentos nodais com tamanho suficiente para formarem novos explantes para a repicagem seguinte (0,8-1,0 cm de comprimento). A avaliação da multiplicação foi feita em dois subcultivos sucessivos de 30 dias cada. Realizou-se o teste Anova e teste de comparação de médias, Tukey, a 5% de probabilidade, com o programa estatístico SAS (versão 9.1). Os dados de contagem foram transformados para $\sqrt{(x+0,5)}$.

2.5 Enraizamento *in vitro* dos brotos

Para a fase de enraizamento, os brotos de *R. nitens*, *R. incompta* e *J. lanstyakii* com comprimento de 2,0 cm foram transferidos para meio MS, contendo duas concentrações de ácido indolbutírico (AIB) (Sigma[®]): 0,0 e 0,01 mg.L⁻¹. Além de sacarose 20 g.L⁻¹ e ágar 7,5 g.L⁻¹. O pH dos meios foi ajustado para 5,7-5,8 e os meios foram autoclavados por 20 min, a 121°C e 105 KPa. A avaliação foi feita pela presença de raízes por explante, aos 30 dias de cultivo. Realizou-se teste Anova e teste de comparação de médias, Tukey, a 5% de probabilidade. Os dados em porcentagem foram transformados para arco-seno $\sqrt{(x)/100}$.

Posteriormente, 24 brotos enraizados, com quatro nós e cerca de 4,0 cm de raiz, foram transferidos para copos plásticos descartáveis de 150 ml, furados na base, contendo vermiculita fina. Os copos foram envolvidos em saco plástico transparente para evitar a perda rápida de água pela planta. A aclimatização foi feita sete dias após o plantio nos copos, e gradativamente o saco foi retirado até a retirada total do mesmo aos 30 dias.

2.6 Estudo anatômico

Foram coletadas da base das estacas de *J. lanstyakii* amostras de 0,5 cm, no 30º dia de cultivo, a partir de brotos enraizados. Foram fixadas em FAA 70 por 24 h (Johansen 1940) e posteriormente estocadas em álcool etílico a 70% para os estudos anatômicos. As seções transversais foram feitas à mão livre e coradas mediante a combinação de safranina 1:4 azul de alcian montadas em verniz vitral incolor (Paiva *et al.* 2006). As lâminas foram analisadas e os resultados foram registrados através de máquina fotográfica Cyber-Shot, Sony DSCW30.

3. RESULTADOS

3.1 Biometria das sementes

Os frutos de *Justicia lanstykii*, *Ruellia nitens* e *Ruellia incompta* são cápsulas loculicidas (Figura 1A-F), de deiscência explosiva. Foram encontradas entre duas e quatro sementes por fruto em *J. lanstykii* e quatro em *R. nitens* e *R. incompta*. A testa das sementes apresenta coloração marrom (Figura 1B, D, F), e a de *J. lanstykii* possui elevações na superfície (Figura 1B). As sementes são pequenas e leves (Tabela 2). O comprimento médio das sementes de *J. lanstykii* encontrado foi de $0,27 \pm 0,02$ cm, a largura de $0,25 \pm 0,02$ cm, a espessura de $0,09 \pm 0,01$ cm e o peso de $9,0 \pm 2,0$ mg. Em *R. nitens*, as médias de comprimento, largura, espessura e peso foram $0,49 \pm 0,06$ cm, $0,52 \pm 0,07$ cm e $0,20 \pm 0,05$ cm $16,0 \pm 3,0$ mg, respectivamente. Já em *R. incompta*, as médias de comprimento, largura, espessura e peso das sementes foram $0,56 \pm 0,02$ cm, $0,54 \pm 0,03$ cm, $0,10 \pm 0,02$ cm e $19,1 \pm 3,2$ mg, respectivamente (Figura 1E).

Sementes de *J. lanstykii* apresentavam-se predadas por larvas (Figura 1A). Em *R. nitens* (Figura 1C) e *R. incompta* também foi observado predação de frutos e sementes. Foram observadas pequenas aranhas e outros insetos entre os frutos de *R. nitens* e *R. incompta* e alguns sacos de tule com pequenos cortes feitos por insetos.

Tabela 2. Biometria das sementes de *Justicia lanstykii* Rizz., *Ruellia nitens* (Nees) Wassh. e *Ruellia incompta* (Nees) Lindau.

Espécie	Comprimento (cm)	Largura (cm)	Espessura (cm)	Peso (mg)
<i>Justicia lanstykii</i>	$0,27 \pm 0,02$	$0,25 \pm 0,02$	$0,09 \pm 0,01$	$9,0 \pm 2,0$
<i>Ruellia nitens</i>	$0,49 \pm 0,06$	$0,52 \pm 0,07$	$0,20 \pm 0,05$	$16,0 \pm 3,0$
<i>Ruellia incompta</i>	$0,56 \pm 0,02$	$0,54 \pm 0,03$	$0,10 \pm 0,02$	$19,1 \pm 3,2$

n = 20 para *J. lanstykii* e 30 para *Ruellia*

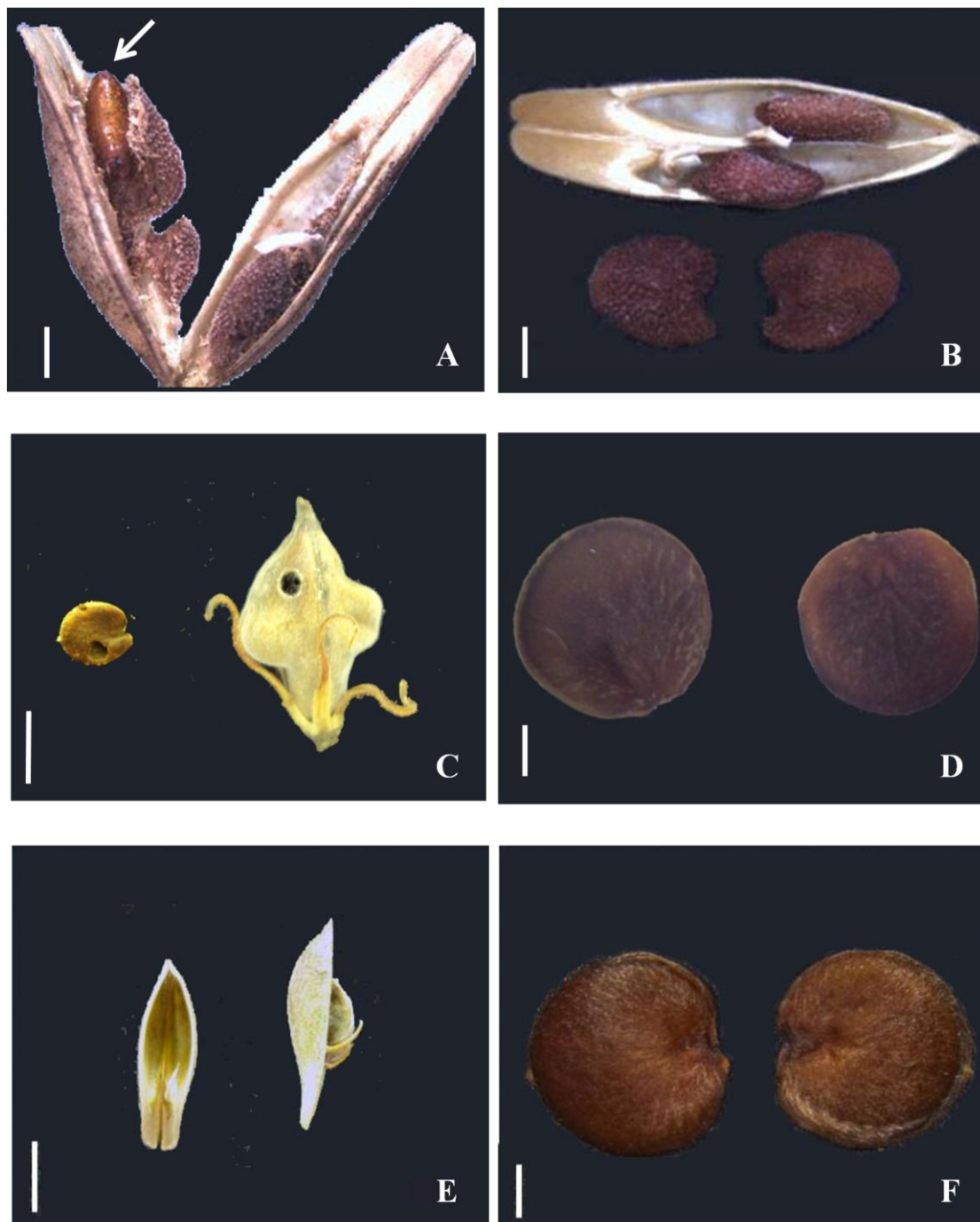


Figura 1. Frutos e sementes de *Justicia lanstykii* Rizz, *Ruellia nitens* (Nees) Wassh. e *Ruellia incompta* (Nees) Lindau. **A.** Semente dentro do fruto de *J. lanstykii* sendo predada por larva (seta). **B.** Fruto de *J. lanstykii* com sementes intactas, mostrando a testa da semente com elevações. **C.** Semente de *R. nitens* predada, fruto deformado e também apresentando um orifício proveniente de predação. **D.** Sementes intactas de *R. nitens*. **E.** Fruto de *R. incompta*, com uma semente presa à metade do pericarpo. **F.** Sementes de *R. incompta* intactas. Barras: A, B, D, F= 0,1 cm; C, E = 0,5 cm;

3.2 Desinfestação das sementes, germinação e desenvolvimento da plântula *in vitro*

As sementes das três espécies foram desinfestadas em álcool etílico a 70% por 1 min, solução comercial de hipoclorito de sódio (NaClO) com 2 a 2,5% de cloro ativo, em três períodos de imersão, 5, 15 e 30 min, e foram inoculadas em meio de cultura. Imediatamente após a hidratação, formou-se uma mucilagem translúcida e pegajosa, recobrando toda a semente das espécies.

a) *Justicia lanstyakii* Rizz.

Nos três tempos de imersão em hipoclorito de sódio verificou-se 100% de descontaminação em *J. lanstyakii* (Tabela 3). A germinação foi máxima nos três tempos testados e os tempos de hipoclorito 15 e 30 min causaram redução no tempo médio de germinação, uma vez que seus valores (3,8 e 3,6 dias, respectivamente) foram menores do que em 5 min (6,0 dias). No entanto, devido ao pequeno número de repetições não foi possível realizar o teste estatístico para essa variável. As plântulas desenvolveram parte aérea e raiz, resultando em 100% de plântulas normais (Tabela 4). O comprimento da parte aérea e da raiz primária não foram influenciados pelo tempo de imersão em hipoclorito, embora tenha sido observado uma pequena redução na parte aérea das plântulas provenientes de sementes tratadas por 30 min (Tabela 4).

Tabela 3. Porcentagens de descontaminação, de germinação, tempo médio de germinação (TMG) de sementes de *Justicia lanstykii* Rizz., inoculadas em ágar, em relação ao tempo de exposição ao hipoclorito de sódio (NaClO), aos 30 dias de cultivo.

Tempo de imersão em NaClO (min)	Descontaminação (%)	Germinação (%)	TMG (dias)
5	100	100	6,0±1,6
15	100	100	3,8±0,5
30	100	100	3,6±0,6

n = 5 sementes/trat. a±b (a=TMG ±b= desvio padrão).

Tabela 4. Porcentagem de plântulas normais e médias do comprimento da parte aérea e raiz principal de *Justicia lanstykii* Rizz., inoculadas em ágar, em relação ao tempo de exposição ao hipoclorito de sódio (NaClO), aos 30 dias de cultivo.

Tempo de imersão NaClO (min)	Plântula normal (%)	Comprimento da parte aérea (cm)	Comprimento da raiz (cm)
5	100	1,36 a	5,6 a
15	100	1,34 a	4,6 a
30	100	1,10 a	5,3 a
CV (%)	-	49,0	28,0

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. n = 5 sementes/trat.

A Figura 2A-C caracteriza a germinação e o desenvolvimento de plântulas de *J. lanstykii*. Observou-se que a embebição da semente ocorreu no primeiro dia depois da semeadura, por meio da visualização da turgescência das sementes. No terceiro ou quarto dia após a inoculação, a raiz primária emerge. A germinação é fanerocotiledonar, como observada no quinto dia de cultura (Figura 2A). No décimo quinto dia, os cotilédones estão completamente expandidos, apresentando formato plano e orbicular, ao mesmo tempo em que a raiz primária prossegue seu alongamento e produção de raízes (Figura 2B). Aos 60 dias de cultivo, a plântula apresenta raiz primária alongada, e algumas raízes adventícias que saem do coleto, e três pares de eofilos opostos, com forma semelhante à planta adulta, se desenvolvendo no campo (Figura 2C).

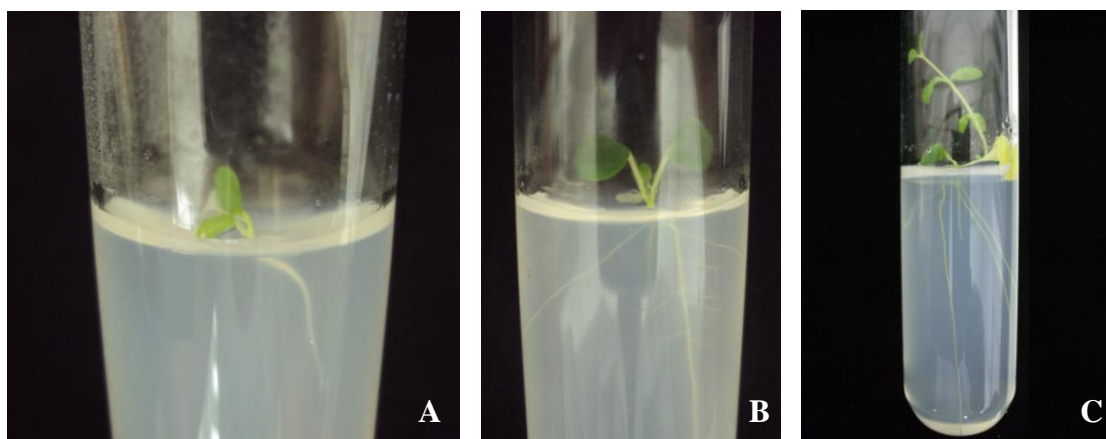


Figura 2. Germinação e desenvolvimento de plântulas de *Justicia lanstyakii* Rizz *in vitro*. **A.** Plântula germinada com cinco dias, mostrando início da expansão dos cotilédones e crescimento da raiz. **B.** Plântula com 15 dias, evidenciando a expansão total dos cotilédones, início da formação os eofilos e ramificação da raiz primária. **C.** Plântula com 60 dias, apresentando desenvolvimento da parte aérea, com três pares de eofilos e sistema radicular.

b) *Ruellia nitens* (Nees) Wassh.

Houve interação entre meio de cultura e tempo de tratamento no hipoclorito para a descontaminação. Observa-se na Tabela 5, que, via de regra, a descontaminação foi acima de 50%, e a maior porcentagem de descontaminação ocorreu em MS 50% com 15 min de imersão no hipoclorito, com 95,8%. De modo geral, a contaminação ocorreu por fungos cerca de cinco dias após a inoculação das sementes em meio de cultura.

Na germinação, não houve interação entre os fatores tempo de imersão em hipoclorito de sódio e meio de cultura, mas foram estatisticamente significativos separadamente (Tabela 6). As sementes tiveram maior porcentagem de germinação quando foram imersas por 15 min no hipoclorito, atingindo 88,9%, se destacando dos outros tempos. Com relação ao meio de cultura, o que propiciou maior porcentagem de germinação foi o MS 50%, com 90,3%; todavia os outros meios geraram resultados superiores a 70%.

Tabela 5. Porcentagem de descontaminação de sementes de *Ruellia nitens* (Nees) Wassh., cultivadas em MS 100%, MS 50% e ágar-água, em relação ao tempo de exposição ao hipoclorito de sódio (NaClO), aos 30 dias de cultivo.

Meio de cultura	Descontaminação (%)		
	Tempo de imersão em NaClO (min)		
	5	15	30
MS 100%	58,3 Aa	70,8 Aba	54,2 Aa
MS 50%	66,7 Ab	95,8 Aa	91,7 Aab
Ágar-água	25,0 Ab	50,0 Bab	83,3 Aa
CV(%) = 22,1			

Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade. Dados transformados para arco-seno $\sqrt{x}/100$. n = 24 sementes/trat.

Tabela 6. Efeito do tempo de imersão no hipoclorito de sódio (NaClO) e do meio de cultura na porcentagem de germinação de *Ruellia nitens* (Nees) Wassh., aos 30 dias de cultivo.

Meio de cultura	Germinação (%)			Média
	Tempo de imersão em NaClO (min)			
	5	15	30	
MS 100%	66,7	83,3	62,5	70,8 B
MS 50%	79,2	100,0	91,7	90,3 A
Ágar-água	79,2	83,3	50,0	70,8 B
Média	75,0 b	88,9 a	68,1 b	
CV(%)=21,2				

Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade. Dados transformados para arco-seno $\sqrt{x}/100$. n = 24 sementes/trat.

Na Figura 3A-E, observa-se a germinação e desenvolvimento de plântulas de *R. nitens*. A mucilagem é produzida pela semente logo após a hidratação (Figura 3A). Verificou-se que a embebição da semente de *R. nitens* também ocorre no primeiro dia depois da semente. No quinto dia, a raiz primária emerge, sendo o primeiro órgão da plântula a se desenvolver dos tegumentos (Figura 3B). A exteriorização dos cotilédones da testa (Figura 3C), que caracteriza a germinação como fanerocotiledonar, foi observada no sétimo dia de cultura e um ou dois dias após, estão expandidos, apresentando formato plano e orbicular, ao mesmo tempo em que a raiz primária prossegue seu alongamento.

O desenvolvimento do primeiro par de eófilos (Figura 3D) começa, em média, 20 dias depois da semente. Os eófilos são opostos, lâmina de formato elíptico a lanceolado,

margem inteira, ápice agudo e base cuneada, semelhante ao da planta adulta, caracterizando o início da fase juvenil. Aos 30 dias, a parte aérea alongou-se pouco e a raiz apresenta, aproximadamente, 3,0 cm de comprimento, sem raízes laterais (Figura 3E).

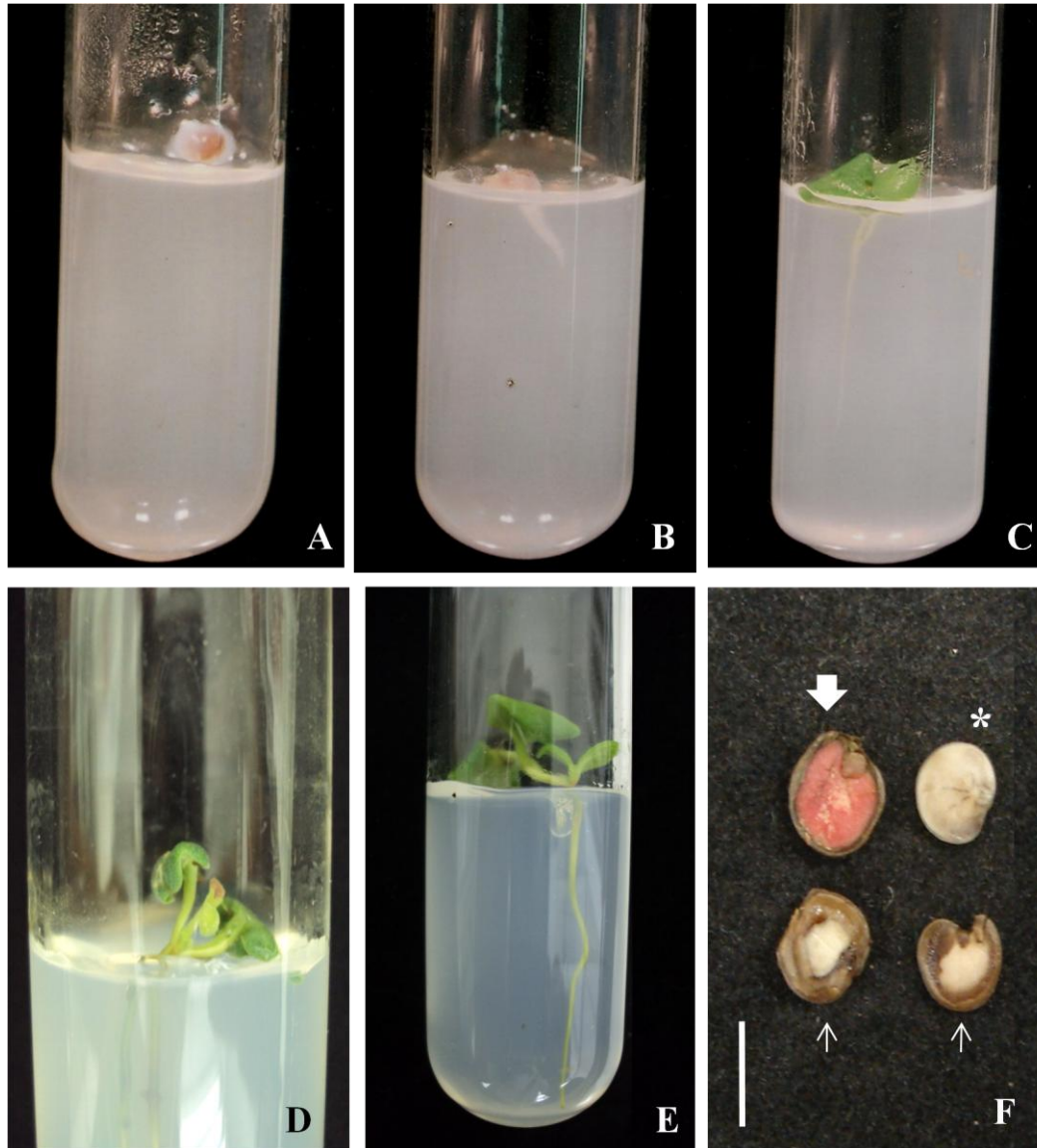


Figura 3. Germinação e desenvolvimento de plântulas de *Ruellia nitens* (Nees) Wassh. **A.** Semente com mucilagem, no primeiro dia após a inoculação. **B.** Emissão da raiz primária no quinto dia de cultivo. **C.** Expansão dos cotilédones após nove dias de cultivo **D.** Plântula com eófilos em início de expansão no 20º dia de cultivo. **E.** Planta com 30 dias de cultivo *in vitro*. **F.** Teste de tetrazólio evidenciando embrião viável (seta espessa), embrião inviável (asterisco) e embriões necrosados na borda (seta fina). Barra = F: 0,5 cm.

Muitas sementes que não germinaram apresentaram extravasamento de líquido de coloração marrom nos meios, como se estivessem oxidadas. Antes de realizar o teste de tetrazólio, ao seccionar as sementes, a borda de alguns embriões apresentava-se necrosada (Figura 3F). O teste de tetrazólio indicou que do total das sementes não contaminadas e que não germinaram (21,3% - 46 sementes), 92,8% não estavam viáveis.

Não ocorreu interação entre hipoclorito de sódio e meio de cultura para o tempo médio de germinação. Esse parâmetro foi afetado somente pelo hipoclorito de sódio (Tabela 7). Com 30 min de exposição, o tempo médio de germinação foi significativamente maior (5,1 dias) do que nos outros tempos de imersão (5 min-4,2 dias e 15 min-4,1 dias).

Tabela 7. Efeito do tempo de imersão em hipoclorito de sódio (NaClO) no tempo médio de germinação de sementes de *Ruellia nitens* (Nees) Wassh., cultivadas em ágar-água, MS 100% e MS 50%.

Meio de cultura	Tempo médio de germinação (dias)		
	Tempo de imersão em NaClO (min)		
	5	15	30
MS 100%	4,3	4,6	5,3
MS 50%	4,1	4,2	4,5
Ágar-água	4,2	3,4	5,3
Média	4,2 b	4,1 b	5,1 a
CV(%)=18,0			

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade. n = 24 sementes/trat.

No crescimento da parte aérea não houve interação entre tempo de imersão, meio de cultura e dias de cultivo, mas sim, os dois últimos fatores influenciaram separadamente, e por isso os dados foram agrupados (Tabela 8). O meio MS 50% foi superior (0,52 cm) ao ágar-água (0,01 cm), mas o MS 100% foi estatisticamente semelhante aos anteriores (0,31 cm). A média do comprimento da parte aérea foi significativamente maior (0,69 cm) com 60 dias do que com 30 dias (0,35 cm).

Tabela 8. Efeito do meio de cultura e dos dias de cultivo sobre a média do comprimento da parte aérea de *Ruellia nitens* (Nees) Wassh., cujas sementes foram imersas em hipoclorito de sódio (NaClO).

Meio de cultura	Comprimento da parte aérea (cm)
MS 100%	0,31 ab (72)
MS 50%	0,52 a (72)
Ágar-água	0,01 b (72)
Dias de cultivo	
30	0,35 b (216)
60	0,69 a (216)
CV(%)	90,0

Médias seguidas da mesma letra na coluna em cada fator separadamente não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade. (n) = número de sementes.

As médias do comprimento da raiz primária das plântulas não foram influenciadas pela interação entre tempo de imersão do hipoclorito e meio de cultura. Entretanto, diferiram em relação ao meio de cultura, no qual os meios MS 100% e 50% obtiveram as maiores médias (2,9 e 2,8 cm, respectivamente) em relação ao ágar-água (0,3 cm), e por isso os dados foram agrupados para o fator meio (Tabela 9).

Tabela 9. Efeito do meio de cultura nas médias do comprimento da raiz de plântulas *in vitro* de *Ruellia nitens* (Nees) Wassh.

Meio de cultura	Comprimento da raiz (cm)
MS 100%	2,9 a
MS 50%	2,8 a
Ágar-água	0,3 b
CV (%)	50,4

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade. n = 72 sementes/trat.

A formação de plântulas normais, com parte aérea e sistema radicular desenvolvidos, foi observada em função do tempo de imersão no hipoclorito e do meio de cultura separadamente (Tabela 10). Com 15 min de imersão no hipoclorito, a porcentagem de plântulas normais foi maior (55,6%) do que nos os outros dois tempos, 5 e 30 min, que foram semelhantes entre si. O meio MS 50% apresentou 69,4% de plântulas normais, ao passo que em MS 100% houve 47,2% e em ágar-água 4,8%, onde todos foram significativamente distintos entre si.

Tabela 10. Efeito do tempo de hipoclorito de sódio (NaClO) e meio de cultura na porcentagem de plântulas normais de *Ruellia nitens* (Nees) Wassh.

Tempo de imersão em NaClO (min)	Plântula normal (%)
5	32,6 b
15	55,6 a
30	33,3 b
Meio de cultura	
MS 100%	47,2 b
MS 50%	69,4 a
Ágar-água	4,8 c
CV (%)	36,5

Médias seguidas da mesma letra dentro de cada fator separadamente não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade. n = 72 sementes/trat.

c) *Ruellia incompta* (Nees) Lindau

As sementes tiveram índices de descontaminação de 100% em quase todos os tratamentos de hipoclorito de sódio (5, 15 e 30 min) e meio de cultura (MS 100%, MS 50% e ágar-água), e não ocorreu diferença estatística entre os tratamentos. As menores porcentagens ocorreram em 5 min com MS 50 % e 30 min com ágar-água, ambos com 91,7% (Tabela 11).

A porcentagem de germinação foi elevada, pois em vários tratamentos obteve-se 100% de germinação e o valor mínimo apresentado foi de 91,7 % para o tratamento ágar-água, com 30 min de imersão no hipoclorito. Os dados mostram que não houve diferença na

porcentagem de germinação para os fatores meio e tempo de imersão no hipoclorito (Tabela 12).

O tempo médio de germinação foi estatisticamente similar entre os tratamentos, onde o maior tempo ocorreu em MS 100% e 5 min (5,7 dias) e o menor tempo foi observado em MS 50% com 5 min (3,1 dias) (Tabela 12).

Tabela 11. Efeito do meio de cultura e do tempo de imersão em hipoclorito de sódio (NaClO) na porcentagem de descontaminação para sementes de *Ruellia incompta* (Nees) Lindau, aos 30 dias de cultivo.

Meio de cultura	Tempo de imersão em NaClO (min)	Descontaminação (%)
MS 100%	5	100 a
	15	100 a
	30	100 a
MS 50%	5	91,7 a
	15	100 a
	30	100 a
Ágar-água	5	100 a
	15	100 a
	30	91,7 a
CV(%)		9,4

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade. n = 24sementes/trat.

Na Figura 4A-E é apresentado a germinação e desenvolvimento *in vitro* de *R. incompta*. A embebição da semente de *R. incompta* ocorre também no primeiro dia depois da semeadura. Entre o quarto e quinto dia, a raiz primária emerge, sendo o primeiro órgão da plântula a se desenvolver dos tegumentos (Figura 4A). A germinação fanerocotiledonar foi observada no sétimo dia de cultura. No oitavo dia, os cotilédones estão completamente emergidos da testa e expandidos, apresentando formato plano e orbicular, ao mesmo tempo em que a raiz primária também se alonga (Figura 4B). Com 30 dias, os dois primeiros pares de eofilos estão bem desenvolvidos, com início de ramificação da raiz (Figura 4C).

O teste de tetrazólio em *R. incompta* indicou que das sementes não contaminadas e que não germinaram (0,02 %, 4 sementes) não estavam viáveis, pois os embriões não adquiriram coloração vermelha (Figura 4F). Além disso, antes do referido teste, essas

sementes também apresentavam extravasamento de líquido de coloração marrom nos tubos de ensaio, como se estivessem oxidadas e ao seccionar a semente, algumas regiões apresentavam-se necrosadas.

Tabela 12. Efeito do meio de cultura e tempo de imersão em hipoclorito de sódio (NaClO) na porcentagem de germinação e no tempo médio de germinação para sementes de *Ruellia incompita* (Nees) Lindau, no 30º dia de cultivo.

Meio de cultura	Tempo de imersão em NaClO (min)	Germinação (%)	Tempo médio de germinação (dias)
MS 100%	5	95,8 a	5,7 a
	15	100 a	4,0 a
	30	100 a	3,8 a
MS 50%	5	95,8 a	3,1 a
	15	100 a	4,3 a
	30	95,8 a	4,7 a
Ágar-água	5	100 a	3,5 a
	15	100 a	4,4 a
	30	91,7 a	4,4 a
CV(%)		9,6	22,7

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade. n = 24sementes/trat.

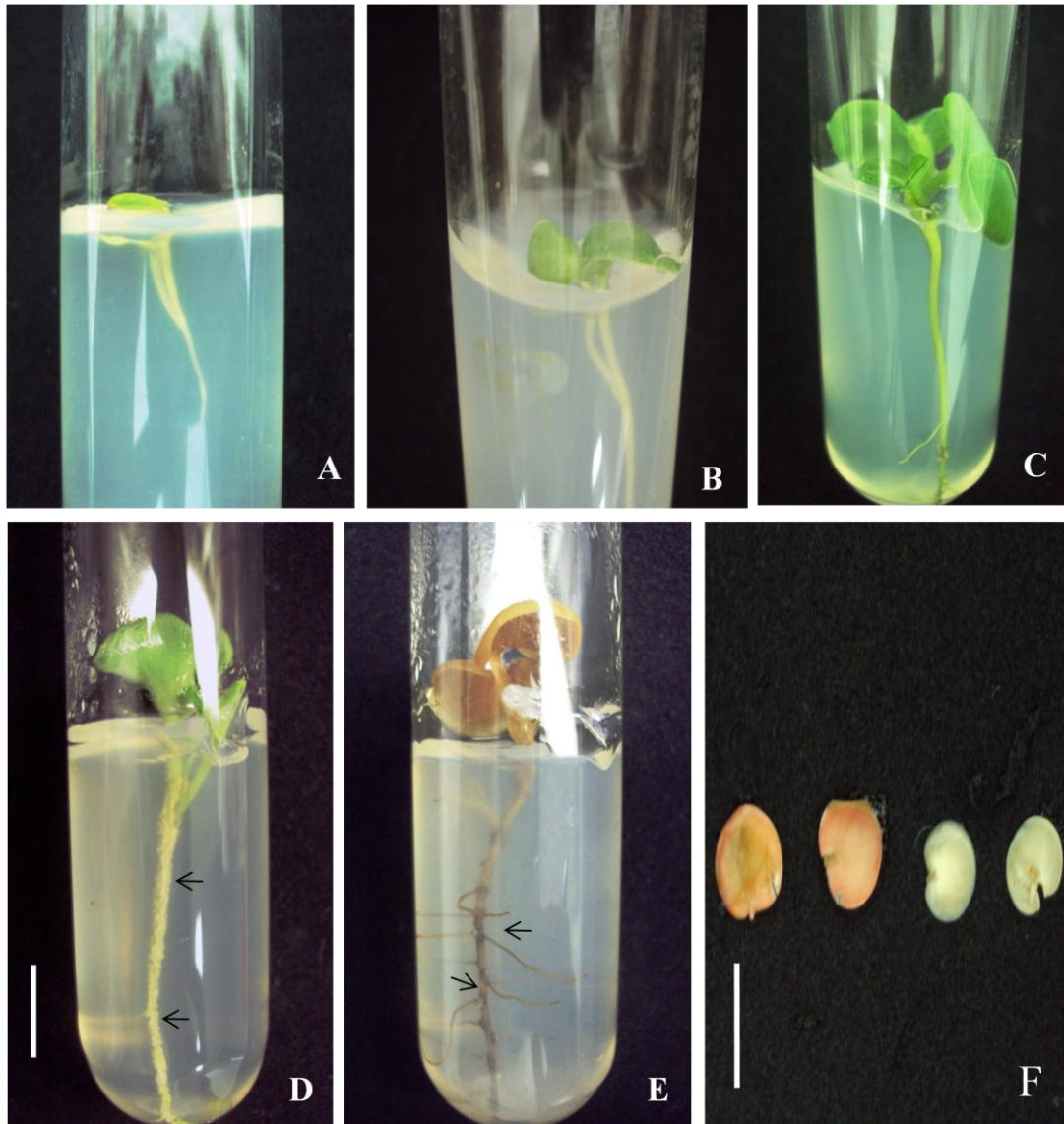


Figura 4. Germinação e desenvolvimento de *Ruellia incompta* (Nees) Lindau. **A** Plântula com cinco dias mostrando a emissão da radícula. **B.** Plântula aos oito dias com abertura dos cotilédones e crescimento da raiz. **C.** Desenvolvimento da plântula com 30 dias, evidenciando a formação de parte aérea. **D.** Plântula de 40 dias com parte aérea presente e lenticelas na raiz (setas) **E.** Plântula com 60 dias totalmente oxidada e com algumas lenticelas (setas). **F.** Teste de tetrazolium evidenciando embriões viáveis (rosados) e não viáveis (bege). Barra = F: 0,4 cm.

No desenvolvimento das plântulas, não houve efeito significativo entre os fatores meio de cultura e tempo de imersão para média do comprimento da parte aérea (Tabela 13), mas houve para o comprimento da raiz (Tabela 14). O meio MS 100% com 15 min de hipoclorito e ágar-água com 30 min apresentaram a maior média de comprimento da parte aérea (0,19

cm), sendo semelhantes dos demais tratamentos. A média do comprimento da raiz foi maior também em MS 100 % com 15 min (3,7 cm) e no meio MS 50% com 15 min (2,9 cm), mas este último foi equivalente ao de 5 min (2,1 cm) análise estatística. Durante as duas observações (30 e 60 dias), ocorreu pouco desenvolvimento de raízes laterais.

Para a porcentagem de plântulas normais (Tabela 15) o que influenciou foi somente o tempo de imersão no hipoclorito, onde com 15 min, a porcentagem atingiu 41,5% de plântulas normais, se destacando de 5 e 30 min, que atingiram, respectivamente, 19,3% e 20,9 % . Os demais fatores (meio de cultura e dias de cultivo) não afetaram a proporção de plântulas normais.

Tabela 13. Efeito do meio de cultura e tempo de imersão em hipoclorito de sódio (NaClO) na média do comprimento da parte aérea e da raiz de *Ruellia incompa* (Nees) Lindau, durante dois sucultivos.

Meio de cultura	Tempo de imersão em NaClO (min)	Comprimento da parte aérea (cm)
MS 100%	5	0,04 a
	15	0,19 a
	30	0,14 a
MS 50%	5	0,16 a
	15	0,17 a
	30	0,01 a
Ágar-água	5	0,17 a
	15	0,13 a
	30	0,19 a
CV(%)		285,2

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade. n = 24 sementes/trat.

Tabela 14. Efeito do meio de cultura e tempo de imersão em hipoclorito de sódio (NaClO) na média do comprimento da raiz de *Ruellia incompa* (Nees) Lindau, durante dois sucultivos.

Meio de cultura	Comprimento da raiz (cm)		
	Tempo de imersão em NaClO (min)		
	5	15	30
MS 100%	1,9 Ab	3,7 Aa	2,2 Ab
MS 50%	2,1 Aac	2,9 Aa	1,4 Abc
Ágar-água	2,2 Aa	1,7 Ba	1,8 Aa
CV(%) = 62,5			

Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade. n = 24 sementes/trat.

Tabela 15. Efeito do tempo de imersão em hipoclorito de sódio (NaClO) na porcentagem de plântulas normais de *Ruellia incompta* (Nees) Lindau, cultivadas por dois subcultivos em ágar-água, MS 100% e MS 50%.

Tempo de imersão em NaClO (min)	Plântula normal (%)
5	19,3 b
15	41,5 a
30	20,9 b
CV(%)	58,1

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade. n = 72 sementes/trat.

Embora a germinação tenha sido elevada, de maneira geral 100 %, e as plântulas tenham apresentado desenvolvimento inicial, tanto da parte aérea quanto da raiz, este desenvolvimento foi interrompido após 30 dias. Observou-se a oxidação das plântulas, que iniciou a partir do ápice da raiz ou do hipocótilo, expandindo para todo o indivíduo, causando a morte (Figura 4E). A oxidação foi influenciada pelo meio e pelos dias de cultivo, como apresentado na Tabela 16. O meio ágar-água foi o que proporcionou menor porcentagem de oxidação da raiz (41,3 %) e os outros tiveram 74,1 % de oxidação das raízes. Com relação aos dias de cultivo, com 60 dias, a oxidação foi maior (81,9 %) em relação aos primeiros 30 dias (44,1 %).

Tabela 16. Efeito do meio de cultura na porcentagem de oxidação da plântula de *Ruellia incompta* (Nees) Lindau.

Meio de cultura	Oxidação (%)
MS 100%	73,9 a (72)
MS 50%	74,1 a (72)
Ágar-água	41,3 b (72)
Dias	
30	44,1 b (216)
60	81,9 a (216)
CV(%)	29,1

Médias seguidas da mesma letra dentro de cada fator não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade. (n) = número de sementes.

Foi observado também que algumas plântulas produziram estruturas visivelmente semelhantes a lenticelas nas raízes que, posteriormente, também resultaram na morte das plântulas com 60 dias (Figura 4D).

A formação de lenticelas na raiz foi influenciada pelo meio de cultura e pelo tempo de imersão, mas não pelos dias, conforme mostra a Tabela 17 O meio de cultura em que mais raízes apresentaram lenticela foi ágar-água, com 58,7 %.

Tabela 17. Efeito do meio de cultura e do tempo de imersão em hipoclorito (NaClO) na porcentagem de formação de lenticelas nas raízes das plântulas de *Ruellia incompta* (Nees) Lindau.

Meio de cultura	Plântulas com lenticelas na raiz (%)
MS 100%	13,8 b (72)
MS 50%	17,8 b (72)
Ágar-água	58,7 a (72)
Tempo de imersão em NaClO (min)	
5	24,1 b (72)
15	30,5 a (72)
30	35,8 a (72)
CV(%)	52,5

Médias seguidas da mesma letra dentro de cada fator não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade. (n) = número de sementes.

3.3 Micropropagação de brotos provenientes de matrizes adultas

a) *Justicia lanstykii* Rizz.

Dos tratamentos de desinfestação utilizados, ou seja, hipoclorito de cálcio e sódio, com três períodos de imersão (15, 30 e 60 min), observou-se que não houve diferença estatística entre os tratamentos, na qual a maior porcentagem foi 100% em 30 min de hipoclorito de cálcio e a menor foi 87,5% para 60 min de hipoclorito de cálcio e 15 min de hipoclorito de sódio (Tabela 18).

Já a porcentagem de sobrevivência foi influenciada pelos tratamentos, tendo em vista que as maiores taxas foram significativas quando o hipoclorito de cálcio foi utilizado, 91,3% e 87,5% para 15 e 30 min, respectivamente (Tabela 19). O hipoclorito de sódio mostrou as menores porcentagens de sobrevivência (entre 4,2 e 0,0%). Os brotos mortos e descontaminados apresentavam-se sem pigmentação, e alguns se mostravam oxidados.

Tabela 18. Efeito do tipo de hipoclorito e tempo de imersão na porcentagem de contaminação de brotos de matrizes adultas de *Justicia lanstykii* Rizz., cultivados em meio MS com 0,0; 0,01 e 0,1 BAP (6-benzilaminopurina), aos 30 dias de cultivo.

Hipoclorito	Tempo de imersão (min)	Descontaminação (%)
Cálcio (Ca(ClO) ₂)	15	95,7 a
	30	100 a
	60	87,5 a
Sódio (NaClO)	15	87,5 a
	30	91,3 a
	60	95,7 a
CV (%)		133,4

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade. n = 24 explantes/trat.

Tabela 19. Efeito do tipo de hipoclorito e tempo de imersão, na porcentagem de sobrevivência de brotos de matrizes adultas de *Justicia lanstyakii* Rizz., cultivados em meio MS com 0,0; 0,01 e 0,1 BAP (6-benzilaminopurina), aos 30 dias de cultivo.

Hipoclorito	Sobrevivência (%)		
	Tempo de imersão (min)		
	15	30	60
Cálcio (Ca(ClO) ₂)	91,3 Aa	87,5 Aa	14,3 Ab
Sódio (NaClO)	4,2 Ba	0,0 Ba	0,0 Ba

CV (%) = 20,7

Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade. n = 24 sementes/trat.

Na fase de multiplicação, que foi realizada testando-se três concentrações de BAP (6-benzilaminopurina), 0,0; 0,01 e 0,1 mg.L⁻¹ em dois subcultivos, verificou-se que essas concentrações não diferiram estatisticamente na proliferação do número de segmentos nodais produzidos, embora o p tenha sido próximo de 0,05 (p = 0.0871). Mas a média do número de segmentos nodais foi influenciada estatisticamente pelos subcultivos, onde no segundo obteve-se 2,5 segmentos nodais e no primeiro, 1,7 segmentos nodais (Tabela 20). Os brotos eram bem desenvolvidos, com folhas bem formadas e sem sinal de clorose (Figura 5A, B). Os segmentos nodais que eram formados se desenvolviam bastante no comprimento, sendo quase todos usados como os novos explantes da subcultura seguinte.

Tabela 20. Efeito do subcultivo na média do número de segmentos nodais produzidos em cada subcultivo. Os explantes foram retirados de matrizes adultas de *Justicia lanstyakii* Rizz. e cultivados em meio MS e 0,0; 0,01; 0,1 mg.L⁻¹ de BAP.

BAP (mg.L ⁻¹)	Número de segmentos nodais por explante	
	1° subcultivo	2° subcultivo
0,0	2,1	2,3
0,01	1,7	2,4
0,1	1,4	2,8
Média	1,7 b	2,5 a

CV(%) = 27,7

Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade. n = 24 explantes/trat.

Foi verificada a formação de calo na base dos brotos de *J. lanstykii* (Figura 4 A). Os calos eram pequenos, com cerca de 0,2 cm de diâmetro. Não eram compactos, pois ao se tocar com a pinça, os calos facilmente se destacavam. Apresentavam coloração branca e sem oxidação. Os calos surgiram em todos os tratamentos, exceto em 0,0 mg.L⁻¹ de BAP no segundo subcultivo. Observa-se na Tabela 21 que os valores aumentaram do primeiro para o segundo subcultivo, sendo que a maior porcentagem ocorreu em 0,1 mg.L⁻¹ de BAP no segundo subcultivo, com 83,3 %.

Tabela 21. Efeito das concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) na porcentagem de explantes com calo na base, provenientes de matrizes adultas de *Justicia lanstykii* Rizz., cultivados em meio MS.

BAP (mg.L ⁻¹)	Explantes com calo (%)	
	1° subcultivo	2° subcultivo
0,0	33,3 Aa	0,0 Bb
0,01	33,3 Ab	75,0 Ab
0,1	58,3 Ab	83,3 Ab
CV(%)=30,8		

Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade. n = 24 explantes/trat.

Os brotos multiplicados foram enraizados em 0,0 e 0,01 mg.L⁻¹ de AIB (ácido indolbutírico). A maior porcentagem de enraizamento foi observada na ausência do fitoregulador (60%). Porém esse valor foi estatisticamente igual aos 40% do tratamento com 0,01 mg.L⁻¹ de AIB (Tabela 22). As raízes eram finas e emergiam em número de uma ou duas tanto na ausência quanto na presença de calos (Figura 5A). A anatomia da base do caule mostra que há conexão entre o sistema vascular do broto e a raiz adventícia formada (Figura 5C).

No final de 30 dias de aclimatização, observou-se 100% de sobrevivência dos brotos. A parte aérea apresentou crescimento, com cerca de 6 entrenós, com folhas expandidas e vigorosas (Figura 5D).

Tabela 22. Efeito das concentrações de ácido indolbutírico (AIB) na porcentagem de enraizamento *in vitro* de brotos de *Justicia lanstykii* Rizz., cultivados em meio MS, aos 30 dia de cultivo.

AIB (mg.L ⁻¹)	Enraizamento (%)
0,00	60,0 a
0,01	40,0 a
CV(%)	41,6

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade. n = 24 explantes/trat.

Observou-se também a formação de raízes nos brotos do experimento de multiplicação, no qual foi utilizado meio MS com 0,0; 0,01 e 0,1 mg.L⁻¹ de BAP, que foi influenciada pela concentração de BAP e pelos subcultivos, separadamente (Tabela 23). Quanto maior a concentração do fitorregulador menor foi o número de brotos com raízes, como se verifica na Tabela 23, onde a maior porcentagem foi observada em 0,0 mg.L⁻¹ de BAP (35,4%) e a menor em 0,1 mg.L⁻¹ de BAP (2,1%). A porcentagem de raízes também diminuiu do primeiro subcultivo (69,4%) para o segundo (22,2%).

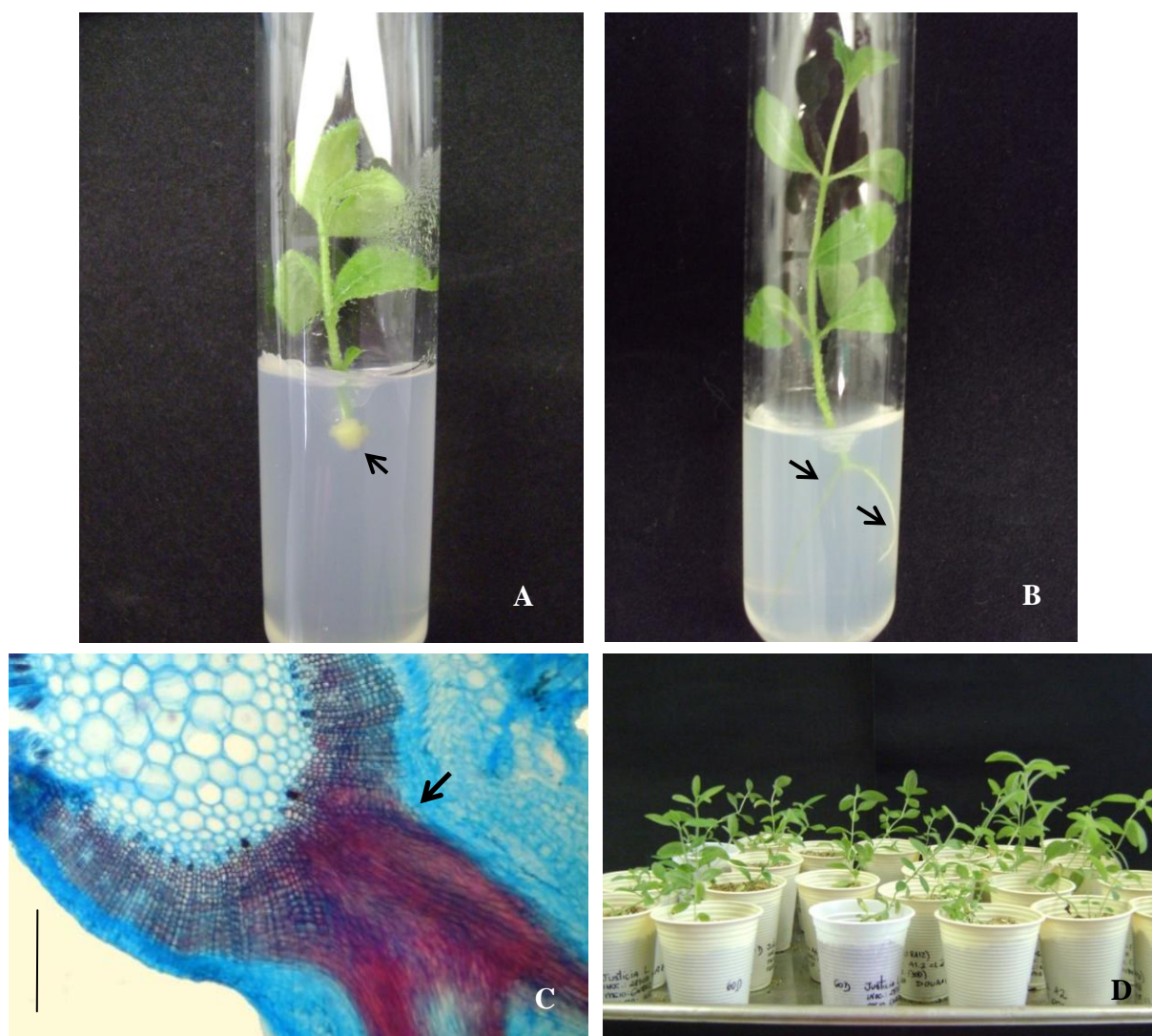


Figura 5. Micropropagação de brotos provenientes de plantas adultas de *Justicia lanstykii* Rizz. **A.** Fase de multiplicação com broto em meio MS com $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP evidenciando formação de calo (seta) na base do explante no segundo cultivo. **B.** Fase de enraizamento em meio MS com $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$ de AIB, apresentando formação de raízes adventícias (setas). **C.** Corte anatômico da base do broto, mostrando a conexão da raiz adventícia e o sistema vascular da planta (seta). **D.** Aclimatização dos brotos enraizados *in vitro*, apresentando crescimento da parte aérea. Barra: $20\mu\text{m}$.

Tabela 23. Efeito das concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) e subcultivo na porcentagem de brotos com raiz durante a fase de multiplicação de *Justicia lanstykii* Rizz., cultivados em meio MS, em dois subcultivos sucessivos de 30 dias.

BAP (mg.L ⁻¹)	Brotos com raiz (%)		
	1º subcultivo	2º Subcultivo	Média
0,0	16,7	54,2	35,4 a
0,01	4,2	8,3	6,2 b
0,1	0,0	4,1	2,1 b
Média	6,9 b	22,2 a	
CV(%) = 80,7			

Médias seguidas da mesma letra maiúsculas na coluna e minúsculas na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade.

b) *Ruellia nitens* (Nees) Wassh.

Os brotos de *Ruellia nitens*, tratados tanto com hipoclorito de sódio quanto com cálcio, nos tempos 15, 30 e 60 min não variaram estatisticamente para descontaminação, embora em hipoclorito de sódio com 30 e 60 min tenham as maiores porcentagens de descontaminação, 83,3% (Tabela 24). Mas a porcentagem de sobrevivência foi influenciada, pelo tipo de hipoclorito. O hipoclorito de cálcio apresentou maior sobrevivência (75%) do que o de sódio, 13,9 % (Tabela 25).

Tabela 24. Efeito do tipo de hipoclorito e tempo de imersão na porcentagem de descontaminação de brotos de *Ruellia nitens* (Nees) Wassh., cultivados em meio MS, aos 30 dias de cultivo.

Hipoclorito	Tempo de imersão (min)	Descontaminação (%)
Cálcio (Ca(ClO) ₂)	15	45,8 a
	30	54,2 a
	60	66,7 a
Sódio (NaClO)	15	62,5 a
	30	83,3 a
	60	83,3 a
CV (%)		57,3

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade. n = 24 explantes/trat.

Tabela 25. Efeito do tipo de hipoclorito e tempo de imersão na porcentagem de sobrevivência de brotos de *Ruellia nitens* (Nees) Wassh., cultivados em meio MS, aos 30 dias de cultivo.

Hipoclorito	Sobrevivência (%)			
	Tempo de imersão (min)			Média
	15	30	60	
Cálcio (Ca(ClO) ₂)	79,1	80,8	75,0	75,0 a
Sódio (NaClO)	25,0	12,5	4,2	13,9 b
CV (%)				49,9

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade. n = 24 explantes/trat.

No experimento de multiplicação *in vitro*, os brotos foram inoculados em meio MS com 0,0, 0,01 e 0,1 mg.L⁻¹ de BAP. Nas Figuras 6A, B e C pode ser observado o desenvolvimento e brotação das plantas de *R. nitens* no segundo subcultivo. Mesmo na ausência de regulador, os brotos do tratamento controle apresentavam-se saudáveis (Figura 6A), assim como nos outros tratamentos (Figura 6B e C). Na Figura 6C, observa-se a emissão de dois brotos de gemas axilares próximos à base do broto.

A concentração de BAP e o subcultivo não influenciaram estatisticamente a produção de novos segmentos nodais (p = 0,0747). O maior resultado foi encontrado em 0,0 BAP mg.L⁻¹ no primeiro subcultivo (2,4 segmentos nodais por explante), e menor foi em 0,1 BAP mg.L⁻¹ no primeiro subcultivo (Tabela 26). Todos os segmentos nodais que eram formados se desenvolviam em altura, podendo ser utilizados, na grande maioria das vezes, como os novos explantes da subcultura seguinte.

Tabela 26. Efeito do subcultivo em relação ao número de segmentos nodais novos formados de *Ruellia nitens* (Nees) Wassh., cultivados em meio MS e três concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP).

BAP (mg.L ⁻¹)	Número de segmentos nodais por explante	
	1º subcultivo	2º subcultivo
0,0	2,4 a	2,0 a
0,01	2,1 a	1,9 a
0,1	1,7 a	2,3 a
CV(%) = 14,4		

Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade. n = 24 explantes

O experimento de enraizamento de *R. nitens*, que consistiu de duas concentrações de AIB (0,0 e 0,01 mg.L⁻¹), não produziu raízes em ambas as concentrações, aos 30 dias, nem aos 60 dias de cultivo (Tabela 27). Tal fato mostra que são necessários novos experimentos para testar outras concentrações e métodos para promover o enraizamento.

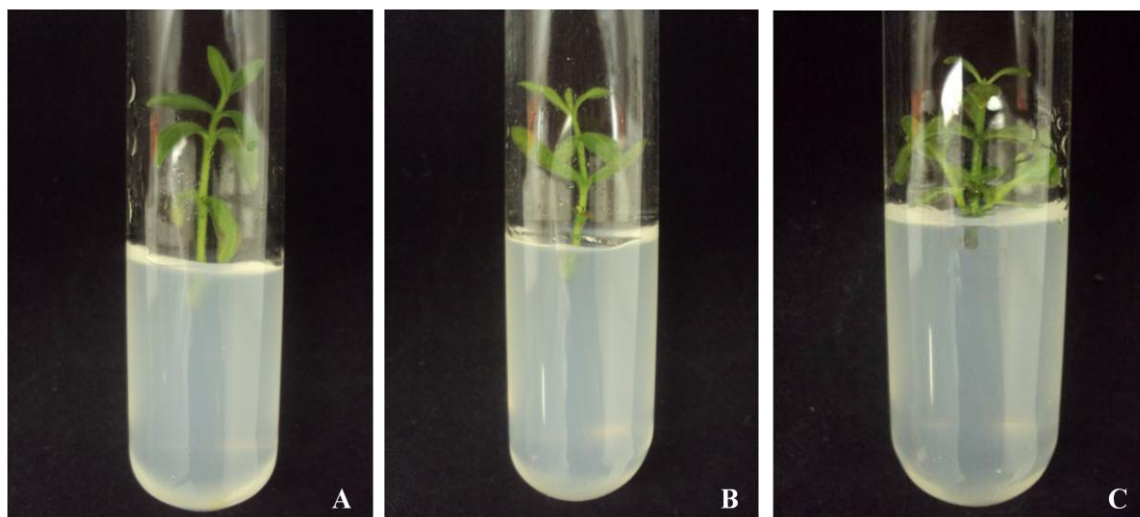


Figura 6. Multiplicação de brotos provenientes de plantas adultas de *Ruellia nitens* (Nees) Washh. no segundo subcultivo, em meio MS com diferentes concentrações de BAP. **A.** 0,0 mg.L⁻¹. **B.** 0,01 mg.L⁻¹. **C.** 0,1 mg.L⁻¹, com emissão de brotações axilares.

Tabela 27. Efeito das concentrações de ácido indolbutírico (AIB) no enraizamento de *Ruellia nitens* (Nees) Washh., cultivados em meio MS, aos 60 dias de cultivo.

AIB (mg.L ⁻¹)	Enraizamento (%)
0,0	0,0
0,01	0,0
CV(%)	-

n = 24 explantes/trat.

c) *Ruellia incompta* (Nees) Lindau

A porcentagem de descontaminação dos brotos de *Ruellia incompta* não foi influenciada pelo tipo de hipoclorito (sódio ou cálcio), mas sim pelo tempo de exposição, sendo os dados agrupados (Tabela 28). Em 30 e 60 min obteve-se maiores taxas de descontaminação, 27,1 % e 40,5%, respectivamente, em relação a 15 min, 12,8 %. A sobrevivência para hipoclorito de sódio foi 4,2 % e de cálcio, 41,0 % (Tabela 29).

Tabela 28. Efeito do tempo de imersão no hipoclorito de sódio e cálcio na porcentagem de descontaminação de brotos de *Ruellia incompta* (Nees) Lindau, cultivados em meio MS, aos 30 dias de cultivo.

Tempo de imersão no hipoclorito (min)	Descontaminação (%)
15	12,8 b
30	27,1 a
60	40,5 a
CV(%)	21,6

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade. n = 72 explantes/trat.

Tabela 29. Efeito do tipo de hipoclorito na porcentagem de sobrevivência de brotos de *Ruellia incompta* (Nees) Lindau, cultivados em meio MS e desinfestados em 15, 30 e 60 min de hipoclorito, aos 30 dias de cultivo.

Hipoclorito	Sobrevivência (%)
Cálcio (Ca(ClO) ₂)	41 a
Sódio (NaClO)	4,2 b
CV(%)	20,8

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade. n = 72 explantes/hipoclorito

Tendo em vista que as porcentagens de descontaminação e sobrevivência (41,0%) foram baixas para os brotos de *R. incompta*, não foi possível dar prosseguimento às fases de multiplicação e enraizamento.

4. DISCUSSÃO

- **Coleta e biometria das sementes**

Dentre os fatores que influenciam na dinâmica de reprodução das espécies há a herbivoria e predação das sementes (Calvo-Irabié'n & Islas-Luna 1999), que são interações elementares entre seres vivos. Elas são definidas como o consumo da presa e conseqüentemente sua eliminação, ou o consumo de partes dela sem provocar morte, denominada parasitismo (Ricklefs 2010).

Um dos tipos mais comuns de predação de sementes, e que ocorre antes da dispersão, é a ovoposição de insetos, na qual a larva se alimenta dos tecidos da semente ou fruto (Briese 2000). Huey *et al.* (2007) verificaram que sementes de *Ruellia tweediana*, na Flórida, eram predadas por larvas de diptera *Melanagromyza ruelliae* Spencer. Durante as coletas, foi observado larvas predando os frutos de *Justicia lanstyakii*. Em *Ruellia nitens* e *Ruellia incompta*, também se observou predação, mas não foi possível identificar os causadores.

A disponibilidade de água, de nutrientes no solo e as condições climáticas influenciam na qualidade fisiológica das plantas, que, por conseguinte, afeta a dieta e abundância dos insetos herbívoros (White 1984). Em *Qualea parviflora* Mart., foi observado que a concentração de nutrientes no solo interferiu no balanço de nutrientes das folhas, nas quais, quanto mais eram nutritivas e tenras, mais eram predadas e apresentavam galhas. Porém, indivíduos que possuíam folhas com mais esclerênquima e compostos secundários, como tanino, foram menos consumidos (Gonçalves-Alvim *et al.* 2004).

Em Acanthaceae, Calvo-Irabié'n & Islas-Luna (1999) registrou que cerca de 75% dos frutos e sementes de *Aphelandra aurantiaca* (Scheidw.) Lindl. (Acanthaceae), herbácea da floresta no México, sofreram herbivoria antes da dispersão. Os autores sugeriram, a partir dos resultados, que a predação teve um importante impacto na abundância e na distribuição espacial da espécie.

Resultados semelhantes foram observados em *J. lanstyakii*, na qual a predação dos frutos e sementes reduziu o número de sementes viáveis. Além disso, embora Vilar (2009) afirme que *J. lanstyakii* seja frequente no Distrito Federal, nas áreas de coleta, foi observado que os indivíduos eram pouco numerosos (cerca de oito indivíduos por hectare) para suprir os experimentos de germinação e estaquia simultaneamente. Desta forma, as matrizes

encontradas de *J. lanstyakii* foram preferencialmente utilizadas para os experimentos de estaquia (capítulo II). Sendo assim, a predação das sementes e a baixa densidade indivíduos limitaram o número de sementes coletadas para *J. lanstyakii*.

A predação de frutos e sementes também foi encontrada em *R. nitens* e *R. incompta*. Entretanto, não afetou fortemente o número de sementes coletadas, provavelmente em virtude das características morfológicas dessas espécies. Estas apresentam mais ramos (5-10 por planta), onde cada ramo produzido durante a fase vegetativa disponibiliza muitas flores e frutos, no período reprodutivo. Foi observado em *J. lanstyakii* a formação de, no máximo, três ramos vegetativos, que formavam, de maneira geral, inflorescência terminais, embora a ocorrência de inflorescências axilares também ocorra.

O número de sementes por fruto de Acanthaceae é variável, podendo ser elevado, como em *Elytraria* Michx. (12 a 16), *Hygrophila* A. Br., (12 a 18) e em *Staurogyne* Wall. (25 a 30) ou reduzido, como em *Aphelandra* R. Br. (4), *Dicliptera* Juss. (4) ou *Lepidagathis* Willd. (4) (Wasshausen & Wood 2004). As espécies em estudo se comportaram como estas últimas, pois os frutos de *R. nitens* e *R. incompta* continham, no máximo, quatro sementes, e de *J. lanstyakii* entre duas e quatro, corroborando com informação de Barroso *et al.* (1999).

Nas coletas iniciais de *R. nitens*, o tipo de deiscência das cápsulas, que é explosiva, (Witztum & Schulgasser 1995), o tamanho reduzido das sementes (0,61 cm de comprimento), assim como a limitada literatura sobre a dinâmica de frutificação das espécies em estudo restringiram números de sementes disponíveis para a realização dos experimentos de germinação (20 sementes). A metodologia proposta para aumentar a eficiência das coletas seguintes, utilizando sacos feitos de tule, aumentou cerca de 10 vezes número de sementes coletadas de *R. nitens* (216 sementes). Nas outras espécies, todas as coletas foram realizadas de acordo com metodologia proposta, desta forma obteve-se 216 sementes de *R. incompta* e 20 sementes de *J. lanstyakii*.

Na coleta de sementes de frutos deiscentes, o conhecimento da época de abertura dos frutos é essencial, principalmente quando as sementes são pequenas ou aladas, pois é necessário coletar antes que ocorra a dispersão (Nogueira & Medeiros 2007). Nichols (2005) sugere que a coleta dos frutos de Acanthaceae seja realizada depois que as cápsulas passarem da coloração verde para cor de palha e que os frutos sejam armazenados em sacos de papel e em local aquecido, para que estes abram naturalmente. No entanto, nem sempre a modificação na coloração do fruto está associada à maturação da semente, como no pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.), cuja maturação completa só ocorre com a queda do fruto (Melo *et al.* 2008). Além disso, na literatura de Acanthaceae, não existem informações sobre o período

necessário para a abertura do fruto, após pericarpo adquirir a cor palha, como indicada por Nichols (2005). As espécies estudadas nesta pesquisa apresentam dispersão assincrônica, isto é, a dispersão das sementes ocorre ao longo de um período mais amplo. Assim, a metodologia proposta por Nichols (2005) apresenta limitações, pois haveria necessidade de realizar coletas pelo menos semanais, o que seria difícil e oneroso, considerando a distância das áreas de coleta. A metodologia de coleta adotada neste trabalho resolveu com eficiência a obtenção de sementes de *R. nitens* e *R. incompta*.

Em termos gerais, os estudos fisiológicos realizados sobre sementes do Cerrado limitam-se à germinação, a cerca de três aspectos: fotoblastismo, temperatura e quebra de dormência (Zaidan & Carrera 2008). Mas o estudo da biometria de sementes também é importante, pois auxilia na identificação das espécies (Lopes *et al.* 2010). A classificação das sementes por tamanho ou por peso é uma estratégia que pode ser adotada para uniformizar a emergência das plântulas e para a obtenção de mudas de tamanho semelhante ou de maior vigor (Carvalho & Nakagawa 2000).

J. lanstykii, *R. nitens* e *R. incompta* possuem sementes com médias de comprimento de 0,27, 0,61 e 0,56 cm, respectivamente. Essas dimensões são semelhantes, de forma geral, às das demais espécies desses gêneros (Ezcurra 2002; Ezcurra 1993). Sendo assim, conclui-se que as sementes podem ser identificadas facilmente pelas dimensões e características morfológicas, pertencendo à esses gêneros.

De acordo com a classificação de tamanho de sementes de Bonner *et al.* (1984) citado por MAPA (2009), as sementes das espécies tratadas no presente estudo são classificadas como pequenas, pois o peso de mil sementes seria menor do que 200 g. Segundo Fenner & Thompson (2005), sementes pequenas são dispersas com mais facilidade, pois são mais leves. Em geral, germinam rapidamente, pois absorvem água com mais agilidade, uma vez que possuem maior razão superfície: volume em contato com a água (Stamp 1990).

- **Desinfestação e germinação *in vitro***

A desinfestação é uma das fases cruciais para o estabelecimento de cultura *in vitro* (Srivastava *et al.* 2010). A efetividade dos tratamentos de descontaminação depende da substância usada, da concentração e dos períodos de exposição do explante aos agentes, além de ser dependente do nível de tolerância da espécie a esses produtos (Hartmann *et al.* 2002).

As sementes, geralmente, são desinfestadas com hipoclorito de sódio tanto para espécies herbáceas quanto para arbóreas (Bevilacqua *et al.* 2011; Nascimento *et al.* 2007).

Algumas sementes de Acanthaceae foram desinfestadas com protocolos de desinfestação semelhantes, tais como *Eranthemum nervosum* (Vahl) R. Br., arbusto exótico perene, cujas sementes foram desinfestadas com 20% de água sanitária (Clorox[®]) por 15 min (Suraninpong & Te-chato 2010) e *Andrographis paniculata* Nees, que foram descontaminadas com hipoclorito de sódio, a 5%, por 20 min (Prathanturarug *et al.* 1996).

Em trabalhos com espécies do Cerrado, o hipoclorito de sódio tem sido utilizado em várias concentrações (0,5%, 2,5%, 5,0%) e tempos de imersão (5, 10, 15, 30 min) (Coelho *et al.* 2001; Souza *et al.* 2003; Martinotto *et al.* 2007). Sementes de *Byrsonima intermedia* A. Juss., de nome popular murici, foram descontaminadas com sucesso com hipoclorito de sódio 0,5 % de cloro ativo por 5 minutos (Nogueira *et al.* 2004).

Considerando que as sementes de *J. lanstyakii*, *R. nitens* e *R. incompta* apresentam dimensões semelhantes foi utilizado o mesmo protocolo de desinfestação para as três espécies. Em *J. lanstyakii* a descontaminação em todos os tempos de imersão de hipoclorito de sódio comercial (5, 15 e 30 min) foram eficientes para descontaminar 100% das sementes testadas. Nos diferentes meios de cultivo (MS 100%, MS 50% e ágar-água) a descontaminação das sementes de *R. nitens* foi, de maneira geral, acima de 50% em todos os tempos de imersão de hipoclorito. As porcentagens mais elevadas foram observadas em MS 50%, com 15 (95,8) e 30 min (91,7%), e ágar-água, com 30 min (83,3%). Em *R. incompta*, as porcentagens foram elevadas em todos os tempos de imersão e meios, acima de 90,0%. Assim, resultados demonstram que 15 e 30 min de exposição são os mais indicados para descontaminação dessas espécies, corroborando com os resultados dos autores citados acima.

As porcentagens de descontaminação das sementes de *R. nitens* nos diferentes tratamentos apresentaram relativa variabilidade, quando comparadas com a descontaminação de *R. incompta* e *J. lanstyakii*. Esse resultado pode ter ocorrido devido à época de coleta, uma vez que os frutos de *R. nitens* iniciaram a deiscência em outubro, sendo coletados no início das chuvas. A presença de água nos frutos pode ter favorecido a proliferação de fungos, que teriam sido parcialmente retirados pelo protocolo testado, ao contrário dos frutos de *R. incompta* e *J. lanstyakii*, que já estavam em processo de deiscência em setembro, período sem chuva. Sugere-se, portanto, para elevar os índices de descontaminação de sementes de *R. nitens*, deve-se procurar coletar as sementes antes do período chuvoso, fazendo a coleta de frutos ainda fechados, mais próximo da época de deiscência, e colocá-los à meia-sombra até abertura espontânea dos frutos para outras espécies do Cerrado (Salomão *et al.* 2003).

Quanto à germinação de Acanthaceae, Nichols (2005) afirma que *Justicia flava* D.N. Gibson, *Justicia capensis* Thunb., *Justicia betonica* L. são propagadas com sucesso em viveiro por meio de sementes. No presente trabalho, *J. lanstykii*, inoculada em ágar-água, apresentou porcentagem de germinação de 100%, corroborando com o referido autor quanto à capacidade de germinação desse gênero. No entanto, estudos mais aprofundados sobre a germinação de sementes de *J. lanstykii*, com maior número amostral, são indispensáveis para confirmar os dados observados neste trabalho.

A ação do hipoclorito de sódio, durante a descontaminação, pode retirar quimicamente as barreiras à embebição da semente, como consta no trabalho de Noletto *et al.* (2010). De acordo com esse trabalho a cutícula das sementes de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.) foi removida parcialmente pelo hipoclorito, reduzindo o tempo de embebição da semente, quando comparado ao controle. No presente trabalho, a germinação de *R. nitens* foi maior quando as sementes foram imersas no hipoclorito por 15 min (88,9%) em relação aos demais tempos, 5 e 30 min (75,0% e 68,1%, respectivamente). Esse resultado provavelmente pode ser explicado pela retirada da cutícula da semente, assim como em copaíba. Entretanto, o fato de retirar essa camada cerosa nas sementes de copaíba, não favoreceu diretamente a sua germinação, mas somente a embebição.

Com 30 min de exposição, a germinação de *R. nitens* foi menor (68,1%), indicando que o hipoclorito pode ter provocado danos nos tecidos embrionários, reduzindo a porcentagem de germinação. Deste modo, o melhor tempo de imersão no hipoclorito verificadopara a germinação de *R. nitens* foi 15 min.

O tempo médio de germinação permite inferir sobre a velocidade de germinação, uma vez que se refere ao tempo médio necessário para que um conjunto de sementes germine (Ferreira & Borghetti 2004). Ocorreu retardamento significativo do tempo médio de germinação em *R. nitens* em 30 min de hipoclorito (5,1 dias), o que sugere que esse tratamento pode ter afetado algum tecido embrionário. Esse resultado foi contrário ao de Noletto *et al.* (2010), no qual o uso do hipoclorito por 60 min não modificou o tempo médio de germinação de copaíba. Para *R. incompta*, não houve alteração na porcentagem de germinação, nem tempo médio de germinação em relação ao tempo de hipoclorito. Já em *J. lanstykii*, houve redução do tempo médio de germinação com o aumento do tempo de exposição ao hipoclorito de sódio (6,0 dias - 5 min; 3,8 dias - 15 min; 3,6 dias - 30 min). Neste caso, provavelmente o hipoclorito provocou microfissuras na testa da semente, que viabilizou a embebição e germinação mais rápida. No entanto, não foi possível realizar análise estatística para essa variável em *J. lanstykii* devido ao pequeno número amostral de

sementes. Esses resultados demonstram que a estrutura da semente varia entre essas espécies, pois reagiram de maneira diferente na germinação e no tempo médio de germinação, frente ao tempo de imersão no hipoclorito de sódio.

A concentração de sais no meio também foi um fato importante na germinação de sementes *in vitro* de *R. nitens*, na qual o meio MS 50% propiciou maior porcentagem de germinação (90,3%) do que MS 100% e ágar-água, sendo ambos 70,8%. Esse resultado sugere que o meio MS na forma diluída aperfeiçoa a germinação dessa espécie, pois a concentrações dos sais do MS 100% devem estar acima do necessário. Sementes e embriões de murici pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.) germinaram melhor em meio WPM 50%, meio menos concentrado em nitrato e amônia do que o meio MS (Nogueira *et al.* 2004).

Em relação ao desenvolvimento da plântula, o tempo de hipoclorito alterou significativamente o comprimento da parte aérea *R. nitens*, pois foi significativamente maior quando as sementes foram imersas durante 30 min (0,67 cm) do que em 5 min (0,44 cm). Além do tempo de imersão, a concentração das substâncias desinfestantes também pode influenciar no desenvolvimento da plântula, como no cacto *Nopalea cochenillifera* (L.) Salm Dyck, cujo comprimento da plântula aumentou em concentrações crescentes de hipoclorito sódio (0,5; 1,0 e 1,5%) (Castro *et al.* 2011).

O meio MS 50% também influenciou no crescimento da parte aérea de *R. nitens*. (0,62 cm), diferindo do ágar-água (0,2 cm). Da mesma forma, o desenvolvimento das raízes foi influenciado pelo meio MS, pois o comprimento da raiz foi superior tanto em 50% quanto em 100% em relação ao observado no ágar-água. Portanto, de maneira geral, o meio MS 50% é o mais indicado dentre os estudados para a germinação e desenvolvimento de plântulas de *R. nitens*. Este resultado difere do desenvolvimento de plântulas *in vitro* de mangaba no trabalho de Ledo *et al.* (2007), no qual o comprimento da parte aérea não foi maior nem em MS 100 ou 50%, o que demonstra que cada espécie reage de maneira diferente frente aos mesmos tratamentos.

Para *R. incompta* houve interação entre meio e tempo de hipoclorito para comprimento da parte aérea e raiz. Considerando que os melhores resultados de crescimento de parte aérea (0,19 cm) e raiz (3,76 cm), observados até o 30º dia de cultivo, foram encontrados em MS 100%, conclui-se que é o mais indicado para o desenvolvimento da plântula. Contudo, após esse período, as plântulas apresentaram sintomas de estresse, como oxidação e formação de lenticelas na raiz principal, e, cerca de 60 dias após, 100% das plântulas haviam morrido.

O aparecimento de lenticelas no sistema radicular de plântulas germinadas *in vitro*, de maneira geral, indica que a planta está sob algum tipo de estresse. Lenticelas são aberturas

localizadas, geralmente, no revestimento dos caules, que permitem as trocas gasosas entre a planta e o ar (Taiz & Zeiger 2004). Em *Pinus sylvestris* L. foram observadas lenticelas nas raízes, quando as plântulas foram cultivadas em casa de vegetação, sob condições de baixa disponibilidade de oxigênio, o que não acontece em condições naturais (Aronen & Häggman 1994). *In vitro*, a ocorrência de lenticelas proliferadas, da base para o ápice, cobrindo eventualmente todo o explante, foi relatada em *Ceratonia siliqua* L., quando cultivada com 0,5 mg.L⁻¹ de BAP e 0,1 mg.L⁻¹ AIB (Vinterhalter *et al.* 1992). Nesta espécie aumento da concentração de sacarose acima de 30,0 g.L⁻¹ e a redução de nitrogênio no meio de cultura reduziu o número de lenticelas por explante (Vinterhalter & Vinterhalter 1999; Vinterhalter *et al.* 2007).

Em *R. incompta*, a oxidação da raiz foi influenciada mais fortemente pelo meio MS 50 e 100% (73,9% e 74,1%, respectivamente) e a formação de lenticela pelo ágar-água (58,7%). O resultado encontrado difere de Vinterhalter *et al.* (2007), pois o meio ágar-água não apresenta fonte de nitrogênio, e mesmo assim, foi o que mais formou lenticelas. Embora a lenticela seja formada na tentativa de facilitar a difusão de oxigênio, também ocorre a eliminação de produtos voláteis potencialmente tóxicos, como etanol, etileno e acetaldeído, que muitas vezes acumulam durante a hipoxia (Bailey-Serres & Voeselek 2008). Portanto, esses componentes podem ter se acumulado nos tubos de ensaio provocando a oxidação dessas plântulas.

A mortalidade das plântulas de *R. incompta* também pode ter ocorrido devido à ausência de sacarose nos meios. Estudo de Pivetta *et al.* (2010) sobre o desenvolvimento de plântulas da orquídea *Caularthron bicornutum* Raf. em relação às concentrações de sacarose no meio mostraram que a sacarose impulsionou o crescimento das plântulas e a sobrevivência em relação ao controle. No entanto, a adição de sacarose pode diminuir a porcentagem de germinação, como ocorreu em sementes de murici pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.), de 60% para 40%, indicando que a sacarose afetou o balanço osmótico, prejudicando o processo germinativo (Nogueira *et al.* 2004). Estudos complementares sobre a germinação *in vitro* de *R. incompta* em meio contendo uma fonte de carbono são necessários para avaliar sua influência na germinação e crescimento das plântulas.

Para as três espécies estudadas, o comprimento da raiz foi maior em relação ao da parte aérea. De maneira geral, esse padrão de crescimento tem sido frequentemente verificado no Cerrado (Castro & Kauffman 1998). Estudos sugerem que essa desproporção de biomassa é uma resposta adaptativa frente às condições ambientais do Cerrado, tais como a ocorrência

de fogo, a baixa fertilidade dos solos e o stress hídrico sazonal. (Miranda *et al.* 2002; Haridasan 2008).

O comprimento da parte aérea de *R. nitens* ficou em torno de 0,50 cm, mas *R. incompta* apresentou comprimentos entre 0,01 e 0,19 cm. De forma geral, o comprimento de explantes utilizados na micropropagação é, no máximo, 1,0 cm. Em *Croton antisiphiliticus* Mart. (pé-de-perdiz) espécie arbustiva nativa do Cerrado, foram utilizados explantes de 0,5 cm para a proliferação dos brotos (Oliveira *et al.* 2011). Portanto, a parte aérea de *R. nitens* pode ser usada como explante na micropropagação. Entretanto, como o comprimento da parte aérea de *R. incompta* é muito reduzido e dificulta seu uso para esse fim. Desse modo, seria mais adequado aproveitar outras partes dessa plântula, tais como cotilédones, hipocótilo e raiz para estudos de regeneração (Silva *et al.* 2006; Beltrão *et al.* 2008). Ainda em *R. incompta*, é importante que excisão dos explantes seja feita até 30 dias, uma vez que a maioria das plântulas morreu depois desse período.

A formação de plântula normal em *R. nitens* foi maior em 15 min de hipoclorito (55,6%), quando comparada com os outros dois tempos (cerca de 30%). Resultado similar foi observado em *R. incompta*, mas em menores porcentagens. Em *R. nitens*, no meio MS 50% também ocorreu maior porcentagem de plântulas normais (69,4%) em relação ao MS 100 % e agar-água, que apresentaram o mesmo resultado (4,8%). Conclui-se que a concentração de sais do MS diluído à metade favoreceu a formação de plantas normais. Este resultado difere de plântulas de mangaba germinadas *in vitro*, onde o meio MS 100 e MS 50% favoreceram a formação de plântulas normais (Ledo *et al.* 2007).

- **Brotos de matrizes adultas**

A micropropagação permite a produção de grande quantidade de brotos em qualquer época do ano, em um reduzido espaço físico e com maior qualidade fitossanitária do material cultivado (Erig & Schuch 2005). O uso de matrizes adultas possibilita a fixação de matrizes com características fenotípicas de interesse para a produção comercial (Guerra *et al.* 1999). Contudo, a descontaminação de brotos adultos é mais difícil do que das sementes, pois resistem menos à ação dos agentes desinfestantes, podendo ocorrer a perda de muitos explantes devido a fitotoxicidade (Nietsche 2006)

Os tipos de hipoclorito, bem como suas concentrações, apresentam diferentes resultados de descontaminação em relação a cada espécie. Em espécies do Cerrado, tem-se observado o uso do hipoclorito de sódio em várias concentrações (Almeida & Sheperd 1999; Spera *et al.* 2001; Silva *et al.* 2008). Associado a esse agente desinfestante, outras substâncias também são aplicadas, tais como álcool, fungicidas e antibióticos, demonstrando a dificuldade de descontaminação (Souza *et al.* 2006). O hipoclorito de cálcio é menos utilizado na desinfestação de espécies do Cerrado, embora tenha efeito menos tóxico para as plantas (Martins *et al.* 2011; Oliveira *et al.* 2011). Também foi observado o uso de cloreto de mercúrio (HgCl_2), substância de alta toxicidade, para a desinfestação de brotos das acantáceas *Graptophyllum pictum* L. (Koilpillai & Wilson 2010) e *Justicia gendarussa* Burm. F. (Janarthanam & Sumathi 2010).

No trabalho, tanto hipoclorito de sódio, 6%, quanto de cálcio demonstraram bons resultados de desinfestação para os brotos de matrizes adultas de *J. lanstykii* e *R. nitens* (entre 100% e 45,8%), não diferindo entre os fatores tipo de hipoclorito e tempo de imersão. Já para *R. incompta*, o resultado foi influenciado pelo tempo de exposição, onde a maior porcentagem de descontaminação foi em 60 min (40,5%), que se igualou ao de 30 min (27,1%) e se diferiu de 15 min (12,8%). Portanto, para *J. lanstykii* e *R. nitens*, a desinfestação acima de 15 min elimina boa parte dos microorganismos, mas para *R. incompta* é necessário ajuste no tempo de exposição ou na concentração para elevar a descontaminação a mais de 50%.

Apesar da descontaminação ter ocorrido nos dois tipos de hipoclorito, o hipoclorito de cálcio permitiu maior sobrevivência dos brotos, principalmente em *J. lanstykii*, com 91,3% (15 min) de brotos vivos, seguido de 75,0% em *R. nitens* e 41,0% em *R. incompta*. O resultado encontrado corrobora com Diniz *et al.* (2008), que verificou que o hipoclorito de cálcio por 10 min foi mais eficiente (73%) e provocou menor oxidação (38,0%) de brotos de lírio-da-paz (*Spathiphyllum wallisi* Regel) do que hipoclorito de sódio a 2%. Segmentos nodais de *Mandevilla illustris* (Vell) Woodson (jalapa), planta nativa do Cerrado, foi descontaminada com sucesso por protocolo que continha hipoclorito de cálcio, a 0,5%, por 30 min (Biondo *et al.* 2004). Diante do exposto, o hipoclorito de cálcio é mais indicado para desinfestação das três espécies estudadas devido ao seu menor efeito fitotóxico.

Observam-se diversos padrões de multiplicação de acordo com a espécie a ser cultivada. Certas espécies produzem muitos brotos por subcultivo, porém tendem a ter comprimentos menores e até podem ser atrofiados (Arellano & Pinto 1993; Melo *et al.* 2008). Em outras espécies o explante produz brotos em menor quantidade, mas são mais alongados

e, geralmente, enraízam facilmente (Bucher 2002). Os brotos de *J. lanstykii* e *R. nitens* produziram uma média de dois segmentos nodais por explante e, em geral, alongados. Além disso, brotos de *J. lanstykii* enraizaram facilmente na ausência de reguladores. Esses dados corroboram com o último padrão de multiplicação citado.

As concentrações de BAP utilizadas (0,0; 0,01; 0,1 mg.L⁻¹) não influenciaram estatisticamente o número de segmentos nodais produzidos por explante de *J. lanstykii* e *R. nitens*. Em Cerrado *Macrosyphonia velame* (St. Hil.) (velame), planta do Cerrado, o meio sem adição de citocinina promoveu maior número de brotos e maior altura em relação a várias concentrações de BAP, CIN, 2ip e TDZ (Martins *et al.* 2011). Estes autores afirmam que estudos realizados com espécies endêmicas do Cerrado têm revelado que, de modo geral, ausência ou reduzidas concentrações de citocininas são mais adequadas ao desenvolvimento *in vitro* dessas espécies.

Em outras acantáceas, maiores concentrações de BAP foram utilizadas para a fase de multiplicação, tais como em *Justicia gendarussa* Burm. f. (Janarthanam & Sumathi 2010) e *Crossandra infundibuliformis* (Girija *et al.* 1999), que produziram maior número de brotos com 1 mg.L⁻¹. Em *Adhatoda vasica* Nees, o meio suplementado com 2,0 mg.L⁻¹ de BAP e 0,2 mg.L⁻¹ de NAA apresentou maior brotação (Khalekuzzaman *et al.* 2008). Em *Ruellia linearibracteolata* Lindau, o número de brotos foi maior em 1,5 mg.L⁻¹ de BAP com 0,5 mg.L⁻¹ de Cinetina e 0,5 mg.L⁻¹ de ANA. Considerando o uso de maiores concentrações, sugere-se que sejam realizados estudos posteriores com novas concentrações e citocininas, para verificar se há maior produção de brotos por explante.

O número de segmentos nodais de *J. lanstykii* foi influenciado pelo subcultivo, onde o segundo subcultivo (2,5 segmentos) superou o primeiro (1,7 segmentos). Em *R. nitens* não houve influência do subcultivo. Em marmeleiro (*Alibertia edulis* Rich.), três subcultivos não diferiram no número de brotos nas concentrações 0,0; 0,1; 0,5; 1,0 mg.L⁻¹ BAP (Silva *et al.* 2008). Esses autores verificaram que a associação de 0,5 mg.L⁻¹ BAP e 0,5 mg.L⁻¹ da auxina AIB propiciaram número crescente de brotos nos subcultivos. Os resultados de *J. lanstykii* sugerem que essa espécie tem boa capacidade de brotação, mas tem potencial para ser aprimorada com a adição de uma auxina, como AIB, em baixas concentrações.

Durante a fase de multiplicação, a formação de raízes e calos na base dos explantes ocorreu em *J. lanstykii*. A ocorrência de raiz nos explantes foi significativamente maior em 0,0 mg.L⁻¹ BAP (35,4%) do que nos outros tratamentos. O enraizamento de brotos na ausência de reguladores é encontrado em outras espécies do Cerrado (Noletto & Silveira 2004; Bonilla *et al.* 2007). O enraizamento ocorreu, provavelmente, pela ausência de citocinina

externa e pela presença de folhas recém formadas, que são promotoras do enraizamento, pois auxinas, carboidratos e outros fatores de enraizamento são translocados do ápice para a base do explante (Hartmann *et al.* 2002).

A formação de calos na base dos explantes indica que a relação auxina/citocinina pode não estar adequada ao desenvolvimento das brotações. Em mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) acréscimos de BAP aumentou a ocorrência de calos na base dos explantes (Soares *et al.* 2007). Diversos trabalhos assinalam que concentrações supra-ótimas de citocininas são responsáveis pelo desenvolvimento de calos na base dos explantes, além de sintomas como clorose, nanismo e hiperhidricidade dos novos brotos formados (Krikorian *et al.* 1988; Martins *et al.* 2011). Em *J. lanstykii*, foi observado presença de calo em todos os tratamentos, com exceção de 0,0 mg.L⁻¹ BAP no segundo subcultivo. De maneira geral, embora a porcentagem de explantes com calo nos tratamentos testados não tenham apresentado diferenças significativas, no segundo subcultivo foram observadas as maiores porcentagens. Estes resultados indicam, provavelmente, que as concentrações de citocinina devem estar em excesso.

Considerando o exposto, sugere-se outros tipos de citocinina que possam interagir melhor com essas espécies. Um exemplo é a cinetina, que apresentou bons resultados na multiplicação da acantácea *Andrographis paniculata* Nees (Prathanturarug *et al.* 1996). *Barleria greenii* M. Balkwill & K. Balkwill produziu maior número de brotos e menor índice anormalidade, tais como hiperhidricidade, com a citocinina aromática meta-Metoxi topolina ribosideo (MemTR) (Amoo *et al.* 2011). O uso de citocininas combinadas com auxinas também tem mostrado resultados satisfatórios em espécies do Cerrado, tais como em pequi, *Caryocar brasiliense* Camb. (Santos *et al.* 2006) e marmeleiro, *Alibertia edulis* Rich. (Silva *et al.* 2008).

Em *R. nitens*, não houve formação de raiz no tratamento de enraizamento, o que pode indicar que essa espécie precise de maiores quantidades de auxina exógena. A diluição do meio MS também pode ser outro recurso a ser utilizado para o enraizamento *in vitro* de *R. nitens*. Na acantácea *Beloperone plumbaginifolia* (Jacq.) Nees, pequeno arbusto nativo, a indução da raiz ocorreu melhor com MS 50% (Shameer *et al.* 2009). No entanto, em duas cultivares de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osb.) a redução dos nutrientes do MS também reduziu o enraizamento *in vitro* (Mendes *et al.* 2011). Sendo assim, estudos mais aprofundados sobre a fase de enraizamento de *R. nitens* são necessários. Já em *J. lanstykii*, o tratamento de enraizamento foi eficaz para *Justicia lanstykii*, pois ocorreu 60% de brotos

enraizados em 0,0 e 40% em 0,01 mg.L⁻¹ de AIB. Conclui-se que *J. lanstyakii* possui bom potencial de enraizamento mesmo sem uso de auxina.

5. CONCLUSÕES

1) A produção de mudas de espécies nativas de valor ornamental por meio da germinação *in vitro* e micropropagação são potencialmente viáveis.

2) A desinfestação com hipoclorito de sódio por no mínimo 15 min possibilita maior descontaminação de sementes de *J. lanstyakii*, *R. nitens* e *R. incompta*.

3) A imersão das sementes de *R. nitens* em hipoclorito de sódio por 15 min foi eficaz para elevar a germinação e reduzir o tempo médio de germinação.

4) O meio MS 50% e 100% são os mais indicados dentre os estudados para a germinação e desenvolvimento de plântulas de *R. nitens* e *R. incompta*, respectivamente.

5) Em plântulas de *R. incompta*, os explantes devem ser retirados até 30 dias de cultivo, devido a baixa sobrevivência das plântulas após este período.

6) O hipoclorito de cálcio apresentou maior sobrevivência de explante descontaminados de *J. lanstyakii*, *R. nitens*, *R. incompta*.

7) As concentrações de BAP produziram, estatisticamente, médias semelhantes do número de segmentos nodais em relação às do tratamento controle de *J. lanstyakii* e *R. nitens*, e provocaram calogênese em *J. lanstyakii*.

8) O segundo subcultivo apresentou maior número de segmentos nodais para *J. lanstyakii*.

9) O tratamento de enraizamento *in vitro* produziu raízes em *J. lanstyakii*, tanto em 0,0 quanto 0,01 mg.L⁻¹ de AIB.

10) O tratamento de enraizamento *in vitro* para *R. nitens* não apresentou formação de raízes.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, V. P. & Shepherd, S. L. K. 1999. *Sinningia allagophylla* (Gesneriaceae): *In vitro* cultivation of a native plant of the Brazilian Cerrado. **Revista brasileira de Botânica** 22 (3): 381-384.
- Amoo, S. O.; Finnie, J. F.; Staden, J. V. 2011. The role of meta-topolins in alleviating micropropagation problems. **Plant Growth Regulation** 63:197–206.
- Arellano, E. F. & Pinto, J. E. B. P. 1993. Propagação *in vitro* de *Kielmeyera coriacea*: Efeito das diversas concentrações combinadas de benzilaminopurina e ácido naftalenoacético na multiplicação de brotos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 28 (1): 25-31.
- Aronen, T. S. & Häggman, H. M. 1994. Occurrence of lenticels in roots of scots Pine seedlings on different growth conditions. **Journal of Plant Physiology** 143 (3): 325-329.
- Barroso, G. M.; Morim, M. P.; Peixoto, A. L.; Ichaso, C. L. F. 1999. **Frutos e sementes – Morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas**. Viçosa: UFV, 443p.
- Beltrão, A. E. S.; Lamoca-Zarate, R. M.; Beltrão, F. A. S. 2008. Cultura *in vitro* de *Solanum paludosum*: Regeneração. **Caatinga** 21(4): 79-82.
- Bailey-Serres, J. & Voesenek, L. A. C. J. 2008. Flooding stress: acclimations and genetic diversity. **Annual Review of Plant Biology** 59: 313–339.
- Bevilacqua, C. B.; Reiniger, L. R. S.; Golle, D. P.; Rosa, F. C. 2011. Desinfestação superficial, germinação e regeneração *in vitro* a partir de sementes de calêndula. **Ciência Rural** 41 (5): 761-766.
- Biondo, R.; Soares, A. M.; Bertoni, B. W.; França, S. C.; Pereira, A. M. S. 2004. Direct organogenesis of *Mandevilla illustris* (Vell) Woodson and effects of its aqueous extract on the enzymatic and toxic activities of *Crotalus durissus terrificus* snake venom. **Plant Cell Reports** 22: 549-552.
- Bonner, F. T. 1984. Tolerance limits in measurement of tree moisture. **Seed Science and Technology** 12:789-794. In: MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2009. **Regras para análise de sementes**. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA/ACS, pp.314.

- Bonilla, M. G. O.; Pinto, J. E. B. P.; Reis, E. S., Corrêa, R. M.; Costa, L. C. B. 2007. Micropropagação de *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth., uma planta medicinal. **Plant Cell Culture & Micropropagation** 3 (2): 89-95.
- Briese, D. T. 2000. Impact of the *Onopordium capitulum* weevil *Larinus latus* on seed production by its host-plant. **Journal of Applied Ecology** 37: 238-246.
- Bucher, J. P. 2002. **Aspectos de conservação *in vitro* e micropropagação de mama-cadela (*Brosimum gaudichaudii* Tréc., Moraceae)**. 64p. Dissertação em Botânica - Departamento de Botânica, Universidade de Brasília, Brasília.
- Calvo-Irabie'n, L.M. & Islas-Luna, A. 1999. Predisersal predation of an understory rainforest herb *Aphelandra aurantiaca* (Acanthaceae) in gaps and mature forest. **American Journal of Botany** 86: 1108-1113.
- Carvalho, N. M. & Nakagawa, J. 2000. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4ªed. Jaboticabal: FUNEP, 588p.
- Castro, E. A. de & Kauffman, J. B. 1998. Ecosystem structure in the Brazilian Cerrado: a vegetation gradient of aboveground biomass, root mass and consumption by fire. **Journal of Tropical Ecology** 14: 263-283.
- Castro, J. P.; Araújo, E. R.; Rego, M. M.; Rego, E. R. 2011. *In vitro* germination and disinfestation of sweet cactus *Nopalea cochenillifera* (L.) Salm Dyck). **Acta Scientiarum Agronomy** 33 (3): 509-512.
- Coelho, M. C. F.; Pinto, J. E. B. P.; Morais, A. R.; Cid, L. P. B.; Lameira, O. A. 2001. Germinação de sementes de sucupira-branca *Pterodon pubescens* (Benth.) Benth. *in vitro* e *ex vitro*. **Ciência e Agrotecnologia** 25 (1): 38-48.
- Diniz, J. D. N.; Almeida, J. L.; Oliveira, A. B.; Bezerra, A. M. E. 2008. Protocolo para desinfestação, multiplicação e enraizamento *in vitro* de *Spathiphyllum wallisi*. **Revista Ciência Agronômica** 39 (1): 107-113.
- Erig, A. C.; Schuch, M. W. 2005. Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural. **Ciência Rural** 35 (4): 961-965.
- Ezcurra, C. 1993. Systematics of *Ruellia* (Acanthaceae) in Southern South America. **Annals of the Missouri Botanical Garden** 80 (4): 787-845.
- Ezcurra, C. 2002. El género *Justicia* (Acanthaceae) em Sudamérica Austral. **Annals of Missouri Botanical Garden** 89: 225-280.
- Fenner, M. & Thompson, K. 2005. *The Ecology of Seeds*. Cambridge University Press.: Cambridge. 241p.
- Ferreira, A. G. & Borghetti, F. 2004. **Germinação: do básico ao aplicado**. Artmed. 324p.

- Girija, S.; Ganapathi, A.; Vengadesan, G. 1999. Micropropagation of *Crossandra infundibuliformis* (L.) Nees. **Scientia Horticulturae** 82: 331-337.
- Gonçalves-Alvim, Silmary J.; Collevatti, Rosane G.; Fernandes, G. Wilson. 2004. Effects of genetic variability and habitat of *Qualea parviflora* (Vochysiaceae) on herbivory by free-feeding and gall-forming. **Annals of Botany** 94: 259–268.
- Grabe, D. F. 1976. **Manual do teste tetrazólio em sementes**. Associação de Analistas Oficiais de Sementes. Ministério da Agricultura –AGIPLAN. Brasília-DF. 85p
- Graham, V. A.W. 1988. Delimitation and Infra-Generic Classification of *Justicia* (Acanthaceae). **Kew Bulletin** 43 (4): 551-624.
- Grattapaglia, D. & Machado, M. A. 1998. Micropropagação. In: **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Torres, A.; Caldas, S.; Buso, J. A. EMBRAPA-SPI/ EMBRAPA – CNPH. v1. Brasília. 508p.
- Guerra, M. P.; Vesco, L. L. D.; Rosete, P.; Schuelter, A. R.; Nodari, R. O. 1999. Estabelecimento de um protocolo regenerativo para a micropropagação do abacaxizeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 34 (9):1557-1563.
- Haridasan, M. 2008. Nutritional adaptations of native plants of the Cerrado biome in acid soils. **Brazilian Journal Plant Physiology** 20(3): 183-195.
- Hartmann, H. T; Kester, D. E; Davies, F. T; Geneve, R. L. 2002. **Plant propagation**. Prentice Hall. 7° ed. 873p.
- Herath, H. M. I.; Krishnarajah, S. A.; Wijesundara, D. S. A. 2008. Micropropagation of two endemic threatened cryptocoryne species of Sri Lanka. **Tropical Agricultural Research & Extension** 11: 19-24.
- Huey, L. A.; Steck, G. J.; Fox, A. M. 2007. Biological notes on *Melanagromyza Ruelliae* (Diptera: Agromyzidae), a seed feeder on the invasive mexican petunia, *Ruellia tweediana* (Acanthaceae). **Florida Entomologist** 90(4): 763-765.
- Janarthanam, B. & Sumathi, E. 2010. *In vitro* regeneration of *Justicia gendarussa* Burm. f. **Libyan Agriculture Research Center Journal Internation** 1 (5): 284-287.
- Joly, C. A.; Haddad, C. F. B.; Verdade, L. M.; Oliveira, M. C.; Bolzani, V. S.; Berlinck, R. G. S. 2011. Diagnóstico da pesquisa em biodiversidade no Brasil. **Revista USP** 89: 114-133.
- Junqueira, A. H. & Peetz, M. S. 2002. Os pólos de produção de flores e plantas ornamentais do Brasil: uma análise do potencial exportador. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental** 8: 25- 47

- Khalekuzzaman, M.; Rahman, M. S.; Rashid, M. H.; Hossain, M. S. 2008. High frequency *in vitro* propagation of *Adhatoda vasica* Nees through shoot tip and nodal explants culture. **Journal of Bio-science** 16: 35-39.
- Kiyuna, I.; Ângelo, J. A.; Coelho, P. J. 2009. Comércio Exterior da Floricultura Brasileira em 2008: lições para o setor. **Análises e Indicadores do Agronegócio** 4 (3): 1-5.
- Klink, C. A. & Machado, R. B. A. 2005. Conservação do Cerrado brasileiro. **Megadiversidade** 1(1): 150-155.
- Koilpillai, Y. J. & Wilson, S. 2010. *In vitro* propagation of *Graptophyllum pictum* L. (Acanthaceae) - A medicinal plant. **Journal of Pharmacy Research** 3(9): 2201-2202.
- Krikorian, A. D.; Kelly, K.; Smith, D. L. 1988. Hormones in tissue culture and micropropagation. Dans: "Plant hormones and their roel in plant growth and development". P.J. Davies, ed. Martinus Nijhoff, Kluwer Academic Publeshers, 2º ed, p.593-613.
- Ledo, A. da S.; Giuseppe, S. V. S.; Barboza, S. B. S.C.; Silva Junior, J. F. 2007. Crescimento inicial de mangabeira em diferentes meios de germinação *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia** 31(4): 989-993.
- Lopes, R. de M. F.; Freitas, V. L. de O.; Lemos Filho, J. P. de. 2010. Biometria de frutos e sementes e germinação de *Plathymenia reticulata* Benth. e *Plathymenia foliolosa* Benth. (Fabaceae - Mimosoideae). **Revista Árvore** 34 (5):797-805.
- MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2009. **Regras para análise de sementes**. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA/ACS, 399p.
- Martinotto, C.; Paiva, R.; Santos, B. R.; Soares, F. P.; Nogueira, R. C.; Silva, A. A. N. 2007. Efeito da escarificação e luminosidade na germinação *in vitro* de sementes de cagaiteira (*Eugenia dysenterica* dc.). **Ciência e Agrotecnologia** 31 (6):1668-1671
- Martins, L. M.; Pereira, A. M. S.; França, S. C.; Bertoni, B. W. 2011. Micropropagação e conservação de *Macrosyphonia velame* (St. Hil.) Muell. Arg. em banco de germoplasma *in vitro*. **Ciência Rural** 41(3): 454-458.
- McDade, L. A.; Daniel, T. F.; Kiel, C. A. 2008. Toward a comprehensive understanding of Phylogenetic relationships among lineages of Acanthaceae s.l. (Lamiales). **American Journal of Botany** 95(9): 1136–1152.
- Melo, J.T; Torres, R. A. A.; Silveira, C. E. S; Caldas, L. S.; 2008. Coleta, propagação e desenvolvimento inicial de plantas do Cerrado. In: **Cerrado: Ecologia e flora**. Vol 1. Sano, S. M.; Almeida, S. P; Ribeiro, J.F (Eds). EMBRAPA Cerrados, Brasília-DF. 1279p.

- Mendes, A.F.S.; Cidade, L.C.; Otoni, W.C.; Soares-Filho, W.S.; Costa, M.G.C. 2011. Role of auxins, polyamines and ethylene in root formation and growth in sweet orange. **Biologia Plantarum** 55 (2): 375-378
- Mendonça, R. C.; Felfili, J. M.; Walter, B. M. T.; Silva Júnior, M. C.; Rezende, A. R.; Filgueiras, T. S.; Nogueira, P. E. Fagg, C. W. 2008. Flora vascular do bioma Cerrado. In: **Cerrado: ecologia e flora**. Sano, S. M.; Almeida, S. P. de; Ribeiro, J. F. (edt). EMBRAPA-Cerrados. EMBRAPA-Informação Tecnológica. Brasília, DF. 1279 p.
- Meyer, J.Y & Lavergne, C. 2004. Beautés fatales: Acanthaceae species as invasive alien plants on tropical Indo-Pacific Islands. **Diversity and Distributions** 10: 333-347.
- Miranda, H. S.; Bustamante, M. M. C.; Miranda, A. C. 2002. The fire factor. In: **The Cerrados of Brazil: Ecology and natural history of a neotropical savanna** (P.S. Oliveira & R.J. Marquis, eds). Columbia University Press, New York, p. 51-68.
- Murashige, T. & Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum** 15 (3): 473-497.
- Nascimento, P. K. V. do; Franco, E. T. H.; Frassetto, E. G. 2007. Desinfestação e germinação *in vitro* de sementes de *Parapiptadenia rigida* Bentham (Brenam). **Revista Brasileira de Biociências** 5 (2): 141-143.
- Nath, S. & Buragohain, A. K. 2005. Micropropagation of *Adhatoda vasica* Nees – A Woody medicinal plant by shoot tip culture. **Indian Journal of Biotechnology** 4: 396-399.
- Nichols, G. 2005. **Growing Rare Plants: A practical handbook on propagating the threatened plants of southern Africa**. Southern African Botanical Diversity Network Report 36. Republic of South Africa: Capture Press. 170p.
- Nietsche, S. 2006. Estabelecimento *in vitro* de explantes de três cultivares de bananeira. **Ciência Rural** 36 (3): 989-991.
- Nogueira, A. C. B. & Medeiros, A. C. de S. 2007. Coleta de Sementes Florestais Nativas. **Circular Técnica** 144. EMBRAPA. 12p.
- Nogueira, C.; Paiva, R.; Castro, A. H. de; Vieira, C. V.; Abbade, L. C.; Alvarenga, A. A. 2004. Germinação *in vitro* de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Ciência e Agrotecnologia** 28 (5): 1053-1059.
- Noletto, L. G. & Silveira, C. E. S. 2004. Micropropagação de Copaíba - *Copaifera langsdorffii* Desf. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento** 33: 109-120.
- Noletto, L. G.; Pereira, M. F. R.; Amaral, L. I. V. 2010. Alterações estruturais e fisiológicas em sementes de *Copaifera langsdorffii* Desf. – Leguminosae - Caesalpinioideae

- submetidas ao tratamento com hipoclorito de sódio. **Revista Brasileira de Sementes** 32 (1): 45-52.
- Northcutt, C.; Davies, D.; Gagliardo, R.; Bucalo, K.; Determann, R. O.; Cruse-Sanders, J. M.; Pullman, G. S. 2012. Germination *in vitro*, micropropagation, and cryogenic storage for three rare pitcher plants: *Sarracenia oreophila* (kearney) wherry (federally endangered), *S. leucophylla* raf., and *S. purpurea* spp. *venosa* (raf.) wherry. **HortScience** 47 (1): 74-80.
- Oliveira, T. G. de; Pina, P. S. S.; Bertoni, B. W.; França, S. de C. ; Pereira, A. M. S. 2011. Micropropagação de *Croton antisiphiliticus* Mart. **Ciência Rural** 41(10): 1712-1718.
- Paul, S.; Kumaria, S.; Tandon, P. 2012. An effective nutrient medium for asymbiotic seed germination and large-scale *in vitro* regeneration of *Dendrobium hookerianum*, a threatened orchid of northeast India. **AoB plants** 2012 (32). doi:10.1093/aobpla/plr032.
- Pivetta, K. F. L.; Martins, T. A.; Galdiano Junior, R. F.; Gimenes, R.; Faria, R. T.; Takane, R. J. 2010. Crescimento *in vitro* de plântulas de *Caularthron bicornutum* em diferentes concentrações de sacarose. **Ciência Rural** 40 (9): 1897-1902.
- Prathanturarug, S.; Schaffner, W.; Biiter, K. B. 1996. *In vitro* propagation of the thai medicinal plant *Andrographis paniculata* Nees: Impact of different cytokinins. **Proceedings of the third Asia-Pacific conference on agricultural biotechnology: Issues and choices**. National Science and Technology Development Agency. Bangkok (Thailand). p.523-526.
- Ricklefs, R. E. 2010. **A economia da natureza**. 6ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 546p.
- Salomão, A. N.; Sousa-Silva, A. C.; Davide, A. C.; Gonzáles, S.; Torres, R. A. A.; Wetzel, M. M. V.S.; Firetti, F. Caldas, L. S. 2003. **Germinação de sementes e produção de mudas de plantas do Cerrado**. Rede de sementes do Cerrado. Brasília. 96p.
- Sano, E. E.; Rosa, R.; Brito, J. L. S. & Ferreira, L. G. 2010. Land cover mapping of the tropical savanna region in Brazil. **Environmental Monitoring Assessment** 166: 113-124.
- Santos, B. R.; Paiva, R.; Nogueira, R. C.; Oliveira, L. M.; Silva, D. P. C.; Martinotto, C.; Soares, F. P.; Paiva, P. D. O. 2006. Micropropagação de pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Revista Brasileira de Fruticultura** 28 (2): 293-296.
- Sarasan, V.; Kite, G. C.; Sileshi, G. W.; Stevenson, P. C. 2011. Applications of phytochemical and *in vitro* techniques for reducing over-harvesting of medicinal and pesticidal plants and generating income for the rural poor. **Plant Cell Reports** 30:1163–1172

- Shameer, M. C.; Saeeda, V. P., Madhusoodanan, P. V.; Benjamin, S. Direct organogenesis and somatic embryogenesis in *Beloperone plumbaginifolia* (Jacq.) Nees. 2009. **Indian Journal of Biotechnology** 8: 132-135.
- Silva, A. L. L.; Bisognin, D. A.; Giroto, C. J. B. J. 2006. Organogênese direta de explantes cotiledonares e regeneração de plantas de mogango. **Ciência Rural** 36 (3): 992-995.
- Silva, F. A. B. da; Pereira, L. A. R.; Silveira, C. E. dos S. 2008. Micropropagation of *Alibertia edulis* Rich. **Brazilian Archives of Biology and Technology** 51 (6): 1103-1114.
- Soares, F. P.; Paiva, R.; Alvarenga, A. A.; Nogueira, R. C.; Emrich, E. B.; Martinotto, C. 2007. Organogênese direta em explantes caulinares de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) **Ciência e Agrotecnologia** 31 (4): 1048-1053.
- Souza, J. A. de; Schuch, M. W.; Silva, L. C. da. 2006. Efeito do tipo de ramo e do regime de luz fornecido à planta matriz no estabelecimento *in vitro* de araçazeiro cv. "Irapuã". **Ciência Rural** 36 (6): 1920-1922.
- Souza, A. V.; Pinto, José E. B. P.; Bertolucci, S. K. V.; Corrêa, R. M.; Castro, E. M. 2003. Germinação de embriões e multiplicação *in vitro* de *Lychnophora pinaster* Mart. **Ciência e Agrotecnologia**. Edição especial: 1532-1538.
- Spera, M. R. N.; Cunha, R. da; Teixeira, J. B. 2001. Quebra de dormência, viabilidade e conservação de sementes de buriti (*Mauritia flexuosa*). **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 36(12): 1567-1572.
- Srivastava, N.; Kamal, B.; Sharma, V.; Negi, Y. K.; Dobriyal, A. K.; Gupta, S.; Jadon, V. S. 2010. Standardization of sterilization protocol for micropropagation of *Aconitum heterophyllum*- an endangered medicinal herb. **Academic Arena** 2(6):37- 42.
- Stamp, N. E. 1990. Production and effect of seed size in a grassland annual (*Erodium brachycarpum*, Geraniaceae). **American Journal of Botany** 77:874-882.
- Suraninpong, P. & Te-chato, S. 2010. *In vitro* propagation of a woody ornamental *Eranthemum nervosum* (Vahl) R. Br. **Journal of Agricultural Technology** 6 (3): 579-588.
- Taiz, L. & Zeiger, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719p.
- Thomas, T. D. & Yoichiro, H. 2010. *In vitro* propagation for the conservation of a rare medicinal plant *Justicia gendarussa* Burm. f. by nodal explants and shoot regeneration from *callus*. **Acta Physiologiae Plantarum** 32: 943-950.
- Varshney, A.; Shahzad A.; Anis, M. 2009. High frequency induction of somatic embryos and plantlet regeneration from nodal explants of *Hygrophila spinosa* T. Anders. **African Journal of Biotechnology** 8 (22): 6141-6145.

- Vilar, T. S. 2009. **Acanthaceae Juss. no Distrito Federal, Brasil**. Dissertação em Botânica, UnB, Brasília. 125p.
- Vinterhalter, D. V. & Vinterhalter, B. S. 1992. Factors affecting *in vitro* propagation of carob (*Ceratonia siliqua* L.). **Archive of Biology Science of Belgrade** 44: 177-186
- Vinterhalter, D. V. & Vinterhalter, B. S. 1999. Hormone-like effects of sucrose in plant *in vitro* cultures. **Phyton** 39 (3): 57- 60.
- Vinterhalter, B.; Ninković, S.; Zdravković-Korać, S.; Subotić, A.; Vinterhalter., D. 2007. Effect of nitrogen salts on the growth of *Ceratonia siliqua* L. shoot cultures. **Archives of Biological Science** 59 (3): 217-222.
- Wasshausen, D. C. & Wood, J. R. I. 2004. Acanthaceae of Bolivia. **Contributions from the United States National Herbarium** 49: 1-152.
- White, T. C. R. 1984. The abundance of invertebrate herbivores in relation to the availability of nitrogen in stressed food plants. **Oecologia** 63: 90–105.
- Witztum, A. & Schulgasser, K. 1995. The mechanics of seed expulsion in Acanthaceae. **Journal Theoretical of Biology** 176:531-542.
- Wochok, Z. S. 1981. The role of tissue culture in preserving threatened and endangered plant species. **Biological Conservation** 20: 83-89.
- Zaidan, L. B. P. & Carreira, R. C. 2008. Seed germination in Cerrado species. **Brazilian Journal of Plant Physiology** 20 (3): 167-181.

7. ANEXOS

Anexo 1. Análise de variância para influência do tempo de imersão ao hipoclorito de sódio no comprimento da parte aérea de sementes germinadas em ágar de *Justicia lanstykii*. Dados não transformados.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	2.09266667	1.04633333	1.35	0.2762
Error	27	20.92600000	0.77503704		
Corrected Total	29	23.01866667			

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
tempo_hipoclorito	2	2.09266667	1.04633333	1.35	0.2762

Anexo 2. Análise de variância para influência do tempo de imersão ao hipoclorito de sódio (NaClO) no comprimento da raiz principal de sementes germinadas em ágar de *Justicia lanstykii*. Dados não transformados.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	3.88066667	1.94033333	0.97	0.3934
Error	27	54.23400000	2.00866667		
Corrected Total	29	58.11466667			

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
tempo_hipoclorito	2	3.88066667	1.94033333	0.97	0.3934

Anexo 3. Análise de variância para influência do tempo de imersão ao hipoclorito de sódio (NaClO) e do meio de cultura na descontaminação de sementes de *Ruellia nitens*. Dados transformados para arco-seno $\sqrt{(x)}/100$.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	8	9401.09570	1175.13696	7.20	<.0001
Error	27	4406.26786	163.19511		
Corrected Total	35	13807.36355			

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
tempo_hipoclorito	2	2952.918073	1476.459037	9.05	0.0010
meio	2	3975.468440	1987.734220	12.18	0.0002
tempo_hipoclori*meio	4	2472.709185	618.177296	3.79	0.0143

Anexo 4. Análise de variância para influência do tempo de imersão ao hipoclorito de sódio (NaClO) e do meio de cultura na germinação de sementes de *Ruellia nitens*. Dados transformados para arco-seno $\sqrt{(x)/100}$.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	8	5958.02362	744.75295	3.79	0.0042
Error	27	5299.57440	196.28053		
Corrected Total	35	11257.59802			

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
meio	2	3065.945263	1532.972632	7.81	0.0021
tempo_hipoclorito	2	1785.473286	892.736643	4.55	0.0198
meio*tempo_hipoclori	4	1106.605069	276.651267	1.41	0.2576

Anexo 5. Análise de variância para influência do tempo de imersão ao hipoclorito de sódio (NaClO) e do meio de cultura no tempo médio de sementes de *Ruellia nitens*. Dados não transformados.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	8	12.56395062	1.57049383	2.41	0.0417
Error	27	17.59250000	0.65157407		
Corrected Total	35	30.15645062			

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
meio	2	1.77084877	0.88542438	1.36	0.2740
tempo_hipoclorito	2	7.41251543	3.70625772	5.69	0.0087
meio*tempo_hipoclori	4	3.38058642	0.84514660	1.30	0.2960

Anexo 6. Análise de variância para influência do tempo de imersão ao hipoclorito de sódio (NaClO), do meio de cultura e dos dias de cultivo no comprimento da parte aérea de sementes germinadas de *Ruellia nitens*. Dados transformados para raiz (x+0,5).

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	13	1.87189273	0.14399175	3.70	<.0001
Error	159	6.18537874	0.03890175		
Corrected Total	172	8.05727147			

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
meio	2	0.53542414	0.26771207	6.88	0.0014
tempo_hipoclorito	2	0.19555246	0.09777623	2.51	0.0842
dias	1	0.91554977	0.91554977	23.53	<.0001
meio*tempo_hipoclori	2	0.04412651	0.02206326	0.57	0.5683
tempo_hipoclori*dias	2	0.04671414	0.02335707	0.60	0.5498
meio*dias	2	0.13059583	0.06529791	1.68	0.1899
meio*tempo_hipo*dias	2	0.00392989	0.00196494	0.05	0.9508

Anexo 7. Análise de variância para influência do tempo de imersão ao hipoclorito de sódio (NaClO), do meio de cultura e dos dias de cultivo no comprimento da raiz de sementes germinadas de *Ruellia nitens*. Dados transformados raiz (x+0,5).

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	17	26.68652870	1.56979581	12.97	<.0001
Error	200	24.19936559	0.12099683		
Corrected Total	217	50.88589429			

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
meio	2	25.67808800	12.83904400	106.11	<.0001
tempo_hipoclorito	2	0.30928098	0.15464049	1.28	0.2808
dias	1	0.00086702	0.00086702	0.01	0.9326
meio*tempo_hipoclori	4	0.58572598	0.14643149	1.21	0.3077
meio*tempo_hipo*dias	8	0.11256672	0.01407084	0.12	0.9986

Anexo 8. Análise de variância para influência do tempo de imersão ao hipoclorito de sódio (NaClO), do meio de cultura e dos dias de cultivo na porcentagem de plântulas normais de sementes germinadas de *Ruellia nitens*. Dados transformados para arco-seno $\sqrt{(x)/100}$.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	17	44318.70751	2606.98279	14.78	<.0001
Error	54	9521.61564	176.32622		
Corrected Total	71	53840.32316			

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
meio	2	35584.42581	17792.21290	100.91	<.0001
tempo_hipoclorito	2	6949.88195	3474.94098	19.71	<.0001
dias	1	100.84325	100.84325	0.57	0.4528
meio*tempo_hipoclori	4	1183.76168	295.94042	1.68	0.1684
meio*tempo_hipo*dias	8	499.79482	62.47435	0.35	0.9397

Anexo 9. Análise de variância para influência do tempo de imersão ao hipoclorito de sódio (NaClO), do meio de cultura na porcentagem de sementes descontaminadas de *Ruellia incompta*. Dados transformados para arco-seno $\sqrt{(x)/100}$.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	8	483.613348	60.451668	0.88	0.5493
Error	27	1865.365770	69.087621		
Corrected Total	35	2348.979117			

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
meio	2	69.0876211	34.5438105	0.50	0.6120
tempo_hipoclorito	2	69.0876211	34.5438105	0.50	0.6120
meio*tempo_hipoclori	4	345.4381055	86.3595264	1.25	0.3137

Anexo 10. Análise de variância para influência do tempo de imersão ao hipoclorito de sódio (NaClO), do meio de cultura na porcentagem de germinação de *Ruellia incompta*. Dados transformados para arco-seno $\sqrt{(x)/100}$.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	8	612.814851	76.601856	1.10	0.3959
Error	27	1886.824672	69.882395		
Corrected Total	35	2499.639523			

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
meio	2	32.2534132	16.1267066	0.23	0.7955
tempo_hipoclorito	2	225.7738924	112.8869462	1.62	0.2174
meio*tempo_hipoclori	4	354.7875452	88.6968863	1.27	0.3064

Anexo 11. Análise de variância para influência do tempo de imersão ao hipoclorito de sódio (NaClO), do meio de cultura no tempo médio de germinação de *Ruellia incompta*. Dados não transformados.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	8	10.39791376	1.29973922	1.48	0.2101
Error	27	23.68597895	0.87725848		
Corrected Total	35	34.08389272			

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
meio	2	0.26207379	0.13103689	0.15	0.8620
tempo_hipoclorito	2	1.39523139	0.69761569	0.80	0.4618
meio*tempo_hipoclori	4	8.74060859	2.18515215	2.49	0.0668

Anexo 12. Análise de variância para influência do tempo de imersão ao hipoclorito de sódio (NaClO), do meio de cultura e dias de cultivo no comprimento da parte aérea de sementes de *Ruellia incompta*.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	17	0.65029408	0.03825259	1.49	0.0946
Error	403	10.35175296	0.02568673		
Corrected Total	420	11.00204704			

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
meio	2	0.05188059	0.02594029	1.01	0.3652
tempo_hipoclorito	2	0.12311193	0.06155596	2.40	0.0923
dias	1	0.02043142	0.02043142	0.80	0.3730
meio*tempo_hipoclori	4	0.30702471	0.07675618	2.99	0.0188
meio*dias	2	0.07793954	0.03896977	1.52	0.2206

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
<i>tempo_hipoclori*dias</i>	2	0.04396581	0.02198290	0.86	0.4257
<i>meio*tempo_hipo*dias</i>	4	0.02594009	0.00648502	0.25	0.9081

Anexo 13. Análise de variância para influência do tempo de imersão ao hipoclorito de sódio (NaClO), do meio de cultura e dias de cultivo no comprimento da raiz principal de sementes de *Ruellia incompta*.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
<i>Model</i>	17	16.0039470	0.9414086	4.45	<.0001
<i>Error</i>	403	85.2825891	0.2116193		
<i>Corrected Total</i>	420	101.2865361			

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
<i>meio</i>	2	2.18270757	1.09135379	5.16	0.0061
<i>tempo_hipoclorito</i>	2	6.34598774	3.17299387	14.99	<.0001
<i>dias</i>	1	0.01528143	0.01528143	0.07	0.7883
<i>meio*tempo_hipoclori</i>	4	7.23699514	1.80924878	8.55	<.0001
<i>meio*dias</i>	2	0.02582172	0.01291086	0.06	0.9408
<i>tempo_hipoclori*dias</i>	2	0.14646872	0.07323436	0.35	0.7077
<i>meio*tempo_hipo*dias</i>	4	0.05068469	0.01267117	0.06	0.9933

Anexo 14. Análise de variância para influência do tempo de imersão ao hipoclorito de sódio (NaClO), do meio de cultura e dias de cultivo na porcentagem de plântulas normais de sementes germinadas de *Ruellia incompta*. Dados transformados para arco-seno $\sqrt{(x)/100}$.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
<i>Model</i>	8	6134.71164	766.83895	3.08	0.0134
<i>Error</i>	27	6724.86815	249.06919		
<i>Corrected Total</i>	35	12859.57978			

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
<i>meio</i>	2	1029.609218	514.804609	2.07	0.1461
<i>tempo_hipoclorito</i>	2	2304.885505	1152.442753	4.63	0.0187
<i>meio*tempo_hipoclori</i>	4	2800.216912	700.054228	2.81	0.0552

Anexo 15. Análise de variância para influência do tempo de imersão ao hipoclorito de sódio (NaClO), do meio de cultura e dias de cultivo na porcentagem de oxidação de plântulas de *Ruellia incompta*. Dados transformados para arco-seno $\sqrt{(x)/100}$.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	17	30242.85361	1778.99139	6.66	<.0001
Error	54	14428.76565	267.19936		
Corrected Total	71	44671.61927			

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
meio	2	10750.00383	5375.00191	20.12	<.0001
tempo_hipoclorito	2	8.06590	4.03295	0.02	0.9850
dias	1	16545.30050	16545.30050	61.92	<.0001
meio*tempo_hipoclori	4	414.67363	103.66841	0.39	0.8163
tempo_hipoclori*dias	2	892.17179	446.08590	1.67	0.1979
meio*dias	2	345.98038	172.99019	0.65	0.5274
meio*tempo_hipo*dias	4	1286.65759	321.66440	1.20	0.3199

Anexo 16. Análise de variância para influência do tempo de imersão ao hipoclorito de sódio (NaClO), do meio de cultura e dias de cultivo na porcentagem de formação de lenticelas na raiz de plântulas de *Ruellia incompta*. Dados transformados para arco-seno $\sqrt{(x)/100}$.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	17	24075.26103	1416.19183	6.03	<.0001
Error	54	12683.72072	234.88372		
Corrected Total	71	36758.98174			

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
meio	2	18154.04039	9077.02019	38.64	<.0001
tempo_hipoclorito	2	3056.71807	1528.35903	6.51	0.0029
dias	1	385.36617	385.36617	1.64	0.2057
meio*tempo_hipoclori	4	1319.77278	329.94319	1.40	0.2448
meio*dias	2	330.11695	165.05848	0.70	0.4997

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
<i>tempo_hipoclori*dias</i>	2	431.43431	215.71715	0.92	0.4053
<i>meio*tempo_hipo*dias</i>	4	397.81237	99.45309	0.42	0.7911

Anexo 17. Análise de variância para influência do tempo de imersão ao tipo de hipoclorito e tempo de imersão na porcentagem de descontaminação de brotos de *Justicia lanstykii*. Dados transformados para arco-seno $\sqrt{(x)}/100$.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
<i>Model</i>	5	881.760069	176.352014	1.02	0.4327
<i>Error</i>	18	3098.492496	172.138472		
<i>Corrected Total</i>	23	3980.252565			

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
<i>hipoclorito</i>	1	171.5649631	171.5649631	1.00	0.3314
<i>tempo</i>	2	158.5345239	79.2672620	0.46	0.6382
<i>hipoclorito*tempo</i>	2	551.6605818	275.8302909	1.60	0.2289

Anexo 18. Análise de variância para influência do tempo de imersão ao tipo de hipoclorito e tempo de imersão na porcentagem de sobrevivência brotos de *Justicia lanstykii*. Dados transformados para arco-seno $\sqrt{(x)}/100$.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
<i>Model</i>	5	27068.88545	5413.77709	35.02	<.0001
<i>Error</i>	16	2473.33726	154.58358		
<i>Corrected Total</i>	21	29542.22270			

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
<i>hipoclorito</i>	1	20960.63397	20960.63397	135.59	<.0001
<i>tempo</i>	2	2702.03459	1351.01730	8.74	0.0027
<i>hipoclorito*tempo</i>	2	3406.21688	1703.10844	11.02	0.0010

Anexo 19. Análise de variância para número de segmentos nodais do tratamento de multiplicação de *Justicia lanstykii*, com dados transformados para raiz $(x+0,5)$.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	4.56456987	0.91291397	4.96	0.0003
Error	127	23.35487262	0.18389663		
Corrected Total	132	27.91944249			

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
trat	2	0.24728028	0.12364014	0.67	0.5123
subcultivo	1	3.40192504	3.40192504	18.50	<.0001
trat*subcultivo	2	0.91536455	0.45768228	2.49	0.0871

Anexo 20. Análise de variância para porcentagem de calo nos brotos dos tratamentos e subcultivos da multiplicação de *Justicia lanstykii*. Dados transformados para arco-seno $\sqrt{(x)/100}$.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	13769.56009	2753.91202	15.87	<.0001
Error	18	3122.58362	173.47687		
Corrected Total	23	16892.14371			

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
trat	2	8691.695703	4345.847851	25.05	<.0001
subcultivo	1	199.880883	199.880883	1.15	0.2973
trat*subcultivo	2	4877.983503	2438.991751	14.06	0.0002

Anexo 21. Análise de variância para porcentagem de enraizamento de brotos de *Justicia lanstykii*. Dados transformados para arco-seno $\sqrt{(x)/100}$.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	596.461630	596.461630	1.82	0.2145
Error	8	2625.148164	328.143521		
Corrected Total	9	3221.609795			

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
AIB	1	596.4616302	596.4616302	1.82	0.2145

Anexo 22. Efeito da concentração de BAP (6-benzilaminopurina) e subcultivo na porcentagem de brotos enraizados durante a fase de multiplicação de *Justicia lanstykii* Rizz. Dados transformados para arco-seno $\sqrt{(x)/100}$.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	6013.302570	1202.660514	7.72	0.0005
Error	18	2805.140236	155.841124		
Corrected Total	23	8818.442806			

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
trat	2	4417.834338	2208.917169	14.17	0.0002
dias	1	1012.767422	1012.767422	6.50	0.0201
trat*dias	2	582.700811	291.350405	1.87	0.1829

Anexo 23. Análise de variância para porcentagem descontaminação de brotos de *Ruellia nitens*. Dados transformados para arco-seno $\sqrt{(x)/100}$.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	2534.677280	506.935456	1.45	0.2547
Error	18	6293.888574	349.660476		
Corrected Total	23	8828.565854			

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
hipoclorito	1	1422.808729	1422.808729	4.07	0.0588
tempo	2	782.312872	391.156436	1.12	0.3484
hipoclorito*tempo	2	329.555680	164.777840	0.47	0.6317

Anexo 24. Análise de variância para porcentagem sobrevivência de brotos de *Ruellia nitens*. Dados transformados para arco-seno $\sqrt{(x)/100}$.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	15424.56620	3084.91324	7.61	0.0005
Error	18	7300.87954	405.60442		
Corrected Total	23	22725.44574			

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
hipoclorito	1	14746.19110	14746.19110	36.36	<.0001
tempo	2	252.12981	126.06490	0.31	0.7367
hipoclorito*tempo	2	426.24530	213.12265	0.53	0.6001

Anexo 25. Análise de variância para número de segmentos nodais do tratamento de multiplicação de *Ruellia nitens*, com dados transformados para raiz $(x+0,5)$.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	0.54346706	0.10869341	2.07	0.0747
Error	105	5.50883397	0.05246509		
Corrected Total	110	6.05230104			

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
trat	2	0.09500570	0.04750285	0.91	0.4075
subcultivo	1	0.00669388	0.00669388	0.13	0.7217
trat*subcultivo	2	0.44176748	0.22088374	4.21	0.0174

Anexo 26. Análise de variância para porcentagem de descontaminação de brotos de *Ruellia incompta*. Dados transformados para arco-seno $\sqrt{(x)/100}$.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	3064.099086	612.819817	3.39	0.0248
Error	18	3253.822560	180.767920		
Corrected Total	23	6317.921647			

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
<i>hipoclorito</i>	1	285.958048	285.958048	1.58	0.2246
<i>tempo</i>	2	2329.339451	1164.669725	6.44	0.0078
<i>hipoclorito*tempo</i>	2	448.801588	224.400794	1.24	0.3126

Anexo 27. Análise de variância para porcentagem de sobrevivência de brotos de *Ruellia incompta* . Dados transformados para arco-seno $\sqrt{(x)/100}$.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
<i>Model</i>	5	7347.33745	1469.46749	7.72	0.0005
<i>Error</i>	18	3425.68697	190.31594		
<i>Corrected Total</i>	23	10773.02442			

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
<i>tempo</i>	2	332.177652	166.088826	0.87	0.4348
<i>hipoclorito</i>	1	6716.543594	6716.543594	35.29	<.0001
<i>tempo*hipoclorito</i>	2	298.616205	149.308103	0.78	0.4713

CAPÍTULO II

Estaquia de *Justicia lanstyakii* Rizz., *Ruellia nitens* (Nees)

Wassh. e *Ruellia incompta* (Nees) Lindau

Estaquia de *Justicia lanstyakii* Rizz., *Ruellia nitens* (Nees) Wassh. e *Ruellia inkompta* (Nees) Lindau

RESUMO

O Cerrado apresenta grande diversidade vegetal e múltiplos potenciais de uso, inclusive o ornamental. No entanto, o bioma tem sofrido grande fragmentação pela agropecuária e mineração. Portanto, é imprescindível a reconstituição de áreas degradadas. Estaquia é uma das técnicas mais tradicionais para produção de mudas e pode trazer bons resultados para espécies do estrato herbáceo-arbustivo. O objetivo do trabalho foi o de verificar o potencial de enraizamento e brotação de *Justicia lanstyakii*, *Ruellia nitens* e *Ruellia inkompta*, subarbustos do Cerrado com potencial ornamental. Foram coletadas estacas apicais de c.a de 10 cm em setembro (estação seca) e dezembro (estação chuvosa) de 2011. As estacas foram dispostas em dois substratos (areia e vermiculita) e quatro concentrações de AIB, em talco, (0, 1000, 2000 e 4000 ppm). Foi avaliado, aos 60 dias, porcentagem de enraizamento, brotação, calo e sobrevivência; número de raízes e nós; comprimento da maior raiz. Estacas das três espécies, coletadas em dezembro, tiveram melhores resultados do que estacas coletadas em setembro em todas as variáveis, exceto em sobrevivência, cujas porcentagens foram semelhantes. O enraizamento das estacas de dezembro ficou em cerca de 94,0% em *J. lanstyakii* e 70,0% em *R. nitens*. Os tratamentos com 1000 ppm (6,2 raízes) e 4000 ppm (7,1 raízes) de AIB elevaram significativamente o número de raízes de *J. lanstyakii*. A concentração 1000 ppm de AIB aumentou o número de raízes de *R. nitens* (3,7 raízes) em relação ao controle e 4000 ppm. Em *R. inkompta*, vermiculita produziu melhores resultados de enraizamento (76,0%) e número de raízes (3,0 raízes), mas menor sobrevivência (35,8%). Os resultados evidenciam que a reprodução das plantas de espécies não domesticadas de *Justicia* e *Ruellia*, através de técnica convencional de propagação assexuada, apresenta eficiência elevada.

Palavras-chave: Cerrado, estaquia, espécie nativa, AIB

Cutting of *Justicia lanstykii* Rizz., *Ruellia nitens* (Nees) Wassh. and *Ruellia incompta* (Nees) Lindau

ABSTRACT

Cerrado presents great diversity of vegetation and multiple potential uses, including ornamental. However, Cerrado is threatened by agriculture and mining. It is essential to rebuild the landscape in degraded areas. Cutting is one of the more traditional techniques for vegetative propagation and brings good results for herbaceous and shrub species. The objective of this study was to investigate the potential of rooting and sprouting of *Justicia lanstykii*, *Ruellia nitens* and *Ruellia incompta*, potential ornamental subshrubs of the Cerrado. Apical cuttings were collected from c.a 10 cm in September (woody) and December (herbaceous) in 2011. It was arranged in two substrates (sand and vermiculite) and four concentrations of IBA, in talc, (0, 1000, 2000 and 4000 ppm). It was evaluated percentage of rooting, sprouting, callus and survival, number of roots and shoots; length of roots, at 60 days. Cuttings from December of three species had better results than mature cuttings in all variables, except for survival, which was similar. The rooting percentage of the herbaceous was around 94.0% in *J. lanstykii* and 70.0% in *R. nitens*. The treatments with 1000 (6.2 roots) and 4000 ppm (7.1 roots) of IBA increased number of root from *J. lanstykii* compared to control. The treatment 1000 ppm of IBA increased the number root of *R. nitens* (3.7 roots) in relation to the control and 4000 ppm. In *R. incompta*, vermiculite produced best results of rooting (76.0%), root number (3.0) and length of the longest root (4.78 cm), but lower survival (35.8%). Cutting is an effective method for producing plantlets of these species.

Key-words: Cerrado, cutting, native species, IBA

1. INTRODUÇÃO

O Cerrado abriga grande diversidade vegetal, somando cerca de 12 mil espécies nativas (Mendonça *et al.* 2008). A vegetação do Cerrado pode ser aproveitada para os mais diversos fins, tais como, alimentação, aromatização, formulação de corantes, produção de cortiça, tanino, óleos e gorduras, mel, produção de medicamentos, de artesanato e para ornamentação (Matteucci *et al.* 1995; Pereira 1996; Conceição *et al.* 2011). No entanto, o bioma vem sofrendo perda de habitats e de diversidade devido ao avanço das fronteiras agrícolas e da degradação provocada por atividades mineradoras (Fiszon 2003; Corrêa *et al.* 2004). A diversidade e a constante ameaça colocaram o Cerrado entre os 25 *hotspots* de biodiversidade global (Myers *et al.* 2000).

Dentre as famílias de potencial ornamental no Cerrado destaca-se Acanthaceae. A família apresenta muitas espécies já admiradas e cultivadas na floricultura mundial (Wasshausen & Wood 2004). *Ruellia nitens* (Nees) Wassh., *Ruellia incompta* (Nees) Lindau e *Justicia lanstyakii* Rizz., presentes no Cerrado, também possuem características que as distinguem de outras espécies pela beleza das flores, que aliado ao porte subarborescente, possibilitam a utilização dessas espécies no paisagismo como elementos de destaque ou na formação de maciços (Padilha, com.pess. 2011*). A importância da família não se limita a essa utilização, uma vez que muitas espécies têm características interessantes para forrageamento e uso medicinal (Ezcurra 2002; Oliveira *et al.* 2000). Além disso, a relevância ecológica da família não pode ser negligenciada, pois é abundante em campos e sub-bosques de mata (Guimarães *et al.* 2009).

A propagação sexuada de espécies ornamentais desses gêneros é limitada pelo pequeno número de sementes por fruto, de maneira geral de 2 a 10 (Wasshausen & Wood 2004). Uma alternativa para a propagação é o emprego da estaquia, técnica usada para muitas espécies de interesse econômico, ornamentais e frutíferas (Hartmann *et al.* 2002).

*Dr. Fábio Alessandro Padilha. Professor visitante do Departamento de Agronomia da UnB. Especialista em paisagismo. Comunicação pessoal em 20 setembro 2011.

A propagação vegetativa de espécies nativas do Cerrado por meio da estaquia é uma forma mais barata para produção de grande quantidade de mudas e assim, auxiliar na revegetação de áreas degradadas (Avidos & Ferreira 2000). Espécies herbáceas e arbustivas são importantes para a recuperação de áreas degradadas, pois apresentam crescimento rápido, possuem um sistema radicular ramificado que evitam a erosão e favorecem sombreamento do terreno, permitindo que sementes de outras ervas, arbustos e árvores se desenvolvam no local (Martins *et al.* 2001).

A facilidade no preparo das estacas, seu o baixo custo e a possibilidade de seleção de características fenotípicas de interesse (Melo *et al.* 2008) são vantagens que podem incentivar o uso dessa técnica por pequenos produtores rurais da região, que não têm recursos financeiros para utilizar técnicas mais caras, mas que desejam complementar sua renda trabalhando com plantas ornamentais do Cerrado (Shigueo 2008).

O uso da estaquia em acantáceas do Cerrado pode ser um método eficaz, pois o enraizamento adventício ocorre em condições naturais em algumas espécies. Em locais úmidos de sub-bosques de florestas da América do Sul, algumas espécies nativas de *Ruellia* possuem caules decumbentes que enraízam rapidamente. Já em outras espécies, a rebrota é observada a partir de um rizoma basal mais ou menos espesso (Ezcurra 1993).

Para acantáceas cultivadas na Europa, Heede & Lecourt (1991) indicam que a estaquia de *Justicia* pode ser feita em qualquer época do ano, desde que cultivadas em estufa climatizada, enquanto em *Ruellia*, os autores afirmam que as estacas cultivadas nas mesmas condições, enraízam melhor quando coletadas na primavera.

Estudos são necessários para verificar quais fatores podem favorecer o enraizamento das espécies no Cerrado. O substrato, a umidade, a luminosidade e temperatura influenciam de maneira complexa no enraizamento de cada espécie (Rios *et al.* 2001; Kibbler *et al.* 2004). De modo geral, um substrato deve ter volume adequado de poros para armazenar ar e água, para possibilitar a respiração adequada das raízes e prevenir o murchamento (Shiembo *et al.* 1996). Diversos tipos de substratos são empregados, tais como solo, areia, turfa, vermiculita, casca de arroz, entre outros (Tillmann *et al.* 1994; Carrijo *et al.* 2002; Ehlert *et al.* 2004).

Os reguladores de crescimento influenciam na formação das raízes, sendo que a classe que tem efeito mais direto são as auxinas, tais como AIA (ácido indol acético), AIB (ácido indolbutírico) e ANA (ácido naftalenoacético) (Fogaça & Fett-Neto 2005; Grieneisen *et al.* 2007). A aplicação dos fitorreguladores pode ser realizada na forma de talco, que é muito utilizado por ser de fácil manuseio e na maioria dos casos proporcionar bons resultados

(Cuquel & Minami 1994; Sharma & Graves 2005; Bortolini *et al.* 2008 Yamamoto *et al.* 2010)

Tendo em vista o pouco conhecimento sobre a propagação vegetativa de espécies com potencial ornamental de Acanthaceae do Cerrado, objetivou-se verificar o potencial de enraizamento e brotação de estacas de *Ruellia nitens* (Nees) Wassh., *Ruellia incompta* (Nees) Lindau e *Justicia lanstyakii* Rizz.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Origem e coleta das estacas

Foram selecionadas matrizes de três espécies de Acanthaceae no Distrito Federal. As coletas dos ramos de *Justicia lanstyakii* Rizz. foram feitas a partir de cerca de 70 indivíduos e as de *Ruellia nitens* (Nees) Wassh. de cerca de 40 indivíduos, ambas localizadas no Memorial das Idades do Brasil (15°46'47,4''S e 47°50'2,4''W), em Cerrado *stricto sensu*. Os ramos de *Ruellia incompta* (Nees) Lindau foram coletadas do Jardim Botânico de Brasília (15°52'34,2''S e 47°49'35''W), em Campo Sujo.

Os materiais foram coletados em 2011, nos dias 10, 12 e 14 de setembro (inverno, estação seca), e 6 e 8 de dezembro (primavera, estação chuvosa). O material foi coletado de indivíduos saudáveis, sem sinais de deficiência hídrica ou nutricional. Os ramos foram acondicionados em saco plástico, que foram mantidos úmidos até a chegada ao viveiro da prefeitura da Universidade de Brasília (UnB) para preparação e plantio das estacas.

Ramos férteis de *J. lanstyakii*, *R. nitens* e *R. incompta* foram herborizados e depositados no Herbário da Universidade de Brasília (UB), respectivamente, sob os registros UB 21 - M. R. Lima; UB 22 - M. R. Lima; UB 26 - M. R. Lima.

2.2 Tratamentos

Para avaliar a capacidade de brotação e enraizamento de *J. lanstyakii*, *R. nitens* e *R. incompta*, foram retiradas estacas, com cerca de 10 cm de comprimento, da porção apical dos ramos contendo entre três e quatro gemas.

As estacas de todas as espécies coletadas em dezembro foram padronizadas com quatro folhas cortadas pela metade, pois em um experimento prévio, quando se utilizou somente duas folhas cortadas pela metade, a maioria das estacas morreu rapidamente. Os ramos das três espécies coletados em setembro apresentavam flores e frutos, que foram retirados. Nos ramos de *R. nitens* permaneceram quatro folhas cortadas pela metade e em *R. incompta* foram mantidas quatro brácteas foliáceas da inflorescência. Porém os ramos de *J. lanstyakii* não possuíam folhas, o que resultou em estacas sem folhas.

As estacas foram tratadas com ácido indolbutírico (AIB, Sigma[®]) nas concentrações 0 (controle), 1000, 2000 e 4000 ppm, com uma mistura de talco neutro e AIB, sendo o controle tratado apenas com talco neutro. Essa mistura foi preparada com 0,1 g, 0,2 g e 0,4 g de AIB e 100 g de talco neutro. Para homogeneizar a mistura, foi adicionado álcool comercial, de maneira a formar uma pasta. A pasta foi deixada à temperatura ambiente até total evaporação do álcool e da água, voltando ao estado de pó. O controle foi realizado tratando a outra metade dos nós com a mesma mistura sem a adição de AIB.

A aplicação foi feita envolvendo 1 cm da base da estaca no talco. As estacas foram dispostas, separadamente, em bandejas de 200 células, de poliestireno expandido (isopor), em dois substratos: areia lavada fina e vermiculita fina (Brasil Minérios[®]), totalizando 16 tratamentos em esquema fatorial (2 épocas de coleta x 2 substratos x 4 concentrações de AIB), inteiramente casualizado, onde cada tratamento foi constituído por três repetições de seis estacas (18 estacas/tratamento). As estacas foram cultivadas em estufa não climatizada, com cobertura de plástico de (polietileno), com irrigação três vezes ao dia, média de temperatura de 40 °C e umidade relativa 95%.

As estacas enraizadas foram transferidas para sacos plásticos pretos perfurados na base (15x25 cm) com latossolo vermelho e areia lavada, na proporção 2:1, e mantidas na estufa.

Foram observados os seguintes dados aos 60 dias de cultivo: número de estacas enraizadas e brotadas, número de nós formados por estaca (sendo contabilizado os nós

formados a partir de todos os brotos que se surgiram na estaca), número de raízes por estaca (sendo contabilizadas as raízes acima de 0,5 cm) e de estacas sobreviventes. Também foi observado comprimento da maior raiz e presença de calo na base das estacas. As estacas mortas foram excluídas da avaliação das variáveis, com exceção da sobrevivência.

Os resultados foram submetidos à Anova e ao teste de comparação de médias de Tukey, a 5% de probabilidade, utilizando o pacote estatístico SAS (versão 9.1) (Brazão *et al.* 2010). Para efeito da análise estatística, os dados em porcentagem relativos ao enraizamento, brotação, sobrevivência e calo foram transformados em arco-seno $\sqrt{(x)/100}$, enquanto os valores referentes ao número de raízes e nós formados foram transformados em $\sqrt{(x+0,5)}$.

2.3 Estudo anatômico

Foram coletadas da base das estacas das três espécies amostras de 0,5 cm no primeiro dia de cultivo (estaca no controle sem raízes) e no 60º dia, a partir de estacas enraizadas. Foram fixadas em FAA 70 por 24 h (Johansen 1940) e posteriormente estocadas em álcool etílico a 70% para os estudos anatômicos. As amostras foram emblocadas em historesina (Leica). As secções transversais foram feitas no micrótomo rotativo, coradas com azul de toluidina e montadas em verniz vitral incolor 500[®] (Paiva *et al.* 2006). Também foram feitos alguns cortes à mão livre e coradas mediante a combinação de safranina 1:4 azul de alcian. As lâminas foram analisadas e os resultados foram registrados através de máquina fotográfica Cyber-Shot, Sony DSCW30.

3. RESULTADOS

Os ramos das estacas das três espécies apresentaram consistência diferente entre as épocas de coleta. De acordo com o aspecto externo, verificou-se que os ramos coletados em setembro apresentaram caule de mais lignificado e de coloração marrom. Essas matrizes estavam em fase de floração/frutificação e apresentaram abscisão das folhas mais basais. Esses ramos foram considerados de tipo lenhoso. Já os ramos coletados em dezembro apresentavam-se em pleno crescimento vegetativo, evidenciado pela presença de folhas novas e vigorosas na maioria das gemas, com caule flexível e de coloração verde, sendo considerados herbáceos.

a) Justicia lanstykii Rizz.

As estacas de *J. lanstykii* apresentaram resultados elevados de enraizamento e brotação. As raízes surgiram diretamente do caule (Figura 1A, B), eram finas e apresentavam raízes secundárias, aos 60 dias de cultivo. Os experimentos realizados com estacas coletadas em dezembro apresentaram porcentagens de 100% de enraizamento em quase todos os tratamentos, com exceção de areia com 1000 e 4000 ppm de AIB, que atingiram cerca de 94%, não ocorrendo interação entre os tratamentos desse tipo de estaca (Tabela 1). Os tratamentos realizados com estacas provenientes de setembro apresentaram menor potencial de enraizamento do que as estacas do experimento anterior (Tabela 1). A porcentagem de enraizamento chegou a 22,2% (vermiculita com 0 ppm de AIB), e não houve enraizamento em vermiculita com 1000 ppm de AIB (Tabela 1), não ocorrendo interação entre os tratamentos desse tipo de estaca. Entretanto foi observada diferença significativa entre a época de coleta, onde as estacas de dezembro apresentaram maior porcentagem de enraizamento (98,0%) do que as estacas de setembro (13,0%).

A média do comprimento da maior raiz nas estacas de dezembro foi superior a 4,0 cm, sendo que o maior valor foi encontrado em areia com 4000 ppm de AIB (7,19 cm), mas sem diferença estatística entre regulador e substrato (Tabela 1). Nas estacas de setembro, as

médias do comprimento da maior raiz ficaram entre 1,0 e 2,1 cm, mas sem diferença estatística entre os tratamentos. O que diferiu foi entre a época de coleta, no qual as de dezembro apresentaram maior média do comprimento da maior raiz (5,6 cm) do que as de setembro (0,2 cm).

A formação de calos foi verificada em todos os tratamentos das estacas de dezembro, com presença em cerca de 30% das estacas e sem diferença estatística entre substrato e concentração de AIB (Tabela 1). Os calos surgiram na base da estaca, na região onde fora seccionada. E as raízes que se formavam em estacas com calos, apareciam acima desses calos. Os calos eram arredondados e tinham diâmetro de cerca de 0,2 cm, de coloração amarelada. A maior porcentagem ocorreu em areia com 0 ppm de AIB (47,1%) e a menor ocorreu em areia 4000 ppm de AIB, com 23,5%. Nas estacas de setembro não houve formação de calos em nenhum tratamento. Sendo assim, a porcentagem de calo foi significativa para as estacas de dezembro (32,1%).

A média do número de raízes por estaca diferiu significativamente entre a época de coleta, com resultado favorável para as estacas de dezembro (Tabela 1), e também houve interação entre época de coleta e a concentração do regulador (Tabela 2), na qual nas estacas de dezembro com 4000 ppm de AIB encontra-se a maior média (7,1 raízes), que diferiu do controle (4,4 raízes), de 2000 ppm (5,4 raízes) e das de setembro (0,1 raízes).

Tabela 1. Efeito da época de coleta, das concentrações de ácido indolbutírico (AIB) e do substrato sobre a porcentagem de enraizamento, porcentagem de calo, média do número de raízes e média do comprimento da maior raiz de ramos de *Justicia lanstykii* Rizz., aos 60 dias de cultivo.

Época de coleta	Substrato	Concentração de AIB (ppm)	Enraizamento (%)	Número de raízes	Comprimento da maior raiz (cm)	Calo (%)
Dezembro	Vermiculita	0	100	5,0	4,8	27,8
		1000	100	6,5	5,5	29,4
		2000	100	5,6	6,6	33,3
		4000	100	7,3	5,4	27,8
	Areia	0	100	3,8	5,9	47,1
		1000	94,4	5,8	5,1	33,3
		2000	100	5,2	5,5	35,3
		4000	94,4	6,9	7,1	23,5
Média			98,0 A	5,8 A	5,63 A	32,1 A
Setembro	Vermiculita	0	22,2	1,2	2,1	0,0
		1000	0,0	0,0	0,0	0,0
		2000	11,1	1,0	1,2	0,0
		4000	5,6	1,0	1,0	0,0
	Areia	0	11,1	2,6	1,9	0,0
		1000	16,7	1,0	1,2	0,0
		2000	5,6	1,0	1,8	0,0
		4000	16,7	1,0	1,8	0,0
Média			13,0 B	0,2 B	0,21 B	0,0 B
CV(%)			21,9	60,8	50,7	29,7

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade. n = 18 estacas/tratamento.

Tabela 2. Efeito da época de coleta e concentrações de ácido indolbutírico (AIB) sobre o número de raízes em estacas de *Justicia lanstykii* Rizz. cultivadas em dois substratos, aos 60 dias de cultivo.

	Época de coleta		Número de raízes			
	Concentração de AIB (ppm)					
	0	1000	2000	4000		
Dezembro	4,4 Ac	6,2 Aab	5,4 Abc	7,1 Aa		
Setembro	0,4 Ba	0,1 Ba	0,1 Ba	0,1 Ba		
CV (%) = 24,5						

Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade. n = 36 estacas/tratamento.

Os brotos novos de *J. lanstykii* eram vigorosos, clorofilados e saudáveis. A brotação das estacas de dezembro ocorreu em todos os tratamentos, com índices de 94 a 100%, mas sem diferença estatística entre os fatores (Tabela 3). Nas estacas de setembro a porcentagem de brotação foi superior a 27%, onde o valor máximo foi observado em vermiculita com 0 ppm de AIB (55,6%) e o valor mínimo em areia com 4000 ppm de AIB (27,8%) (Tabela 3). Verifica-se que a vermiculita teve maior porcentagem de brotação nas de setembro, entretanto, análise estatística não apresentou significância em relação à areia. O que foi significativo foi a época de coleta, no qual as estacas de dezembro apresentaram maior porcentagem de brotação (98,5%) do que as de setembro (41,6%).

As médias do número de nós nas de dezembro não diferiram entre os tratamentos, com a maior média presente em vermiculita com 0 ppm AIB (2,8 nós), com mostra a Tabela 3. As de setembro permaneceram com nós em torno de 1,5, com a maior para areia com 4000 ppm de AIB (1,8 nós) e a menor (1,4 nós) para três tratamentos diferentes (Tabela 3). O que diferiu foi somente a época de coleta em que as estacas de dezembro apresentaram maior número de nós (2,5 nós) do que as de setembro (0,7 nós).

A sobrevivência foi de 100% nas estacas de dezembro em três tratamentos: vermiculita com 0 e 4000 ppm de AIB, e areia com 1000 ppm de AIB. A menor porcentagem foi observada em vermiculita com 2000 ppm de AIB (83,3%), como apresentado na Tabela 3. As porcentagens de estacas de setembro vivas ficaram entre 88,9% e 94,4%. De modo geral, vermiculita também apresentou maior porcentagem de sobrevivência, mas não ocorreu diferença estatística entre substrato, concentração de AIB e época de coleta (Tabela 3). Não houve estacas mortas e com raízes em ambas a épocas de coleta.

O estudo anatômico da base das estacas do controle de dezembro mostra uma estrutura organizada, com uma hipoderme esclerenficada, seguida de cerca de cinco camadas de células parenquimáticas. Seguindo em direção à medula, observa-se uma camada de células rompidas e logo depois o floema secundário, região cambial e xilemas secundário (Figura 1C). Nas estacas enraizadas, a conexão das raízes adventícias com o caule é feita pelo câmbio vascular, como apresentado na Figura 1D.

Tabela 3. Efeito das concentrações de ácido indolbutírico (AIB) e do substrato sobre a porcentagem de brotação, sobrevivência e média do número de nós de estacas de dezembro e setembro de *Justicia lanstyakii* Rizz. aos 60 dias de cultivo.

Época de coleta	Substrato	Concentração de AIB (ppm)	Brotação (%)	Número de nós	Sobrevivência (%)
Dezembro	Vermiculita	0	100	2,8	100
		1000	100	2,8	94,4
		2000	100	2,5	83,3
		4000	94,4	2,3	100
	Areia	0	100	2,2	94,2
		1000	100	2,6	100
		2000	100	2,4	94,4
		4000	94,4	2,5	94,4
Média			98,5 A	2,5 A	95,1 A
Setembro	Vermiculita	0	55,6	1,5	94,2
		1000	50,0	1,7	94,4
		2000	38,9	1,4	94,4
		4000	50,0	1,4	88,9
	Areia	0	33,3	1,5	88,9
		1000	44,4	1,4	88,9
		2000	33,3	1,5	88,3
		4000	27,8	1,8	88,3
Média			41,6 B	0,7 B	90,9 A
CV(%)			14,8	64,0	132,3

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade. n = 18 estacas/tratamento.

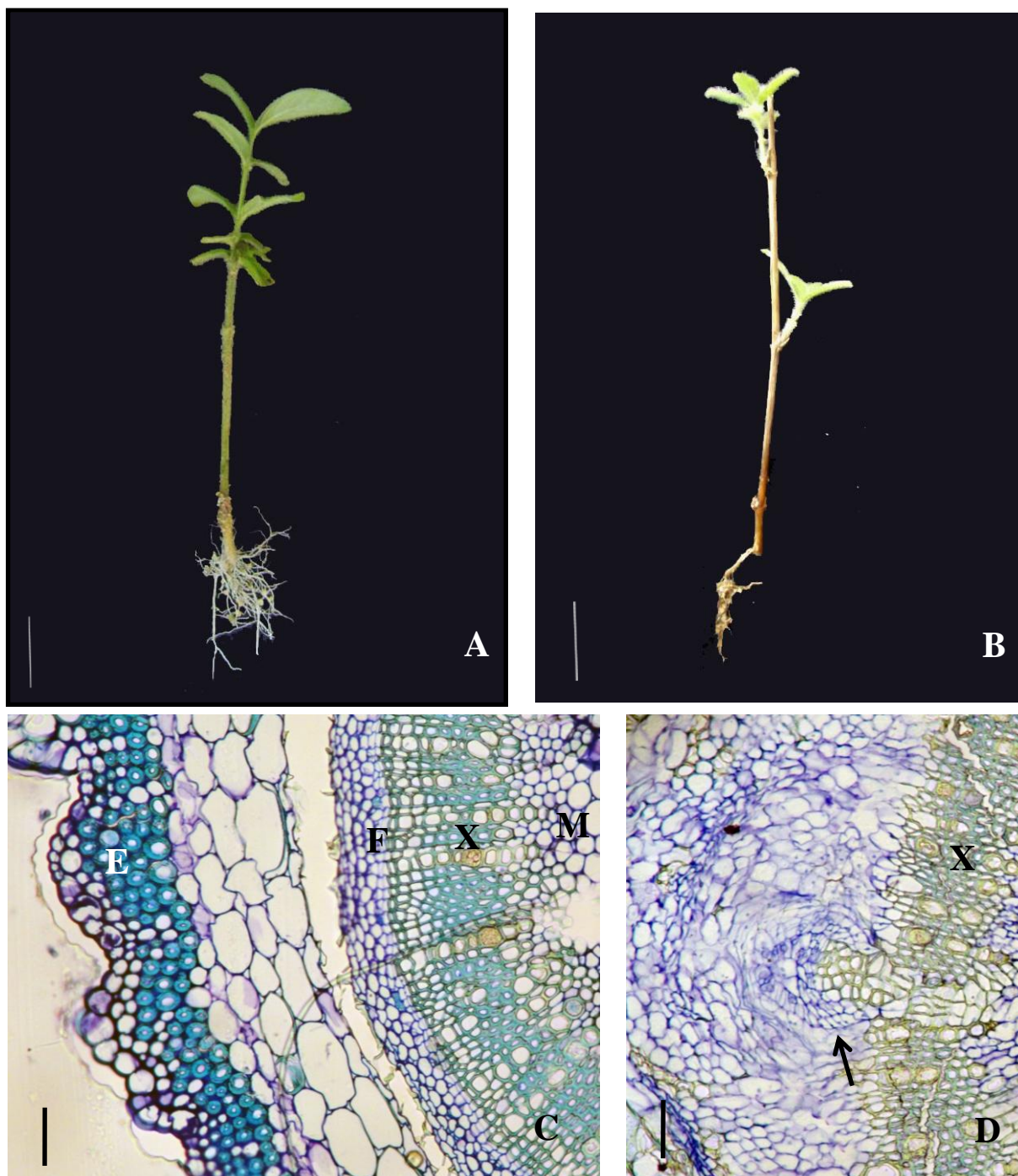


Figura 1. Estaquia e aspecto anatômico de ramos apicais de *Justicia lanstykii* Rizz. aos 60 dias de cultivo. **A.** Estaca proveniente de ramos herbáceos (coletados em dezembro) em vermiculita com 1000 ppm de AIB. **B.** Estaca de ramos lenhosos (coletados em setembro) em vermiculita com 0 ppm de AIB. **C.** Corte transversal da base da estaca de dezembro (controle), no primeiro dia de cultivo. **D.** Corte transversal da base da estaca de dezembro enraizada, aos 60 dias de cultivo, apresentando início da formação da raiz adventícia (seta). **E:** Esclerênquima, **F:** Floema secundário, **X:** Xilema secundário, **M:** Medula. Escala: A, B = 1,5 cm; C e D = 10 μ m.

b) *Ruellia nitens* (Nees) Wassh.

Os ramos das estacas de *R. nitens* apresentaram resultados elevados de enraizamento e brotação, principalmente as de dezembro (Tabela 4, Figura 2A, B). As raízes surgiram diretamente do caule, sem formação de calo no local de emergência das raízes. As raízes eram vigorosas e mais espessas do que as de *J. lanstykii*.

Estacas de ramos herbáceos de *R. nitens*, que foram também submetidas às quatro concentrações de ácido indolbutírico (AIB) e plantadas nos dois substratos, apresentaram taxas de enraizamento em torno de 75% (Tabela 4), sendo que em areia com 4000 ppm de AIB, foram 46,7% de estacas enraizadas. A maior porcentagem foi obtida em areia com 1000 ppm de AIB (93,7%). As estacas provenientes de ramos lenhosos de *R. nitens* mostraram-se estatisticamente menos propensas a enraizar (8,3%) do que as de dezembro (75,6%), como consta na Tabela 4. A porcentagem de enraizamento variou de 0% em vermiculita 1000 e areia 0 ppm de AIB até 16,7% em vermiculita 2000 e 4000 ppm de AIB. Houve interação entre regulador e época de coleta, na qual estacas de dezembro com 1000 ppm AIB (91,2%) diferiram na porcentagem de enraizamento em relação aos demais tratamentos (Tabela 5).

A interação entre concentração do AIB e época de coleta influenciou estatisticamente o número de raízes, no qual estacas de dezembro produziram mais raízes do que as de setembro e o tratamento das de dezembro com 1000 ppm (3,7 raízes) se destacou dos demais (Tabela 6). As médias do comprimento da maior raiz das estacas de dezembro ficaram por volta de 3,0 cm, onde a maior média foi observada em vermiculita com 1000 ppm de AIB (4,8 cm) e a menor foi em areia 4000 ppm (2,3 cm) (Tabela 4). Nas de setembro, a maior média do comprimento da maior raiz ocorreu em areia com 1000 ppm de AIB (5,00 cm). Mas o que diferiu estatisticamente foi época de coleta, com resultados melhores para de dezembro (Tabela 4) e também o substrato, onde as raízes das estacas apresentaram maior comprimento (2,0 cm) em vermiculita (Tabela 7).

A formação de calo nas estacas de dezembro ocorreu em todos os tratamentos. Os calos surgiram na base da estaca. Os calos tinham diâmetro de cerca de 0,3 cm e apresentavam coloração amarelada. As raízes que surgiam em estacas com calos formavam-se acima deles. A porcentagem foi um pouco maior na ausência de regulador (44%-vermiculita e 41%-areia) do que nas outras concentrações (Tabela 4). No entanto, essa diferença não foi tão

expressiva a ponto de torná-la significativa pela análise estatística. Não houve formação de calos nas estacas de setembro.

Tabela 4. Efeito da época de coleta, das concentrações de ácido indolbutírico (AIB) e do substrato sobre a porcentagem de enraizamento, porcentagem de calo e média do número de raízes e média do comprimento da maior raiz em *Ruellia nitens* (Nees) Wassh., aos 60 dias de cultivo.

Época de coleta	Substrato	Concentração de AIB (ppm)	Enraizamento (%)	Número de raízes	Comprimento da maior raiz (cm)	Calo (%)
Dezembro	Vermiculita	0	72,2	1,6	3,0	44,4
		1000	88,9	3,2	4,8	33,3
		2000	72,2	2,8	3,6	27,8
		4000	81,2	2,1	2,8	31,2
	Areia	0	76,4	1,4	2,8	41,2
		1000	93,7	4,1	3,2	18,7
		2000	78,6	2,5	2,8	21,4
		4000	46,7	1,1	2,3	26,7
Média			75,6 A	2,4 A	3,2 A	31,1 A
Setembro	Vermiculita	0	5,6	1,0	1,30	0,0
		1000	0,0	0,0	0,00	0,0
		2000	16,7	3,5	4,17	0,0
		4000	16,7	2,0	3,33	0,0
	Areia	0	0,0	0,0	0,00	0,0
		1000	5,6	2,0	5,00	0,0
		2000	11,1	2,0	1,90	0,0
		4000	5,6	1,0	1,20	0,0
Média			8,3 B	0,1 B	0,2 B	0,0 B
CV(%)			39,9	40,2	107,4	63,2

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade. n = 18 estacas/tratamento.

Tabela 5. Efeito da época de coleta e do substrato sobre a porcentagem de enraizamento de *Ruellia nitens* (Nees) Washh. aos 60 dias de cultivo.

Época de coleta	Enraizamento (%)			
	AIB (ppm)			
	0	1000	2000	4000
Dezembro	74,3 Ab	91,2 Aa	75,0 Aab	64,5 Ab
Setembro	2,9 Ba	2,9 Ba	15,6 Ba	12,9 Ba
CV(%) = 39,9				

Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade. n = 36 estacas/tratamento.

Tabela 6. Efeito da época de coleta e concentrações de ácido indolbutírico (AIB) no número de raízes em estacas de *Ruellia nitens* (Nees) Washh., cultivadas em dois substratos, durante 60 dias de cultivo.

Época de coleta	Número de raízes			
	AIB (ppm)			
	0	1000	2000	4000
Dezembro	1,5 Ac	3,7 Aa	2,7 Ab	1,6 Ac
Setembro	0,0 Ba	0,1 Ba	0,3 Ba	0,2 Ba
CV(%) = 40,2				

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade. n = 36 estacas/tratamento.

Tabela 7. Efeito do substrato sobre a média do comprimento da maior raiz em estacas de dezembro e de setembro de *Ruellia nitens* (Nees) Washh., cultivadas em quatro concentrações de ácido indolbutírico (AIB), aos 60 dias de cultivo.

Substrato	Comprimento da maior raiz (cm)
Vermiculita	2,0 a
Areia	1,4 b
CV(%)	43,8

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade. n = 144 estacas/substrato.

A porcentagem de estacas de dezembro brotadas foi significativamente maior nas de dezembro (99,0%) do que nas de setembro (30,5%), como indicado na Tabela 8. As estacas de dezembro tiveram 100% de brotação em quase todos os tratamentos. As estacas de setembro tiveram brotação de, no mínimo 22,2% e máximo de 61,0%. Entre substrato e época de coleta também foi significativo, onde foi observado 100 % e 98,4% de brotação para estacas de dezembro em vermiculita e areia, diferindo das de setembro nos substratos (Tabela 9).

As médias do número de nós nas de dezembro foram variadas, onde a maior média encontrada foi em areia com 2000 ppm de AIB (2,7 nós), sendo semelhante estatisticamente a areia 0 e 1000 ppm de AIB (2,3 e 2,5 nós , respectivamente), além de vermiculita com 4000 ppm (2,6 nós). Nas de setembro, o número de nós foi maior em vermiculita com 4000 ppm de AIB e o restante dos tratamentos ficaram entre 1,2 e 1,7 nós (Tabela 10). A interação ocorreu para época de coleta, prevalecendo as de dezembro, e entre substrato e regulador, onde o maior valor foi em areia com 1000 ppm de AIB (1,8 nós), diferindo de vermiculita com 0, 1000 e 2000 ppm AIB.

A sobrevivência nas de dezembro foi relativamente maior em vermiculita (100%), exceto para 4000 ppm de AIB (88,9%). A menor porcentagem foi verificada em areia com 2000 ppm de AIB (77,8%). Nas de setembro, os valores de sobrevivência ficaram entre 83,3% e 94,4% (Tabela 8). Houve influência do regulador na sobrevivência e também entre substrato e estaca. Com o aumento da concentração do regulador, reduziu a sobrevivência, cujo maior valor foi na ausência de AIB (95,8%), como apresentado na Tabela 11. Além disso, as estacas de dezembro em vermiculita foram as que tiveram maior porcentagem de sobrevivência (97,3%) (Tabela 12). Não houve estacas mortas com raízes em ambos os tipos de estaca.

O estudo anatômico da base das estacas do controle de dezembro mostra que há o início da formação da periderme. No córtex, observa-se a presença de colênquima, algumas esclereides, logo após, seis camadas de células parenquimáticas e região do sistema vascular em crescimento secundário (Figura 2C). Nas estacas enraizadas, a conexão das raízes adventícias com o caule é feita pelo câmbio vascular, como apresentado na Figura 2D.

Tabela 8. Efeito da época de coleta, das concentrações de ácido indolbutírico (AIB) e do substrato sobre a porcentagem de brotação, porcentagem de sobrevivência e média do número de nós de estacas de *Ruellia nitens* (Nees) Wassh. aos 60 dias de cultivo.

Época de coleta	Substrato	Concentração de AIB (ppm)	Brotação (%)	Número de nós	Sobrevivência (%)
Dezembro	Vermiculita	0	100	1,8 bd	100
		1000	100	1,9 bcd	100
		2000	100	2,1 ab	100
		4000	100	2,6 a	88,9
	Areia	0	100	2,3 ac	94,4
		1000	100	2,5 a	88,9
		2000	100	2,7 a	77,8
		4000	93,0	1,5 d	83,3
Média			99,2 A	2,2 A	91,7 A
Setembro	Vermiculita	0	22,2	1,2 d	94,4
		1000	16,7	1,3 d	94,4
		2000	16,7	1,3 d	88,9
		4000	22,0	2,0 ab	88,9
	Areia	0	33,0	1,7 d	94,4
		1000	61,1	1,5 d	94,4
		2000	27,8	1,2 d	88,9
		4000	22,2	1,2 d	83,3
Média			30,5 B	0,4 B	95,5 A
CV(%)			18,8	24,2	129,0

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade. n = 18 estacas/tratamento.

Tabela 9. Efeito da época de coleta e do substrato sobre a porcentagem de brotação de *Ruellia nitens* (Nees) Wassh. aos 60 dias de cultivo.

Época de coleta	Brotação (%)	
	Substrato	
	Vermiculita	Areia
Dezembro	100 Aa	98,4 Aa
Setembro	21,1 Bb	40,0 Ba
CV(%) = 18,8		

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade. n = 72 estacas/tratamento.

Tabela 10. Efeito do substrato e concentrações de ácido indolbutírico (AIB) sobre a média do número de nós de estacas de dezembro e de setembro de *Ruellia nitens* (Nees) Wassh. aos 60 dias de cultivo.

Substrato	Número de nós			
	AIB (ppm)			
	0	1000	2000	4000
Vermiculita	1,1 Ab	1,1 Bb	1,2 Aab	1,6 Aa
Areia	1,5 Ba	1,8 Aa	1,5 Aa	0,9 Bb
CV(%) = 23,1				

Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade. n = 36 estacas/tratamento.

Tabela 11. Efeito das concentrações de ácido indolbutírico (AIB) sobre a porcentagem de sobrevivência de estacas de dezembro e de setembro de *Ruellia nitens* (Nees) Wassh., cultivadas em vermiculita em areia, aos 60 dias de cultivo.

AIB (ppm)	Sobrevivência (%)
0	95,8 a
1000	93,1 ab
2000	86,2 ab
4000	82,0 b
CV(%)	98,2

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade. n = 72 estacas/tratamento.

Tabela 12. Efeito da época de coleta e substrato sobre a porcentagem de sobrevivência de estacas de *Ruellia nitens* (Nees) Wassh., cultivadas com 0, 1000, 2000 e 4000 ppm de ácido indolbutírico (AIB), aos 60 dias de cultivo.

Época de coleta	Sobrevivência (%)	
	Substrato	
	Vermiculita	Areia
Dezembro	97,3 Aa	86,2 Ab
Setembro	86,2 Ba	87,5 Aa
CV(%) = 98,2		

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade. n = 72 estacas/tratamento.

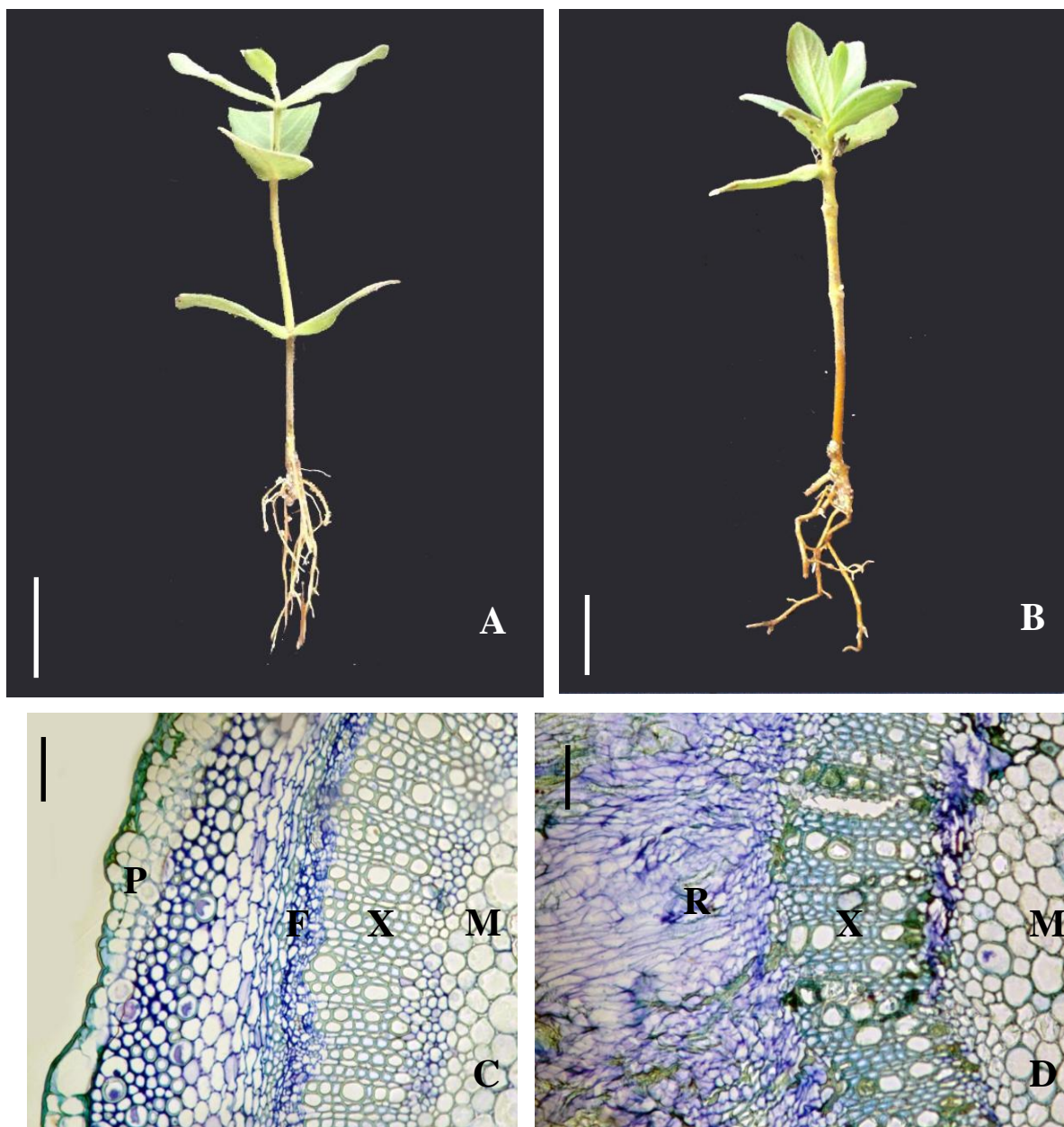


Figura 2. Estaquia e aspecto anatômico de ramos apicais de *Ruellia nitens* (Nees) Wassh. **A.** Estaca proveniente de ramos herbáceos (coletados em dezembro) em vermiculita com 1000 ppm de AIB. **B.** Estaca de ramos lenhosos (coletados em setembro) em vermiculita com 4000 ppm de AIB. **C.** Corte transversal da base de estaca controle no primeiro dia de cultivo **D.** Corte transversal da base da estaca, aos 60 dias de cultivo, mostrando a conexão da raiz adventícia com o sistema vascular. M: Medula, X: Xilema secundário, F: Floema secundário, P: Periderme, R: Raiz adventícia. Escala = A, B: 2,0 cm e C e D: 10 μ m.

c) *Ruellia incompata* (Nees) Lindau

A porcentagem de enraizamento das estacas de ramos herbáceos de *R. incompata*, foi significativamente maior no substrato vermiculita, com média de 76%, do que na areia, com 45,3% (Tabela 13, Figura 3A). Bons resultados também foram obtidos em com vermiculita com 0 e 1000 ppm AIB para número de raízes (3,0 raízes). Mas para comprimento da maior raiz os maiores valores foram em areia com 0 (7,48 cm), 1000 (5,13 cm) e 4000 (4,80 cm) ppm de AIB.

A porcentagem de sobrevivência foi significativamente menor para estacas de dezembro no substrato vermiculita, com 35,8%, contra os demais resultados, sendo as médias apresentadas fatores na Tabela 13. Foi observado que a maioria das estacas mortas apresentou queda foliar. Não houve estacas mortas e com raízes em ambos os tipos de estaca.

Observou-se o desenvolvimento de calo na base das estacas de dezembro de *R. incompata*. Os calos apresentavam diâmetro de cerca de 0,2 cm, tinham coloração amarela, provavelmente em virtude do contato com os substratos. Os calos surgiram em quase todos os tratamentos desse tipo de estaca, com cerca de 20%, com ressalva para vermiculita com 0 e 1000 ppm de AIB, que não apresentaram calos (Tabela 14). No entanto, não foram encontrados calos nas estacas de setembro em nenhum tratamento utilizado. Portanto, a análise estatística apresentou diferença estatística somente entre época de coleta, prevalecendo as estacas de dezembro.

Tabela 13. Efeito da época de coleta, das concentrações de ácido indolbutírico (AIB) e do substrato sobre a porcentagem de enraizamento, porcentagem de sobrevivência, de estacas de *Ruellia incompta* (Nees) Lindau, aos 60 dias de cultivo.

Época de coleta	Substrato	Concentração de AIB (ppm)	Enraizamento (%)	Sobrevivência (%)
Dezembro	Vermiculita	0	80,0	27,8
		1000	100	22,2
		2000	55,6	50,0
		4000	85,7	39,0
	Média		76,0 A	35,8 C
	Areia	0	42,8	77,8
		1000	40,0	83,3
		2000	35,8	77,8
		4000	70,0	55,6
	Média		45,3 B	73,8 B
Setembro	Vermiculita	0	0,0	88,9
		1000	0,0	88,9
		2000	0,0	94,4
		4000	0,0	100
	Média		0,0 C	93,1 A
	Areia	0	0,0	100
		1000	0,0	88,9
		2000	0,0	94,4
		4000	0,0	94,4
	Média		0,0 C	94,4 A
CV(%)		47,4	58,5	

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade. n = 18 estacas/tratamento.

Tabela 14. Efeito da época de coleta, das concentrações de ácido indolbutírico (AIB) e do substrato sobre a média do número de raízes e média do comprimento da maior raiz de estacas de *Ruellia incompta* (Nees) Lindau, aos 60 dias de cultivo.

Época de coleta	Substrato	AIB (ppm)	Número de raízes	Comprimento da maior raiz (cm)	Calo (%)	
Dezembro	Vermiculita	0	3,6 a	1,3 c	0,0 b	
		1000	4,0 a	1,4 c	0,0 b	
		2000	2,2 bc	1,5 c	22,2 a	
		4000	3,0 ac	5,8 a	28,6 a	
	Areia	0	0,7 b	7,4 a	7,1 a	
		1000	0,9 b	5,1 a	26,7 a	
		2000	0,6 b	3,2 b	23,1 a	
		4000	2,2 bc	4,8 a	27,3 a	
		Vermiculita	0	0,0 d	0,0 d	0,0 b
			1000	0,0 d	0,0 d	0,0 b
			2000	0,0 d	0,0 d	0,0 b
			4000	0,0 d	0,0 d	0,0 b
Setembro	Areia	0	0,0 d	0,0 d	0,0 b	
		1000	0,0 d	0,0 d	0,0 b	
		2000	0,0 d	0,0 d	0,0 b	
		4000	0,0 d	0,0 d	0,0 b	
CV(%)			36,2	149,5	153,6	

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade. n = 18 estacas/tratamento.

Para a brotação de estacas de dezembro, todos os tratamentos propiciaram 100% de estacas brotadas (Tabela 15). A porcentagem de brotação das estacas de setembro ficou entre 77,8% (vermiculita-2000ppm de AIB) e 100% (areia-0ppm e areia-2000 ppm de AIB), porém com semelhança estatística entre todos os fatores. A maior média do número de nós das de dezembro foi 3,0 nós para vermiculita 1000 ppm de AIB, e restante ficou entre 1,8 e 2,0 nós. Todos os tratamentos em relação ao número de nós das de setembro foram significativamente semelhantes, ocorrendo entre 1,4 e 2,1 nós por estaca (Tabela 16). Houve interação entre substrato e época de coleta sobre o número de nós, onde o menor valor (1,6 nós) encontrado em estacas de setembro em vermiculita diferiu dos demais (Tabela 15). Observou-se também que as estacas alongaram os entrenós, mas este dado não foi contabilizado neste experimento.

As estaca de dezembro do controle apresentam epiderme, seguido de uma faixa de colênquima. Observa-se o desenvolvimento de xilema e floema secundários (Figura 3C). O

estudo anatômico da base das estacas enraizadas mostra que a conexão das raízes adventícias com o caule é feita pelo câmbio vascular (Figura 3D).

Tabela 15. Efeito da época de coleta, das concentrações de ácido indolbutírico (AIB) e do substrato sobre a porcentagem de brotação, de calo e média do número de nós de estacas de ramos herbáceos de *Ruellia incompta* (Nees) Lindau aos 60 dias de cultivo.

Época de coleta	Substrato	Concentração de AIB (ppm)	Brotação (%)	Número de nós
Dezembro	Vermiculita	0	100 a	2,0
		1000	100 a	3,0
		2000	100 a	1,9
		4000	100 a	2,0
	Média		-	2,1 A
	Areia	0	100 a	1,8
		1000	100 a	1,9
		2000	100 a	1,8
		4000	100 a	1,8
	Média		-	1,8 A
Setembro	Vermiculita	0	83,3 a	1,9
		1000	88,9 a	1,7
		2000	77,8 a	1,4
		4000	94,4 a	1,9
	Média		-	1,6 B
	Areia	0	100 a	1,9
		1000	83,3 a	2,1
		2000	100 a	2,1
		4000	94,4 a	2,1
	Média		-	2,0 A
CV(%)		11,0	15,5	

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade. n = 18 estacas/tratamento.

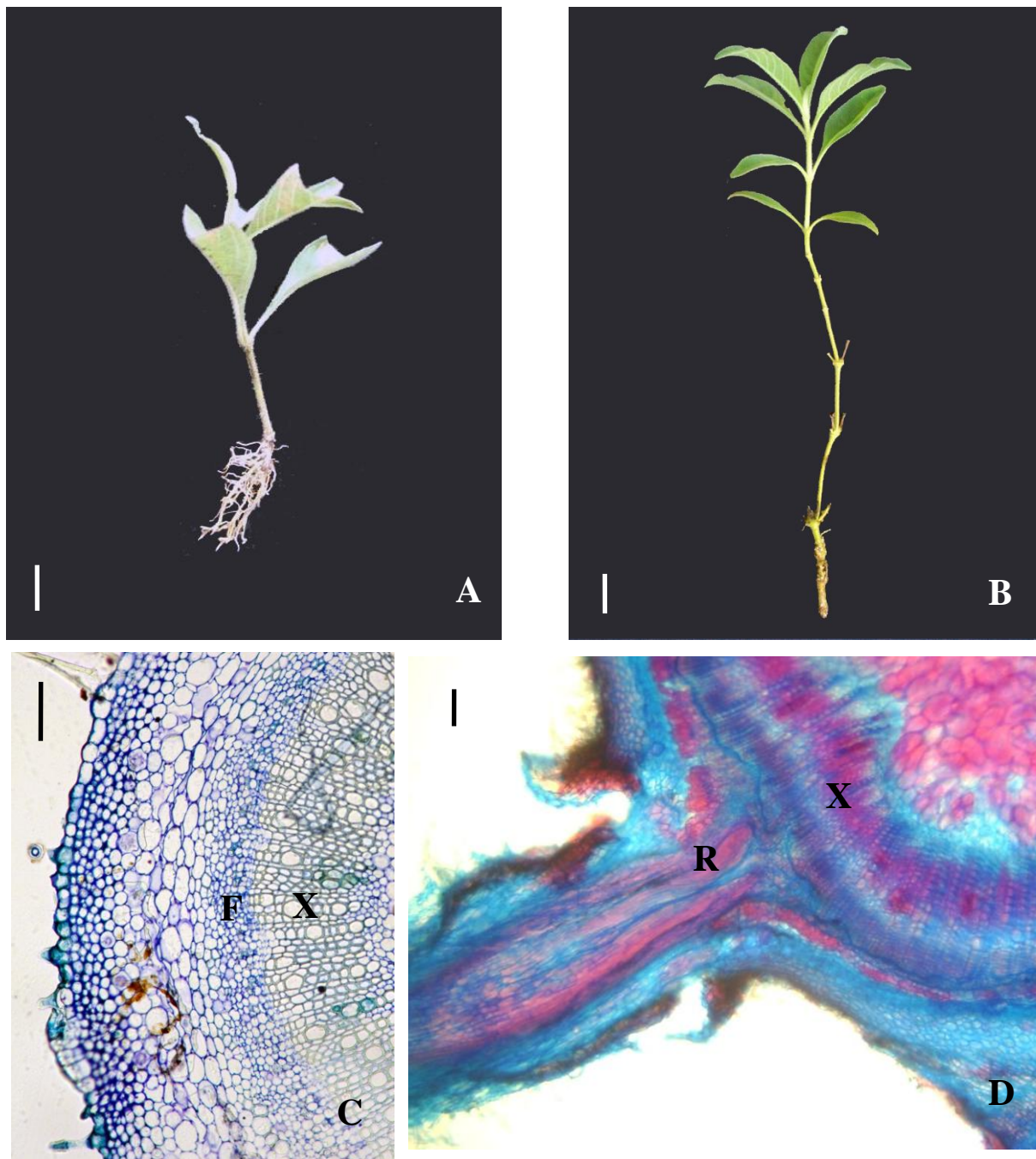


Figura 3. Estaquia e aspecto anatômico de ramos apicais de *Ruellia incompta* (Nees) Lindau. **A.** Estaca coletada em dezembro)em vermiculita com 2000 ppm de AIB. **B.** Estaca coletada em setembro em vermiculita com 0 ppm de AIB, sem formação de raiz, com a queda das folhas antigas, mas com brotação de novas folhas e alongamento dos entrenós. **C.** Corte transversal da base da estaca de dezembro do controle, no primeiro dia de cultivo **D.** Corte transversal, à mão livre, da base da estaca de dezembro enraizada, evidenciando a emissão de raiz adventícia aos 60 dias de cultivo. F: Floema secundário, X: Xilema secundário, R: raiz adventícia. Escala: A e B = 1,5 cm; C e D = 10 μ m.

4. DISCUSSÃO

O Cerrado apresenta grande riqueza florística e com vasto potencial de uso, entre eles o ornamental (Pereira 1996). A vegetação do Cerrado é determinada por vários fatores, destacando-se o clima sazonal, com invernos secos e verões chuvosos. Não menos importantes são os solos, que são geralmente profundos e bem drenados, e com uma baixa disponibilidade de nutrientes (Goodland & Ferri 1979; Haridasan 2000).

No entanto, o bioma vem sofrendo fragmentação devida, principalmente, ao crescimento acelerado das fronteiras agrícolas (Fiszon 2003). A produção de mudas de espécies nativas do Cerrado por meio da estaquia possibilita a recuperação de áreas degradadas e pode ser desenvolvida por pequenos produtores rurais, pois não requer grande investimento inicial (Avidos & Ferreira 2000; Shigueo 2008). Porém, existem poucos trabalhos com espécies do estrato herbáceo-arbustivo (Oliveira *et al.* 2001). Assim, estudos são necessários para verificar os fatores que podem favorecer o enraizamento de estacas de espécies com potencial ornamental, tais como as características fisiológicas das estacas relacionadas com a época de coleta, as características físico-químicas do substrato, tipo e concentração de reguladores de crescimento, entre outros (Oliveira *et al.* 2001).

Ficou evidenciado pelos resultados que as estacas coletadas em dezembro apresentaram melhores resultados de enraizamento e brotação do que as de setembro. Esse fato indica que a época de coleta afetou a formação de raízes e brotos. As estacas de dezembro foram coletadas depois do início das chuvas, período de retomada do crescimento vegetativo, cujos ramos possuíam caule menos lignificado e folhas jovens. Esse crescimento é desencadeado por determinado balanço de reguladores e co-fatores endógenos (Iritani *et al.* 1986; Bortolini *et al.* 2007), que interagem de forma a induzir desenvolvimento das plantas no campo e conseqüentemente também das estacas de dezembro na estufa. Segundo Neves *et al.* (2006), órgãos em crescimento ativo apresentam maiores concentrações de auxinas, que é a principal classe de reguladores envolvida na formação de raízes. A maior concentração desse hormônio nas estacas de dezembro pode ser inferida pela presença de calo no tratamento controle das estacas de dezembro e pela ausência de calos nas de setembro.

As estacas de dezembro de *R. nitens* e *R. incompta* apresentaram colênquima abaixo da epiderme, e como observado, tiveram elevadas porcentagens de enraizamento. Embora as

estacas de dezembro de *J. lanstykii* tenham apresentado uma hipoderme esclerenficada, essa espécie também proporcionou altas porcentagens de enraizamento. Esse resultado indica que o esclerênquima presente em *J. lanstykii* não constituiu uma barreira física à formação das raízes adventícias, como observado na arboreta espinheira santa, *Maytenus muelleri* Schwacke (Lima *et al.* 2011). Já a menor flexibilidade apresentada pelas estacas de setembro pode sugerir que houve maior lignificação, que pode ter prejudicado a formação de raízes. No entanto, para confirmar essa hipótese, estudos anatômicos adicionais das estacas de setembro precisam ser realizados.

As estacas de setembro foram coletadas no período de estiagem (inverno seco), onde a disponibilidade hídrica fica bastante reduzida nas primeiras camadas do solo, dificultando o acesso das raízes aos nutrientes (Haridasan 2008), e conseqüentemente, o crescimento de parte aérea fica limitado (Munhoz & Felfili 2005). Além disso, foi observado que as estacas de setembro estavam em fase de floração e início de frutificação. Este resultado pode ser explicado por Hartmann *et al.* (2002), os quais assinalam que no final de floração e desenvolvimento de frutos as reservas são mobilizadas para a formação desses órgãos, sendo produzidas citocininas e giberelinas, que inibem o processo de iniciação de raízes. No trabalho de Kibbler *et al.* (2004), a fase de floração não inibiu o enraizamento em *Backhousia citriodora* F. Muell, mas retardou-o, mostrando que a intensidade da influência pode variar com a espécie.

Bortolini *et al.* (2008), trabalhando com *Tibouchina sellowiana* (Cham.) Cogn. verificou que as estacas apresentaram maior enraizamento na primavera (outubro), que coincidiu com altos índices pluviométricos. Para acantáceas cultivadas na Europa, Heede & Lecourt (1991) indicam que a estaquia do gênero *Justicia* pode ser feita em qualquer época do ano, desde que cultivadas em estufa climatizada, enquanto em *Ruellia*, os autores afirmam que as estacas cultivadas nas mesmas condições, enraízam melhor quando coletadas na primavera. Já para as espécies trabalhadas, que pertencem ao Cerrado, verificou-se que é mais adequado coletar as estacas de *J. lanstykii*, *R. nitens* e *R. incompta* durante o período chuvoso, pois as espécies estão em pleno crescimento vegetativo, o que aumenta as chances de enraizamento e brotação das estacas em estufa.

No presente estudo, o enraizamento das estacas de dezembro foi elevado, com médias de 98% de estacas enraizadas em *J. lanstykii*, 75,6% em *R. nitens* e 76% em *R. incompta*. Mas de maneira geral, as concentrações de AIB (0, 1000, 2000 e 4000ppm) e os substratos (areia e vermiculita) utilizados não influenciaram significativamente as porcentagens de brotação e as de enraizamento das estacas de *J. lanstykii*, *R. nitens*. No entanto, o número de

raízes nas estacas de dezembro de *J. lanstykii* foi significativamente maior em 1000 ppm (6,2 raízes) e 4000 ppm de AIB (7,1 raízes) em relação ao controle (4,4 raízes). Esses dados corroboram com Biasi *et al.* (1997), no qual incrementos na concentração de AIB promoveram aumento na emissão de raízes de porta-enxertos de videira, *Vitis vinifera* L. Fogaça & Fett-Neto (2005) verificaram que a auxina exógena AIB, por ser de estabilidade intermediária, apresentou maior enraizamento em microestacas de *Eucalyptus globulus* Labill. (difícil-de-enraizar) e *Eucalyptus saligna* Sm.(fácil-de-enraizar).

Já em *R. nitens*, o tratamento com 1000 ppm de AIB produziu o maior número de raízes (3,7 raízes), destacando-se estatisticamente das demais concentrações de AIB. Este resultado é semelhante ao encontrado em estacas apicais de *Bauhinia rufa*, presente em mata de galeria do Cerrado, que também produziram raízes em 1000 ppm de AIB (Oliveira *et al.* 2001). Além disso, o número de raízes decresceu com o aumento da concentração da auxina em *R. nitens*.

Em *R. incompta* verifica-se um outro panorama de enraizamento das estacas de dezembro, pois verifica-se que o enraizamento (76%) e o número de raízes (3,0 raízes em 4000 ppm AIB) das estacas de dezembro aumentaram estatisticamente no substrato vermiculita em relação à areia. Esses resultados são semelhantes ao encontrado por Zuffellato-Ribas *et al.* (2005) em que o substrato vermiculita apresentou o maior número de raízes por estaca (22,4 raízes) de *Odontonema strictum* Kuntze (Acanthaceae) em relação ao pó de casca de coco. A vermiculita é capaz de absorver grande quantidade de água, tem relativamente alta capacidade de trocas catiônica e por isso pode manter nutrientes em reserva para liberação tardia, além de conter magnésio e potássio (Hartmann *et al.* 2002). Todos esses fatores podem ter favorecido o enraizamento de *R. incompta* nesse substrato.

Foi observado a presença de calo nas estacas de dezembro de *R. nitens* (31,1%) e em *J. lanstykii* (32,1 %). Em *R. incompta*, houve formação de calo nos dois tipos de estaca, porém com maior porcentagem para as de dezembro (19,2%). Em relação aos fatores substrato e concentração de AIB, não houve efeito significativo desses sobre a formação de calo. A formação de calo pode não estar associada à formação da raiz nessas espécies, uma vez que, de maneira geral, a porcentagem de estacas com calo, nas espécies testadas, foi relativamente baixa, cerca de 30%. Além disso, das estacas que apresentavam calo, as raízes surgiam acima deles, não se diferenciando em raízes.

Ono *et al.* (1992) afirmaram que a calogênese não é interessante em estacas de cafeeiro (*Coffea arabica*), pois demonstraram que os calos formados não se diferenciaram em raízes. Estacas de setembro de amora-preta apresentaram uma resposta inversa de

enraizamento em relação às cultivares estudadas para formação de calo (Villa *et al.* 2003). Mas no estudo de Tofanelli *et al.*(2003), a cultivar Jóia 1 de *Prunus persica* L. Batsch (pêssego) apresentou a maior porcentagem de estacas enraizadas em estacas com calos.

Sendo assim, os dados sugerem que os calos formados sejam parte de um processo de cicatrização em resposta ao corte da estaca, estando mais relacionado às condições fisiológicas e ambientais das estacas de dezembro das três espécies (Hartmann *et al.* 2002).

Foi observado que a porcentagem de sobrevivência das estacas de dezembro de *R. incompta* foi significativamente maior em areia (73,8%) do que em vermiculita (35,8%). Uma hipótese para esse resultado é que a base da estaca (com maior disponibilidade de fotossintatos do que as de setembro) e as condições de cultivo na estufa (maior temperatura e umidade) tenham favorecido a proliferação de microrganismos e que esses possam ter se desenvolvido no sistema vascular da estaca e comprometido sua sobrevivência. Portanto, novos experimentos precisam ser realizados combinando o uso de métodos desinfestantes, tais como fungicidas, e assim, evitar a proliferação de microrganismos (Mayer *et al.* 2001).

Considerando que essas espécies apresentaram resultados elevados de enraizamento e brotação, pode-se sugerir que além da produção de mudas, essas estacas podem ser utilizadas como matrizes para a micropropagação *in vitro*. O uso de brotos recém formados das estacas facilita a logística de trabalho, uma vez que não seria necessária a retirada da planta inteira do campo, mas somente o ramo para o preparo da estaca.

5. CONCLUSÕES

1) O presente estudo indicou que há grande potencial para a produção de mudas de *J. lanstyakii*, *R. nitens* e *R. incompta* a partir da estaquia, pois a técnica propiciou elevados índices de brotação e enraizamento.

2) Os tratamentos realizados com estacas provenientes de ramos coletados em dezembro (estação chuvosa) apresentaram melhores resultados em todas as variáveis testadas, sendo mais indicadas para o enraizamento.

3) O número de raízes de ramos de dezembro foi maior em 1000 ppm ou 4000 ppm de AIB para *J. lanstyakii*.

4) O tratamento com 1000 ppm de AIB produziu maior número de raízes em *R. nitens*.

5) O substrato vermiculita potencializa o enraizamento e o número de raízes de estacas de ramos de dezembro de *R. incompta*.

6) As estacas dessas espécies pode ser usadas como fonte de explantes para estabelecimento e propagação *in vitro* de brotos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, E. F. A.; Luz, P. B. da; Lessa, M. A.; Paiva, P. D. de O.; Albuquerque, C. J. B.; Oliveira, M. V. C. de. 2008. Diferentes substratos e ambientes para o enraizamento de mini-ixora (*Ixora coccinea* compacta). **Ciência e Agrotecnologia** 32 (5): 1449-1453.
- Avidos, M. F. D. & Ferreira, L. T. 2000. Frutos do Cerrado: Preservação gera muitos frutos. **Biociência** 15: 36-41.
- Biasi, L. A.; Celso Valdevino Pommer; Percy Antonio Gerardo Salas Pino. 1997. Propagação de porta-enxertos de videira mediante estaquia semilenhosa. **Bragantia** 56 (2): 1-15.
- Bortolini, M. F.; Dobignies, A.; Zuffellato-Ribas, K. C.; Carpanezzi, A. A. Tavares, F. R. 2007. Enraizamento de estacas caulinares de Kudzu. **Scientia Agraria** 8 (2):135-140.
- Bortolini, M. F.; Zuffellato-Ribas, K. C.; Koehler, H. S.; Carpanezzi, A. A.; Deschamps, C.; Oliveira, M. C.; Bona, C.; Mayer, J. L. S. 2008. *Tibouchina sellowiana* (Cham.) Cogn.: Enraizamento, anatomia e análises bioquímicas nas quatro estações do ano. **Ciência Florestal** 18 (2): 159-171.
- Brazão, J.; Goncalves, E.; Eiras-Dias, J.; Amâncio, S. 2010. Efeito da casta no enraizamento de estacas semilenhosas de videira. **Ciência e Técnica Vitivinícola** 25(1): 9-14.
- Carrijo, O. A.; Liz, R. de S.; Makishima, N. 2002. Fibra de casca de coco verde como substrato agrícola. **Horticultura Brasileira** 20(4): 533-535.
- Conceição, G. M.; Ruggieri, A. C.; Araújo, M. F. V.; Conceição, T. T. M. M.; Conceição, M. A. M. M. 2011. Plantas do Cerrado: comercialização, uso e indicação terapêutica fornecida pelos raizeiros e vendedores, Teresina, Piauí. **Scientia Plena** 7(12):1-6.
- Corrêa, R. S.; Bias, E. S.; Baptista, G. M. M. 2004. Áreas degradadas pela mineração no Distrito Federal. In: Corrêa R. S. & Baptista G. M. M (eds). **Mineração e áreas degradadas no Cerrado**. Universa Press, Brasília. pp.9-21.
- Cuquel, F.L. & Minami, K. 1994. Enraizamento de estacas de crisântemo *Dendranthema morifolium* (Ramat.) Tzvelev tratadas com ácido indolbutírico veiculado em talco. **Scientia Agricola** 51 (1): 28-35.
- Ehlert, P. A. D.; Luz, J. M. Q.; Innecco, R. 2004. Propagação vegetativa da alfavaca-cravo utilizando diferentes tipos de estacas e substratos. **Horticultura Brasileira** 22 (1): 10-13.

- Ezcurra, C. 1993. Systematics of *Ruellia* (Acanthaceae) in Southern South America. **Annals of the Missouri Botanical Garden** 80 (4): 787-845.
- Ezcurra, C. 2002. El género *Justicia* (Acanthaceae) em Sudamérica Austral. **Annals of Missouri Botanical Garden** 89: 225-280.
- Fiszon, J. T. 2003. Causas da Fragmentação: Causas antrópicas. In: **Fragmentação de Ecosystemas: Causas e efeitos sobre a biodiversidade e recomendações de Políticas Públicas**. Rambaldi, D. M, Oliveira D. A. S. de (orgs). Série Biodiversidade 6. Brasília: Ministério do Meio Ambiente/Secretaria de Biodiversidade e Florestas. 510p.
- Fogaça, C. M. & Fett-Neto, A. G. 2005. Role of auxin and its modulators in the adventitious rooting of *Eucalyptus* species differing in recalcitrance. **Plant Growth Regulation** 45: 1–10.
- Goodland, R. & Ferri, M. G. 1979. **Ecologia do Cerrado**. São Paulo, Editora da Universidade de São Paulo. 193 p.
- Grieneisen, V.A.; Xu, J.; Marée, A. F. M.; Hogeweg, P., Scheres, B. 2007. Auxin transport is sufficient to generate a maximum and gradient guiding root growth. **Nature** 449: 1008–1013.
- Guimarães, P. J. F.; Harris, S.; Proença, C. E. B.; Mansano, V. de F.; Zanatta, M. R. V. 2009. **Sistemática das Angiospermas**. UnB. CD-ROM.
- Haridasan, M. 2000. Nutrição mineral de plantas nativas do Cerrado. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal** 12: 54-64.
- Haridasan, M. 2008. Nutritional adaptations of native plants of the Cerrado biome in acid soils. **Brazilian Journal of Plant Physiology** 20 (3): 183-195.
- Hartmann, H. T; Kester, D. E; Davies, F. T; Geneve, R. L. 2002. **Plant propagation**. Prentice Hall. 7° ed. 873p.
- Heede, V. D. & Lecourt, M. 1991. **L'Art de Bouturer**. La Maison Rustique. 8°ed. Paris. 159p.
- Iritani, C.; Soares, R. V.; Gomes, A. V. 1986. Aspectos morfológicos da aplicação de reguladores do crescimento nas estacas de *Ilex paraguariensis* St. Hilaire. **Acta Biologica do Paraná** 15: 21-26.
- Johansen, D. A. 1940. **Plant microtechnique**. Mc Graw Hill, New York.
- Kibbler, H.; Johnston, M. E.; Williams, R. R. 2004. Adventitious root formation in cuttings of *Backhousia citriodora* F. Muell: Seasonal influences of temperature, rainfall, flowering and auxins on the stock plant. **Scientia Horticulturae** 102: 323-358.

- Lima, D. M.; Biasi, L. A.; Zanette, F.; Zuffellato-Ribas, K. C.; Bona, C.; Mayer, J. L. S. 2011. Capacidade de enraizamento de estacas de *Maytenus muelleri* Schwacke com a aplicação de ácido indol butírico relacionada aos aspectos anatômicos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais** 13 (4): 422-438.
- Matteucci, M. B. de A.; Guimarães, N. N. R.; Tiveron, D. F.; Santos, C. 1995. A flora do Cerrado e suas formas de aproveitamento. **Anais da Escola de Agronomia e Veterinária** 25(1): 13-30.
- Mayer, N. A.; Pereira, F. M.; Nachtigal, J. C. 2001. Propagação do umezeiro (*Prunus mume* Sieb & Zucc.) por estaquia herbácea. **Revista Brasileira de Fruticultura** 23(3): 673-676.
- Melo, J. T. de; Torres, R. A. de A.; Silveira, C. E. S. Caldas, L. S. 2008. Coleta, Propagação e Desenvolvimento Inicial de Plantas do Cerrado. In: **Cerrado: ecologia e flora**. Sano, S.M.; Almeida, S. P. de; Ribeiro, J. F. (eds). EMBRAPA Cerrados. EMBRAPA Informação Tecnológica. Brasília, DF. pp.319-342
- Munhoz, C. B. R. & Felfili, J. M. 2005. Fenologia do estrato herbáceo-subarbusivo de uma comunidade de campo sujo na Fazenda Água Limpa no Distrito Federal, Brasil. **Acta Botânica Brasileira**. 19(4): 979-988.
- Myers, N. R.; Mittermeier, R. A.; Mittermeier, C. G.; Fonseca, G. A. B. Kent, J. 2000. Biodiversity hotspot for conservation priority. **Nature** 403: 853-858.
- Neves, T. dos S.; Carpanezzi, A. A.; Zuffellato-Ribas, K. C.; Marengo, R. A. 2006. Enraizamento de corticeira-da-serra em função do tipo de estaca e variações sazonais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 41 (12): 1699-1705.
- Oliveira, A. F. M.; Xavier, H. S.; Silva, N. H.; Andrade, L. H. C. 2000. *Screening* cromatográfico de Acantáceas medicinais: *Justicia pectoralis* Jacq. e *Justicia gendarussa* Burm. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais** 3 (1):37-41
- Oliveira, M. C.; Ribeiro, J. F.; Rios, M. N. F.; Rezende, M. E. 2001. Enraizamento de estacas para produção de mudas de espécies nativas em mata de galeria. **Recomendação Técnica** 41. EMBRAPA Cerrados. 4p.
- Ono, E. O.; Rodrigues, J. D.; Pinho, S. Z. 1992. Interações entre auxina e ácido bórico, no enraizamento de estacas caulinares de *Coffea arabica* L. cv Mundo Novo. **Scientia Agricola** 49 (1): 23-27.
- Paiva, J. G. A. de; Frank-de-Carvalho, S. M.; Magalhães, M. P.; Graciano-Ribeiro, D. 2006. Verniz vitral incolor 500: uma alternativa de meio de montagem economicamente viável. **Acta Botânica Brasileira** 20(2): 257-264.

- Rios, M. N.; Ribeiro, J. F.; Rezende, M. E. 2001. Propagação vegetativa: enraizamento da estacas de espécies nativas de Mata de Galeria. In: Ribeiro, J. F.; Silva, J. C. S.; Fonseca, C. E. L. (eds.). **Cerrado: caracterização e recuperação de matas de galeria**. Planaltina, DF. EMBRAPA Cerrados. p. 455-491.
- Sharma, J. & Graves, W. R. 2005. Propagation of *Rhamnus alnifolia* and *Rhamnus lanceolata* by seeds and cuttings. **Journal of Environmental Horticulture** 23(2): 86-90.
- Shiembo, P. N.; Newton, A. C.; Leakey, R. R. B. 1996. Vegetative propagation of *Irvingia gabonensis*, a West African fruit tree. **Forest Ecology and Management** 87: 185-192.
- Shigueo, M. 2008. **EMATER – 30 anos ensinando e aprendendo**. EMATER-DF. 134p.
- Tillmann, M. A. A.; Cavariam, C.; Piana, Z.; Minamim K. 1994. Comparação entre diversos substratos no enraizamento de estacas de croton (*Codiaeum variegatum* L.) **Scientia Agricola** 51(1): 17-20.
- Tofanelli, M. B. D.; Ono, E. O.; Rodrigues, J. D. 2003. Método de aplicação de ácido indolbutírico no enraizamento de estacas herbáceas de pessegueiro. **Revista Brasileira de Fruticultura** 25 (2): 363-364.
- Villa, F.; Pio, R.; Chalfun, N. N. J.; Gontijo, T. C. A.; Dutra, L. F. 2003. Propagação de amoreira-preta utilizando estacas lenhosas. **Ciência e Agrotecnologia** 27 (4): 829-834.
- Wasshausen, D. C. & Wood, J. R. I. 2004. Acanthaceae of Bolivia. **Contributions from the United States National Herbarium** 49: 1-152.
- Yamamoto, L. Y.; Borges, R. de S.; Sorace, M.; Rachid, B. F.; Ruas, J. M. F.; Sato, O.; Assis, A. M. de; Roberto, S. R. 2010. Enraizamento de estacas de *Psidium guajava* L. 'Século XXI' tratadas com ácido indolbutírico veiculado em talco e álcool. **Ciência Rural** 40 (5): 1037-1042.
- Zuffellato-Ribas, K. C.; Boeger, M. R. T.; Bona, C.; Paes, E. G. B.; Pimenta, A. C.; Masuda, E. T. 2005. Enraizamento e morfo-anatomia de estacas caulinares de *Odontonema strictum* Kuntze (Acanthaceae). **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental** 11 (1): 57-61.

7. ANEXOS

Anexo 1. Esquema geral das estratégias de propagação de *Justicia lanstyakii*, *Ruellia nitens* e *Ruellia incompacta*.

Estratégia de propagação	Espécie	Desinfestação	Meio de cultura	Enraizamento	Aclimatização	Observação
Germinação <i>in vitro</i>	<i>Justicia lanstyakii</i>	Etanol 70 % (1 min); hipoclorito de sódio 2% (15 min); 3x água destilada, deionizada e autoclavada (1 min)	Ágar-água	-	-	
	<i>Ruellia nitens</i>	Etanol 70 % (1 min); hipoclorito de sódio 2% (15 min); 3x água destilada, deionizada e autoclavada	MS 50%	-	-	
	<i>Ruellia incompacta</i>	Etanol 70 % (1 min); hipoclorito de sódio 2% (15 min); 3x água destilada, deionizada e autoclavada	MS 100%	-	-	Transferir explantes após 30 dias de cultivo
Micropropagação a partir de matrizes adultas	<i>Justicia lanstyakii</i>	Lavagem em água corrente (10 min); fungicida Carbendazim (60 min); etanol 70 % (1 min); hipoclorito de cálcio 70% (15 min); 3x água destilada, deionizada e autoclavada (1 min)	MS sem reguladores	MS sem reguladores	Copo descartável perfurados na base com vermiculita fina	

Estratégia de propagação	Espécie	Desinfestação	Meio de cultura	Enraizamento	Aclimatização
Micropropagação a partir de matrizes adultas	<i>Ruellia nitens</i>	Lavagem em água corrente (10 min); fungicida Carbendazim (60 min); etanol 70 % (1 min); hipoclorito de cálcio 70% (15 min); 3x água destilada, deionizada e autoclavada (1 min)	MS sem reguladores	-	-
	<i>Ruellia incompta</i>	Lavagem em água corrente (10 min); fungicida Carbendazim (60 min); etanol 70 % (1 min); hipoclorito de cálcio 70% (30 min); 3x água destilada, deionizada e autoclavada (1 min)	-	-	-
	<i>Justicia lanstyakii</i>	-	-	Estacas apicais com 4 folhas cortadas pela metade, coletadas em dezembro, com 4000 ppm de AIB.	Saco preto com latossolo vermelho e areia lavada, na proporção 2:1
Estaquia	<i>Ruellia nitens</i>	-	-	Estacas apicais com 4 folhas cortadas pela metade, coletadas em dezembro, em vermiculita com 1000 ppm de AIB.	Saco preto com latossolo vermelho e areia lavada, na proporção 2:1
	<i>Ruellia incompta</i>	-	-	Estacas apicais com 4 folhas cortadas pela metade, coletadas em dezembro, em vermiculita.	Saco preto com latossolo vermelho e areia lavada, na proporção 2:1

Anexo 2. Análise de variância do número de estacas enraizadas em dois substratos, em diferentes concentrações do regulador AIB e duas épocas de coleta em *Justicia lanstykii*. Dados transformados para arco-seno $\sqrt{(x)/100}$.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	15	65685.52648	4379.03510	34.09	<.0001
Error	32	4110.35792	128.44869		
Corrected Total	47	69795.88440			

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
substrato	1	0.10313	0.10313	0.00	0.9776
regulador	3	651.96316	217.32105	1.69	0.1884
substrato*regulador	3	206.66173	68.88724	0.54	0.6608
época	1	63400.76585	63400.76585	493.59	<.0001
substrato*época	1	204.57891	204.57891	1.59	0.2161
regulador*época	3	378.83433	126.27811	0.98	0.4130
subst*regula*época	3	842.61935	280.87312	2.19	0.1088

Anexo 3. Análise de variância do comprimento da maior raiz em dois substratos, em diferentes concentrações do regulador AIB e duas épocas de coleta em *J. lanstykii*. Dados transformados para $\sqrt{(x+0,5)}$.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	9	1995.242881	221.693653	98.39	<.0001
Error	257	579.070377	2.253192		
Corrected Total	266	2574.313258			

Source	D F	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
substrato	1	8.299792	8.299792	3.68	0.0561
regulador	3	14.919481	4.973160	2.21	0.0877
época	1	1954.592928	1954.592928	867.48	<.0001
substrato* época	1	4.634786	4.634786	2.06	0.1527
regulador* época	3	12.795894	4.265298	1.89	0.1312
subst*regul*época	3	732.61975	277.87312	2.28	0.1290

Anexo 4. Análise de variância do número de estacas com calo em dois substratos, em diferentes concentrações do regulador AIB e duas épocas de coleta em *J. lanstykii*. Dados transformados para arco-seno $\sqrt{(x)}/100$.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	15	69782.06009	4652.13734	22.92	<.0001
Error	32	6495.96048	202.99877		
Corrected Total	47	76278.02058			

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
substrato	1	16.70974	16.70974	0.08	0.7760
regulador	3	78.40136	26.13379	0.13	0.9423
substrato*regulador	3	56.49737	18.83246	0.09	0.9635
época	1	69290.22712	69290.22712	341.33	<.0001
substrato* época	1	111.01776	111.01776	0.55	0.4650
regulador* época	3	177.30789	59.10263	0.29	0.8315
subst*regula* época	3	51.89886	17.29962	0.09	0.9676

Anexo 5. Análise de variância do número de raízes por estaca em dois substratos, em diferentes concentrações do regulador AIB e duas épocas de coleta em *J. lanstykii*. Dados transformados para $\sqrt{(x+0,5)}$.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	9	2279.119645	253.235516	75.89	<.0001
Error	258	860.880355	3.336746		
Corrected Total	267	3140.000000			

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
substrato	1	7.224283	7.224283	2.17	0.1424
regulador	3	63.596122	21.198707	6.35	0.0004
época	1	2115.480388	2115.480388	634.00	<.0001
substrato*época	1	11.155065	11.155065	3.34	0.0686
regulador*época	3	81.663787	27.221262	8.16	<.0001
subst*regul*época	3	832.61975	289.87312	2.18	0.1090

Anexo 6. Análise de variância do número de estacas brotadas em dois substratos, em diferentes concentrações do regulador AIB e duas épocas de coleta em *J. lanstykii*. Dados transformados para arco-seno $\sqrt{(x)/100}$.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	15	25776.41025	1718.42735	18.36	<.0001
Error	32	2995.83700	93.61991		
Corrected Total	47	28772.24724			

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
substrato	1	262.83446	262.83446	2.81	0.1036
regulador	3	252.65825	84.21942	0.90	0.4521
substrato*regulador	3	124.42796	41.47599	0.44	0.7239
época	1	24645.34882	24645.34882	263.25	<.0001
substrato*época	1	240.22156	240.22156	2.57	0.1190
regulador*época	3	145.79377	48.59792	0.52	0.6722
subst*regula*estaca	3	105.12542	35.04181	0.37	0.7721

Anexo 7. Análise de variância do número de nós por estaca em dois substratos, em diferentes concentrações do regulador AIB e duas épocas de coleta em *J. lanstykii*. Dados transformados para $\sqrt{(x+0,5)}$.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	9	225.7449660	25.0827740	23.76	<.0001
Error	258	272.3296609	1.0555413		
Corrected Total	267	498.0746269			

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
substrato	1	1.9382860	1.9382860	1.84	0.1766
regulador	3	1.8662998	0.6220999	0.59	0.6225
época	1	221.6581009	221.6581009	209.99	<.0001
substrato*época	1	0.0027762	0.0027762	0.00	0.9591
regulador*época	3	0.2795030	0.0931677	0.09	0.9664
subst*regul*época	3	101.12542	25.04181	0.32	0.6721

Anexo 8. Análise de variância do número de estacas vivas em dois substratos, em diferentes concentrações do regulador AIB e duas épocas de coleta em *J. lanstykii*. Dados transformados para arco-seno $\sqrt{(x)/100}$.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	15	2800.116532	186.674435	1.30	0.2573
Error	32	4588.888452	143.402764		
Corrected Total	47	7389.004985			

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
substrato	1	49.8253217	49.8253217	0.35	0.5597
regulador	3	555.9800209	185.3266736	1.29	0.2939
substrato*regulador	3	555.9800209	185.3266736	1.29	0.2939
época	1	314.9027240	314.9027240	2.20	0.1482
substrato*época	1	14.7021238	14.7021238	0.10	0.7509
regulador*época	3	504.2628605	168.0876202	1.17	0.3357
substr*regula*estaca	3	804.4634606	268.1544869	1.87	0.1545

Anexo 9. Análise de variância do número de estacas enraizadas em dois substratos, em diferentes concentrações do regulador AIB e duas épocas de coleta em *R. nitens*. Dados transformados para arco-seno $\sqrt{(x)/100}$.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	15	40136.99109	2675.79941	11.89	<.0001
Error	32	7203.95177	225.12349		
Corrected Total	47	47340.94286			

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
substrato	1	88.15360	88.15360	0.39	0.5359
regulador	3	585.62346	195.20782	0.87	0.4682
substrato*regulador	3	912.05796	304.01932	1.35	0.2755
época	1	35739.28640	35739.28640	158.75	<.0001
substrato*época	1	9.14291	9.14291	0.04	0.8416
regulador*época	3	2330.20090	776.73363	3.45	0.0280
substr*regula*época	3	472.52587	157.50862	0.70	0.5592

Anexo 10. Análise de variância do número de raízes por estaca em dois substratos, em diferentes concentrações do regulador AIB e duas épocas de coleta em *R. nitens*. Dados transformados para $\sqrt{(x+0,5)}$.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	15	52.7531990	3.5168799	15.91	<.0001
Error	247	54.6124828	0.2211032		
Corrected Total	262	107.3656818			

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
substrato	1	0.31671968	0.31671968	1.43	0.2325
regulador	3	4.58609280	1.52869760	6.91	0.0002
época	1	41.69823642	41.69823642	188.59	<.0001
substrato*regulador	3	0.97206546	0.32402182	1.47	0.2245
substrato*época	1	0.02425232	0.02425232	0.11	0.7408
regulador*época	3	4.70015298	1.56671766	7.09	0.0001
substr*regula*época	3	0.45567936	0.15189312	0.69	0.5608

Anexo 11. Análise de variância do comprimento da maior raiz em dois substratos, em diferentes concentrações do regulador AIB e duas épocas de coleta em *R. nitens*. Dados transformados para $\sqrt{(x+0,5)}$.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	15	72.3088294	4.8205886	14.92	<.0001
Error	247	79.8233997	0.3231717		
Corrected Total	262	152.1322291			

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
substrato	1	1.85626513	1.85626513	5.74	0.0173
regulador	3	2.02614753	0.67538251	2.09	0.1021
época	1	64.55788541	64.55788541	199.76	<.0001
substrato*regulador	3	0.22360687	0.07453562	0.23	0.8750
substrato*época	1	0.39302217	0.39302217	1.22	0.2712
regulador*época	3	2.77341827	0.92447276	2.86	0.0575
substr*regula*estaca	3	0.47848397	0.15949466	0.49	0.6871

Anexo 12. Análise de variância do número de estacas com calo em dois substratos, em diferentes concentrações do regulador AIB e duas épocas de coleta em *R. nitens*. Dados transformados para arco-seno $\sqrt{(x)}/100$.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	15	12830.24844	855.34990	8.92	<.0001
Error	32	3069.20852	95.91277		
Corrected Total	47	15899.45696			

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
substrato	1	110.90634	110.90634	1.16	0.2903
regulador	3	400.56433	133.52144	1.39	0.2631
substrato*regulador	3	137.72827	45.90942	0.48	0.6994
época	1	11531.85055	11531.85055	120.23	<.0001
substrato*época	1	110.90634	110.90634	1.16	0.2903
regulador*época	3	400.56433	133.52144	1.39	0.2631
substr*regula*estaca	3	137.72827	45.90942	0.48	0.6994

Anexo 13. Análise de variância do número de estacas brotadas em dois substratos, em diferentes concentrações do regulador AIB e duas épocas de coleta em *R. nitens*. Dados transformados para arco-seno $\sqrt{(x)}/100$.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	15	42287.65343	2819.17690	21.93	<.0001
Error	32	4114.15591	128.56737		
Corrected Total	47	46401.80934			

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
substrato	1	461.35023	461.35023	3.59	0.0673
regulador	3	232.23229	77.41076	0.60	0.6184
substrato*regulador	3	620.47349	206.82450	1.61	0.2067
época	1	39634.86678	39634.86678	308.28	<.0001
substrato*época	1	849.59043	849.59043	6.61	0.0150
regulador*época	3	201.11446	67.03815	0.52	0.6706
substr*regula*estaca	3	288.02575	96.00858	0.75	0.5322

Anexo 14. Análise de variância do número de nós por estaca enraizadas em dois substratos, em diferentes concentrações do regulador AIB e duas épocas de coleta em *R. nitens*. Dados transformados para $\sqrt{(x+0,5)}$.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	15	35.72101082	2.38140072	27.81	<.0001
Error	247	21.14745223	0.08561722		
Corrected Total	262	56.86846305			

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
substrato	1	0.29542972	0.29542972	3.45	0.0644
regulador	3	0.18520962	0.06173654	0.72	0.5402
época	1	32.28889238	32.28889238	377.13	<.0001
substrato*regulador	3	2.10088267	0.70029422	8.18	<.0001
substrato*época	1	0.08184663	0.08184663	0.96	0.3292
regulador*época	3	0.29287497	0.09762499	1.14	0.3334
substr*regula*estaca	3	0.47587483	0.15862494	1.85	0.1382

Anexo 15. Análise de variância do número de estacas vivas em dois substratos, em diferentes concentrações do regulador AIB e duas épocas de coleta em *R. nitens*. Dados transformados para arco-seno $\sqrt{(x)/100}$.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	15	3613.282880	240.885525	1.94	0.0572
Error	32	3980.188911	124.380903		
Corrected Total	47	7593.471791			

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
substrato	1	303.608167	303.608167	2.44	0.1280
regulador	3	1383.317454	461.105818	3.71	0.0214
substrato*regulador	3	211.419550	70.473183	0.57	0.6410
época	1	247.108447	247.108447	1.99	0.1683
substrato*época	1	920.754396	920.754396	7.40	0.0104
regulador*época	3	26.970844	8.990281	0.07	0.9744
substr*regula*época	3	520.104022	173.368007	1.39	0.2625

Anexo 16. Análise de variância do número de estacas enraizadas em dois substratos, em diferentes concentrações do regulador AIB e duas épocas de coleta em *R. incompta*. Dados transformados para arco-seno $\sqrt{x}/100$.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	15	47720.21128	3181.34742	16.16	<.0001
Error	31	6103.83176	196.89780		
Corrected Total	46	53824.04304			

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
substrato	1	2292.64246	2292.64246	11.64	0.0018
regulador	3	766.77252	255.59084	1.30	0.2926
substrato*regulador	3	540.42740	180.14247	0.91	0.4451
época	1	40506.16274	40506.16274	205.72	<.0001
substrato*época	1	2213.41931	2213.41931	11.24	0.0021
regulador*época	3	768.20331	256.06777	1.30	0.2918
substr*regula*estaca	3	632.58354	210.86118	1.07	0.3757

Anexo 17. Análise de variância do número de raízes por estaca em dois substratos, em diferentes concentrações do regulador AIB e duas épocas de coleta em *R. incompta*. Dados transformados para $\sqrt{x+0,5}$.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	15	28.61986113	1.90799074	16.70	<.0001
Error	197	22.50945355	0.11426119		
Corrected Total	212	51.12931467			

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
substrato	1	0.47534293	0.47534293	4.16	0.0427
regulador	3	0.39301672	0.13100557	1.15	0.3315
época	1	20.75102506	20.75102506	181.61	<.0001
substrato*regulador	3	0.44432762	0.14810921	1.30	0.2769
substrato*época	1	4.24171377	4.24171377	37.12	<.0001
regulador*época	3	1.27440966	0.42480322	3.72	0.0124
substr*regula*época	3	1.04002536	0.34667512	3.03	0.0304

Anexo 18. Análise de variância do comprimento da maior raiz em dois substratos, em diferentes concentrações do regulador AIB e duas épocas de coleta em *R. incompta*. Dados transformados para $\sqrt{(x+0,5)}$.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	15	62.5347244	4.1689816	20.87	<.0001
Error	194	38.7448673	0.1997158		
Corrected Total	209	101.2795917			

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
substrato	1	0.58502023	0.58502023	2.93	0.0886
regulador	3	1.14132943	0.38044314	1.90	0.1301
substrato*regulador	3	0.72639127	0.24213042	1.21	0.3064
época	1	45.18523913	45.18523913	226.25	<.0001
substrato*época	1	5.99690146	5.99690146	30.03	<.0001
regulador*época	3	4.49274142	1.49758047	7.50	<.0001
substr*regula*época	3	4.40710150	1.46903383	7.36	0.0001

Anexo 19. Análise de variância do número de estacas com calo em dois substratos, em diferentes concentrações do regulador AIB e duas épocas de coleta em *R. incompta*. Dados transformados para arco-seno $\sqrt{(x)/100}$.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	15	9348.08892	623.20593	2.37	0.0205
Error	31	8139.05444	262.55014		
Corrected Total	46	17487.14335			

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
substrato	1	6.068527	6.068527	0.02	0.8801
regulador	3	2216.745413	738.915138	2.81	0.0555
substrato*regulador	3	922.321558	307.440519	1.17	0.3366
época	1	4277.636385	4277.636385	16.29	0.0003
substrato*época	1	87.981394	87.981394	0.34	0.5669
regulador*época	3	1386.798439	462.266146	1.76	0.1752
substr*regula*época	3	450.537201	150.179067	0.57	0.6377

Anexo 20. Análise de variância do número de estacas vivas em dois substratos, em diferentes concentrações do regulador AIB e duas épocas de coleta em *R. incompta*. Dados transformados para arco-seno $\sqrt{(x)/100}$.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	15	26764.78125	1784.31875	11.58	<.0001
Error	32	4931.10574	154.09705		
Corrected Total	47	31695.88700			

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
substrato	1	1767.07768	1767.07768	11.47	0.0019
regulador	3	296.66004	98.88668	0.64	0.5938
substrato*regulador	3	538.77989	179.59330	1.17	0.3382
época	1	21559.74605	21559.74605	139.91	<.0001
substrato*época	1	1767.07768	1767.07768	11.47	0.0019
regulador*época	3	296.66004	98.88668	0.64	0.5938
substr*regula*época	3	538.77989	179.59330	1.17	0.3382

Anexo 21. Análise de variância do número de estacas brotadas em dois substratos, em diferentes concentrações do regulador AIB e duas épocas de coleta em *R. incompta*. Dados transformados para arco-seno $\sqrt{(x)/100}$.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	15	1117.536490	74.502433	0.80	0.6670
Error	31	2879.415217	92.884362		
Corrected Total	46	3996.951707			

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
substrato	1	127.7893041	127.7893041	1.38	0.2498
regulador	3	40.9346433	13.6448811	0.15	0.9309
substrato*regulador	3	228.9587382	76.3195794	0.82	0.4919
época	1	323.5479183	323.5479183	3.48	0.0715
substrato*época	1	130.1473322	130.1473322	1.40	0.2455
regulador*época	3	40.4472197	13.4824066	0.15	0.9320
substr*regula*época	3	225.7113340	75.2371113	0.81	0.4980

Anexo 22. Análise de variância do número de nós por estaca em dois substratos, em diferentes concentrações do regulador AIB e duas épocas de coleta em *R. incompta*. Dados transformados para $\sqrt{(x+0,5)}$.

<i>Source</i>	<i>DF</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F Value</i>	<i>Pr > F</i>
<i>Model</i>	15	1.86518512	0.12434567	2.22	0.0068
<i>Error</i>	197	11.01573001	0.05591741		
<i>Corrected Total</i>	212	12.88091513			

<i>Source</i>	<i>DF</i>	<i>Type I SS</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F Value</i>	<i>Pr > F</i>
<i>substrato</i>	1	0.24057458	0.24057458	4.30	0.0394
<i>regulador</i>	3	0.22392995	0.07464332	1.33	0.2642
<i>substrato*regulador</i>	3	0.35624858	0.11874953	2.12	0.0985
<i>época</i>	1	0.09712283	0.09712283	1.74	0.1891
<i>substrato* época</i>	1	0.66108057	0.66108057	11.82	0.0007
<i>regulador* época</i>	3	0.12074270	0.04024757	0.72	0.5413
<i>substr*regula* época</i>	3	0.16548590	0.05516197	0.99	0.4002