



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**GERMINAÇÃO E VIABILIDADE DE PROPAGAÇÃO POR SEGMENTOS
FOLIARES DE PETÚNIA (*Petúnia x hybrida*)**

BRUNA LAÍS NASCIMENTO ALVES

AREIA-PB

Fevereiro - 2017

Ficha Catalográfica Elaborada na Seção de Processos Técnicos da
Biblioteca Setorial do CCA, UFPB, Campus II, Areia – PB.

A474g Alves, Bruna Laís Nascimento.

Germinação e viabilidade de propagação por segmentos foliares de petúnia
(Petúnia x hybrida) / Bruna Laís Nascimento Alves. - Areia: UFPB/CCA, 2017.
xii, 25 f. ; il.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Agronomia) - Centro de Ciências
Agrárias. Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2017.

Bibliografia.

Orientadora: Núbia Pereira da Costa Luna.

1. Petúnia – Germinação in vitro
 2. Petúnia-comum – Brotação de sementes
 3. Petúnia x hybrida – Família solanacea
- I. Luna, Núbia Pereira da Costa (Orientadora)
II. Título.

UFPB/CCA

CDU: 582.926.2

BRUNA LAÍS NASCIMENTO ALVES

**GERMINAÇÃO E VIABILIDADE DE PROPAGAÇÃO POR SEGMENTOS
FOLIARES DE PETÚNIA (*Petúnia x hybrida*)**

Trabalho de Graduação apresentado ao curso de Agronomia da Universidade Federal da Paraíba - Centro de Ciências Agrárias – Campus II – Areia - PB, como parte dos requisitos para obtenção do título de Engenheiro Agrônomo.

Orientadora: Profa. Dr^a. Núbia Pereira da Costa Luna

Coorientadora: MSc. Lucinalva Azevedo dos Santos

AREIA-PB

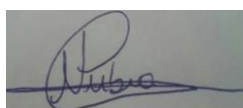
Fevereiro – 2017

BRUNA LAÍS NASCIMENTO ALVES

**GERMINAÇÃO E VIABILIDADE DE PROPAGAÇÃO POR SEGMENTOS
FOLIARES DE PETÚNIA (*Petúnia x hybrida*)**

Aprovada em:

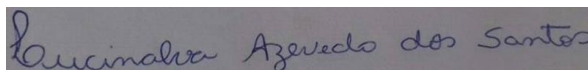
BANCA EXAMINADORA



Profa. Dr.^a. Núbia Pereira da Costa Luna

DCB/CCA-UFPB

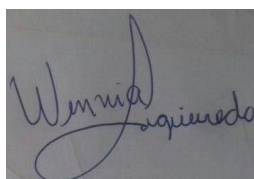
Orientadora



MSc. Lucinalva Azevedo dos Santos

CCA-UFPB

Examinadora



MSc. Wennia Rafaelly Souza Figueiredo

CCA/UFPB

Examinadora

AREIA- PB

Fevereiro - 2017

Dedico aos meus pais Lourivaldo Alves da Silva e Rozimere Nascimento Alves, pelo exemplo, amor e incentivo, que sempre estiveram presentes e obrigada por existirem na minha vida.

AGRADECIMENTOS

A DEUS por me conceder a vida e permitir esta realização.

Aos meus pais Lourivaldo e Rozimere pelo apoio todos os dias da minha vida e pela confiança em mim depositada.

Aos meus irmãos, Rosa Luíza e João Paulo pelo apoio incondicional.

Em especial a minha avó Luíza Fernandes (*in memoriam*) pelo seu cuidado comigo, afeto e dedicação, que me fez aprender o verdadeiro valor da vida, serei eternamente grata. E aos demais familiares por todo carinho e por sempre estarem dispostos a me ajudar.

Aos amigos e colegas de turma adquiridos durante o curso que ficarão para sempre em minha vida, pelos momentos de estudos e descontração. Em especial a Anne Caroline, Gabriela Torres, João Rafael, Marcos Antônio e Anderson Rodrigo, por sempre compartilharem essas ocasiões. E também, aos que fazem o 'MZR's' e 'C14' pelos momentos compartilhados. Lembrando também dos momentos de convivência com Camila Alexandre e Veraylma.

A minha amiga-irmã Patrícia Abraão por todos seus conselhos e ensinamentos, você foi um presente para minha vida.

As companheiras de moradia Maria Amália, Mirelly Porcino e Iolanda Costa, em particular a Anne Caroline pelo companheirismo e ajuda em vários momentos.

A Márcia Paloma pelo carinho e disposição em ajudar neste trabalho.

Desejo expressar um agradecimento especial a minha orientadora Prof^ª Dra. Núbia Pereira da Costa Luna, pela orientação, total disponibilidade, seriedade e ensinamentos. E a minha coorientadora MSc. Lucinalva Azevedo dos Santos sempre prestativa, que com boa vontade e profissionalismo, muito me auxiliou nesta jornada.

A todos que fazem a equipe do Laboratório de Biologia Celular e Cultura de Tecidos (LABCULTIVE), em especial a Sabrina Santos, Otálcio Júnior, Karollayne

Emiliano e Verônica Souza que me acompanharam no decorrer do trabalho. E também, a ajuda do técnico em laboratório Cosmo Ribeiro.

A Associação de Desenvolvimento Sustentável de Macacos e Furnas (ADESMAF), na pessoa de Maria das Dores, pela aquisição das mudas e as sugestões.

Ao Prof^a Walter Esfrain Pereira, Dra. Patrícia da Silva Alexandre e aos colegas de turma Lucildo (Cruz), Roberto Tavares, Aldeir Ronaldo, Mayara Gomes, André Raimundo, David Farias e Victor Hugo pelas essenciais contribuições no decorrer deste trabalho.

Aos professores do Centro de Ciências Agrárias - CCA, especialmente aqueles do curso de Agronomia, pelos ensinamentos eternizados.

E por fim, a todos que, de uma forma ou de outra, me apoiaram e me incentivaram no decorrer destes anos e contribuíram na minha trajetória acadêmica, como também, na realização deste trabalho, meus mais sinceros agradecimentos.

Eu procuro por mim.

Eu procuro por tudo o que é meu e que em mim se esconde.

Eu procuro por um saber que ainda não sei, mas que de alguma forma já sabe em mim.

Eu sou assim...

Processo constante de vir a ser.

O que sou e ainda serei são verbos que se conjugam sob áurea de um mistério
fascinante.

Eu me recebo de Deus e a Ele me devolvo.

Movimento que não termina porque terminar é o mesmo que deixar de ser.

Eu sou o que sou na medida em que me permito ser.

E quando não sou é porque o ser eu não soube escolher.

Pe. Fábio de Melo

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1: Médias de temperatura e umidade relativa do ambiente telado do Departamento de Ciências Biológicas DCB/CCA/UFPB. Areia – PB, 2016. 10
- Tabela 2: Número médio de altura de plantas (AP), número médio de comprimento da maior raiz (CR), número médio do diâmetro do caule (DC), número médio de comprimento de caule (CC) e número médio de folhas (NF) de plântulas de *Petúnia x hybrida*, germinadas *in vit* 12
- Tabela 3: Avaliação do estabelecimento *in vitro* aos 14 dias em estacas foliares de *Petúnia x hybrida*. Areia-PB, 2016. 13
- Tabela 4: Médias de variável número de brotos/calos de *Petúnia x hybrida* aos 14 dias de cultivo *in vitro*, considerando a distribuição negativa binominal, em diferentes concentrações de BAP mg/L⁻¹. Areia-PB, 2016. 13

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Índice de Velocidade de Germinação (IVG) (A) e Porcentagem de Germinação (%) (B). Areia-PB, 2016. 10
- Figura 2: Número de brotos/calos em plântulas de *Petúnia x hybrida* no cultivo in vitro em diferentes concentrações de BAP mg/L -1. Areia-PB, 2016. 14
- Figura 3: Formação de brotos/calos no cultivo in vitro de *Petúnia x hybrida*, nas concentrações de BAP 0,0 mg.L-1 (A), 0,5 mg.L-1 (B), 1,0 mg.L-1 (C) e 1,5 mg.L-1 (D). Areia-PB, 2016. 15

ALVES, Bruna Laís Nascimento. Germinação e viabilidade de propagação por segmentos foliares de petúnia (*Petúnia x hybrida*). 2017. 37f. Monografia (Graduação em Agronomia). Centro de Ciências Agrárias - Universidade Federal da Paraíba. Orientadora: Prof^ª. Dra. Núbia Pereira da Costa Luna.

RESUMO – A *Petúnia x hybrida* é de interesse ornamental da família solanacea, cuja origem é da América do Sul (Brasil, Argentina e Uruguai). As petúnias podem ser propagadas de forma sexuada ou assexuada. Objetivou-se com este trabalho, analisar a germinação e desenvolvimento *in vitro* e *ex vitro*, como também, obter a formação de brotações em explantes foliares de *Petúnia x hybrida*. Os trabalhos *in vitro* (germinação e estaquia foliar) foram conduzidos no Laboratório de Biologia Celular e Cultura de Tecidos e o *ex vitro* (germinação) em ambiente telado do Departamento de Ciências Biológica do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba – PB. Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizados – DIC, sendo que nos experimentos de germinação (*in vitro* em e *ex vitro*) utilizou-se sementes, onde cada semente se constitui uma parcela experimental. No experimento *in vitro* o meio foi reduzido a metade de sais MS Murashige & Skoog (1962) e o *ex vitro* em substrato na proporção de 1:1 de palha de arroz e terra vegetal. Foram realizadas observações diárias, contando-se o número de plântulas emergidas para avaliar o Índice de Velocidade de Germinação (IVG) e Porcentagem de Germinação, aos 14 dias avaliou-se altura de planta, comprimento de maior raiz, diâmetro de caule, comprimento de caule e número de folhas. No experimento de propagação por estaca foliar em BAP (Benzilaminopurina) nas diferentes concentrações de 0,0; 0,5; 1,0 e 1,5 mg/L⁻¹, sendo 4 tratamentos e 30 repetições, totalizando 120 parcelas, contendo três explantes por parcela. Avaliou-se aos sete e quatorze dias a porcentagem de contaminação total dos explantes (%), explantes necrosados (%), explantes viáveis (%) e aos 14 dias foi realizada a contagem das brotações desenvolvidas em cada explante. A semeadura *ex vitro* permitiu uma melhor germinação e desenvolvimento inicial das plântulas de *Petúnia x hybrida*; Explantes foliares de *Petúnia x hybrida* formam brotos/calos na ausência e com 1,5 mg.L⁻¹ de benzilaminopurina; A presença de tricomas, característico de folhas de *Petúnia x hybrida* contribui para a contaminação dos explantes, pois é nessa estrutura onde os microrganismos se alojam.

Palavras-chave: Brotação; Ornamental; Sementes;

ALVES, Bruna Laís Nascimento. Germination and viability of propagation by leaf segments of petunia (*Petunia x hybrida*). 2017. 37f. Monograph (Undergraduate Agronomy). Center for Agricultural Sciences – Federal University of Paraíba. Advisor: Profa. Dra. Núbia Pereira da Costa Luna.

ABSTRACT – The *petunia x hybrida* is of ornamental interest of the solanacea family, whose origin is of South America (Brazil, Argentina and Uruguay). Petunias can be propagated sexually or asexually. The objective of this work was to analyze the germination and development in vitro and ex vitro, as well as to obtain the bud formation in *Petunia X hybrida* leaf explants. The in vitro studies (germination and leaf cutting) were conducted at the Laboratory of Cell Biology and Culture of Tissues and the ex vitro (germination) in the environment of the Department of Biological Sciences of the Center of Agricultural Sciences of the Federal University of Paraíba - PB. The experiments were conducted in a completely randomized design - DIC, and in the germination experiments (in vitro and in vitro) seeds were used, where each seed constitutes an experimental plot. In the in vitro experiment the medium was reduced to half MS salts Murashige & Skoog (1962) and the ex vitro in substrate in the ratio of 1: 1 rice straw and vegetable soil. The number of seedlings emerged to evaluate the Germination Speed Index (IVG) and Percentage of Germination, at 14 days, plant height, root length, stem diameter, leaf length Stem and number of leaves. In the BAP (benzylaminopurine) leaf cutting experiment at different concentrations of 0.0; 0.5; 1.0 and 1.5 mg / L-1, being 4 treatments and 30 repetitions, totalizing 120 plots, containing three explants per plot. The percentage of total contamination of the explants (%), necrotic explants (%), viable explants (%) was evaluated at seven and fourteen days, and the counts of the shoots developed in each explant were counted at 14 days. The ex vitro sowing allowed a better germination and initial development of the *Petunia x hybrida* seedlings; Leaf explants of *Petunia x hybrida* form shoots/calli in the absence and with 1.5 mg.L-1 of benzylaminopurine; The presence of trichomes, characteristic of leaves of *Petunia x hybrida* contributes to the contamination of the explants, because it is in this structure where the microorganisms are housed.

Key words: Budding; Ornamental; Seeds;

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
2.1. Aspectos gerais da espécie.....	2
2.2. Germinação.....	3
2.3. Cultura de tecidos.....	4
2.4. Reguladores de Crescimento.....	5
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	6
3.1. Experimento I: Germinação <i>in vitro</i> de Petúnia.....	7
3.2. Experimento II: Germinação <i>ex vitro</i> de Petúnia.....	8
3.3. Variáveis avaliadas.....	8
3.4. Experimento III: Formação de brotos em estacas foliares.....	9
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	9
4.1. Experimento I e II – Germinação <i>in vitro</i> e <i>ex vitro</i> de Petúnia.....	9
4.2 Experimento III - Formação de brotos em estacas foliares.....	12
5. CONCLUSÕES.....	16
6. REFERÊNCIAS.....	17
7. ANEXOS.....	24

1. INTRODUÇÃO

O mercado mundial de flores e plantas ornamentais está em plena fase de expansão e é uma importante engrenagem na economia brasileira (ANDRADE, 2016). Atualmente, diversos países emergentes têm atuado nesse segmento, como, por exemplo, a Colômbia. No contexto atual, vem ganhando destaque entre os produtos ligados ao agronegócio no Brasil. Isso se deve ao crescimento bastante significativo que ocorreu na última década, quando a floricultura se tornou uma atividade altamente rentável (RESENDE, 2014).

O Instituto Brasileiro de Floricultura- IBRAFLOR (2015) relata que no Brasil existem aproximadamente 8.248 produtores de flores, possuindo um total de 14.992 hectares de área cultivada. Os estados das regiões sudeste e sul apresentam os maiores índices de produção e comercialização (RESENDE, 2014). Segundo Batalha e Buainain (2007), o maior produtor, consumidor e exportador de flores e plantas ornamentais do Brasil é o estado de São Paulo. Dentre as plantas ornamentais o gênero *Petúnia* se destaca com espécies promissoras economicamente. Estão entre as plantas mais populares no mundo devido à sua versatilidade, variedade, e cor da flor (KESSLER, 1998). Elas podem ser propagadas de forma sexuada ou assexuada.

As primeiras petúnias de jardim são consideradas como híbridos interespecíficos entre *P. axillaris* (Lam.) e *P. integrifolia* (Hook.) (PAXTON, 1836). A petúnia (*Petunia x hybrida*) apresenta atributos que favorecem seu uso como sistema modelo secundário, devido à facilidade de crescimento e ao ciclo de vida relativamente curto (cerca de quatro meses da germinação à produção de sementes) e a facilidade de propagação assexual (a partir de estacas ou de calo).

Para Filgueira (2003), a propagação vegetativa ou assexual baseia-se na capacidade, inerente a certas estruturas de algumas espécies, de formar novos indivíduos vegetais, completos e idênticos à planta matriz. Segundo o autor, o motivo principal para este tipo de propagação é a incapacidade de certos indivíduos de produzir sementes botânicas, sendo definidas de plantas anuais aquelas que independem de um intervalo de frio para que passem da etapa vegetativa para a reprodutiva. Descreve ainda, que as espécies perenes, onde se enquadra a petúnia, são plantas de ciclo muito dilatado, que podem ocupar o terreno por um ou mais anos, e que enfrentam condições termoclimáticas decorrentes da passagem de quatro estações.

Na micropropagação *in vitro* os explantes são cultivados assepticamente em meio de cultura, permitindo uma interação controlada entre fatores abióticos e bióticos, que pode dar origem a plantas geneticamente superiores multiplicadas massivamente. Diversos explantes podem ser utilizados para o início de uma propagação *in vitro* de uma planta, entretanto, procura-se selecionar explantes que contenham maior proporção de tecido meristemático ou que tenham maior capacidade de expressar totipotência, tais como gemas apicais, gemas axilares, sementes (TORRES et al., 2000), folhas, câmbio, raiz e pólen (TORRES et al., 1998). Desse modo, objetivou-se com este trabalho, analisar a germinação e desenvolvimento *in vitro* e *ex vitro*, como também, obter a formação de brotações em explantes foliares de *Petúnia x hybrida*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Aspectos gerais da espécie

A família Solanácea L. compreende 2930 espécies distribuídas em 147 gêneros, incluindo espécies de interesse ornamental em gêneros como *Brunfelsia* L. (macana-de-cheiro), *Cestrum* L. (dama da noite), *Datura* L. (trombeteira) e *Petunia* Juss (petúnia), (JUDD; COLS, 2009). O cultivo de *Petunia* para utilização como ornamental foi registrada em 1830 (MADER, 2008). Na década de 1990, os produtores encontraram novos tipos, espalhando petúnias e as alterando significativamente (ANDERSON, 2006), para obtenção de híbridos de interesse ornamental.

Maciel (2001) descreve a petúnia (*Petúnia x hybrida*) como sendo da família solanacea, cuja origem é da América do Sul (Brasil, Argentina e Uruguai). Petúnia (*Petunia hybrida* Hort. Ex Vilm. também apresentada como *P. Hybrida*) é um híbrido de interesse ornamental que tem sido amplamente utilizado, sendo referencia devido à disponibilidade de ferramentas de genética molecular (GERATS; VANDENBUSSCHE, 2005), resultante do cruzamento de *P. axillaris* e *P. integrifolia*, que podem ser artificialmente fertilizadas (WIJSMAN, 1983; ANDO et al., 2001).

Popularmente conhecida como “petúnia-de-jardim” é normalmente cultivada como planta anual em climas temperados, porém sob condições tropicais e subtropicais é mantida como perene, embora, sob estas condições é negativamente afetada pelo calor intenso, pela umidade e pelo ataque de fitopatógenos e insetos. Recomenda-se seu cultivo em floreiras ou canteiros a pleno sol, pois sob condições de sombreamento a

planta apresenta um aspecto estiolado e cores pálidas, tanto das partes vegetativas quanto das flores (BERENSCHOT, 2008).

Morfologicamente, a arquitetura da parte aérea de *Petunia x hybrida* tem o crescimento vegetativo monopodial, com hábito de crescimento contínuo e o desenvolvimento dos ramos reprodutivos ocorrendo por ramificação simpodial, originando um ramo individual constituído de unidades repetitivas chamadas de antoclados, que se desenvolve de uma posição axilar e termina em uma flor única (CHILD, 1979; WEBERLING, 1989).

As petúnias são plantas variáveis com ramos pubescentes e folhas ovaladas, levemente viscosas, anfistomáticas, tricomas presentes uniseriados, de 15-30 cm de altura. Suas flores são grandes, em cores variadas, formadas principalmente na primavera (ARMITAGE, 1994). Segundo Lorenzi (2000), as flores podem apresentar diversas tonalidades, brancas, vermelhas, roxas, listradas, franjadas, entre outras.

2.2. Germinação

Em condições naturais a multiplicação de petúnia é feita basicamente por reprodução sexuada através da formação de sementes. O processo de germinação é um mecanismo dependente da viabilidade das sementes e de condições ambientais favoráveis (BEWLEY; BLACK, 1984; GUI-FERREIRA; BORGHUETTI, 2004).

O processo de germinação de sementes se inicia com a embebição de água pela semente e se completa quando uma parte do embrião, normalmente a radícula, se estende para penetrar as estruturas que o cercam (BEWLEY, 1997). Outro fator importante no processo germinativo é a temperatura, pois afeta na velocidade, quanto o total e a uniformidade de germinação. Na ausência de outro fator limitante, a germinação ocorre dentro de certos limites de temperatura e seus extremos variam conforme a espécie (TOLEDO; MARCOS FILHO, 1977; CARVALHO; NAKAGAWA, 2000). Também há uma necessidade de oxigênio, pois a respiração é muito ativa nas sementes. Em solos em que a aeração é reduzida, a germinação pode ser inibida pela limitação na difusão de oxigênio imposta por estes solos (TOLEDO; MARCOS FILHO, 1977). A luz do ambiente é importante na ocorrência da germinação é detectada pelo fitocromo, um pigmento fotorreceptor. Quando exposto a diferentes comprimentos de onda, o fitocromo se interconverte em duas principais formas: a forma ativa (Pfr) quando este é exposto à luz vermelha, forma esta que induz a germinação e,

quando o fitocromo é exposto à luz vermelho-distante ela se converte em forma inativa (Pr) (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Sua propagação é realizada geralmente por sementes, assim como em *lisianthus* o seu pequeno tamanho de aproximadamente 20.000 sementes por grama obriga uma cuidadosa e vagarosa manipulação (PEREIRA FILHO, 2014), o que dificulta o manuseio na forma de propagação a ser empregada.

A fase de germinação pode ser definida pelo desenvolvimento dos embriões somáticos em plantas de genótipo idêntico ao do explante que lhes deu origem, capazes de se desenvolverem e crescerem *ex vitro*, tendo já uma raiz, uma gema apical e os órgãos formados (NAWROT-CHORABIK, 2012).

A germinação de sementes *in vitro* pode ser uma alternativa para a obtenção de explantes livres de infestações para serem utilizados no processo de micropropagação. E quando comparada à germinação em condições naturais apresenta como vantagens: evitar problemas de aborto embrionário, reduzir o tempo necessário à ocorrência do processo, aumentar a taxa de germinação, além de sincronizá-la (ENCINA; PADILLA, 1996).

2.3. Cultura de tecidos

A cultura de tecidos, células ou órgãos excisados de plantas é caracterizado por ser conduzida em condições assépticas, desenvolvidas em meio nutritivo, e mantidas em sala de crescimento com controle de luminosidade, fotoperíodo e temperatura. Alguns termos técnicos como cultivo *in vitro* e micropropagação são comumente usados como sinônimo de cultura de tecidos (TORRES et al., 2001). Explantes são segmentos excisado de tecidos vegetais, com o objetivo de regenerar uma nova planta em meio de cultura, idêntico a planta mãe.

Ao se propor um determinado meio de cultura para a propagação de uma espécie há que se considerem diversos fatores. Dentre estes fatores destacam-se, pela sua importância, os nutrientes minerais e os reguladores vegetais que compõe o meio de cultura, e estes por sua vez, em associação com os outros fatores, como o estado físico do meio, vão interferir de forma efetiva para o estabelecimento da cultura, ou seja, vão agir diretamente na propagação da espécie (FORTES; PEREIRA, 2001).

O carvão ativado muito utilizado no meio de cultivo se trata de um pó bem fino e de cor escura usada para eliminar substâncias tóxicas produzidas pelo explante além de promover o escurecimento do meio de cultura (GUERRA; NODARI, 2006) e a capacidade de adsorver substâncias secretadas pelo explante ou presentes no meio de cultura, que podem inibir o crescimento (HARTMANN et al., 2002).

O sistema padrão de micropropagação, segundo Grattapaglia e Machado (1998), baseia-se em três estágios: a seleção dos explantes, a desinfestação e a cultura em meio nutritivo sob condições assépticas; a multiplicação dos propágulos sob sucessivas subculturas em meio adequado; a transferência dos explantes para meio de enraizamento e subsequente aclimatização.

No cultivo *in vitro* é comum ocorrerem perdas expressivas devido à contaminação por microrganismos, ou quando a assepsia é difícil de ser executada, devido às características do explante, com isso é necessária cautela no processo de assepsia, visto que este é um aspecto que otimiza e justifica essa técnica, no sentido de se obter um maior número de plantas livre de doenças e patógenos. Na fase de estabelecimento do cultivo, a contaminação pode comprometer o trabalho de micropropagação (PEREIRA, 2011). Para minimizar a contaminação microbiana inúmeros protocolos de esterilização são apresentados por diversos autores, quais sejam, o uso de substâncias como hipoclorito de sódio (PEREIRA et al, 2009) e, em alguns casos, a adição de antibióticos ao meio de cultura (PEREIRA et al, 2011). O hipoclorito de sódio é geralmente o agente mais utilizado no processo de descontaminação dos explantes, embora a sua concentração e tempo de exposição dos propágulos à solução possa danificar seus tecidos, de maneira que torne inviável o desenvolvimento dos explantes.

2.4. Reguladores de Crescimento

Os reguladores de crescimento na forma natural ou indutiva quando aplicados em plantas influenciam no seu crescimento e desenvolvimento, diferentemente dos hormônios vegetais que proporciona os mesmos efeitos, mas, apenas na forma natural.

Os meios nutritivos utilizados na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas tem por finalidade disponibilizar as substâncias necessárias ao crescimento e influenciam o desenvolvimento *in vitro*. Normalmente é utilizado o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962). Para Caldas et al. (1998), a presença de reguladores

vegetais no meio de cultura bem como sua composição e concentração tem papel fundamental no crescimento e no padrão de desenvolvimento na maioria dos sistemas de micropropagação.

O uso de 6-benzilaminopurina (BAP) tem se mostrado eficaz no processo de multiplicação tanto de estruturas aéreas como na indução de gemas adventícias em diversas espécies (HU; WANG, 1983). Para multiplicação em meio de cultura, em geral, suas concentrações variam de 0,1 a 5 mgL⁻¹ (TOMBOLATO; COSTA, 1998). O enraizamento e a formação de brotos/calos são influenciados pelo meio de cultivo, concentrações e auxina que variam conforme a espécie.

3. MATERIAL E MÉTODOS

No período de novembro a dezembro de 2016, os experimentos *in vitro* foram conduzidos no Laboratório de Biologia Celular e Cultura de Tecidos (LABCULTIVE) e o *ex vitro* em ambiente telado com cobertura de plástico branco leitoso (150 µm), pertencentes ao Departamento de Ciências Biológicas, do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba (DCB- CCA - UFPB), Areia- PB.

Foram obtidas matrizes de petúnia na Associação de Desenvolvimento Sustentável de Macacos e Furnas (ADESMAF) do mesmo município e, posteriormente, transportadas em caixas ao laboratório. As mudas foram transplantadas em canteiro, utilizou-se terra vegetal e esterco como fonte de substrato. Após o desenvolvimento fez-se a coleta de cápsulas e explantes.

As cápsulas foram colhidas das plantas antes da antese e utilizadas para a semeadura *in vitro* e *ex vitro*. A porcentagem de germinação foi dada pela fórmula proposta nas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992):

$$G=NG * 100/NT$$

Onde: G = porcentagem de germinação

NG = número de sementes germinadas

NT = número de sementes postas para germinar.

O índice de velocidade de germinação é determinado após o número de dias transcorridos após a semeadura, avaliando-se o número de plântulas. A determinação foi conduzida conforme a expressão matemática de Maguire (1962):

$$IVG = G1 / N1 + G2 / N2 + G3 / N3 + \dots + Gn / Nn$$

Onde: G1, G2, G3, ... , Gn = número de sementes germinadas no dia da observação.

N1, N2, N3 ,..., Nn = número de dias após a semeadura.

Considerou-se a média dos resultados obtidos para cálculo da porcentagem de germinação e IVG. Não existiu necessidade de transformação dos dados originais para atender aos pressupostos da ANOVA.

3.1. Experimento I: Germinação *in vitro* de Petúnia

Foram utilizadas sementes de Petúnia, que sequencialmente o protocolo de desinfestação adotado foi a lavagem das cápsulas em imersão no álcool 70% durante 30 segundos, e em seguida a imersão em solução de hipoclorito comercial (NaOCl 2%) a 20% (v/v) submetido a agitação contínua durante 20 minutos. Depois, levadas para a câmara de fluxo laminar e lavadas por três vezes seguidas com água destilada autoclavada. Logo após, as cápsulas foram abertas com auxílio de bisturi e as sementes inoculadas em potes de vidro com capacidade de 250 mL com tampas de BIO SAMA[®] PP - 74 contendo 30 mL do meio de cultura.

O meio de cultura utilizado foi o meio Murashige e Skoog (1962), com redução de 50% da concentração dos sais, suplementados com 20,0 mg.L⁻¹ de sacarose, solidificados com 7g.L⁻¹ de Ágar e com presença de 1g.L⁻¹ carvão ativado. O pH foi ajustado para 5,8 e em seguida autoclavado a 120 °C e à pressão de 1 atm por 20 minutos.

Após a inoculação das sementes os potes foram vedados com filme policloreto de polivinila – PVC, mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16/8 horas sob intensidade luminosa artificial de 35 µmol/m/s, à temperatura de média 25 °C ± 2°C, mantida em ar-condicionado.

Foram realizadas observações diárias após a instalação do experimento, contando-se o número de plântulas emergidas por dia, até que esse número fosse

constante, observando-se a germinação com a protusão das radículas. Para o cálculo do IVG (Índice de Velocidade de Germinação), foi realizada a contagem diária, do número de sementes germinadas até que estacionasse, sendo calculado pela fórmula de Maguire (1962), e os resultados expressos em porcentagem.

Para o experimento utilizou-se 70 sementes. O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado, onde cada semente se constitui uma parcela experimental.

3.2. Experimento II: Germinação *ex vitro* de Petúnia

Foram utilizadas 70 sementes distribuídas, em sacos plásticos de polietileno (12 x 10 cm) próprios para mudas, contendo como substrato na proporção de 1:1 de palha de arroz e terra vegetal. Os substratos a 120 °C e à pressão de 1 atm por 20 minutos. Foram postos em ambiente telado com cobertura plástica de 150 µm branco leitoso, sob luz natural e temperatura controlada por termômetro de bulbo seco e úmido, com também a umidade relativa do ar (UR%).

A avaliação foi diária de índice de velocidade de germinação (IVG), sendo consideradas germinadas as que apresentavam protrusão da radícula por dia até a estabilização e calculado pela fórmula matemática proposta por Maguire (1962). O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado, com uma semente em cada saco plástico, compondo uma parcela.

3.3. Variáveis avaliadas

As variáveis analisadas para os Experimentos I e II foram: comprimento de maior raiz (cm), diâmetro do caule (mm), altura de planta (cm), comprimento de caule (cm) e número de folhas de plântulas, com auxílio de régua milimétrica e paquímetro digital. O programa estatístico utilizado foi o Software Statistical Analysis System (SAS[®]) e as médias dos fatores estudados foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

3.4. Experimento III: Formação de brotos em estacas foliares

Foram coletadas folhas da parte mediana da planta, como fonte de explantes. Estas foram lavadas em água corrente e retiradas o excesso de umidade em papel toalha. O protocolo de desinfestação adotado foi à lavagem dos ramos em água corrente e excisão dos explantes, onde foram imersos em álcool 70% durante 30 segundos e em solução de hipoclorito (NaOCl 2%), a 20% (v/v) submetido a agitação contínua durante 10 minutos. Em seguida os explantes foram lavados em três vezes seguidas com água destilada autoclavada, cortadas em segmentos de aproximadamente um cm², inoculados em pote de vidro contendo 30 ml de meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), com 7g.L⁻¹ de Agar, presença de 2g.L⁻¹ carvão ativado, acrescidos de diferentes concentrações de BAP (Benzilaminopurina) nas concentrações de 0,0; 0,5; 1,0 e 1,5 mg/L⁻¹. Sendo vedados com filme policloreto de polivinila - PVC e mantidos em sala de crescimento com controle de temperatura em luz artificial 35 micro mol/m²/s, temperatura média de 25°C ± 2°C e fotoperíodo 16 horas de luz controlada.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com 4 tratamentos e 30 repetições, totalizando 120 parcelas, contendo três explantes por parcela.

As observações foram realizadas aos sete e quatorze dias para contaminação total dos explantes (%), explantes necrosados (%), explantes viáveis (%) e aos 14 dias foi realizada a contagem das brotações desenvolvidas em cada explante. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e foram submetidos à análise de regressão polinomial, no programa estatístico Software Statistical Analysis System (SAS[®]).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Experimento I e II – Germinação *in vitro* e *ex vitro* de Petúnia

As condições de temperatura e umidade relativa para o período do experimento *ex vitro*, em ambiente telado, pode ser observada (Tabela 1).

Tabela 1: Médias de temperatura e umidade relativa do ambiente telado do Departamento de Ciências Biológicas DCB/CCA/UFPB. Areia – PB, 2016.

Mês	°C	UR (%)
Novembro	25,8	69,5
Dezembro	25,4	67

Verificou-se, que nos meses de novembro e dezembro não houve diferença significativa para as variáveis: temperatura média e a umidade relativa.

Após cinco dias de semeadura as primeiras plântulas emergiram na condição *in vitro*, com a germinação até o décimo dia. Os maiores percentuais de emergência ocorreram aos cinco dias após a semeadura para o experimento *ex vitro*, com algumas sementes de germinação mais tardia aos 14 dias. Que corroboram com as Regras de Análise de Sementes – RAS (2009) em que a primeira contagem e início de germinação é dada a partir do quinto até o 14° dia. No geral, o desenvolvimento inicial de plântulas *in vitro* é mais lento que *ex vitro*.

Os maiores valores para o índice de velocidade de germinação (IVG) e % de germinação ocorreu para a semeadura *ex vitro* (Figura 1). Segundo Ferreira et al. (2001) as sementes de petúnia podem ser classificadas quanto ao tempo de germinação como intermediárias (tempo médio de cinco a dez dias), pois o tempo médio de germinação foi de 5 dias/sementes.

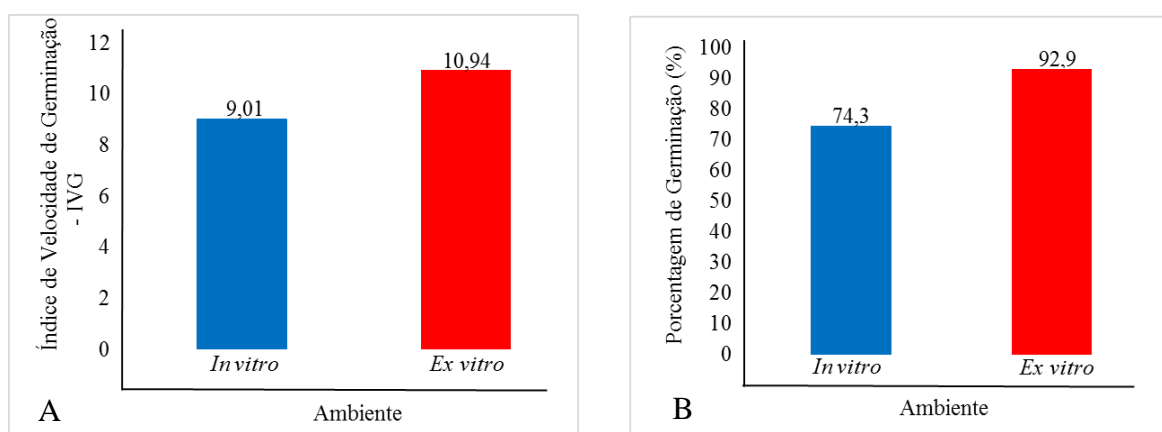


Figura 1: Índice de Velocidade de Germinação (IVG) (A) e Porcentagem de Germinação (%) (B). Areia-PB, 2016.

Analisando-se os valores de germinação para os diferentes ambientes, pode-se observar que houve diferença estatística, entre as porcentagens de sementes de petúnia germinadas nos substratos terra vegetal + palha de arroz e meio MS ½. A porcentagem de germinação foi maior na condição *ex vitro*, chegando a 92,9%, onde o valor foi superior ao estabelecido pelo padrão nacional de germinação de sementes de tomate que equivale a 70%, também solanacea (CASTELLANE et al., 1990). Xavier (2010) obteve valor semelhante na germinação de *Hamatocactus setispinus* (74%), no cultivo em meio MS ½ e com presença de carvão ativado.

O maior Índice velocidade de germinação (10,94) foi observado no ambiente *ex vitro*, onde Vieira e Krzyzanowsky (1999), alegaram que para variável IVG quanto maior o valor apresentado, maior é capacidade das sementes expressarem seu potencial germinativo.

A porcentagem de germinação das sementes também pode ser afetada por mudanças fisiológicas, morfológicas e funcionais que ocorrem durante o processo de desenvolvimento da semente, que é interrompido quando a planta cessa o fornecimento de assimilados para as sementes, conhecido como maturidade fisiológica (LOPES et al., 2005), Durante o cultivo *in vitro*, as soluções de sais e açúcares que compõem os meio de cultura, influenciam o crescimento celular e a morfogênese por meio de propriedades osmóticas (GEORGE, 1996).

Estudos realizados na condição *ex vitro*, independentemente da espécie, revelam que o suprimento adequado em água, composição de gases, temperatura convenientes são requisitos fundamentais para a germinação (TOLEDO; MARCOS FILHO, 1977; MAYER; POLJAKOFF-MAYBER, 1982; BEWLEY, 1984; BORGES; RENA, 1993).

Tais constatações para Torres (1999), provavelmente, se devam ao fato de que a semente já possua em sua reserva nutritiva um teor de sacarose que lhe permita a emergência da plúmula e da radícula, com a adição de sacarose no meio extracelular pode ter provocado uma maior perda de água devido à pressão osmótica exercida sobre a semente.

Observa-se que, as variáveis altura de planta (AP) e número de folha (NF) diferiram estatisticamente, onde a AP e NF tiveram maiores valores médios no ambiente *ex vitro* (Tabela 2).

Tabela 2: Número médio de altura de plantas (AP), número médio de comprimento da maior raiz (CR), número médio do diâmetro do caule (DC), número médio de comprimento de caule (CC) e número médio de folhas (NF) de plântulas de *Petúnia x hybrida*, germinadas *in vitro*

Local	AP (cm)	CR (cm)	DC (cm)	CC (cm)	NF (n°)
<i>In vitro</i>	0,70 b	0,48 a	0,04 a	2,22 a	2,66 b
<i>Ex vitro</i>	1,32 a	0,40 a	0,04 a	0,91 a	4,07 a

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Esses valores divergem de outros estudos para altura de planta (PASQUAL et al., 2001; THOMAS, 2008) onde a adição de carvão ativado no meio de cultura influencia na diferença de altura média das plântulas devido à adsorção de substâncias inibitórias do meio ou à adsorção de produtos tóxicos liberados pelos explantes, pela manutenção do pH em valor ótimo para morfogênese e liberação de substâncias naturalmente presentes no carvão que poderiam promover o crescimento. As variáveis de porcentagem de comprimento de raiz, diâmetro de caule e comprimentos de caule não apresentaram significância estatística.

4.2 Experimento III - Formação de brotos em estacas foliares

Bezerra et al. (2014), constataram maiores índices de contaminação com a adição de de BAP em explantes de *M. caesalpinifolia*. Nesse sentido, possivelmente, concentrações elevadas de hormônio vegetal tenham apresentado efeito tóxico, afetando a multiplicação, desenvolvimento do explante e, assim contribuído para sua deterioração ou necrose, favorecendo o surgimento de microrganismos endógenos.

Apesar do número médio total de contaminação e necrose, observou-se aos 14 dias ainda um adequado percentual de estacas viáveis (75%) (Tabela 3). Provavelmente, para essa espécie, a adição de BAP nas concentrações utilizadas favoreceu a sobrevivência de estacas, em razão de essa citocinina participar do retardamento da senescência de tecidos e órgão vegetais, portanto, aumentando a longevidade celular. Resultado idêntico ocorreu em Morgante e Lombardi (2004), que ao estudarem as concentrações de 0 a 4,0 mg.L⁻¹ de BAP no cultivo *in vitro* de hortelã-pimenta (*Mentha*

x *Piperita* L.), constataram ainda, aumento na porcentagem de sobrevivência dos explantes ao elevarem a dose desse fitorregulador.

Tabela 3: Avaliação do estabelecimento in vitro aos 14 dias em estacas foliares de *Petúnia x hybrida*. Areia-PB, 2016.

Contaminação (%)	Necrose (%)	Estacas viáveis (%)
12,5	12,5	75%

O processo de indução de brotos/calos teve início na primeira semana de cultivo, contendo células meristemáticas conhecidas como células-tronco (totipotentes) capazes de se diferenciar em outros tipos celulares (TAIZ; ZEIGER, 2004). Verificou-se maior número de brotos/calos no tratamento testemunha e em BAP na concentração de 1,5 mg/L⁻¹ (Tabela 4).

Tabela 4: Médias de variável número de brotos/calos de *Petúnia x hybrida* aos 14 dias de cultivo in vitro, considerando a distribuição negativa binomial, em diferentes concentrações de BAP mg/L⁻¹. Areia-PB, 2016.

Concentrações	0	0,5	1,0	1,5
Número de Brotos/Calos	1,33	0,16	0,56	1,53

Observou-se a formação de brotações em todos os tratamentos testados. Os tratamentos com as concentrações de 0,5 ou 1,0 mg.L⁻¹ de BAP proporcionaram baixo índice de multiplicação dos explantes. De tal modo, que o uso de fitorreguladores no meio de cultura, nas diferentes concentrações de BAP mg/L⁻¹, não se mostrou eficiente para a indução de brotações em petúnia, visto que o segundo maior número de brotos foi obtido em meio de cultivo sem reguladores de crescimento vegetal. No tratamento sem BAP, o número médio de brotos foi de 1,3. Reis (2011), em estudo semelhante com mangabeira constataram o menor número de brotações na ausência de BAP (1,2 brotos) e na máxima concentração utilizada (1,46 brotos).

O efeito quadrático foi observado para o número de brotos, no entanto foi maior nas plantas provenientes do meio com ausência de BAP e na concentração foi 1,5 mg/L⁻¹, verifica-se (Figura 2), que não difere estatisticamente da testemunha. No

tratamento sem BAP, a porcentagem de brotação foi de 50%, valor inferior na mesma condição para Oliveira et al. (2016) que foi de 80% enquanto que, na concentração de $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ foi de 70%.

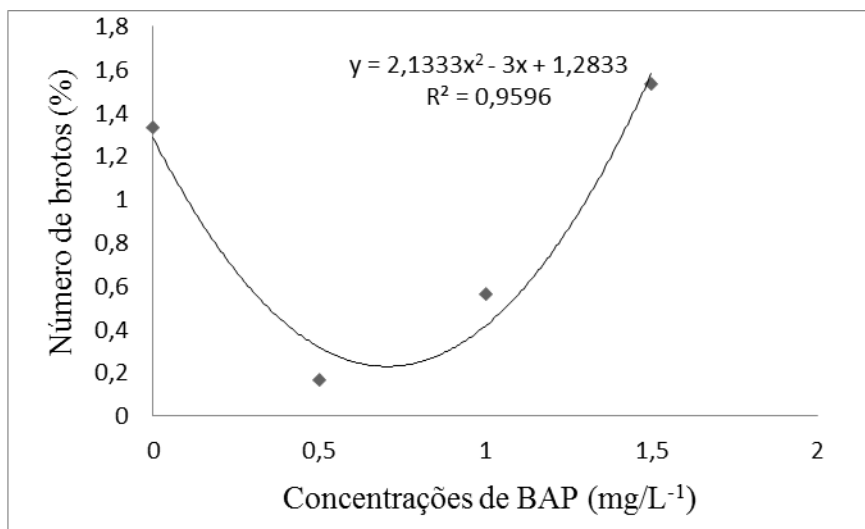


Figura 2: Número de brotos/calos em plântulas de *Petúnia x hybrida* no cultivo *in vitro* em diferentes concentrações de BAP mg L^{-1} . Areia-PB, 2016.

O número elevado de brotações por explante foi obtido com uso de TDZ (Tidiazuron), de acordo (THIRUKKUMARAN et al., 2009) que obtiveram uma máximo frequência de regeneração dos rebentos (52,1%) com explantes de petúnia.

Foi possível observar, um decréscimo na taxa de brotação conforme a adição das concentrações desses reguladores de crescimento e depois um aumento. Portanto, teve uma grande emissão de brotos na testemunha, uma redução em $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ e com o aumento de concentrações, um crescente surgimento de brotações, que também ocorreu nos experimentos de propagação *in vitro* com a indução de brotações em explantes nodais de mangabeira, sobre o efeito de diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) e ácido naftalenoacético (ANA), realizados por Oliveira et al. (2016).

Observa-se (Figura 3), pontos que se expandem e recobrem a superfície dos explantes. Percebe-se ainda, que para indução de brotações as melhores concentrações estão na ausência de fitorregulador e em BAP $1,5 \text{ mg L}^{-1}$.

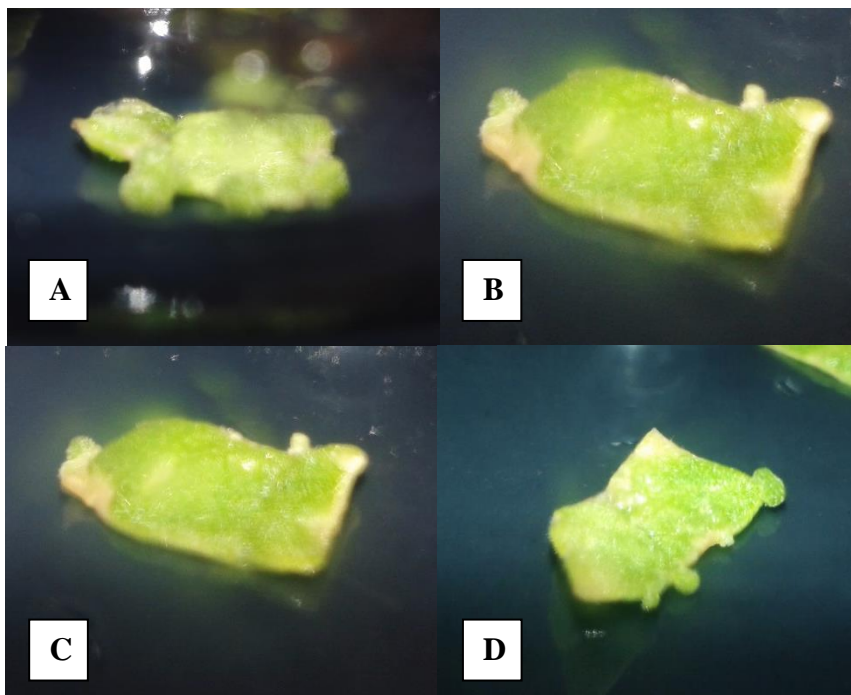


Figura 3: Formação de brotos/calos no cultivo in vitro de *Petúnia x hybrida*, nas concentrações de BAP 0,0 mg L⁻¹ (A), 0,5 mg L⁻¹ (B), 1,0 mg L⁻¹ (C) e 1,5 mg L⁻¹ (D). Areia-PB, 2016.

O comportamento observado evidencia que possivelmente não há necessidade de uma fonte exógena de citocinina para estimular a divisão celular e consequente formação de brotos, devido à existência de concentrações endógenas de citocinina suficientes para a indução de brotos (FERMINO JUNIOR; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2012).

Embora a adição de uma fonte de citocinina (BAP) seja imprescindível no meio nutritivo para a formação de brotações (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998), o aumento na concentração de BAP nem sempre resulta no maior número de brotações, pois, Teixeira et al. (2004) avaliando o efeito das concentrações de BAP (0; 0,5; 1,0; 2,0; e 4,0 mg L⁻¹) na multiplicação do porta-enxerto de *Prunus* cv. Carelli, observaram que não houve diferença no número de brotações por explante entre as concentrações de 0,5 e 4 mg L⁻¹ de BAP com média de brotações por explantes de 3,3 e 3,4 respectivamente. As variáveis de porcentagem de contaminação, necrose e taxa de sobrevivência não possuem estatística significativa.

5. CONCLUSÕES

- A semeadura *ex vitro* permitiu uma melhor germinação e desenvolvimento inicial das plântulas de *Petúnia x hybrida*;
- Explantes foliares de *Petúnia x hybrida* formam brotos/calos na ausência e com $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ de benzilaminopurina;
- A presença de tricomas, característico de folhas de *Petúnia x hybrida* contribui para a contaminação dos explantes, pois é nessa estrutura onde os microorganismos se alojam.

6. REFERÊNCIAS

ANDERSON, R. P. **Hort Fact Cooperative Extension service**, 2006.

ANDO, T. et al. Reproductive isolation in a native population of *Petunia* sensu Jussieu (Solanaceae). **Annals of Botany**, 88(3):403, 2001.

ANDRADE. P. F. S. **Floricultura**. Disponível em: <http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/2016/flores_2015_16.pdf>. Acesso em: 30 de agosto de 2016.

ARMITAGE, A. M. Ornamental beddingplants. Wallingford: **CAB International**, 1994. 175 p.

BATALHA, M. O.; BUAINAIN, A. M. Cadeias produtivas de flores e mel. Brasília: IICA: **MAPA/SPA**, n. 2, 2007. 56 p.

BERENSCHOT, A. S. **Mutagênese visando à aplicação da genética reversa em Petúnia** (*Petunia x hybrida*). Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical), Instituto Agronômico, Campinas, 2008.

BEWLEY, J. D. Seed germination and dormancy. **Plant Cell**, v. 9, p.1055-1066, 1997.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2nd ed. New York: Plenum, 1984, 445 p.

BEZERRA, R. M. de F. et al. Efeito de 6- benzilaminopurina sobre a propagação in vitro de *Mimosa caesalpinifolia* Benth. (Fabaceae). **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v. 38, n. 5, p. 771-778, 2014.

BORGES, C.; RENA, A. B. Germinação de sementes. In: AGUIAR, I. B.; PIÑA-RODRIGUES, F. C. M.; FIGLIOLIA, M. B. (Coord.) **Sementes florestais tropicais**. Brasília: Associação Brasileira de Tecnologia de Sementes, 1993. p.88-135.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Regras para análise de sementes**. Brasília, DF: Secretaria Nacional de Defesa da Agropecuária, 1992. 365 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília, DF: Secretaria Nacional de Defesa da Agropecuária, 2009. 399 p.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.) **Cultura de tecidos e transformação genética plantas**. Brasília, DF: EMBRAPA/CNPH, 1998. v. 1, p. 87-132.

CARVALHO, N. M., NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4. ed. Jaboticabal: Funep, 588p, 2000.

CASTELLANE, P. D.; NICOLOSI, W. M.; HASEGAWA, M. **Produção de sementes de hortaliças**. Jaboticabal, FCAV/FUNEP, 1990. 261 p.

CHILD, A. A review of branching patterns in the Solanaceae. In: Hawkes, J.G.; Lester, R.N.; Skelding, A.D. (eds.). *The biology and taxonomy of the Solanaceae*. London, Academic Press, p.345-356, 1979.

ENCINA, C. L., PADILLA, I. G. **A propósito de semillas**. 1996. Disponível em: <<http://www.ciencias.uma.es/publicaciones/encuentros/ENCUENTROS33/semilla33.html>>. Acesso em 20 de outubro de 2016.

FERMINO JUNIOR, P. C. P.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Germinação e propagação *in vitro* de cerejeira (*Amburana acreana* (Ducke) A. C. Smith - Fabaceae). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 22, n. 1, p. 1-9, 2012.

FERREIRA, A. G. et al. GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE ASTERACEAE NATIVAS NO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL. **Acta Botânica Brasilica**. vol.15, n.2, São Paulo. 2001.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo Manual de Olericultura**. Viçosa: UFV, 2003.

FORTES, G. R. L.; PEREIRA, J. E. S. Estabelecimento in vitro da ameixeira cv. América. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 23, n.1, p.183-185, 2001.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: part 1: the technology**. Edington: Exegetics, 1996. 574 p.

GERATS, T.; VANDENBUSSCHE, M. A model system for comparative research: Petunia. **Trends in Plant Science**, v.10, n.5. p.251-256, 2005.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: EMBRAPA, p. 99-169, 1998.

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

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. **Introdução ao conceito da biotecnologia**. CCA/UFSC, Florianópolis, 2006, 40p.

GUI-FERREIRA, A.; BORGUETTI, F. (Ed.) **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. 324 p.

HARTMANN, H. T. et al. Plant propagation: principles and practices. **Prentice-Hall/Englewood Cliffs**, New Jersey. 7th ed. Upper saddle River: Prentice Hall. 2002.

HU, C. Y., WANG, P. J. Meristem, shoot tip and bud culture, In: EVANS, D.A., SHARP, W.R., et al. **Handbook of plant cell cultures**, New York: Macmillan, 1983. v.1, p. 177-227.

IBRAFLOR. **Instituto Brasileiro de Floricultura**. 2015. Disponível em: <<http://www.ibraflor.com/>>. Acesso em: 20 de agosto de 2016.

JUDD, W. S. et al. **Sistemática vegetal: um enfoque filogenético**. 6ª edição. Editora Artmed, Porto Alegre, 632 pp. 2009.

KESSLER, J. R. Greenhouse production of Petunias. **Extension Horticulturist**. ALABAMA A & M AND AUBURN UNIVERSITIES, ANR-1118. New June, 1998.

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

LORENZI, H.; SOUZA, H. M. **Plantas ornamentais no Brasil**. Nova Odessa, SP: Plantarum, 2000.

MACIEL, M. G. F. Decorações e plantas-Petúnia. **Planeta Agostini**, [S.I.], 11 mar. 2001. Disponível em: <<http://www.botany.com>>. Acesso em: 10 de agosto de 2016.

MÄDER, G. **Filogenia e Variabilidade Genética de Calibrachoa heterophylla (Sendtn.) Wijsman (Solanaceae)**. 2008. 86 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

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

MAYER, A. M.; POLJAKOFF-MAYBER, A. **The germination of seeds**. 3. ed. New York: Pergamon, 1982. 211p.

MORAIS, T. P.; ASMAR, S. A.; LUZ, J. M. Q. Reguladores de crescimento vegetal no cultivo in vitro de Mentha x Piperita L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v. 16, n. 2, supl. I, p. 350-355, 2014.

MORGANTE, C. V.; LOMBARDI, S. P. **Hormônios vegetais e biotecnologia**. Piracicaba: Esalq, 2004. 13 p.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid grow and biossays with tobacco tissues cultures. **Physiologia Plantarum**. Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.

NAWROT-CHORABIK, K. Somatic embryogenesis in forest plants. Ken-ichi Sato (ed.) Embryogenesis, Rijeka: **InTech 20**: 423-446. (2011). Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/embryogenesis/somatic-embryogenesis-in-woody-plants>>. Disponível em: 02 de dezembro de 2016.

OLIVEIRA, K, S. FREIRE, F. A. M; ALOUFA, M. A. I. Efeito de 6-benzilaminopurina e ácido naftalenoacético sobre a propagação *in vitro* de *Hancornia speciosa* Gomes. **FLORESTA**, Curitiba, PR, v. 46, n. 3, p. 335 - 342, jul. / set. 2016.

PASQUAL, M.; RAMOS, J. D.; DUTRA, L.F. (2001). **Aplicações no melhoramento genético de plantas**. Dissertação (Mestrado em Genética). Universidade Federal de Lavras, Lavras. 79p.

PAXTON, J. *Petunia nyctaginiflora violacea*. **Paxton's Magazine Botanic Flowers and Plants**. n.2, p.173, 1836.

PEREIRA FILHO, T. B. **Propagação e Micropropagação de Lisianthus (*Eustoma grandiflorum* SHINN)**. Monografia (Graduação em Agronomia). Centro de Ciências Agrárias - Universidade Federal da Paraíba. Areia – PB, 2014. 34f.

PEREIRA, G. A. et al. Desinfestação e estabelecimento *in vitro* de explantes de bananeira 'IAC 2001' em diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v. 3, n. 2, p. 43-46, 2009.

PEREIRA, G. A; CORREA, L. S; BOLIANI, A. C. Desinfestação e estabelecimento *in vitro* de explantes de bananeira 'Grande naine' em diferentes concentrações de hipoclorito de sódio, **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal - SP, Volume Especial, E. 222-226, Outubro 2011.

REIS, L. L. dos. **Propagação de *Hancornia speciosa* Gomes – Apocynaceae, por alporquia e micropropagação.** 105 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista, Ilha Solteira, 2011.

RESENDE, W. T, TOLEDO, M. Especialização regional produtiva em Barbacena (MG) e municípios vizinhos: o cultivo das rosas. **Caderno de Geografia**, v.24, ISSN 2318-2962 número especial (1), 2014.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal.** Porto Alegre: Artmed, 719p, 2004.

TEIXEIRA, P. T. et al. Multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de *Prunus* spp. Carelli . **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal. v. 26, n. 2, p. 377-379, 2004.

THIRUKKUMARAN G, NTUI VO, SHERKHAN R, MII M. Thidiazuron: an efficient plant growth regulator for enhancing *Agrobacterium*-mediated transformation in *Petunia hybrid*. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, 99(1): 109-115, 2009.

THOMAS, T. D. The role of activated charcoal in plant tissue culture. **Biotechnology Advances**, 26:618-631, 2008.

TOLEDO, F. F., MARCOS FILHO, J. **Manual das Sementes:** Tecnologia da Produção. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 224 p, 1977.

TOMBOLATO, A. F. C.; COSTA, A. M. M. Micropropagação de plantas ornamentais. **Boletim Técnico do Instituto Agronômico**, Campinas, n. 174, p. 58-62, maio 1998.

TORRES, A. C. et al. **Glossário de Biotecnologia vegetal.** Brasília: Embrapa Hortaliças. 2000.

TORRES, A. C. et al. Meio e condições de incubação para cultura de tecidos de plantas. Embrapa Hortaliças, Brasília, DF, n. 24, 2001. 20 p. (**Circular Técnica**).

TORRES, A. C. - **Curso Teórico e Prático de Cultura de Tecidos e Biologia Molecular**. Departamento de Botânica, Ecologia e Zoologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, 1999.

TORRES, A. C.; TEIXEIRA, S. L.; POZZER, L. Cultura de ápices caulinares e recuperação de plantas livres de vírus. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa, 1998, 133-145.

VIEIRA, R. D.; KRZYZANOWSKI, F. C. Teste de condutividade elétrica. In: Krzyzanowski, F.C.; Vieira, R.D.; França Neto, J.B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Brasília: Abrates, 1999. Cap. 4, p. 1-26.

WEBERLING, F. Morphology of flowers and inflorescences. New York: Cambridge Univeristy Press. 405 p., 1989.

WIJSMAN, H. (1983). On the interrelationships of certain species of *Petunia*: 2. **Experimental data**: crosses between different taxa. *Acta Botanica Neerlandica*, 32(1/2):97-107.

XAVIER, P. B. **Germinação e aclimatização de *Hamatocactus setispinus* (Cactaceae)**. 2010. 107f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal). Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2010.

7. ANEXOS

Tabela 1 - Estrutura da análise de variância para a avaliação de diferentes concentrações de BAP mg.L⁻¹, em estacas foliares de *Petúnia x hybrida*. Areia-PB, 2016.

F.V.⁽¹⁾	G.L.⁽²⁾	F
BAP	(3)	0,68
L	1	0,98 ^{ns}
Q	1	0,98 ^{ns}
Falta de ajuste	1	0,98 ^{ns}

(1) Fonte de variação; (2) Graus de liberdade; ns: não significativa.

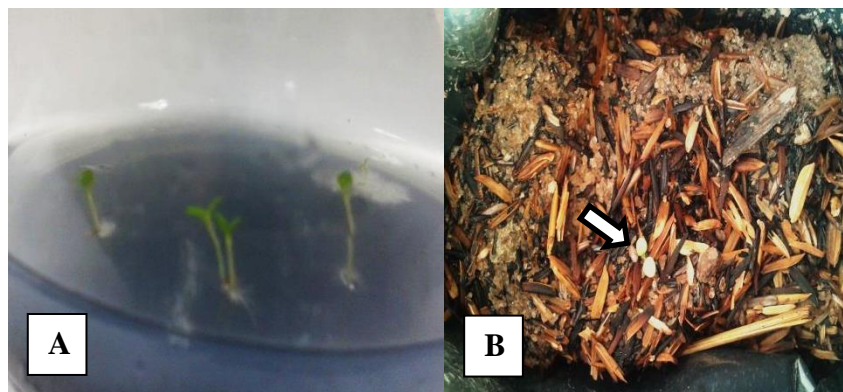


Figura 1: Germinação *in vitro* (A) e germinação *ex vitro*, de plântulas de *Petúnia x hybrida* cinco dias após a sementeira. Areia-PB, 2016.