



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

PROPAGAÇÃO E MICROPROPAGAÇÃO DE LISIANTHUS

(Eustoma grandiflorum SHINN)

TARCISO BOTELHO PEREIRA FILHO

AREIA - PB
Fevereiro - 2014

TARCISO BOTELHO PEREIRA FILHO

PROPAGAÇÃO E MICROPROPAGAÇÃO DE LISIANTHUS

(Eustoma grandiflorum SHINN)

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação em Agronomia apresentado a Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências Agrárias, Campus II, Areia - PB, como parte das exigências para obtenção do título de Engenheiro Agrônomo.

Orientadora: Prof^a. Dra. Núbia Pereira da Costa

AREIA - PB

Fevereiro - 2014

Tarciso Botelho Pereira Filho

PROPAGAÇÃO E MICROPROPAGAÇÃO DE LISIANTHUS

(Eustoma grandiflorum SHINN)

Aprovado em: 20/03/2014

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dr^a. Núbia Pereira da Costa

DCB/CCA-UFPB

Orientadora

Dr^a. Leandra Matos Barrozo

CESBA/UEMA

Examinadora

Msc. Márcia Maria de Souza Gondim

CCA-UFPB

Examinadora

AREIA - PB

Fevereiro – 2014

DEDICO

*Aos meus avós paternos **José Alves da Cunha e Francisca Botelho Pereira da Cruz** e avós maternos **Bartolomeu Ferreira Neto e Maria do Carmo de Alencar**, todos in memorian, por sempre terem sido motivos de perseverança, especialmente aos que tive a oportunidade de conhecer, por terem sempre sonhado comigo, o dia em que conquistaria essa vitória.*

OFEREÇO

*Aos meus irmãos, **Bartolomeu, Humberto, Heriberto** (in memorian), **Genilda, Ceixa, Leonardo e Adriano** pelo apoio e confiança.*

*Aos meus sobrinhos, **Angelica, Marcos, Diego, Ingrid, Marília, Laila, Maurício, Anaélia, Maria Nilda, Bárbara, Cristiane, Emanuela, Dulce Maria e Vitor Emanuel**, por serem jovens confiantes na minha sabedoria e por serem crianças que já me veem como exemplo.*

*Aos meus sobrinhos netos **Miguel e Vivian Alessandha** que são as novas luzes da família e já perpetuam união e felicidade.*

A fragrância sempre permanece na mão de quem oferece flores.

Hadia Bejar

AGRADEÇO

*Aos meus pais, **Tarciso Botelho Pereira e Maria Nilda Ferreira Botelho**, pois foram essas duas pessoas minha maior inspiração e motivação, sem eles não conseguiria forças para batalhar em busca dos meus objetivos, superando todas as dificuldades.*

A Universidade Federal da Paraíba, especificamente ao Centro de Ciências Agrárias, por ter me proporcionado uma formação profissional.

A minha orientadora, Profa. Dra. Núbia Pereira da Costa por ter me guiado nesse trabalho de conclusão de curso, por estar sempre disponível a esclarecer todas as dúvidas e ter acreditado na minha capacidade de desenvolver um bom trabalho. Sou grato a essa grande profissional e pessoa, que diretamente contribuiu para a minha formação profissional e pessoal, passando um pouco do seu conhecimento e experiência nos três anos que trabalhamos juntos.

Ao Laboratório de Biologia Celular e Cultura de Tecidos Vegetais, onde tive a oportunidade de desenvolver meus trabalhos acadêmicos juntamente com os funcionários que me auxiliaram e ajudaram a conduzir os experimentos.

Aos amigos e colegas da turma 2009.1 por todo apoio e incentivo ao longo de todos esses cinco anos, Rinaldo Barbosa, Alberto Marreiro, Thales Medeiros, Antônio Dantas, Begna Janine, Ronaldo Gomes, Rodolfo César, Max Kleber, Alex Pacheco, Bruno Oliveira, Talles Renan, Lucas Cavalcante, Rommel Raphael, Ayson Jackson, Luana Ferreira, Ariosto Célio, Suany Pinheiro, Isnaldo Rodrigues, Francisco Cabral, Wílina Júlia, Francisco Caio, Erton Mendonça, Dornelles Soares e Hildebrando.

As amigas que foram construídas na vida acadêmica, especialmente aos do Bloco B, aos do quarto 15 e do laboratório, companheiros que sempre estiveram dispostos a contribuir de alguma maneira, não só com o trabalho de conclusão de curso ou disciplinas, mas também na vida pessoal.

A toda a minha família, tios, tias, primos e primas por todo o apoio moral e carinho prestado durante essa etapa da minha vida.

Aos meus amigos contemporâneos da Escola Agrotécnica Federal do Crato, Marcelo, Jackson, Aline, Halan, Adriana, Mikhael, Paulo Anderson, Lincoln, Vanessa e Ivan e aos amigos que fiz depois que se tornou Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia - Campus Crato, Raylson, Lucas, Géssyca, João Ítalo, Expedito, Francisco Jeanes, Jadson e Uanderson, por sempre acreditarem no meu sucesso.

A todos os agentes sociais envolvidos nos diversos projetos de extensão desenvolvidos, por serem prova da mudança por meio de novas perspectivas.

Aos professores e funcionários que contribuíram com a minha caminhada, até este momento, especialmente aos do Centro de Ciências Agrárias.

Obrigado!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	VIII
RESUMO.....	IX
ABSTRACT.....	XI
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Aspectos gerais da espécie e importância econômica.....	3
2.2. Propagação por estaca foliar.....	5
2.3. Substratos.....	6
2.4. Micropropagação e Cultivo Fotoautotrófico.....	7
2.5. Reguladores de Crescimento.....	8
2.6. Aclimatização.....	9
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3.1. Local de condução da pesquisa e obtenção dos propágulos.....	10
3.2. Experimento de propagação por estaca foliar.....	10
3.2.1. Tratamentos.....	10
3.2.2. Parâmetros avaliados.....	11
3.3. Experimento de micropropagação	11
3.3.1. Tratamentos.....	11
3.3.2. Parâmetros avaliados.....	13
3.4. Experimento de aclimatização.....	13
3.4.1. Tratamentos.....	14
3.4.2. Parâmetros avaliados.....	14
3.5. Delineamento experimental e análise estatística.....	15
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	16
5. CONCLUSÕES.....	23
6. REFERÊNCIAS.....	24
7. APÊNDICES.....	33

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Percentual médio de explantes de lisianthus que emitiram brotações em diferentes ambientes de cultivo <i>in vitro</i> e concentrações de sacarose.....	18
Figura 2.	Percentual médio do número de brotações por explantes em diferentes ambientes de cultivo <i>in vitro</i> e concentrações de sacarose.....	20
Figura 3.	Média da taxa de sobrevivência de <i>E. grandiflorum</i> após 47 dias em aclimatização.....	21
Figura 4.	Média do número de folhas de <i>E. grandiflorum</i> após 47 dias em aclimatização.....	22
Figura 5.	Média do número de raízes de <i>E. grandiflorum</i> após 47 dias em aclimatização.....	23

PEREIRA FILHO, Tarciso Botelho. **Propagação e Micropropagação de Lisianthus** (*Eustoma grandiflorum* SHINN). 2014. 34f. Monografia (Graduação em Agronomia). Centro de Ciências Agrárias - Universidade Federal da Paraíba. Orientadora: Prof^a. Dra. Núbia Pereira da Costa.

RESUMO - O lisianthus (*Eustoma grandiflorum* SHINN) é uma espécie que começou a se destacar economicamente no Brasil na década de 90. É uma planta ornamental da família das Gentianaceas, originária da América do Norte, sendo cultivada como flor-de-corte ou em vasos. O objetivo no presente trabalho foi testar concentrações de ácido indol-butírico (AIB) em diferentes substratos para conhecer o potencial de propagação via estaca foliar do lisianthus, testar ambientes alternativos para cultivá-lo *in vitro* e avaliar o desenvolvimento na aclimatização. O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Celular e Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Ciências Biológicas do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba – PB e em telado anexo ao laboratório. Os três experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizados - DIC, sendo que no experimento de propagação por estaca foliar obedeceu ao esquema fatorial (5x3) sendo 5 concentrações de AIB (0,0 ppm; 1000 ppm; 2000 ppm; 3000 ppm e 4000ppm) em pó e 3 substratos (vermiculita, terra vegetal + vermiculita e terra vegetal), avaliou-se o comprimento de raiz, porcentagem de folhas vivas, número de raiz e número de folhas vivas com raiz. O experimento de micropropagação utilizou plântulas de lisianthus cultivada *in vitro* como fonte de explantes em esquema fatorial (4x5) representado por quatro ambientes de cultivo (sala de crescimento; sala de laboratório com luz artificial; sala de laboratório com luz natural e telado) e cinco concentrações de sacarose (0,0; 0,5; 10,0; 15,0 e 20,0 mg.L⁻¹), com cinco repetições provenientes da média de 10 tubos. Avaliou-se o número de explantes que emitiram brotações e o número de brotações por explantes. Para o experimento de aclimatização de brotos de lisianthus obtidos do cultivo *in vitro*, testou-se a indução do enraizamento utilizando-se cinco concentrações de AIB (0,0; 0,2; 0,4; 0,6 e 0,8 mg.L⁻¹) e transferiu-se para substrato vermiculita para aclimatização em telado onde avaliou-se a taxa de sobrevivência das plântulas, número de folhas e número de raízes, altura de parte aérea e comprimento do sistema radicular, peso fresco e diâmetro do caule. Para o experimento de estaca foliar verificou-se que a concentração de IBA que apresentou melhor desenvolvimento de raízes foi de 4000 mg.L⁻¹ sendo a vermiculita o melhor substrato. *E. grandiflorum* pode ser cultivado em condições fotoautotróficas, mas o número de brotações é maior em meio com a concentração de 20 mg.L⁻¹ de sacarose. Ocorreu o desenvolvimento de *E.*

grandiflorum in vitro em ambiente telado a partir da concentração de 10 mg.L⁻¹ de sacarose. A concentração de 0,54 mg.L⁻¹ de IBA aumentou a taxa de sobrevivência das plantas na aclimatização das mudas.

Palavras chave: Cultivo *in vitro*. Ornamental. Aclimatização.

PEREIRA FILHO, Tarciso Botelho Pereira. **Propagation and micropropagation of Lisianthus (*Eustoma grandiflorum* SHINN)**. 2014. 34f. Monograph (Undergraduate Agronomy). Center for Agricultural Sciences – Federal University of Paraíba. Advisor: Profa. Dra. Núbia Pereira da Costa.

ABSTRACT - The lisianthus (*Eustoma grandiflorum* SHINN) is a species that began to stand economically in Brazil in the 90s. It is an ornamental plant of the family Gentianaceas, native to North America and is grown as a cut flower or in pots. The aim of this study was to test concentrations of indole butyric acid (IBA) on different substrates to meet potential propagation through leaf cutting lisianthus, test alternative environments to cultivate it *in vitro* and evaluate the development in acclimatization. The work was developed in the Laboratory of Cell Biology and Plant Tissue Culture, Department of Biological Sciences, Center for Agricultural Sciences, Federal University of Paraíba - PB and greenhouse attached to the laboratory. Three experiments were conducted in a completely randomized design - CRD, and the experiment of cutting propagation by leaf obeyed factorial (5x3) and 5 concentrations of IBA (0,0 ppm, 1000 ppm, 2000 ppm, 3000 ppm and 4000 ppm) in powder and 3 substrates (vermiculite, topsoil, vermiculite and topsoil), has been reported the root length, percentage of live leaves, number of roots and number of live leaves to root. The experiment used micropropagation lisianthus seedlings grown *in vitro* as a source of explants in factorial (4x5) represented by four culture environments (growing room, laboratory room with artificial light, laboratory room with natural light and greenhouse) and five sucrose concentrations (0,0; 0,5; 10,0; 15,0 and 20,0 mg L⁻¹), with five replicates from the mean of 10 tubes. Has been evaluated the number of explants that emit shoots and number of shoots per explants. The experiment of acclimatization of lisianthus shoots obtained from *in vitro* culture, tested the induction of *in vitro* rooting in five IBA concentrations (0,0; 0,2; 0,4; 0,6 and 0,8 mg.L⁻¹) and transferred to vermiculite for acclimatization in greenhouse which assessed the survival rate of seedlings, number of leaves, number of roots, height of shoot and root length, fresh weight and stem diameter. For the experiment leaf cutting it has been found that the concentration of IBA presented better root development was 4000 mg.L⁻¹ being the best vermiculite substrate. *E. grandiflorum* can be grown under photoautotrophic conditions, but the number of shoots is higher in medium with a concentration of 20 mg.L⁻¹ sucrose. A development had occurred *E. grandiflorum in vitro* in a greenhouse. The IBA increased the survival rate of plants in the acclimatization of seedlings.

KEYWORDS: *In vitro* culture. Ornamental. Acclimatization.

1. INTRODUÇÃO

O lisianthus, *Eustoma grandiflorum* SHINN, pertencente à família das Gentianaceas, nativo do norte do México e sul dos Estados Unidos, tem sido cultivado em grande escala na Holanda, Japão, Israel e Estados Unidos. No Brasil foi introduzida na década de 80 (BACKES et al. 2007). É uma planta muito utilizada como ornamental devido as suas variedades híbridas possuírem flores de distintas cores, sendo comercializadas como flor de corte e de vaso.

No âmbito internacional da floricultura, a cultura de tecidos movimenta em torno de US\$15 dólares, sendo que, países como Alemanha, Holanda, Índia, Inglaterra, USA, etc. fazem dela uma poderosa ferramenta de propagação vegetativa, visando inserir-se tanto no mercado nacional como internacional com um amplo volume de negócios (CID, 2007).

A micropropagação destina-se, principalmente, aquelas espécies de difícil propagação. É uma importante estratégia para o melhoramento, clonagem e multiplicação de plantas em larga escala e para obtenção de plantas livres de vírus, com alta qualidade fitossanitária e genética (VILLASLOBOS e THORPE, 1991).

No processo de cultivo *in vitro* tradicional em salas de crescimento, os cultivos são postos para se desenvolver geralmente, com o fornecimento de luz diário de 16h e em temperatura em torno de 25°C, mantidos por luz artificial e arcondicionado. Atualmente veem se buscando alternativas a essas condições controladas, com a substituição das salas totalmente climatizadas por condições ambientais tais como o uso de luz natural e temperatura ambiente no cultivo *in vitro*. Estas alternativas já foram testadas com sucesso para algumas ornamentais como crisântemos, orquídeas (DIGNART et al., 2005) e violeta africana (AGRA, 2009).

As plantas de cultivo *in vitro* necessitam de aclimatização, o que lhes dará maiores chances de adaptar-se às condições de cultivo em campo. A aclimatização consiste basicamente na retirada das mudas do meio de cultivo e transferência para recipientes contendo substrato. Entretanto, a sobrevivência e o crescimento de plântulas micropropagadas, após a remoção do meio de cultivo *in vitro*, estão entre as principais dificuldades encontradas em várias culturas.

Diante do exposto, o objetivo no presente trabalho foi testar concentrações de ácido indol-butírico (AIB) em diferentes substratos para conhecer o potencial de propagação via

estaca foliar de *Eustoma grandiflorum* SHINN; testar formas alternativas das condições do cultivo *in vitro* na micropropagação desta espécie, bem como, avaliar o potencial de aclimatização.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Aspectos gerais da espécie e importância econômica

O lisianthus (*Eustoma grandiflorum* Shinn.) pertencente à família Gentianaceae, sendo a terceira maior família da ordem Gentianales, é uma planta originária da América do Norte, nativa precisamente do norte do México e sul dos Estados Unidos, sendo encontrado principalmente nas pradarias úmidas do Nebraska e Colorado. O interesse atual da produção mundial desta espécie, ocorre principalmente pela grande diversidade de cores das flores e alta produtividade (FOX, 1998). É uma importante planta ornamental, cultivada principalmente na Europa, Japão, Estados Unidos e em Israel como flor-de-corte ou planta de vaso (HALEVY E KOFRANEK, 1984; ECKERET et al., 1994). No Brasil, apesar de ter sido introduzida no final da década de 80, o interesse econômico pela espécie teve início somente a partir da década de 90 (SALVADOR 2000; CAMARGO et al., 2004).

É uma herbácea bienal, cultivada como anual, de caule ereto, com folhas ovais e oblongas, formando com as flores um grande atrativo ornamental. As flores, simples ou dobradas, são grandes e duráveis. Tais características têm atraído o mercado consumidor, tornando-a uma espécie importante para o mercado mundial de flores (GRIESBACHET et al., 1988; ROHET et al., 1989). Os floristas têm preferido o lisianthus para arranjos decorativos, devido à durabilidade das flores e ao comprimento e firmeza das hastes (HANKINS, 2004 apud BACKES, 2005).

Sua propagação é realizada geralmente por sementes, mas o seu pequeno tamanho de aproximadamente 20.000 sementes por grama obriga uma cuidadosa e vagarosa manipulação nas bandejas de germinação, apresentando particularidades quanto às exigências de temperatura e luminosidade. Quando exposto a temperaturas acima de 25°C seu crescimento é prejudicado e as plantas tomam a forma de roseta (entrenós curtos, ocorrendo agrupamento de folhas basais, sem alongamento visível de entrenós). Quando expostas a temperaturas baixas as plantas alongam os entrenós rapidamente (TAKEZAKI et al. 2000).

O ciclo da cultura é longo, aproximadamente seis meses, sendo então dividido em dois estádios desde a semeadura até o florescimento. O primeiro estágio tem início com a germinação e sua duração, em média, é de três meses. Durante esse estágio, as plantas crescem em forma de roseta, formando somente quatro pares de folhas verdadeiras. O

segundo estágio tem início após os três primeiros meses e envolve a alongação da haste finalizando com o florescimento (GRIESBACHET et al., 1988).

A maioria dos cultivares comerciais desta espécie tem haste com ramificação simpodial e as plantas não formam ramos basais, a menos que se faça uma poda acima do terceiro nó (HALEVY E KOFRANEK, 1984; STARMAN, 1991). Esta poda é uma prática necessária para estimular brotações laterais e, conseqüentemente, a produção de maior número de hastes e de flores.

Apresenta basicamente três cores distintas: azul, rosa e branca (HALEVY e KOFRANEK, 1984). O mercado consumidor europeu prefere o azul-escuro, enquanto o japonês e o brasileiro preferem o branco com bordas azuis. Há diferenças de preferência também entre as cultivares de flores simples e dobradas, onde o mercado europeu e o japonês preferem as simples, enquanto o americano e o brasileiro, as flores dobradas.

Sua aceitação no mercado de flores foi potencializada pelo trabalho de melhoramento genético realizado na espécie, que resultou em cultivares com novas cores e tonalidades de flores, diferentes estruturas da inflorescência, excelente vida de vaso e disponibilidade de flores ao longo do ano (ECKER et al., 1994; OHKAWA; SASAKI, 1999). Segundo Corr e Katz (1997), sua produção e popularidade têm crescido mundialmente, sendo considerada uma das dez espécies de flores-de-corte mais comercializadas no sistema de leilão holandês.

Embora com grande potencial de produção e de mercado no Brasil, o lisianthus é uma planta pouco estudada em condições de clima tropical, diferentemente do que acontece no Japão, onde seu estudo tem sido feito há mais de 30 anos (CORR E KATZ, 1997). O lisianthus, sendo uma espécie ainda pouco conhecida no Brasil necessita de estudos para que sua produção seja otimizada, uma vez que nossas condições de cultivo são diferentes das encontradas nas regiões com maior tradição.

No Brasil há escassez de informações técnicas e científicas do cultivo principalmente quanto à produção e ao manejo da cultura, como, épocas de plantio e adaptação de cultivares a estas épocas, manejo da condução e da nutrição mineral. Esta indisponibilidade de informações leva os produtores a utilizarem técnicas de cultivo que não correspondem a todo o potencial da cultura.

A existência de estudos e pesquisas que contemplem as várias etapas do processo produtivo é necessária, pois segundo Junqueira e Peets (2008), a produção de flores tem adquirido notável desenvolvimento no Brasil, caracterizando-a com um dos mais promissores segmentos da horticultura no campo do agronegócio. O que acarreta grande demanda por produtos de alta qualidade, tanto no mercado interno como no externo.

Dentre os produtos exportados, destacam-se as flores tropicais (helicônias, bromélias e antúrios), as rosas, as flores secas, os gladiólos, os lisianthus, as gérberas, os bulbos, as mudas de cordilines e dracenas, as folhagens, as sementes de palmeiras e as mudas de orquídeas, gerânios e crisântemos. Esse volume exportado foi destinado principalmente para os Estados Unidos, Países Baixos, Portugal, Canadá e Alemanha (AGRIANUAL, 2009).

Os efeitos do aumento gradativo da importância econômica da floricultura mundial podem ser visto em todo o território brasileiro desde a Região Sul até a Região Norte. Essa atividade movimenta uma grande parcela da economia de vários Estados brasileiros, como: Santa Catarina, Pernambuco, Alagoas, Ceará, Rio Grande do Sul, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Paraná, Goiás, Bahia, Espírito Santo, Amazonas e Pará (BATALHA E BUAINAIN 2007, apud CAVASINI, 2013).

Desde 2006 o segmento de flores tem registrado altas de 8% a 15% em volume e de 15% a 17% em valor no Brasil. Em relação aos empregos diretos foram 206 mil. Dos quais 102.000 (49,5%) relativos à produção, 6.400 (3,1%) relacionados à distribuição, 82.000 (39,7%) no varejo e 15.600 (7,7%) em outras funções, principalmente de apoio. Em 2012, o faturamento do mercado de flores e plantas ornamentais, no país, foi de R\$ 4,8 bilhões, com cerca de 13,800 mil hectares de área cultivada (IBRAFLOR, 2013). Para o ano de 2014 o IBRAFLOR estima um crescimento na ordem de 8 a 10%.

2.2. Propagação por estaca foliar

A reprodução por meio assexual é comum entre as plantas superiores, devido proporcionar a perpetuação de genótipos. É possível regenerar uma planta a partir de um órgão ou fragmento de órgão vegetativo que não seja especializado para a propagação, como folhas, caules e raízes. Lajús et al. (2007) definiram estaca como sendo o segmento retirado da planta-mãe, com pelo menos uma gema vegetativa capaz de originar uma nova planta, podendo ser estacas de ramos, de raízes e de folhas.

Embora a utilização de estacas caulinares seja mais frequente, a especificidade da espécie pode levar a multiplicação por estacas de folhas. As estacas foliares são feitas utilizando a totalidade ou parte do limbo da folha, podendo ou não ter o pecíolo. Não foi encontrado na literatura até o momento trabalhos sobre a propagação assexuada de lisianthus via estaca foliar. Ornamentais comumente propagadas por estacas foliares são a violeta-africana (*Saintpaulia ionantha* Wendl) compostas por uma folha e seu pecíolo (LORENZI & SOUZA, 1999; SOARES, 1998; TOMBOLATO, 1993); espada ou lança de São Jorge

(*Sansevieria* sp. e *Sansevieria trifasciata* Prain) folhas laminares folhas semicilíndricas respectivamente (NASCIMENTO 2004) e zamioculcas (*Zamioculcas zamiifolia* Engl.) segundo Dinalli et al (2013).

2.3 Substratos

O substrato, assim como a água, a temperatura, são os fatores externos que merecem atenção especial, pois atuam diretamente no enraizamento. O substrato utilizado pode limitar o processo de formação de raízes em estacas, podendo influir na qualidade das raízes formadas e no percentual de enraizamento (KÄMPF et al., 2006; LONE et al., 2010). De acordo com Ruggiero (1987), o substrato é o meio onde ocorre o enraizamento e faz parte do sistema, disponibilizando água às estacas, permitindo a penetração das raízes e as trocas gasosas, além de proporcionar um ambiente escuro na base da estaca.

Dessa forma, é fundamental a seleção de substratos que possibilitem a retenção de água suficiente para prevenir a dessecação da base da estaca e possuam espaço poroso, para facilitar o fornecimento de oxigênio, para a iniciação e desenvolvimento radicular. Dentre os materiais comumente utilizados para enraizamento de estacas estão a vermiculita. Por existir poucas informações sobre o substrato ideal para o enraizamento de estacas de foliares e a produção de mudas, deve-se ressaltar a importância da mistura de diferentes componentes para a composição de um substrato estável e adaptado à obtenção de mudas de boa qualidade em curto período de tempo.

Devido à elevada porosidade e boa retenção de umidade, a vermiculita é cada vez mais utilizada como substrato para o enraizamento de estacas herbáceas e semi-lenhosas (GONÇALVES & MINAMI, 1994). A vermiculita é uma mica (silicato hidratado de magnésio, alumínio e ferro) que se expande acentuadamente quando aquecida. Contém suficiente magnésio e potássio para suprir a maioria das necessidades das plantas. Apresenta reação neutra e boa propriedade tampão. É insolúvel e capaz de absorver quantidades de água. Tem uma alta capacidade de troca de cátions, podendo reter nutrientes em reserva e liberá-los mais tarde (HARTMANN & KESTER, 1975).

2.4 Micropropagação e Cultivo Fotoautotrófico

Um método de propagação vegetativa amplamente estudado nas mais diversas espécies vegetais é a micropropagação, sendo a modalidade dentro da cultura de tecidos, que mais tem difundido e encontrado aplicações práticas comprovadas.

Para Paiva (1998), a micropropagação consiste em uma metodologia eficiente na produção de mudas com alta qualidade fitossanitária e genética. Essa técnica vem sendo utilizada com sucesso para a obtenção de mudas sadias em grande número de espécies economicamente importantes ou com dificuldade de propagação, obtendo avanços importantes nos campos de genética, fisiologia e patologia.

Entre as vantagens de sua utilização, para Erig e Schuch (2005), está a possibilidade de obterem-se várias plantas a partir de um explante inicial, independentemente da estação do ano; a redução do tempo e da área necessária à propagação da espécie; as melhores condições sanitárias por meio do cultivo de meristemas previamente tratados por termoterapia, para eliminação de doenças; a reprodução do genótipo da planta-mãe, geralmente, com fidelidade durante a multiplicação e; a propagação vegetativa de espécies difíceis de serem propagadas por outros métodos. Entretanto, o emprego da micropropagação em escala comercial na produção de mudas pode ser limitado, devido, entre outros fatores, ao elevado custo para obtenção da muda.

Para que a aplicação da micropropagação na produção de mudas torne-se viável comercialmente e possa competir com os métodos tradicionais de propagação é necessário reduzir os custos de produção (ALTMAN, 1999), que se devem em grande parte às perdas causadas pela contaminação *in vitro*; por desordens fisiológicas e morfológicas nas plantas; à baixa percentagem de sobrevivência das plantas no estágio de aclimatização às condições *ex vitro*; à necessidade de mão-de-obra especializada, para a intensiva manipulação dos frascos e das plantas (KURATA E KOZAI, 1992; KOZAI E KUBOTA, 2001) e; principalmente, ao elevado custo de funcionamento e manutenção das salas de crescimento com regime de luz artificial e temperatura controlada, onde as culturas *in vitro* são normalmente incubadas (STANDAERT DE METSENAERE, 1991; KODYM E ZAPATAARIAS, 1999).

O desenvolvimento de sistemas de micropropagação fotoautotrófica (produção de micropropágulos sem adição de sacarose no meio de cultura e sob condições ambiente que favoreçam a fotossíntese) (KUBOTA E TADOKORO, 1999) com o uso de luz natural, surgem como possibilidades potenciais de aumentar a eficiência da micropropagação e auxiliar na redução dos custos, viabilizando-a comercialmente.

Algumas vantagens da micropropagação fotoautotrófica associada à luz natural, em relação ao método convencional de micropropagação, incluem aumento do crescimento das plantas, redução do risco de contaminação microbiana, em virtude da remoção da sacarose do meio de cultura, melhoria das características fisiológicas da planta, devido às condições ambientais de cultivo serem mais naturais, redução do estresse da planta durante a aclimatização, aumentando a percentagem de sobrevivência das mudas (HEMPEL, 1994; KOZAI et al., 2003 apud ERIG E SCHUCH 2005), eliminação dos custos com iluminação e redução dos custos com reparos e manutenção, e ainda, possibilidade de utilização de instalações simplificadas reduzindo os custos das construções (KODYM E ZAPATA-ARIAS, 1999).

2.5. Reguladores de Crescimento

Uma distinção pode ser feita entre os termos hormônio vegetal (também chamado de Fitohormônio) e reguladores de crescimento. De acordo com a maioria dos fisiologistas de plantas, o hormônio vegetal é uma substância natural produzida pela própria planta. Já os reguladores de crescimento ou reguladores vegetais, inclui a forma natural ou sintética que quando aplicados em plantas influenciam no seu crescimento e desenvolvimento.

No meio de cultura, além das formulações básicas dos meios normalmente utilizados, como o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), a utilização de fitorreguladores é imprescindível para que se obtenha sucesso na propagação de culturas *in vitro*. O tipo de citocinina e a sua concentração são fatores que influenciam no sucesso da multiplicação *in vitro* e, segundo Grattapaglia e Machado (1998), são fatores indispensáveis no auxílio durante o processo de superação da dominância apical e indução de proliferação de gemas axilares. Desse modo, ocorre um grande número de brotações por meio do crescimento de meristemas laterais (SRISKANDARAJAH; MULLINS; NAIR 1982, Apud LEITZKE 2007).

A utilização de 6-benzilaminopurina (BAP) tem revelado eficiência no processo de multiplicação tanto de estruturas aéreas como na indução de gemas adventícias em diversas espécies (HU E WANG, 1983), e vem sendo a citocinina a mais utilizada. Para multiplicação em meio de cultura, em geral, suas concentrações variam de 0,1 a 5 mgL⁻¹ (TOMBOLATO; COSTA, 1998).

Os brotos desenvolvidos no cultivo *in vitro* geralmente não apresentam raízes. Eles deverão, portanto, passar por uma fase de enraizamento em meio propício à indução de raízes, preparando as mudas para o transplante do ambiente de cultivo para o ambiente em casa de

vegetação e de campo (HARTMANN et al., 1997). Nesta nova etapa as substâncias promotoras de enraizamento mais utilizadas são ácido indol-acético (IAA), ácido naftaleno acético (NAA) e o ácido indol-butírico (AIB), provocando o mesmo efeito das auxinas endógenas.

Estes reguladores de crescimento são as auxinas e compreendem uma grande família de substâncias que têm em comum a capacidade de produzir crescimento celular e também promover a divisão celular em cultura de tecidos (KRIKORIAN, 1991), sendo, desta forma utilizadas na estimulação de raízes adventícias, principalmente de espécies ornamentais, pois as características de interesse comercial são mantidas (Tagliacozzo, 1998). Entre elas, o AIB tem sido o mais utilizado por não causar fitotoxicidade aos explantes em uma larga faixa de concentração, ser eficiente em uma grande variedade de espécies (HARTMANN et al., 1997) e relativamente estável, sendo pouco suscetível à ação dos sistemas de enzimas de degradação de auxinas (PIRES & BIASI, 2003).

A vantagem desse tipo de enraizamento representa o melhor controle das condições em que se trabalha e, com isso, a obtenção de um alto percentual de enraizamento, sendo uma das etapas mais difíceis da micropropagação. O tipo de meio de cultura, de auxina e suas concentrações são as variáveis que, em geral, mais influenciam o enraizamento, e variam conforme a espécie e a cultivar.

2.6. Aclimatização

Para que as plantas de cultivo *in vitro* tenham maiores chances de adaptar-se às condições de cultivo em campo e se tornar uma planta adulta, necessitam de aclimatização. A aclimatização é um evento de adaptação climática que consiste basicamente na retirada das mudas do meio de cultivo e transferência para recipientes contendo substrato.

Esta fase é muito delicada, uma vez que, as condições de cultura “*in vitro*” modificam características bioquímicas, anatômicas e morfológicas das plantas, alterando os processos fisiológicos normais (LUCAS et al., 2002). A temperatura instável e à redução de umidade do ar em que as plântulas são expostas as levam ao estresse e favorece o perigo de contaminações por fungos e bactérias que podem se desenvolver neste estágio (TOMBOLATO E COSTA, 1998).

Essa passagem crítica, da fase *in vitro* para a casa de vegetação, deve-se basicamente aos fatores de estresse hídrico, fotossíntese, absorção de nutrientes e fitossanidade. No entanto, existem poucos trabalhos que relatam os detalhes do procedimento de transplante e

aclimação das plantas micropropagadas. Desse modo Campostrini e Otoni (1996), reforçam que a transferência das condições assépticas e heterotróficas (*in vitro*) para o crescimento em ambiente externo deve ser realizada de forma gradativa e cuidadosa.

Uma das alternativas para aumentar o sucesso da aclimação é a passagem das plantas por um período de rustificação ou pré-aclimação, que consiste em mudanças no ambiente ainda *in vitro* para estimular a transição de heterotrofismo para o autotrofismo. Em vista disso vários estudos e trabalhos vêm sendo desenvolvidos com o intuito de minimizar os danos causados pela transição de uma condição à outra (JACKSON, 2003).

Souza et al (2006) sugerem a pré-adaptação à condição autotrófica mediante redução da concentração de sacarose no meio de cultura, para promover a rustificação *in vitro*, buscando aumentar a capacidade fotossintética das plantas. Outro fator que merece destaque é a aeração dos recipientes de cultivo. A condição de esterilização necessária aos cultivos *in vitro* e a manutenção do ambiente asséptico no interior dos frascos de cultivo impõe um selamento severo dos recipientes, impedindo dessa forma trocas gasosas, tão necessárias ao bom desenvolvimento das plantas (JACKSON, 2003).

Outro fator importante na aclimação de mudas é o substrato (CALVETE, 2000), devendo apresentar boa coesão entre as partículas e adequada aderência junto às raízes (TOLEDO, 1992). Esses substratos podem influenciar as respostas das mudas através de suas características químicas, físicas e biológicas (GONÇALVES, 1995). Desta forma, a seleção do substrato é fundamental no crescimento e desenvolvimento das plantas micropropagadas, influenciando diretamente no sucesso da aclimação.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local de condução da pesquisa e obtenção dos propágulos

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Celular e Cultura de Tecidos Vegetais - e em telado do Departamento de Ciências Biológicas - Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba (DCB/CCA/UFPB). Para a propagação por estaquia foliar foram utilizadas plantas matrizes de lisianthus (*Eustoma grandiflorum* SHINN) obtidas na ADESMAF (Associação de Desenvolvimento Sustentável de Macacos e Furnas), localizada em Areia, PB. Para os ensaios de micropropagação foram utilizadas como fonte de explantes segmentos foliares de plântulas de lisianthus de primeiro subcultivo mantidas *in vitro* no laboratório.

3.2. Experimento 1: Propagação por estaca foliar

Para o teste de enraizamento de estacas foliares foram utilizadas oito plantas matrizes adultas produzidas a partir de sementes. Da parte mediana dessas plantas foram retiradas folhas e padronizadas quanto ao tamanho, para serem utilizadas como fonte de propágulo. Essas folhas passaram por uma lavagem em água corrente de torneira e por uma secagem sob papel toalha.

Em seguida, as estacas foliares tiveram seus pecíolos mergulhados em cinco diferentes concentrações de ácido indol-butírico (AIB) na formulação de pó e enterradas verticalmente em três diferentes substratos que formavam os tratamentos. Foram utilizadas 15 repetições para cada concentração de AIB. Os substratos permaneceram por 30 dias com três turnos de regas em condições de viveiro telado.

3.2.1. Tratamentos

Os tratamentos utilizados foram formados por diferentes concentrações de AIB (0,0 ppm; 1000 ppm; 2000 ppm; 3000 ppm e 4000 ppm) em pó em três tipos de substrato, conforme descrito a seguir:

Tratamento 1: vermiculita e AIB em pó nas cinco concentrações;

Tratamento 2: terra vegetal + vermiculita (proporção de 1:1) e AIB em pó nas cinco concentrações;

Tratamento 3: terra vegetal e AIB em pó nas cinco concentrações.

A terra vegetal obtida foi peneirada com peneira de malha 100. A vermiculita expandida utilizada continha partículas com diâmetro entre 0,15 e 8,0 mm e densidade entre 80 a 170 kg/m³ a 25 °C.

3.2.2. Parâmetros avaliados

No trigésimo dia foram avaliados o número de folhas vivas, folhas vivas com raiz, número de raiz e comprimento de raiz, com auxílio de uma régua milimétrica.

3.3. Experimento 2: Micropropagação

Como fonte de explantes foram utilizadas plantas provenientes de primeiro subcultivo *in vitro*. Dessas plantas foram retiradas as folhas e cortadas em segmentos de aproximadamente um cm² que constituíram os explantes. Estes explantes foram inoculados em tubo de ensaio contendo o meio de cultura. Após inoculação, todos os tubos foram vedados com papel alumínio e filme policloreto de polivinila - PVC e dispostos em sala de cultivo nos diferentes ambientes que formaram os tratamentos.

O meio utilizado para multiplicação foi o MS de Murashige e Skoog (1962) + 0,5mg.L⁻¹ de BAP (Benzilaminopurina), 7g.L⁻¹ de Agar, pH ajustado para 5,8, com as concentrações de sacarose que formaram os tratamentos.

3.3.1. Tratamentos

Os tratamentos utilizados foram formados por diferentes ambientes de cultivos e diferentes concentrações de sacarose:

Ambiente 1: Sala de Crescimento - luz artificial 35 micro mol/m²/s, distanciadas em 15 cm, com fotoperíodo de 16 horas de luz controlada por timer programador manual e temperatura média de 25°C ±1°C mantida por ar-condicionado nas concentrações de sacarose em 0,0; 0,5; 10,0; 15,0 e 20,0 mg.L⁻¹.

Ambiente 2: Sala de Laboratório – luz artificial 35 micro mol/m²/s, distanciadas em 15 cm, com fotoperíodo de 16 horas de luz controlada por timer programador manual e temperatura ambiente nas concentrações de sacarose em 0,0; 0,5; 10,0; 15,0 e 20,0 mg.L⁻¹.

Ambiente 3: Sala de Laboratório - luz natural incidente através da janela de vidro conforme metodologia de Kodym e Zapata-arias, (1999) e temperatura ambiente nas concentrações de sacarose em 0,0; 0,5; 10,0; 15,0 e 20,0 mg.L⁻¹.

Ambiente 4: Viveiro telado –luz natural, cobertura plástica de sombrite 50% e temperatura ambiente nas concentrações de sacarose em 0,0; 0,5; 10,0; 15,0 e 20,0 mg.L⁻¹.

3.3.2.Parâmetros avaliados

3.3.2.1.Avaliação de brotação

Foi avaliado o número de explantes que emitiram brotações aos 60 dias após a instalação do experimento. Os explantes que não brotaram ou que morreram foram descartados e os que brotaram foram transferidos para potes com meio MS acrescido com 2 mg.L⁻¹ de carvão ativado sem regulador de crescimento, de modo a proporcionar o alongamento e foram mantidos nos mesmos ambientes de cultivo e mesmas concentrações de sacarose por mais 20 dias para se proceder a avaliação do número de brotações por explante.

3.3.2.2. Avaliação de número de brotações por explante

O número de brotações por explantes foi avaliado aos 90 dias do início do cultivo em todos os ambientes estudados através da contagem das brotações desenvolvidas em cada explante.

3.4. Experimento de aclimatização

Após a avaliação de número de brotações por explante, as brotações do ambiente Sala de Crescimento, foram transferidas para potes com o meio MS com 2 mg.L⁻¹ de carvão ativado, na concentração 20,0 mg.L⁻¹ de sacarose e mantidos nessas condições por 38 dias para eliminar possíveis resíduos do indutor de brotações.

Em seguida estes brotos foram transferidos para potes de cultivo com o meio MS com 2 mg.L⁻¹ de carvão ativado, na concentração 20,0 mg.L⁻¹ de sacarose e diferentes concentrações de ácido indol-butírico e mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas de luz por 45 dias, visando estimular o enraizamento.

Após esse período os cultivos foram iniciados no processo de aclimação em condições de telado. Ao serem retiradas do meio de cultivo *in vitro*, as raízes dos brotos foram lavadas para retirado o excesso de ágar. Foram utilizados como recipientes, vasos preto comercial com capacidade de 200 ml e garrafas de politereftalato de etileno - PET, para formar a câmara úmida, cortadas na altura de 13 centímetros e com furos na base . Em cada tratamento as 23 plantas foram distribuídas em seis vasos. O substrato utilizado em todos os tratamentos foi composto pela proporção de 1:1 de vermiculita e terra vegetal.

Nos primeiros quatro dias se manteve um filme policloreto de polivinila- PVC sob os furos existentes no recipiente de PVC para evitar a desidratação das plântulas. A câmara úmida permaneceu por mais 20 dias promovendo um microclima com elevada umidade, assemelhando-se às condições do interior do recipiente de micropropagação. As regas mantiveram-se constantes de acordo a umidade do substrato. Com 15 e 30 dias da transferência para o substrato foi realizada uma adubação foliar em todas as plantas com adubo NPK na formulação 10-10-10.

As mudas permaneceram em telado até completa aclimatização, sob sombrite com 50% de sombreamento. Aos 47 dias foram realizadas as avaliações relacionadas à sobrevivência e ao desenvolvimento das plantas.

3.4.1. Tratamentos

Os tratamentos foram formados por cinco diferentes concentrações de ácido indolbutírico (0,0; 0,2; 0,4; 0,6 e 0,8 mg.L⁻¹) no meio de cultivo para enraizamento em sala de crescimento e posterior aclimatização no telado.

3.4.2. Parâmetros avaliados

Avaliou-se a taxa de sobrevivência das plântulas na aclimatização, número de folhas e número de raízes, altura de parte aérea e comprimento do sistema radicular com o auxílio de uma régua milimétrica, peso fresco em balança analítica de precisão e diâmetro do caule com a ajuda de um paquímetro digital.

3.5. Delineamento experimental e análise estatística dos experimentos

Os três experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizados - DIC, o experimento de propagação por estaca foliar obedeceu ao esquema fatorial 5x3, sendo cinco concentrações de AIB (0,0; 1000; 2000; 3000 e 4000 ppm) e três substratos (vermiculita, terra vegetal + vermiculita e terra vegetal). O experimento de micropropagação em esquema fatorial 4x5, representado por quatro ambientes de cultivo (Sala de Crescimento; Sala de Laboratório com luz artificial; Sala de Laboratório com luz natural e o Telado) e cinco concentrações de sacarose (0,0; 0,5; 10; 15 e 20 mg.L⁻¹), com cinco repetições provenientes da média de 10 tubos. Para o experimento do efeito de AIB na aclimatização foi feito teste de médias representado por cinco concentrações de AIB (0,0; 0,2; 0,4; 0,6 e 0,8 mg.L⁻¹) no substrato vermiculita + terra vegetal.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e, para comparar os substratos e os ambientes as médias foram comparadas pelo teste de Tukeya 5%, e com base na significância do teste F foram testados os modelos linear e quadrático para avaliar as doses utilizando o Programa Computacional Sistema para Análise de Variância – SISVAR 5.0.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Experimento de propagação por estaquia foliar

Os resultados foram apresentados apenas em forma de tabela devido a não significância entre suas médias pelo teste de regressão. Observa-se o efeito significativo das concentrações de AIB, substrato e da interação concentrações de AIB x substrato para todas as variáveis analisadas na estaquia foliar de *E. grandiflorum*, Tabela 1.

Tabela 1. Médias dos resultados obtidos para folhas vivas, folhas vivas com raízes, número e comprimento de raízes, obtidos em diferentes concentrações de AIB e substratos. CCA/UFPB, Areia - PB, 2014.

AIB mg.L ⁻¹	Substratos		
	Número de Folhas vivas		
	Vermiculita	Verm + Terra veg.	Terra vegetal
0	7bA	6aA	2aA
1000	8abA	3aA	4aA
2000	8abA	5aA	5aA
3000	5bA	4aA	4aA
4000	14aA	6aB	2aB
AIB mg.L ⁻¹	Número de Folhas vivas com raiz		
	Vermiculita	Verm + Terra veg.	Terra vegetal
	Vermiculita	Verm + Terra veg.	Terra vegetal
0	1bcA	0aA	0aA
1000	0cA	0aA	0aA
2000	4bA	2aAB	1aB
3000	1bcA	0aA	0aA
4000	8aA	2aB	0aB
AIB mg.L ⁻¹	Número de raízes		
	Vermiculita	Verm + Terra veg.	Terra vegetal
	Vermiculita	Verm + Terra veg.	Terra vegetal
0	3bA	0aA	0aA
1000	0bA	0aA	0aA
2000	2,25bA	4aA	1aA
3000	1,25bA	0aA	0aA
4000	7aA	8,5aB	0aB
AIB mg.L ⁻¹	Comprimento de raiz (cm)		
	Vermiculita	Verm + Terra veg.	Terra vegetal
	Vermiculita	Verm + Terra veg.	Terra vegetal
0	5,5bA	0aA	0aA
1000	0bA	0aA	0aA
2000	4,27abA	3,5aAB	3aB
3000	4,27bA	0aA	0aA
4000	3,53aA	6,65aAB	0aB

Médias seguidas de letras maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas são iguais entre si pelo teste de Tukey a 5%.

A concentração de 0,0 mg.L⁻¹ de AIB apresentou folhas vivas no substrato vermiculita e no substrato vermiculita + terra, e folhas vivas com raiz no substrato vermiculita, sugerindo que as mesmas apresentaram níveis endógenos de auxinas suficientes para induzir o enraizamento. No entanto, no substrato vermiculita a concentração de 4000 mg.L⁻¹ de AIB foi estatisticamente superior no número de folhas vivas e no número de folhas vivas com raiz. Para o número de raízes e o seu comprimento, este efeito ocorreu também na concentração de 2000 mg.L⁻¹. Estes resultados demonstram a necessidade de AIBA para complementar o teor endógeno de auxinas presente nas folhas.

Verifica-se que o substrato vermiculita induziu um maior número médio de folhas vivas na concentração de 4000 mg.l⁻¹ de AIB quando comparado com os demais substratos. Assim como o maior número de folhas vivas com raiz nas concentrações de 2000 e 4000 mg.l⁻¹, o maior número de raízes na concentração de 4000 mg.l⁻¹ e o maior comprimento de raiz nas concentrações de 2000 e 4000 mg.l⁻¹. Tal resultado reforça a teoria de que o substrato regula o suprimento de água e ar para as raízes, sendo a vermiculita importante por deixar o substrato mais leve, facilitando a formação do sistema radicular das estacas (Sganzerla, 1995).

Para o enraizamento de estacas foliares de violeta africana (*Saintpaulia ionantha*), Chen & Henny (2009) recomendam a aplicação de fitorreguladores. Mas estes autores não recomendam a aplicação de fitorreguladores para enraizamento de estacas foliares de *Zamioculcas zamiifolia*. No entanto, trabalho realizado Dinalli et al (2013) discorda dessa assertiva ao concluir que a aplicação de 1.000 ppm de IBA via gel é viável na propagação por estacas foliares de *zamioculcas*.

Constatou-se que a vermiculita sobressaiu aos demais substratos em todos os parâmetros analisados. O substrato formado apenas por terra vegetal foi o que demonstrou menor desempenho, pois apesar de manter as folhas vivas, durante o tempo de avaliação, não proporcionou o desenvolvimento do sistema radicular, exceto na concentração de 2000 mg.L⁻¹. Uma das explicações para o fato do mau desempenho pode ser encontrada no tipo de solo utilizado para a confecção do substrato, provavelmente devido a pouca presença de matéria orgânica, importante agente condicionante das estruturas físicas do solo.

Gonçalves et al (1991) estudando o efeito de diferentes substratos no enraizamento de estacas apicais e não apicais de *Rhipsalis elliptica* constataram que a vermiculita estava entre os melhores tratamentos. Em trabalho de enraizamento com Crisantemo (*Chrysanthemum morifolium* cv. Polaris), Takeyoshiet et al (1983), verificaram que a vermiculita proporcionou níveis satisfatórios de enraizamento, embora tenha exigido maior tempo para tal.

A vermiculita, por apresentar boa aeração e drenagem, elevada porosidade, com equilíbrio entre macro e microporos e alta capacidade de retenção de água (KÄMPF, 2000; HARTMANN et al., 2002), favoreceu o enraizamento da estaca foliar de *E. grandiflorum* mesmo na concentração de 0,0 mg.L⁻¹ de AIB, o que não aconteceu com o substrato vermiculita + terra vegetal e apenas terra vegetal.

Estes resultados estão de acordo com os de Smiderle & Minami (2001), segundo o qual não somente a água é necessária para as plantas, mas também o ar é importante para o crescimento radicular. Sendo assim, verifica-se a importância da escolha correta do substrato a ser utilizado para espécies ornamentais.

4.2. Experimento de micropropagação

As percentagens médias de explantes que emitiram brotações de *E. grandiflorum*, aos 60 dias de cultivo em diferentes ambientes e concentrações de sacarose estão apresentadas na Figura 1. Observa-se que ocorreu formação de brotações em todos os ambientes e concentrações estudadas.

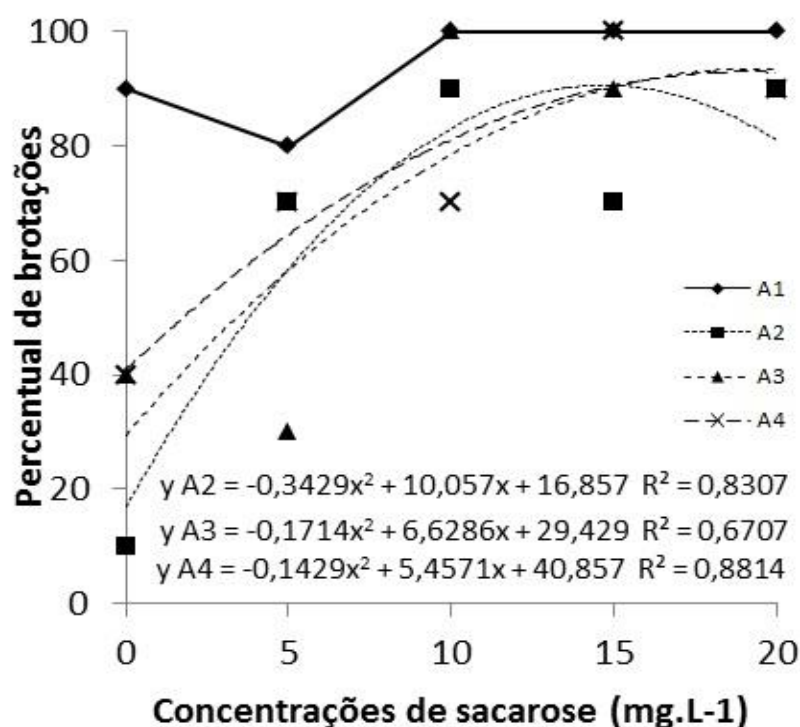


Figura 1. Percentual médio de explantes de lisianthus que emitiram brotações em diferentes ambientes de cultivo *in vitro* e concentrações de sacarose. CCA/UFPB, Areia – PB, 2014.

Observa-se interação entre ambientes e doses de sacarose no número de explantes que emitiram brotações. Para os ambientes sala de laboratório com luz artificial, sala de laboratório com luz natural e telado, observa-se comportamento quadrático a partir do aumento nas concentrações de sacarose com tendência a diminuição no ambiente sala de laboratório com luz artificial a partir da dose de 15 mg.L⁻¹. Apesar da falta de ajuste ao modelo de regressão, o ambiente 1 manteve-se sempre superior aos demais, apresentando 100% de brotações a partir da concentração de 10 mg.L⁻¹ de sacarose.

Quando se avalia a concentração de sacarose, a sua ausência levou a formação de brotações em todos os ambientes, sugerindo que essas condições favorecem o início do desenvolvimento fotoautotrófico dos explantes, embora no ambiente sala de crescimento tenha ocorrido em maior expressividade. Agra et al. (2009) encontraram resultados similares, ao estudarem a influência de ambientes e concentrações de sacarose na micropropagação de violeta africana em diferentes tempos de cultivo, concluíram que as concentrações de 10 e 20 mg L⁻¹ de sacarose possibilitaram um bom desenvolvimento de brotações, em sala de crescimento e em sala com luz artificial e temperatura ambiente.

O ambiente sala de laboratório com luz artificial foi quem menos favoreceu o desenvolvimento de explantes. Comparando com a sala de laboratórios com luz natural nas concentrações 0,0; 10 e 15mg L⁻¹ de sacarose, observa-se que o número de brotações foi maior nos explantes mantidos em sala de laboratório com luz natural. Kodym e Zapata-Arias (1999) afirmam que além dos reguladores de crescimento, a luz também influencia consideravelmente a taxa de multiplicação e o crescimento de explantes cultivados *in vitro*. Uma provável explicação para a elevação dessas taxas é que a intensidade de luz elevada poderia estar reduzindo as concentrações de auxinas endógenas das gemas através da fotoxidação, provocando um deslocamento do balanço hormonal em direção às citocininas (RADMANN et al., 2001; SOONTOUNCHAINAKSAENG et al., 2001).

Na Figura 2 estão as percentagens médias dos números de brotações por explantes de *lisianthus*, aos 90 dias de cultivo em diferentes ambientes e concentrações de sacarose, onde se observa que a maior porcentagem de números de brotações por explante ocorreu na sala de crescimento na concentração de 20,0 mg.L⁻¹.

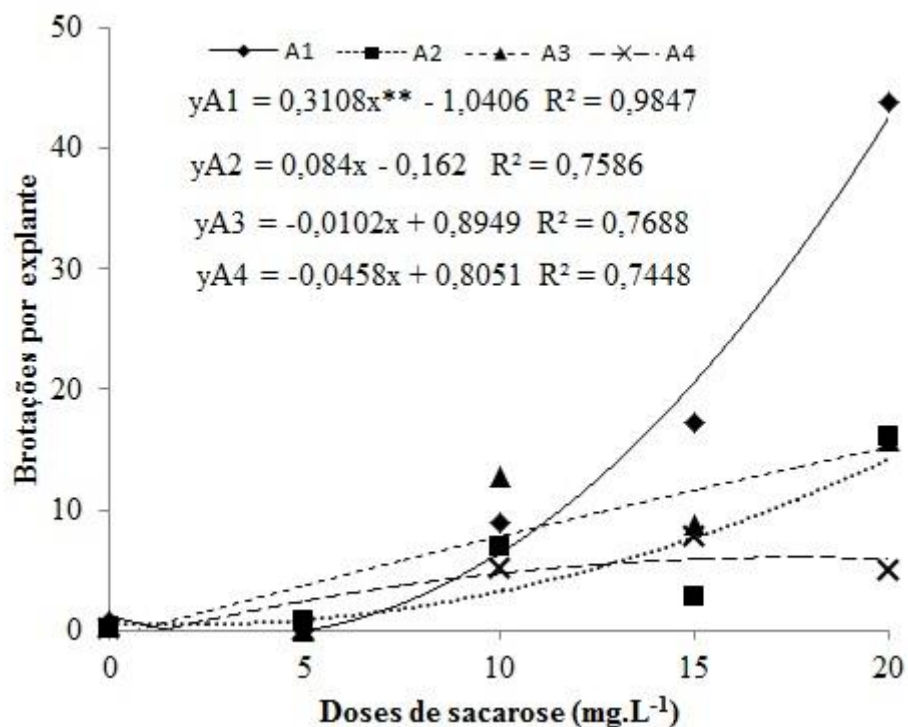


Figura 2. Percentual média do número de brotações por explantes em diferentes ambientes de cultivo *in vitro* e concentrações de sacarose. CCA/UFPB, Areia – PB, 2014.

Houve interação entre ambientes e doses de sacarose no número de brotações por explantes. O comportamento quadrático é observado em todos os ambientes, mas com tendência a diminuição na sala de laboratório com luz natural e no telado a partir da concentração de 20 mg.L⁻¹. O que não ocorre na sala de crescimento, pois neste ambiente foi a concentração que provocou expressivo número de brotações por explante.

Observa-se que na concentração de 10 e 15 mg.L⁻¹, o ambiente com luz natural foi superior ao ambiente com luz artificial, reforçando a ideia de que além dos reguladores de crescimento, a luz natural também influencia a taxa de multiplicação dos explantes *in vitro*.

No ambiente telado a concentração de 15 mg.L⁻¹ de sacarose proporcionou o maior número de brotos por explante, mostrando tendência a decair de acordo com a equação. Segundo Agra et al. (2009), a condição de luz nesse ambiente possibilitou, que os tecidos desenvolvidos no meio com uma menor concentração de sacarose, fotossintetizassem compensando a redução de sacarose do meio, fazendo com que o número de brotações fosse superior às desenvolvidas em concentrações superiores.

Em razão do custo/benefício e pelos dados de número de brotações por explante no ambiente telado, pode-se afirmar que a micropropagação de *E. grandiflorum* utilizando a concentração de 10 mg.L⁻¹ de sacarose no meio MS neste ambiente é possível. Segundo

Kodym e Zapata-arias (1999) a utilização de luz natural apresenta várias vantagens, como a eliminação dos gastos com luz artificial, redução dos custos de manutenção, instalações simplificadas, diminuindo os custos com construção e, durante a aclimatização o estresse causado à planta é menos intenso.

4.4. Experimento de aclimatização

Para a variável taxa de sobrevivência, a testemunha (sem AIB) apresentou 17,39% de sobrevivência. Segundo Centellas et al. (1999) há acúmulo de auxinas endógenas de origem foliar, fator que provavelmente contribuiu no enraizamento destas estacas. Uma vez que, a formação de raízes está relacionada com o acúmulo de auxinas endógenas, associado ao aumento da atividade metabólica do tecido (Wareing; Phillips, 1981).

No entanto esse valor é baixo, pois o melhor resultado foi obtido utilizando-se 0,54 mg.L⁻¹ de IBA, registrando-se 68% de sobrevivência das mudas de *E. grandiflorum* durante a aclimatização sob temperatura média no telado de 34,21°C, (Figura 2). Tal desempenho pode estar associado às características desse fito-regulador, que proporciona condições favoráveis para o melhor desenvolvimento das mudas, além do substrato e das condições favoráveis de umidade oferecidas.

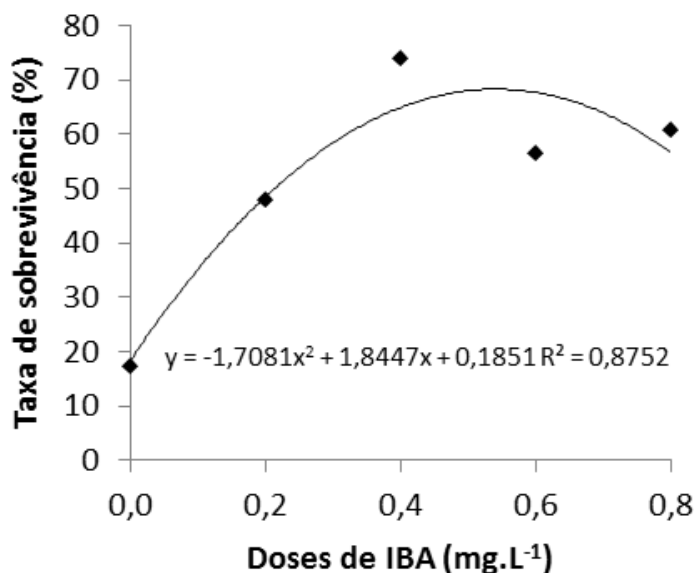


Figura 3. Média da taxa de sobrevivência de *E. grandiflorum* após 47 dias em aclimatização. CCA/UFPB, Areia – PB, 2014.

A partir da concentração de $0,54 \text{ mg.L}^{-1}$ de IBA a taxa de sobrevivência começa a diminuir até a concentração de $0,8 \text{ mg.L}^{-1}$ de IBA (Figura 2). Grattapaglia & Machado (1998) afirmam que o crescimento das raízes pode ser inibido pela presença de auxina. Estudos têm preconizado que o aumento da concentração de reguladores aplicados em plantas provoca efeito estimulador de raízes até certo nível, a partir do qual, concentrações maiores têm efeito inibitório (Fachinello et al., 1995), ou em outros casos fitotóxico, como o efeito observado de IBA. A atividade fisiológica das auxinas depende não apenas daquelas adicionadas ao meio, mas também do AIB no interior dos tecidos cultivados e da interação entre os dois (Pasqual et al., 2001).

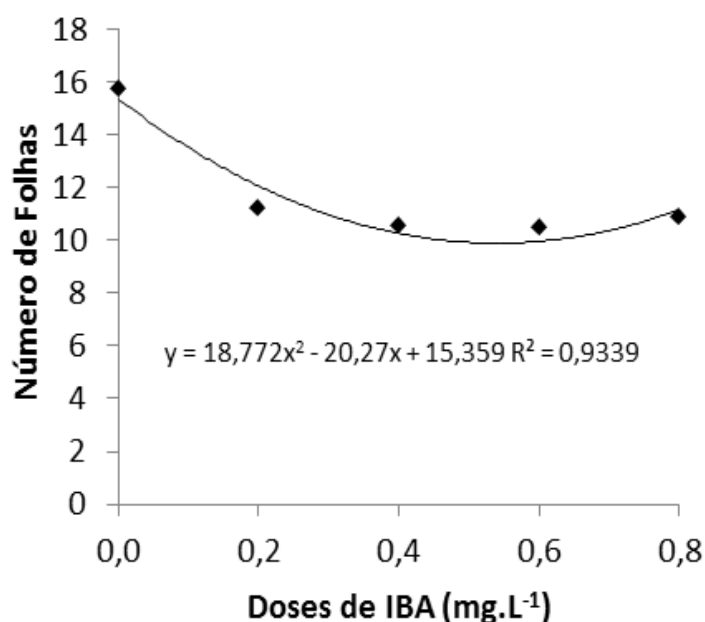


Figura 4. Média do número de folhas de *E. grandiflorum* após 47 dias em aclimatização. CCA/UFPB, Areia – PB, 2014.

O crescimento de uma plântula pode ser medido de várias maneiras, entre elas o número de folhas/planta e a altura da parte aérea, são duas variáveis importantes, inclusive em desenvolvimento em condições de telado. Embora o que se observa é que o número de folhas foi maior nas plantas provenientes do meio com ausência de AIB, não havendo diferença estatística com o aumento da concentração nos demais tratamentos. Assim como não houve diferença estatística em todos os tratamentos quando se avaliou a altura da parte aérea das plantas.

Costa (2003) lembra que o número de folhas nem sempre é um critério adequado para se estimar o crescimento vegetal, podendo ser muito variável em relação à idade da planta. Por sua vez, a área foliar revela a capacidade fotossintética, demonstrando o vigor da planta e sua capacidade de sobrevivência a campo (BAKKER, 1994).

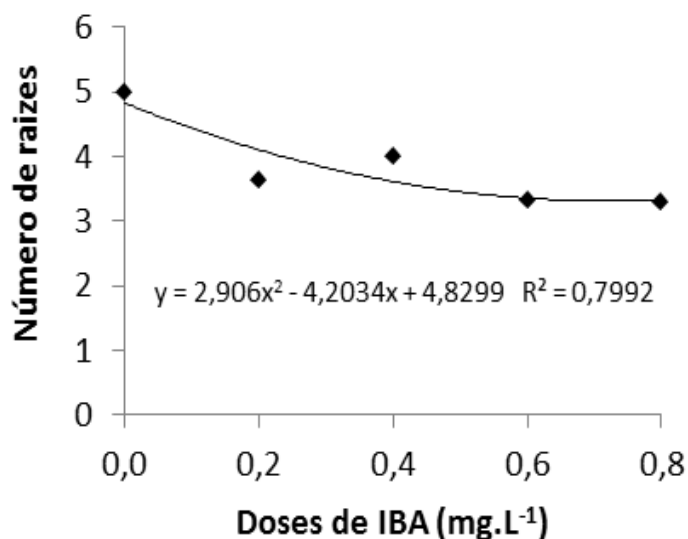


Figura 5. Média do número de raízes de *E. grandiflorum* após 47 dias em aclimatização. CCA/UFPB, Areia – PB, 2014.

O efeito quadrático também foi observado para o número de raízes, no entanto foi maior nas plantas provenientes do meio com ausência de AIB, decaindo progressivamente com o aumento das concentrações de AIB. Já Fukasawa et al (2003), avaliando o enraizamento de estacas apicais de ramo da begônia cv. Carneval, tratadas com IBA observou que, na formulação líquida, as estacas apresentaram 100% de enraizamento nos tratamentos com 500, 1000, 1500 e 2000 ppm.

As variáveis altura da parte aérea, comprimento de raiz e diâmetro do caule não se adequaram a nenhum modelo estatístico analisado, apresentando os seguintes valores médios 2,63 cm; 15,50 cm e 1,89 mm.

Em razão do custo/benefício e pela análise estatística de regressão pode-se atribuir que a concentração de 0,54 mg.L⁻¹ de IBA é a mais indicada para o enraizamento de brotos de *E. grandiflorum in vitro*. A diferença significativa encontrada em relação à testemunha mostra que o ganho de benefícios foi muito favorável sem indícios de fitotoxidez.

5. CONCLUSÕES

A estaca foliar de *E. grandiflorum* apresentou melhor desenvolvimento de raízes na concentração de 4000 mg.L⁻¹ de AIB tendo a vermiculita como o melhor substrato;

Verifica-se que apesar do surgimento de brotos em condições fotoautotróficas, o número de brotações foi maior em meio com a concentração mais elevada (20 mg.L⁻¹) de sacarose;

É possível o desenvolvimento satisfatório de *E. grandiflorum in vitro* em ambiente telado a partir da concentração de 10 mg.L⁻¹ de sacarose;

A concentração de 0,54 mg.L⁻¹ de IBA aumentou a taxa de sobrevivência das plantas na aclimatização das mudas.

6. REFERÊNCIAS

- A.H. (Ed.). **CRC Handbook of Flowering**. Florida: CRC Press, 1989. v. 6, p. 322-327.
- AGRA, P. F. M. **Fontes de irradiação e concentrações de sacarose no cultivo *in vitro* de violeta africana (*saintpaulia ionatha wendl*)**. 2006. 46f. Trabalho Graduação (Agronomia) – Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2006.
- AGRA, P. F. M.; SANTOS, M. S.; BARROS, H. M. M.; COSTA, C. M. G. R.; COSTA, N. P.; PERAZZO NETO, A. Influência de ambientes e concentrações de sacarose na micropropagação de violeta africana em diferentes tempos de cultivo. **Tecnologia & Ciência Agropecuária** [online], João Pessoa, v. 3, n. 3, p. 73-76, set. 2009.
- AGRIANUAL Flores**. São Paulo: FNP, 2001, 2003, 2004, 2005, 2006, 2007, 2008, 2009 (FNP Consultoria & Comércio). 236 p.
- ALTMAN, A. Plant biotechnology in the 21st century: the challenges ahead. **EJB Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v.2, n.2, p.51-55, 1999. Disponível em: <<http://www.ejb.org/content/vol2/issue2/full/1/>>. Acesso em: 15 de novembro de 2013.
- BACKES F. A. A. L.; BARBOSA J. G., BACKES R. L. E.; RIBEIRO J. M. O.; MORITA R. M. Produção de lisianthus (*Eustoma grandiflorum* Shinn.) em vaso sob diferentes densidades de plantas. **Acta Scientiarum Agronomy**. Maringá, v. 27, n. 2, p. 237-241, Apr./Jun., 2005.
- BACKES F. A. A. L.; BARBOSA J. G., CECON P. R., GROSSI J. A. S., BACKES R. L. E.; FINGER F. L. Cultivo hidropônico de lisianto para flor de corte em sistema de fluxo laminar de nutrientes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 11, p. 1561-1566, 2007.
- BAKKER, A. P. **Efeito do húmus de minhoca e da inoculação do fungo micorrízico arbuscular *Glomusma crocarpum* Tul. & Tul. sobre o desenvolvimento de mudas de cajueiro anão precoce (*Anacardium occidentale* L.)**. 1994. 60p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1994.
- BATALHA, M. O.; BUAINAIN, A. M. **Cadeias produtivas de flores e mel**. Brasília: IICA: MAPA/SPA, n. 2, 2007. 56 p.

CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de Tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa/ SPI/ CNPH, 1998. v,1, p,183-260.

CALVETE, E. O. Efeito do substrato na aclimatização *ex vitro* de morangueiro cv. Campinas, *Fragaria x ananassa* Duch. In: KÄMPF, A.N.; FERMINO, M.H. (Eds.). **Substrato para plantas**: a base da produção vegetal em recipientes. Porto Alegre: Genesis, 2000. p. 257-264.

CAMARGO M. S.; SHIMIZU, L. K.; SAITO, M., A.; KAMEOKA, C. H.; MELLO, S. C.; CARMELLO, Q. A. C.C. Crescimento e absorção de nutrientes pelo *Lisianthus* (*Eustoma grandiflorum*) cultivado em solo. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 1, p. 143-146, jan./mar. 2004.

CAMPOSTRINI, E.; OTONI, W.C. **Aclimatização de plantas**: abordagens recentes. Brasília, DF: ABCTP Notícias, CNPH/EMBRAPA, 1996. 12p.

CARMELLO Q. A. C. Crescimento e absorção de nutrientes pelo *lisianthus* (*Eustoma grandiflorum*) cultivado em solo. **Horticultura Brasileira**, v. 22 p. 143-146. 2004.

CAVASINI, R. **Inibidores de etileno na pós-colheita de lisianthus**. 2013. 107f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Horticultura). Universidade Estadual Paulista “Júlio De Mesquita Filho”, Botucatu, SP, 2013.

CENTELLAS, A. Q.; FORTES, G. R. L.; MÜLLER, N. T. G.; ZANOL, G. C.; FLORES, R.; GOTTINARI, R. A. Efeito de auxinas sintéticas no enraizamento *in vitro* da macieira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.34, n. 2, p. 181-186, 1999.

CHEN, J.; HENNY, R. J. Cultural Guidelines for Commercial Production of African Violets (*Saintpaulia ionantha*), University of Florida (IFAS Extension), 2009, p.1-4. Disponível em: < <http://edis.ifas.ufl.edu/ep360>>. Acesso em: 15 fev. 2013.

CID, L. P. B. **Micropropagação de lisianthus, uma alternativa viável para o agronegócio**. 2007. (Artigo em Hypertexto). Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2007_1/lisianthus/index.htm>. Acesso em: 30 jun. 2013.

COSTA, A. M. G. **Substrato e adubação mineral na formação de porta-enxerto de gravioleira (*Annona muricata* L.) em tubete**. 2003. 45f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2003.

DIGNART, S. L.; CASTRO, E. M.; BRAGA, F. T.; PASQUAL, M. Cultivo in vitro de *Catleia walkeriana* Gardn (Orchidaceae) em casa de vegetação. **Horticultura Brasileira**, v.23, n.2, p.616, ago. 2005. (Suplemento).

DINALI, R. P.; CASTILHO, R. M. M.; GAZOLA, R. de N.; CELESTRINO, T. de S.; GONZAGA, D. de A.; FERREIRA, A. F. A. Produção de mudas de *Zamioculcas zamiifolia* por estaca foliar. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**. João Pessoa, v.7, n.3, p.7-12, set. 2013.

ECKER, R.; BARZILAY, A.; OSHERENKO, E. The genetic relations between length of time to germination and seed dormancy in *lisianthus* (*Eustoma grandiflorum*). **Euphytica**, Netherlands, n. 80, p. 125-128, 1994.

ERIG, A. C; SCHUCH, M. W. Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural. **Ciência Rural**, Santa Maria-RS, v.35, n.4, p.961-965, jul./ago. 2005.

FACHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. C.; KERSTEN, E.; FORTES, G. R. L. **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado**. 2. ed. Pelotas: UFPel, 1995. 178 p.

FOX, R.. *Lisianthus*: a specialty cut flower. **Practical Hydroponics & Greenhouses**: 43-51. 1998

FUKASAWA, S. T., CAMPOS, D. V. A.; WADA, J. F.; LASCHI, D. **Efeito da Aplicação de IBA no Enraizamento de Begônia**. Botucatu-SP: UNESP, 2013.

GONÇALVES, A.L. recipientes, embalagens e acondicionamento de mudas de plantas ornamentais. In: MINAMI, K. (Ed.) **Produção de mudas de alta qualidade em horticultura**. São Paulo: T.A Queiroz, 1995. 18p.

GONÇALVES, A.L.; CATHARINO, E.L.M.; TOYOFUKU, R.A. Efeitos de diferentes substratos no enraizamento de estacas apicais e não apicais de *Rhipsalis selliptica* G.A. Lindberg, Cactaceae. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 8., 1991, Joinville. **Anais...** p.68.

GRATTAPAGLIA D; MACHADO MA. 1998. Micropropagação. In: TORRES AC; CALDAS LS; BUSO JA. (eds). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa p. 183-260.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A.C. et al. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, 1998. v.1, p.183-260.

GRIESBACH, R.J.; SEMENIUK P; ROH M; LAWSON RH. Tissue culture in the improvement of Eustoma. **Hortscience**, Alexandria, v. 23, n. 4, p. 790-791, 1988.

HALEVY, A. H.; KOFRANEK, A. M. Evaluation of lisianthus as a new flower crop. **HortScience**, Alexandria, VA, v. 19, n. 6, p. 845-847, 1984.

HANKINS, A. **Lisianthus (*Eustoma grandiflorum*), a new species for the cut flower market**. 2004. Disponível em: <www.ext.vt.edu/news/periodicals/commhort/2002-01-03.html> Acesso em: 6 jan. 2014.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES, F. T.; GENEVE, R. L. **Plant propagation: principles and practices**. 6. ed. New Jersey: Prentice Hall, 1997. p 549-622.

HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E. Plant propagation: principles and practices. 3.ed., **Engle Wood Cliffs**: Prentice-Hall, 1975. 662p.

HEMPEL, M. From micropropagation to microponics (part II). **Practical Hydroponics & Greenhouses**, May/June, p.17-20, 1994. Disponível em: <<http://members.ozemail.com.au/~mhempel/publications/mponic2.htm>>. Acesso em: 15 out. 2003.

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. **Dados Gerais do Setor de Floricultura do ano de 2012**. Disponível em: <<http://www.ibraflor.com/boletim.php>>. Acesso em: 12 jan. 2014.

JACKSON, M. B. Aeration stress in plant tissue cultures. **Bulgarian Journal of Plant Physiology**, Special issue, p. 96-109, 2003.

JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, M. S. Mercado interno para os produtos da floricultura brasileira: características, tendências e importância socioeconômica recente. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 14, n. 1, p. 37-52, 2008.

KÄMPF, A. N. Substrato. IN: KÄMPF, A.N. **Produção comercial de plantas ornamentais**. Guaíba: Agropecuária, 2000. p. 45-73.

KÄMPF, A.N. et al. **Floricultura**: técnicas de preparo de substratos. Brasília: LK, 2006. 132p.

KODYM, A.; ZAPATA-ARIAS, F.J. Natural light as an alternative light source for the *in vitro* culture of banana (*Musa acuminata* cv. 'Grande Naine'). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v.55, p.141-145, 1999.

KODYM, A.; ZAPATA-ARIAS, F.J. Natural light as an alternative light source for the *in vitro* culture of banana (*Musa acuminata* cv. 'Grande Naine'). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.55, n.2, p.141-145, 1998. Disponível em:

<<http://www.springerlink.com/content/l3990j3474114124>>. Acesso em: 06 jan. 2014.

KOZAI, T. et al. **Efficient production of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) propagules and transplants using single node leafy cuttings in closed systems with artificial lighting**. [Online]. Disponível em:

<http://www.mykz.affrc.go.jp/workshop/ws2000/proceedings/pdf/p106_kozai.pdf>. Acesso em: 20 out 2003.

KOZAI, T. Micropropagation under photoautotrophic conditions. In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H. (Eds). **Micropropagation-technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1991. p.447-469.

KOZAI, T. **Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation as a new propagation and transplant production system**. Dordrecht, The Netherlands: Springer, 2005, 315p.

KOZAI, T; KUBOTA, C. Developing a photoautotrophic micro propagation system for woody plants. **Journal of Plant Research**, Tokyo, v.114, p.525-537, 2001.

KRIKORIAN, A. D. Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. In: ROCA, W. R.; MROGINSKI, L. A. **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones**. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1991. p. 41-78.

KRIKORIAN, A. D. Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. In: ROCA, W. R.; MROGINSKI, L. A. **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones**. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1991. p. 41-78.

KUBOTA, C.; TADOKORO, N. Control of microbial contamination for large-scale photoautotrophic micropropagation. ***In vitro Cellular and Developmental Biology Plant***, New York, v.35, p.296-298, 1999.

KURATA, K.; KOZAI, T. (eds). **Transplant production systems**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1992. 299p.

LAJÚS, C. R.; SOBRAL, L. S.; BELOTTI, A.; SAVARIS, M.; LAMP E RT, S.; SANTOS, S. R. F.; KUNST, T. Ácido Indolbutírico no enraizamento de estacas lenhosas de figueira (*Ficus carica* L.). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.5, supl.2, p.1107-1109, 2007.

LEITZKE, L.N. **Micropropagação fotoautotrófica de amoreira-preta (*Rubus* spp.) e framboeseira (*Rubus idaeus* L.) com a utilização de luz natural**. 2007. 88f. Dissertação (Mestrado em Ciências)- Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, 2007.

LONE, A.B. et al. Efeito do AIB no enraizamento de estacas herbáceas do porta-enxerto de videira VR 43-43 em diferentes substratos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.31, n.3.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M. **Plantas ornamentais do Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras**. 2. ed. Nova Odessa: Plantarum, 1999. 1088 p.

LUCAS, M. A. K.; SAMPAIO, N.V.; KOHN, E.T.; SOARES, P. F.; SAMPAIO, T. G. Avaliação de diferentes composições de substratos para a aclimação de mudas de morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch). **Revista Cient. Rural**, Santa Maria-RS, v.8, n.1, p. 16-23, 2002.v

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

NASCIMENTO, T. M. do. **Estaquia foliar como método de propagação de sanseviérias (*Sansevieria trifasciata* e *Sansevieria* sp.)**. 2004. 91p. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) – Instituto Agrônômico Campinas, Campinas, 2004.

OHKAWA, K.; SASAKI, E. *Eustoma* (Lisianthus) – Its past, present, and future. **Acta Horticulturae**, Colômbia, n. 482, p. 423-426, 1999.

ONO, E. O.; RODRIGUES, J. D. **Aspectos da fisiologia do enraizamento de estacas caulinares**. Jaboticabal: FUNEP, 1996. p.599-604, 2010a.

PAIVA, P. D. de O. **Estabelecimento in vitro de estrelicia (*Strelitzia reginae* Ait.) e controle de oxidação com identificação dos compostos liberados no meio de cultura.** 1998. 84 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1998.

PASQUAL M; HOFFMANN A; RAMOS JD. 2001. **Cultura de tecidos - tecnologia e aplicações. Introdução: Situação e Perspectivas.** Lavras: UFLA/FAEPE. 72 p.

PIRES, E.J.P.; BIASI, L.A. Propagação da videira. In: POMMER, C.V. **Uva: tecnologia da produção, pós colheita e mercado.** Porto Alegre: Cinco Continentes, 2003. Cap.5, p.295-350.

ROH, M. S; HALEVY A. H; WILKINS H. F. *Eustoma grandiflorum*. In: HALEVY A.H. (Ed.). **Handbook of Flowering.** Florida: CRC Press, 1989. p. 322-327.

RUGGIERO, C. **Maracujá.** Ribeirão Preto: Legis Summa, 1987. 246p.

SALVADOR, E. D. **Caracterização física e formulação de substratos para o cultivo de algumas ornamentais.** 2000. 148 f. Tese (Doutorado em Agronomia)- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2000.

SGANZERLA, E. **Nova agricultura: a fascinante arte de cultivar com os plásticos.** 5.ed. Porto Alegre: Guaíba Agropecuária, 1995. 342 p.

SMIDERLE, O. S.; MINAMI, K. Emergência e vigor de plântulas de goiabeira em diferentes substratos. **Revista Científica Rural**, Bagé, v. 6, n. 1, p. 38-45, 2001.

SOARES, M. P. **Verdes urbanos e rurais: orientação para arborização de cidades e sítios campestres.** Porto Alegre: Cinco Continentes, 1998. 242 p.

SOONTORNCHAINAKSAENG, P.; CHAICHAROEN, S.; SIRIJUNTARUT, M.; KRUATRACHUE, M. *In vitro* studies on the effect of light intensity on plant growth of *Phaiustanker villiae* (Banks ex L' Herit) Bl. And *Vanda coerulea* Giff. **Science Asia**, [S.l.], v. 27, p. 233-237, 2001.

SOUZA, F. V. D. et al. Aclimatização. In: SOUZA, A. da S.; JUNGHANS, T. G. **Introdução à micropropagação de plantas.** Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. p. 131-140.

- SRISKANDARAJAH, S.; MULLINS, M. G.; NAIR, Y. Induction of adventitious rooting *in vitro* in difficult to propagate cultivars of apple. **Plant Science Letters**, Limerick, v.24, p.1-9, 1982.
- STANDAERT DE METSENAERE, R.E.A. Economic considerations. In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H. (Eds). **Micropropagation**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1991. p.131-140.
- STARMAN, T.W. Lisianthus growth and flowering responses to uniconazole. **Hortscience**, Alexandria, v. 26, n. 2, p. 150-152, 1991.
- TAGLIACOZZO, G.M.D. Fitormônios e seus efeitos biológicos *in vitro* e *in vivo*. In: TOMBOLATO, A.F.C.; COSTA, A.M.M. (eds.) **Micropropagação de plantas ornamentais. Campinas: Instituto Agrônomo**, 1998. 72 p. (Boletim Técnico, 174).
- TAKEYOSHI, N.I.; ANRAKU, R.N.; MINAMI, K.; LIMA, A.M.L.P. Efeitos de diversos substratos no enraizamento de estacas de *Chrysanthemum morifolium* cv. Polaris. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 4., 1983, Rio de Janeiro, **Anais...** Brasília: EMBRAPA, Departamento de Difusão de Tecnologia, 1984. p. 137-142.
- TAKEZAKI A, FUJINO, M., NONAKA M., KAWASHIMA, H., MORI A. The effects of temperature treatments on stem length of *Eustoma grandiflorum*. **Acta Horticulturae**, Local, v. 515, p. 151-157, 2000.
- TOLEDO, A.R.M. 1992. **Efeitos de substratos na formação de mudas de laranjeira (Citrus sinensis (L.) Osbeck cv. Pêra Rio) em vaso**. 1992. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1992.
- TOMBOLATO, A. F. C. Cultivo comercial de violeta-africana. **Boletim técnico do Instituto Agrônomo**, Campinas, n. 140, jan. 1993.
- TOMBOLATO, A. F. C.; COSTA, A. M. M. Micropropagação de plantas ornamentais. **Boletim Técnico do Instituto Agrônomo**, Campinas, n. 174, p. 58-62, maio 1998.
- TOMBOLATO, A.F.C; COSTA, A.M.M. **Micropropagação de plantas ornamentais**. Campinas: Instituto Agrônomo, 1998. (Boletim Técnico 174).

VILLALOBOS, V. M.; THORPE, T. A. Micropropagación: concepto, metodología y resultados. In: ROCA, W. M.; MROGISNKI, L. A. (ed.). **Cultivo de tejidos en la agricultura**: fundamentos y aplicaciones. Cali: CIAT, 1991. cap.6, p.127-142.

WAREING, P. F.; PHILLIPS, I. D. J. **Growth and differentiation in plants**. 3. ed. Oxford, England: Pergamon Press, 1981. 343 p.

7. APÊNDICES



Apêndice A - Experimento 1: Propagação por estaca foliar de Lisianthus (*E. grandiflorum*)



Apêndice B - Experimento de micropropagação fotoautotrófica de lisianthus (*E. grandiflorum*)



Apêndice C - Experimento de aclimatização de lisianthus (*E. grandiflorum*)