



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

SÉRGIO PEDRO JUNIOR

**ESTABELECIMENTO *IN VITRO* E ACLIMATIZAÇÃO DE
ACTINOCEPHALUS POLYANTHUS (BONG.) SANO**

Londrina
2024

SÉRGIO PEDRO JUNIOR

**ESTABELECIMENTO *IN VITRO* E ACLIMATIZAÇÃO DE
ACTINOCEPHALUS POLYANTHUS (BONG.) SANO**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Tadeu de Faria.
Coorientador: Prof. Dr. Cristiano Medri.

Londrina
2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de
Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Junior, Sérgio Pedro.

ESTABELECIMENTO in vitro E ACLIMATIZAÇÃO DE *Actinocephalus polyanthus* (BONG.) SANO / Sérgio Pedro Junior. - Londrina, 2024.
53 f. : il.

Orientador: Ricardo Tadeu de Faria.

Coorientador: Cristiano Medri.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina,
Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2024.
Inclui bibliografia.

1. Micropropagação - Tese. 2. Domesticação - Tese. I. Tadeu de Faria, Ricardo.
II. Medri, Cristiano. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências
Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. IV. Título.

CDU 63

SÉRGIO PEDRO JUNIOR

**ESTABELECIMENTO *IN VITRO* E ACLIMATIZAÇÃO DE
ACTINOCEPHALUS POLYANTHUS (BONG.) SANO**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em agronomia.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Tadeu de faria
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Ana Ligia Giraldeli
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Dr. Rodrigo Thibes Hoshino
EMBRAPA

Londrina, 27 de Fevereiro de 2024.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Maria tereza Alves de Mira e Sérgio Pedro por sempre acreditarem nos meus sonhos e me ajudarem nesta jornada de todas as formas possíveis e impossíveis.

Agradeço também ao meu orientador Ricardo Tadeu de Faria por acreditar na importância e relevância desta dissertação para o mercado de flores nacional e internacional, bem como para a conservação da flora brasileira. Ao meu coorientador Cristiano Medri por todos os ensinamentos à campo e também em laboratório.

Aos meus amigos de pós-graduação Débora, Jean, Gabriel e Bruno por todo o apoio durante todo o experimento, desde o momento da delimitação até as análises após a aclimatização das plantas, bem como aos estagiários Leonardo, Maria e Vivian e ao bolsista Geraldo por estarem sempre presentes quando se fizeram necessários.

Por ultimo agradeço à UEL pela disponibilização do espaço para a realização dos experimentos presentes nesta dissertação, bem como a CAPES/CNPQ pela bolsa recebida.

RESUMO

PEDRO JUNIOR, Sérgio. **Estabelecimento *in vitro* por sementes e aclimatização de *Actinocephalus polyanthus* (Bong.) Sano**. 2024. 53p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2024.

Actinocephalus polyanthus (Bong.) Sano é uma planta endêmica do Brasil com grande potencial para a floricultura e o paisagismo devido a beleza exuberante de seus escapos florais. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um protocolo de estabelecimento *in vitro* por sementes para *A. polyanthus*, analisando a germinação e o crescimento inicial das plântulas *in vitro* em dois meios de cultura e suas diferentes concentrações, além de definir o melhor substrato e iluminação para a sobrevivência das plântulas durante a aclimatização em casa de vegetação. Escapos florais foram coletadas no município de Ortigueira, Paraná, Brasil, e levados ao laboratório de análise de sementes da Universidade Estadual de Londrina (UEL), onde foram beneficiadas e caracterizadas quanto ao teor de água e viabilidade pelo teste do tetrazólio e teste de germinação. Para os experimentos de germinação e crescimento inicial, foram utilizados dois meios de cultura para cultivo *in vitro*, sendo eles meio WPM e meio MS; ambos foram formulados em diferentes concentrações (0, 25, 50, 75 e 100%), totalizando 9 tratamentos e utilizando-se quatro repetições de 50 sementes por tratamento no experimento de germinação e cinco repetições com 10 plântulas por frasco no experimento de crescimento inicial. Para o experimento de aclimatização, utilizou-se como tratamento quatro substratos diferentes (areia lavada, Carolina Soil®, vermiculita e uma mistura de 1:1:1 dos três substratos citados anteriormente); e duas estufas, sendo uma com sombrite de 50% e uma sem sombrite. Para o teste de germinação, o meio WPM com 75% foi superior aos demais em quase todos os parâmetros, menos o TMG, onde o meio ágar-água teve uma melhor resposta. No experimento de crescimento inicial, o meio MS se mostrou superior ao WPM em todos os dados analisados, exceto número de raízes, possuindo também diferença também nas concentrações de sais, sendo o meio MS100% superior aos demais em quase todos os parâmetros, sendo assim recomendado para esta fase da micropropagação. Na fase de aclimatização, a estufa com sombreamento de 50% se mostrou mais efetiva, quando analisado a taxa de sobrevivência das plântulas; e os substratos areia lavada, Carolina Soil® e a mistura foram efetivos para a aclimatização com taxa de sobrevivência superior à 75%. O cultivo *in vitro* de *A. polyanthus* é viável sendo observado taxa de germinação das sementes de 95% no meio WPM100% e no WPM 95% e crescimento rápido das plântulas no meio MS100%. A aclimatização da espécie é possível em casa de vegetação com sombrite e em areia lavada com taxa de sobrevivência de 100%.

Palavras-chave: Domesticação; Germinação; Propagação; Sempre-viva.

ABSTRACT

PEDRO JUNIOR, Sérgio. *In vitro* establishment by seed and acclimatization of **Actinocephalus polyanthus (Bong.) Sano**. 2024. 53 p. Dissertation (Master's degree in Agronomy) - Agricultural Sciences Center, State University of Londrina, Londrina, 2024.

Actinocephalus polyanthus (Bong.) Sano is an endemic plant of Brazil with great potential for floriculture and landscaping due to the exuberant beauty of its floral scapes. The aim of this work was to develop an *in vitro* establishment protocol for *A. polyanthus*, analyzing the germination and initial growth of the seedlings in different culture media and their different concentrations, as well as defining the best substrate and lighting for the greatest survival of the seedlings during acclimatization in the greenhouse. Flower scapes were collected in the municipality of Ortigueira, Paraná - BR and taken to the seed analysis laboratory at the State University of Londrina (UEL), where they were processed and characterized for water content and viability using the tetrazolium test and germination test. For the germination and initial growth experiments, two culture media were used for *in vitro* cultivation: WPM medium and MS medium, both formulated in different concentrations (0, 25, 50, 75 and 100%), totaling 10 treatments and using four replicates of 50 seeds per treatment in the germination experiment and five replicates with 10 seedlings per flask in the initial growth experiment. For the acclimatization experiment, four different substrates (washed sand, Carolina Soil®, vermiculite and a 1:1:1 mixture of the three substrates mentioned above) and two greenhouses were used, one with 50% shade and one without. For the germination test, the 75% WPM medium proved to be superior to the others in almost all parameters, except TMG, where the agar-water medium had a better response. In the initial growth experiment, the MS medium proved to be superior to the WPM medium in all the data analyzed, except for the number of roots, which also differed in the salt concentrations. The MS100% medium was superior to the others in almost all the parameters and is therefore recommended for this stage of micropropagation. In the acclimatization phase, the greenhouse with 50% shading proved to be more effective when analyzing the survival rate of the seedlings and the substrates washed sand, Carolina Soil® and the mixture were effective for acclimatization with a survival rate of over 75%. The *in vitro* cultivation of *A. polyanthus* is viable, with a seed germination rate of 95% being observed in the WPM100% and WPM 95% mediums and rapid growth of the seedlings in the MS100% medium. The species can be acclimatized in a greenhouse with shade and in washed sand with a survival rate of 100%.

Key-words: Domestication; Germination; Propagation; Evergreen.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – (A) Haste floral de *A. polyanthus* com frutos e sementes maduras no Morro da Pedra Branca, Ortigueira/PR. (B) Mapa do Brasil com indicação do local de coleta de todos os indivíduos de *A. polyanthus* presentes no herbário online reflora (REFLORA, 2024) 12
- Figura 2** – (A) Mapa do Paraná-BR com círculo marcando a localização do Morro da Pedra Branca em Ortigueira. (B) Foto no platô do Morro da Pedra branca 21
- Figura 3** – Fases do beneficiamento das sementes de *Actinocephalus polyanthus* (Bong.) Sano. (A) Capítulo floral de *Actinocephalus polyanthus* após serem retiradas da umbela. (B) Capítulos florais após processo de fricção, passagem pela peneira e sopragem. (C) Capítulos após processo de fricção, passagem pela peneira e sopragem visto em microscópio estereoscópico. (D) Sementes totalmente beneficiadas após separação das impurezas 22
- Figura 4** – Semente de *Actinocephalus polyanthus* cortada no eixo longitudinal apresentando embrião de coloração avermelhada após o teste do tetrazólio, indicando semente viável 22
- Figura 5** – (A) Frasco de 250ml contendo 50ml de meio de cultura e 50 sementes por frasco no dia da instalação do experimento. (B) Frasco com 50ml de meio de cultura e 50 sementes germinadas após 30 dias de instalação do experimento. (C) Experimento instalado na sala de crescimento do laboratório de cultura de tecidos vegetais na UEL. (D) Planta após período de 60 dias de crescimento inicial no meio MS 100% da concentração de sais. 24
- Figura 6** – Aclimatização de *Actinocephalus polyanthus* (Bong.) Sano após 90 dias de cultivo in vitro. (A) Sistema de aclimatização de *A. polyanthus* no dia instalação do experimento onde é possível observar a utilização de saco de polietileno para manutenção da umidade relativa do ar; (B) Experimento instalado na estufa sem sobrite 27

- Figura 7** – Plântulas de *Actinocephalus polyanthus* (Bong.) Sano após 60 dias de crescimento *in vitro* em cinco meios de cultura: MS 0%, MS 25%, MS 50%, MS 75% e MS 100% das concentrações de sais. 33
- Figura 8** – Diferentes meios de cultura WPM (cor laranja) e MS (cor azul) em diferentes concentrações de sais (0, 25, 50, 75 e 100%) em parâmetros de crescimento. A) Comprimento da parte aérea (CPA). B) Diâmetro da roseta (DR). C) Comprimento da maior folha (CMF) e D) número de folhas vivas (NFV)..... 34

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Germinação (%GERM), Índice de velocidade de germinação (IVG), Tempo médio de germinação(TMG) e Primeira contagem (PC) de sementes de *Actinocephalus polyanthus* germinadas *in vitro* em diferentes meios de cultura 28
- Tabela 2** – Germinação (%), Índice de velocidade de germinação, tempo médio de germinação (dias) e primeira contagem (%) de *Actinocephalus polyanthus* germinadas *in vitro* após 30 dias em dois meios de cultura (MS e WPM) em cinco concentrações de sais diferentes (0, 25, 50, 75 e 100%)..... 29
- Tabela 3** – Comprimento da parte aérea (CPA), Comprimento da maior raiz (CMR), Diâmetro da roseta (DR), número de folhas (NF), número de raízes (NR), número de folhas vivas (NFV) e o comprimento da maior folha (CMF) de plântulas de *Actinocephalus polyanthus* após 90 dias de crescimento inicial *in vitro* 30
- Tabela 4** – Comprimento da parte aérea (CPA), Comprimento da maior folha (CMF), Diâmetro da roseta (DR), número de folhas (NF), número de raízes (NR), número de folhas vivas (NFV) e o comprimento da maior raiz (CMR) de plântulas de *Actinocephalus polyanthus* (Bong.) Sano, após 90 dias de crescimento inicial *in vitro* em dois meios de cultura MS e WPM e em cinco concentrações de sais. 31
- Tabela 5** – Porcentagem de sobrevivência de mudas de *Actinnocephalus polyanthus* (Bong.) Sano após 30 dias de aclimatização em casa de vegetação em diferentes substratos (areia lavada, vermiculita, Carolina Soil e uma mistura de 1:1:1 dos 3 substratos citados anteriormente) e dois tipos de sistema de iluminação (sombrite 50% e sol pleno)..... 35

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	06
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	09
2.1	Plantas nativas na floricultura e no paisagismo	09
2.2	Sempre-vivas	10
2.3	Cultura de tecidos	12
2.3.1	Estabelecimento <i>in vitro</i>	13
2.3.2	Aclimatização	15
3	ARTIGO	17
3.1	Introdução	19
3.2	Material e métodos	20
3.2.1	Experimento de germinação	23
3.2.2	Experimento de crescimento inicial	25
3.2.3	Experimento de aclimatização	26
3.3	Resultados e discussão	27
3.4	Conclusão	36
4	CONCLUSÃO	37
	REFERÊNCIAS	38
	ANEXOS	46
	ANEXO A - Teste físico de solo realizado no Morro da Pedra Branca, Ortigueira- PR	47
	ANEXO B - Teste químico de solo realizado no Morro da Pedra Branca, Ortigueira- PR	48

INTRODUÇÃO GERAL

A família Eriocaulaceae possui cerca de 1200 espécies em 10 gêneros, distribuídas nas Américas, especialmente na América do Sul, com apenas uma espécie ocorrendo na Europa. Levando em conta somente o Brasil, são 8 gêneros e aproximadamente 630 espécies, ocorrendo em todos os domínios fitogeográficos, mas com centro de distribuição nos estados de Minas Gerais, Bahia e Goiás (SANO et al, 2015).

Actinocephalus polyanthus (Bong.) Sano é uma espécie endêmica do Brasil e possui grande potencial no comércio de flores secas e também do paisagismo. Está distribuída nos biomas Cerrado, Mata atlântica e Pampas, e é encontrada nos estados da Bahia, Goiás, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina (REFLORA, 2024)

Sabendo-se que a espécie apresenta um alto potencial para uso ornamental e que só ocorre em determinadas regiões do país, faz-se necessário conhecer sobre os seus métodos de propagação. Todavia, para a maioria das espécies incluindo *A. polyanthus*, não há metodologia estabelecida para a sua reprodução.

Deste modo, as plantas ou flores para a comercialização são obtidas de forma extrativista, o que pode levar a drástica redução nas populações em seu habitat, já que os escapos florais são coletados antes da maturação das sementes, fator que afeta a propagação natural da espécie. Este processo pode, ainda, causar erosão genética, pois, normalmente, as plantas são removidas inteiras e ocorre seleção dos indivíduos mais robustos para a extração.

Considerando todos os riscos decorrentes do extrativismo predatório, a valorização do potencial ornamental da flora brasileira, a mais biodiversa do planeta com, aproximadamente, 17% das espécies vegetais, e o crescente interesse paisagístico pelas sempre-vivas, torna-se relevante e urgente a realização de pesquisas que viabilizem a conservação e a produção de mudas em larga escala, podendo assim ser utilizadas para recompor áreas devastadas e para atender as demandas do comércio paisagístico nacional e internacional, justificando, assim, a necessidade do estabelecimento de protocolos para propagação dessas espécies.

A partir do desenvolvimento da cultura de tecidos vegetais no século passado, obteve-se maiores avanços na obtenção de mudas para comercialização de espécies ornamentais. Um dos motivos são as vantagens que a técnica possui, como

a obtenção de elevado número de plantas em curto período e espaço reduzido e a qualidade fitossanitária das mudas. Ultimamente, a técnica tem sido aplicada com sucesso em pesquisas com espécies nativas com potencial comercial e/ou passíveis de extinção, já que além da produção de mudas, o cultivo *in vitro* também é uma ferramenta para estudos de conservação, uma vez que possibilita a minimização das coletas de plantas em seu habitat, preservando as populações naturais, principalmente, as nativas ornamentais.

No entanto, estudos referentes ao cultivo *in vitro* de espécies do gênero *Actinocephalus* objetivando a conservação *ex-situ* ou a produção de mudas para comercialização ainda são escassos. Existem protocolos já estabelecidos para outros gêneros da família Eriocaulaceae, como para *Comanthera* e *Paepalanthus*, porém, são necessários ajustes dos protocolos para cada espécie visando a otimização da multiplicação e a redução no tempo necessário para a obtenção de mudas vigorosas e de qualidade, não deixando de considerar características peculiares de cada espécie envolvendo sua reprodução, crescimento e desenvolvimento.

Para a elaboração de protocolos de propagação *in vitro* e de micropropagação, a primeira etapa é o estabelecimento da cultura *in vitro* através de propagulos, podendo ser meristemas, células e, no caso deste trabalho, sementes. O uso destas últimas é recomendado para espécies nativas e/ou em risco de extinção ou que possuam sementes muito pequenas, características encontradas em *A. polyanthus*.

Para que o estabelecimento ocorra de forma correta, algumas características precisam ser estudadas, entre elas qual meio de cultura utilizar e quais seriam as melhores concentrações destes meios para sua germinação e seu crescimento. Dentre os meios mais estudados para espécies ornamentais da família Eriocaulaceae, destacam-se o MS (MURASHIGE & SKOOK, 1962) e o Woody Plant Medium (WPM) (LLOYD & McCOWN, 1980), ambos utilizados nesta dissertação.

A aclimatização, processo de transplântio para a casa de vegetação, e última fase na micropropagação é uma das etapas mais críticas para o cultivo de plantas *in vitro* e pode inviabilizar a produção de mudas pela técnica, devido a não sobrevivência durante este período.

Dentre os fatores que mais afetam a sobrevivência de mudas em processo de aclimatização podemos citar a taxa de irradiância de fótons (iluminação)

e o substrato ao qual foram transplantadas. A iluminação pode causar desidratação, devido a presença de cutículas mais finas nas folhas logo após a saída do laboratório, bem como aumento da taxa de evapotranspiração, além de parâmetros fotossintéticos menores, devido a presença de folhas mais delgadas e estômatos muitas vezes não funcionais.

O substrato por sua vez também pode influenciar o sucesso da aclimatização. Diminuindo a taxa de mortalidade na saída das plantas do laboratório para as condições ambientais, e influenciando devido a sua composição, similaridade com o ambiente de ocorrência natural, retenção de água e pH.

Sendo assim o presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um protocolo de estabelecimento *in vitro* para *Actinocephalus polyanthus* (Bong.) Sano, analisando sua germinação e crescimento inicial, bem como identificar o melhor substrato e iluminação para a aclimatização das plantas em casa de vegetação.

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 PLANTAS NATIVAS NA FLORICULTURA E NO PAISAGISMO

O uso de plantas ornamentais acompanha a humanidade desde a antiguidade. Antigas civilizações já selecionavam espécies com características peculiares para cultivá-las pelo prazer estético. No Brasil, a utilização em larga escala de plantas com função ornamental desenvolveu-se tardiamente. No período colonial, não havia arborização urbana e o cultivo de pequenos jardins limitava-se a utilização de plantas utilitárias, alimentícias e medicinais. No Brasil império, jardins mais elaborados começaram a serem implantados, mas com estética inspirada em jardins europeus (HEIDEN, 2006).

De acordo com HOEHNE (1930), desde a época colonial observou-se no paisagismo brasileiro o uso de plantas oriundas de outras regiões em detrimento das espécies nativas. O jovem Roberto Burle Marx, que viria a se tornar o mais importante paisagista do Brasil, realizou uma viagem para a Alemanha para realizar estudos estéticos e botânicos. Percebeu em sua viagem que os europeus apreciavam e cultivavam espécies vegetais brasileiras como verdadeiras joias de beleza e raridade. Retornando ao Brasil, Burle Marx passou a pesquisar e testar intensamente as espécies vegetais brasileiras no paisagismo, observando e recriando, inclusive, as associações em que ocorrem na natureza (TABACOW, 1996).

O paisagismo com espécies exóticas (alóctones) contribui para a uniformização das paisagens, contaminação biológica, empobrecimento da biodiversidade e para o desaparecimento de relações ecossistêmicas e funções ecológicas; enquanto o uso de espécies nativas (autóctones) contribui para a valorização e conservação da flora local, manutenção de funções ecológicas e relações ecossistêmicas e para o reforço das identidades regionais. Além disso, a inserção de plantas nativas com potencial ornamental na cadeia produtiva e sua disponibilização para a comercialização representam um diferencial em um mercado altamente competitivo, ávido por novidades e com tendência a tornar-se cada vez mais inclinado a produtos que não geram impacto ambiental (ZILLER, 2001; HEIDEN, 2007).

Apesar do trabalho exaustivo de Burle Marx para valorização da flora nativa, o paisagismo no Brasil ainda prioriza o uso de plantas exóticas em detrimento das nativas, com desperdício e desvalorização da nossa flora, a mais biodiversa no mundo, correspondendo a 17% de toda biodiversidade vegetal do planeta, sendo considerado o país da megadiversidade com 15 a 20% das espécies do planeta e 43.660 espécies de plantas (MYERS *et al.*, 2000; REFLORA, 2024).

Essa potencialidade, por outro lado, tem sido mais bem aproveitada em outros países, nos quais instituições de pesquisa, produtores, paisagistas e jardineiros amadores promoveram a popularização, a propagação comercial e o cultivo de inúmeras espécies ornamentais da flora brasileira, ausentes dos jardins nacionais (FISCHER *et al.*, 2007; BECKMANN-CAVALCANTE *et al.*, 2013).

No Brasil, são escassos os trabalhos visando à elaboração de inventários da flora ornamental nativa e à organização de bancos de germoplasma de espécies que demonstrem potencial para esse fim. Assim, é de extrema relevância a ampliação dos esforços nacionais em busca da prospecção do potencial ornamental da flora brasileira, visando aumentar a utilização destas plantas em jardins públicos e privados brasileiros. Para tanto, estabelecer um conjunto de características ornamentais desejáveis é o primeiro passo no desenvolvimento de uma estratégia de introdução de uma nova planta para cultivo (O'BRIEN, 1996; HEIDEN *et al.*, 2006).

Além disto, informações que contribuam para a domesticação de espécies nativas potencialmente ornamentais, como desenvolvimento de métodos e protocolos de propagação em larga escala, são cruciais para a inserção destas plantas na cadeia produtiva e utilização em jardins (BECKMANN-CAVALCANTE *et al.*, 2013; DA SILVA *et al.*, 2022).

1.2 SEMPRE-VIVAS

Plantas denominadas “sempre-vivas” como é o caso de *Actinocephalus polyanthus* (Bong.) Sano, se caracterizam por apresentarem inflorescências com pouca alteração após o processo de colheita e secagem, garantindo assim alta durabilidade das hastes. Esta característica é de grande interesse, tanto para o mercado de flores de corte como para o mercado de decoração de interiores, sendo encontradas espécies principalmente nas famílias Eriocaulaceae, Poaceae, Xyridaceae e Rapateaceae (PRUDENTE *et al.*, 2015).

Os escapos florais e as inflorescências de sempre-vivas são economicamente importantes, e, em algumas regiões do Brasil, são a única fonte de renda das comunidades locais. Porém, por não serem espécies cultivadas, o comércio se baseia em plantas coletadas dos ambientes de ocorrência natural (*in situ*) de forma extrativista, não levando em consideração aspectos de manejo e questões ecológicas e de conservação destas espécies (DUARTE, 2020).

Outra questão a se pontuar é que a extração, para este grupo, é realizada antes da completa formação do fruto, conseqüentemente, afetando a reprodução, já que não ocorre a dispersão das sementes, fator que faz com que este grupo de plantas seja um dos com mais representantes na lista vermelha de espécies ameaçadas de extinção (GIULIETTI *et al.*, 2012; TANNURE, 2013). O extrativismo de sempre-vivas foi relatado pelo instituto Terra Brasilis em 1999 como tendo início em 1930 na cidade de Diamantina, em Minas Gerais, e estava associado a moradores de povoados da região como fonte de renda para subsistência, onde a fonte principal de renda era a mineração. O auge da exploração se deu entre as décadas de 1970 e 1980, momento em que o mercado internacional ansiava por flores secas, sendo os principais países que importavam estas plantas o Japão, Estados Unidos da América e alguns países da Europa (SATURNINO *et al.*, 1977; GIULIETTI *et al.*, 1987; COSTA *et al.*, 2008).

Apesar da importância econômica, ecológica e social da exploração das sempre-vivas, ainda é baixo o conhecimento destas plantas, tanto em relação a sua ecologia, como em relação à sua biologia reprodutiva e os efeitos do extrativismo nestas populações. Durante as pesquisas para este trabalho, por exemplo, não foram encontrados relatos científicos acerca da propagação da espécie em questão, sendo essa informação fundamental para o manejo correto e sustentável, bem como para o cultivo da espécie (BEDÊ, 2006, LIMA *et al.*, 2021).

A família Eriocaulaceae possui cerca de 1200 espécies distribuídas em 10 gêneros, ocorrendo, principalmente, na América do Sul. Levando em conta somente o Brasil, a família é representada por 8 gêneros que constituem 632 espécies, sendo uma das mais representativas na flora brasileira (FORZA, 2010; GIULIETTI *et al.*, 2014); e amplamente distribuída por todas as regiões do Brasil, sendo encontrados representantes nativos em todos os estados brasileiros e em todos os domínios fitogeográficos, possuindo maior número de indivíduos nos estados de Minas Gerais, Bahia e Goiás, com centro de distribuição em campos de altitude, campos rupestres e restingas (REFLORA, 2024).

Dentro desta família, destacam-se os gêneros *Paepalanthus* e *Actinocephalus*, sendo o último endêmico do Brasil (FLORA DO BRASIL, 2024). *Actinocephalus* possui a maior variedade de formas dentro da família, resultante dos diferentes arranjos de paracládios e número de capítulos florais, possuindo potencial para o paisagismo e a floricultura, sendo encontrado somente na América do Sul (SANO, 2004; SANO, 2015).

Dentre as espécies com potencial ornamental está *Actinocephalus polyanthus* (Bong.) Sano (Sempre-viva-de-mil-flores) (Figura 1A), planta endêmica do Brasil e com distribuição nos biomas cerrado, mata atlântica e pampas, estando presente nos estados da Bahia, Goiás, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina (Figura 1B) (GOEBEL, 2019; REFLORA, 2024)

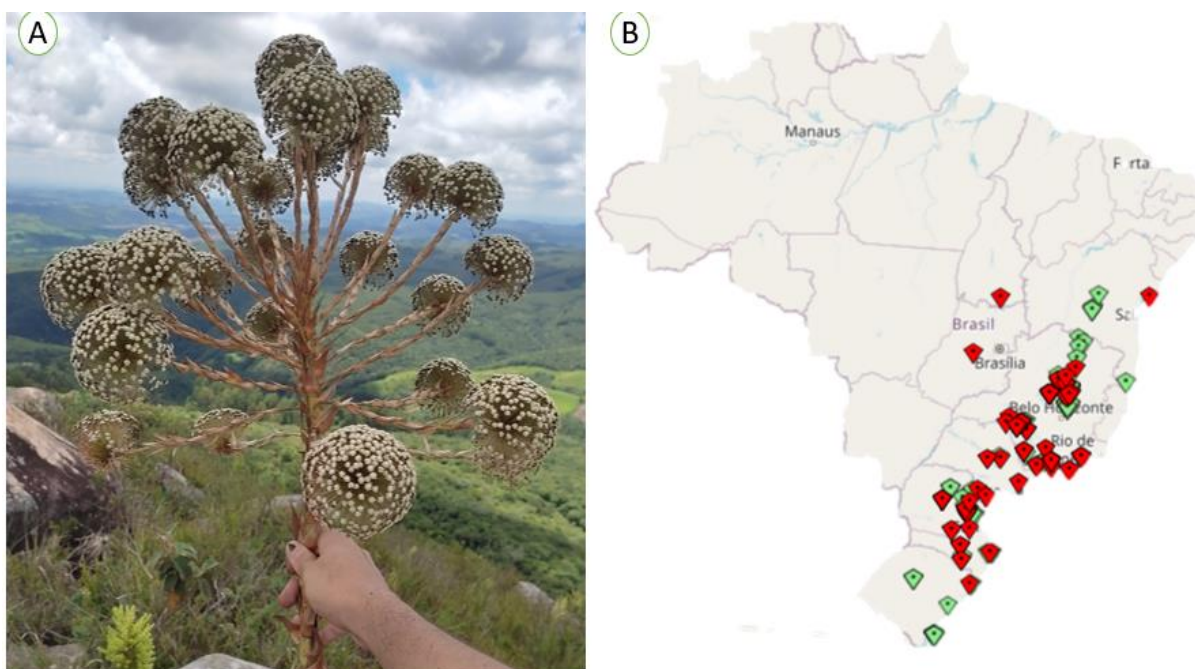


Figura 1 – (A) Haste floral de *A. polyanthus* com frutos e sementes maduras no Morro da Pedra Branca, Ortigueira/PR. (B) Mapa do Brasil com indicação do local de coleta de todos os indivíduos de *Actinocephalus polyanthus* presentes no herbário online refflora (REFLORA, 2024)

1.3 CULTURA DE TECIDOS

A cultura de tecidos é uma técnica da biotecnologia de suma importância e com

muitas aplicações e objetivos variados. Tendo como viés principal a produção em larga escala de plantas de interesse, e podendo ser aplicada em diversas áreas, como em estudos de botânica visando analisar a fisiologia e/ou o comportamento da espécie, como também na agricultura, olericultura, silvicultura, plantas medicinais e plantas ornamentais, visando a produção de plantas assépticas e em larga escala. Além da produção em larga escala, a cultura de tecidos ainda pode gerar direcionamento para o reflorestamento, à conservação do germoplasma, principalmente se tratando de espécies nativas, endêmicas ou ameaçadas de extinção, e também auxiliar no melhoramento genético de algumas espécies (COX, 2018; HARTMANN, 2018).

A técnica consiste em isolar uma parte da planta, podendo ser sementes, meristemas, folhas, raízes, embriões ou até mesmo grãos de pólen, que são denominados explantes, e proporcionar para os mesmos as condições, em ambiente asséptico, os recursos apropriados tanto químicos como físicos para que estes explantes expressem seu potencial natural ou induzido de regeneração e crescimento de células, órgãos ou tecidos (AMBROSANO, 2023). Esta técnica também pode ser empregada para determinadas espécies quando o cultivo tradicional não é viável devido alguma característica botânica que dificulta ou impossibilita este processo (MOREIRA *et al.*, 2015).

A cultura de tecidos tem se demonstrado uma opção viável para a produção de sempre vivas devido a baixa germinação de sementes no método tradicional e pelo tamanho diminuto das sementes, fator que interfere diretamente na produção (PEGÔ *et al.*, 2014).

A germinação de sementes *in vitro* possibilita a produção de grande número de explantes assépticos, conseqüentemente livre de patógenos, contribuindo assim para a conservação da espécie e para prosseguir estudos quanto a propagação da espécie (PEGÔ *et al.*, 2013; ALBUQUERQUE *et al.*, 2016).

1.3.1 Estabelecimento *in vitro*

No processo de micropropagação existem diferentes etapas, sendo a primeira delas o estabelecimento *in vitro* dos explantes que são capazes de se adaptar as condições laboratoriais. O uso de sementes neste processo é o mais recomendado para plantas nativas em vulnerabilidade ou ameaçadas de extinção por manter a

variabilidade genética da espécie, bem como para evitar a retirada de indivíduos do seu habitat natural, contribuindo assim para a conservação *ex situ* e erradicação ou diminuição do extrativismo predatório, principal causa da diminuição das populações de sempre vivas (ALBUQUERQUE, 2013).

A obtenção de plântulas através da germinação *in vitro* para algumas espécies, como no caso das sempre-vivas, é uma estratégia de interesse para o estabelecimento em laboratório de cultura de tecidos, pois, além da produção de um alto número de explantes assépticos, possibilita a utilização de praticamente qualquer parte da planta como futuro explante (UNEMOTO *et al.*, 2006; AMBROSANO, 2023).

No cenário atual das pesquisas brasileiras, a cultura de tecidos está sendo amplamente utilizada para a produção de plantas ornamentais, principalmente quando se trata de plantas nativas ou em processo de domesticação devido à falta de protocolos para a produção e conservação em laboratório da espécie (PEGÔ *et al.*, 2013; PEGÔ *et al.*, 2014; ALBUQUERQUE *et al.*, 2016; MEZZALIRA, 2020).

A eficiência do protocolo empregado para o estabelecimento *in vitro* é de suma importância e pode ser afetado por diversos fatores, como pela composição do meio de cultura, bem como pela concentrações de sais existentes no meio. Porém, existe certa precariedade dos laboratórios brasileiros em relação ao desenvolvimento de novos protocolos específicos para cada espécie e muitos acabam adaptando protocolos já existentes para outras grupos de plantas (DE CARVALHO *et al.*, 2009; FLORES *et al.*, 2015; AMBROSANO, 2023).

Os meios de cultura têm a função de fornecer nutrientes essenciais para o desenvolvimento dos tecidos, sendo acrescidos usualmente de uma combinação de sais minerais, carboidratos, vitaminas e em alguns casos reguladores vegetais que podem gerar diferentes respostas de acordo com o estágio de desenvolvimento da planta. Outro composto que pode ser acrescido no meio de cultura é o gelificante, porém, seu uso varia conforme a espécie (SOUSA & VERSIEUX, 2020).

A definição do meio de cultura a ser utilizado depende de espécie para espécie e, apesar de não existir um meio padrão, o meio MS em suas diferentes concentrações de sais é atualmente utilizado para plantas ornamentais herbáceas. Já para espécies lenhosas, o meio WPM é o mais indicado, possuindo os dois diferenças em relação aos íons nitrato, amônio, sulfato e potássio (PEGÔ *et al.*, 2015).

O meio MS possui altas concentrações de nitrogênio em comparação com o meio WPM, fator que pode influenciar diretamente a germinação e o crescimento das

plântulas, tendo em vista que altas concentrações de substâncias osmoticamente ativas podem diminuir a absorção de água durante o processo de germinação, assim, a identificação das melhores concentrações é fundamental para que as sementes possam apresentar sua maior qualidade fisiológica (PEGÔ *et al.*, 2014)

Para o crescimento das plantas é fundamental identificar e compreender quais concentrações de nutrientes possibilitam melhores resultados para o crescimento e qualidade das mudas, sendo o nitrogênio uma das substâncias que mais podem influenciar este processo (FARIA *et al.*, 2004).

Sendo assim, para desenvolvimento de um protocolo de micropropagação, é necessária a escolha do meio mais propício para aquela espécie. Mesmo que meio WPM seja mais utilizado em lenhosas, existem relatos de herbáceas que se desenvolveram melhor neste meio, como observado por PEGÔ *et al.* (2013 e 2014), em duas espécies de sempre-vivas da família Eriocaulaceae.

1.3.2 Aclimatização

A aclimatização é a última etapa da micropropagação. Esta fase consiste na retirada das plantas da condição *in vitro*, ou seja, a realocação da planta em casa-de-vegetação e, posteriormente, em campo. A aclimatização pode ser considerada a etapa mais decisiva para a propagação de plantas *in vitro*, sendo a etapa mais delicada de todo o processo, podendo impossibilitar a micropropagação de determinadas espécies, tendo em vista que estas plântulas estão saindo de um estado heterótrofo para um estado autótrofo; e de um estado asséptico para um ambiente com a possibilidade de ataque de patógenos ou microorganismos, além de fatores limitantes como a baixa taxa de crescimento e a desuniformidade das mudas, que pode estar vinculado a presença de raízes não funcionais (MOREIRA *et al.*, 2006; LIMA-BRITA *et al.*, 2016).

Dentre os fatores limitantes para este processo está a alta taxa de desidratação. Isso se deve a presença de cutículas mais finas nas folhas, o que promove uma maior taxa de evapotranspiração. Também é observado em plantas micropropagadas uma menor rigidez das paredes celulares que não promovem a sustentação necessária para a planta. Além disso, estas plantas podem apresentar baixa taxa fotossintética e folhas mais delgadas com estômatos não funcionais,

característica que pode impossibilitar a sobrevivência da planta durante a aclimatização e impossibilitar o cultivo *in vitro* (ALBUQUERQUE, 2013; MARTINS *et al*, 2020).

É necessário também a correta seleção do substrato para este processo, pois pode influenciar no crescimento e desenvolvimento das plantas nesta fase, sendo essencial a escolha adequada para o sucesso da aclimatização, dando suporte para a planta e tendo papel importante na produção e crescimento de raízes (ALBUQUERQUE *et al*, 2016).

Há relatos na literatura da influência dos substratos e de pré-aclimatização em Sempre-vivas. Pegô *et al* (2013) observou que *Comanthera elegantula* (referida como *Syngonanthus elegantulus*) foi afetado tanto pelo processo de pré-aclimatização como também pelos substratos utilizados, sendo que a melhor taxa de aclimatização ocorreu na areia sem processos de pré-aclimatização, com taxa de sobrevivência neste tratamento de 74%, sendo estatisticamente superior aos demais. A mesma metodologia foi empregada por Pegô *et al* (2014) para *Comanthera elegans*, na qual não houve diferença estatística para os substratos nem para a pré-aclimatização, sendo a taxa de sobrevivência mais alta de 25,6%. Sendo assim, estudos para desenvolvimento de técnicas mais eficientes para a aclimatização são necessários para a família Eriocaulaceae para sua produção e futura comercialização.

2 ARTIGO

Germinação, crescimento inicial e aclimatização de *Actinocephalus polyanthus* (Bong.) Sano propagada *in vitro*

Germination, initial growth and acclimatization of *Actinocephalus polyanthus* (Bong.) Sano propagated *in vitro*

Resumo - Esta pesquisa teve como objetivo identificar o melhor meio de cultura para a germinação e crescimento inicial *in vitro* de *Actinocephalus polyanthus*, bem como definir o melhor substrato e luminosidade para aclimatização das plantas em casa de vegetação. Sementes foram germinadas em meio de cultura MS e WPM, ambos contendo 0, 25, 50, 75 e 100% das concentrações de sais e foram analisados quanto à parâmetros de germinação. Também foi realizado uma segunda etapa onde as plântulas germinadas foram inoculadas nos mesmos meios de cultura da primeira fase do experimento e os parâmetros de crescimento inicial foram aferidos. Para a aclimatização foram testados duas iluminações diferentes, sendo uma estufa com sombrite de 50% e uma sem a utilização de sombrite; e quatro substratos sendo eles: vermiculita, areia média, Carolina Soil© e uma mistura 1:1:1 dos três citados anteriormente. Os resultados obtidos nas três etapas foram submetidos a análise de variância e teste de Tukey (5%) para comparação das médias e, quando necessário, análise por regressão linear. A germinação foi afetada tanto pelos meios de cultura utilizados como pelas concentrações de sais, sendo que os melhores resultado foram observados no meio WPM 75% e 100%, ambos com 95% de %GERM. O IVG mais alto foi observado no meio WPM 75% (4,62) e o mais baixo no meio MS100% (1,64). O TMG também foi afetado pela disponibilidade de sais no meio, sendo o mais baixo no meio sem nutrientes 0% (10,81) e sendo estatisticamente igual ao MS25% (11,44) e ao WPM75% (11,79). Para o crescimento inicial, o meio MS se mostrou superior ao meio WPM em todos os parâmetros, menos para o número de raízes, que não foi afetado pelo meio utilizado nem pelas concentrações de sais. Na aclimatização, a utilização de sombrite 50% é recomendada, pois proporcionou uma maior taxa de sobrevivência das plantas, bem como o substrato areia lavada e a mistura dos três se mostraram promissores para esta fase da propagação *in vitro*, tendo taxas de sobrevivência com sombrite de 50% de 100% ambos. O cultivo *in vitro* da espécie é possível se germinada em meio WPM 100% ou WPM 50%, e repicada para o meio MS em 75% ou 100% das concentrações de sais para o seu crescimento. A aclimatização deve ser realiza em estufa com sombreamento de 50% e em substrato areia lavada ou a mistura.

Palavras-chave: Domesticação; Estabelecimento *in vitro*; Propagação; Sempre-viva.

Abstract - The aim of this research was to identify the best culture medium for the germination and initial *in vitro* growth of *Actinocephalus polyanthus*, as well as to define the best substrate and light for acclimatizing the plants in a greenhouse. Seeds were germinated in MS and WPM culture media, both containing 0, 25, 50, 75 and 100% salt concentrations, and were analyzed for germination parameters. A second stage was also carried out in which the germinated seedlings were inoculated into the same culture media as in the first phase of the experiment and the initial growth parameters were measured. For acclimatization, two different lighting conditions were tested: a greenhouse with 50% shade and one without shade; and four substrates: vermiculite, medium sand, Carolina Soil© and a 1:1:1 mixture of the three mentioned above. The results obtained in the three stages were subjected to analysis of variance and Tukey's test (5%) to compare the means and, where necessary, analysis by linear regression. Germination was affected by both the culture media used and the salt concentrations, with the best results being observed in the 75% and 100% WPM media, both with 95% %GERM. The highest IVG was observed in the 75% WPM medium (4.62) and the lowest in the 100% MS medium (1.64). The TMG was also affected by the availability of salts in the medium, being the lowest in the 0% nutrient-free medium (10.81) and being statistically equal to MS25% (11.44) and WPM75% (11.79). For initial growth, the MS medium was superior to the WPM medium in all parameters, except for the number of roots, which was not affected by the medium used or the salt concentrations. For acclimatization, the use of 50% shade is recommended, as it provided a higher survival rate for the plants, as well as the substrate washed sand and the mixture of the three proved promising for this stage of *in vitro* propagation, with survival rates with 50% shade of 100% both. *In vitro* cultivation of the species is possible if it is germinated in 100% WPM or 50% WPM medium and then transferred to MS medium at 75% or 100% of the salt concentrations required for growth. Acclimatization should be carried out in a greenhouse with 50% shading and in a substrate of washed sand or a mixture of the three.

Keywords: Domestication; Everlast flower; *In vitro* establishment; Propagation.

2.1 INTRODUÇÃO

Actinocephalus polyanthus (Bong.) Sano é uma espécie ornamental endêmica do Brasil pertencente à família Eriocaulaceae, se enquadrando no grupo das sempre-vivas. Ocorre nos estados da Bahia, Goiás, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina (SANO *et al.*, 2015, GOEBEL, 2019; REFLORA, 2024),

As hastes florais deste grupo de plantas ficam preservadas por vários anos sem a necessidade de serem mantidas em soluções conservantes, característica essa de muito interesse no comércio de flores de corte (PEGÔ *et al.*, 2014). O comércio deste grupo é feito quase inteiramente por extrativismo predatório, o que pode acarretar na erosão genética e consequente diminuição das populações naturais (ALBUQUERQUE *et al.*, 2016). O comércio da espécie é realizado no Paraná com plantas retiradas da natureza e sem sendo relatado desde 1976 (CASTELLANI *et al.*, 2000).

Uma das estratégias mais efetivas para evitar a extinção de espécies nativas ornamentais é sua domesticação, estratégia essa que permite a produção de plantas em ambientes controlados e a manutenção de bancos de germoplasma, evitando assim a sua erosão genética e consequente extinção (PEGÔ *et al.*, 2014).

No Brasil a micropropagação tem se mostrado uma estratégia biotecnológica viável para a produção e conservação de espécies raras e ameaçadas de extinção, como “sempre-vivas”, podendo ser destacadas as seguintes espécies: *Comanthera mucugensis* subsp. *mucugensis* (PAIXÃO-SANTOS *et al.*, 2008; LIMA-BRITO *et al.*, 2011), *Syngonanthus elegantulus* (PEGÔ *et al.*, 2013), *Syngonanthus elegans* (Bong.) Ruhland (PEGÔ *et al.*, 2014), *Actinocephalus bongardii* (A. St.-Hil.) Sano (PRUDENTE *et al.*, 2015), *Comanthera curralensis* Moldenke (ALBUQUERQUE *et al.*, 2016) e *Paepalanthus chiquitensis* Herzog (MAGALHÃES *et al.*, 2023). Porém, para a *A. Polyanthus*, não há relatos na literatura sobre a sua propagação *in vitro*.

O estabelecimento *in vitro* é a primeira etapa para o desenvolvimento de um protocolo de micropropagação para uma espécie, e pode ser realizado com diferentes partes da planta. No presente trabalho a forma de propágulo escolhida foram as sementes, que permitem a manutenção da variabilidade genética e evitam a retirada de indivíduos do ambiente de origem. (UNEMOTO *et al.*, 2006)

A identificação do melhor meio de cultura e as concentrações ideais de sais

para o desenvolvimento mais rápido e uniforme das mudas *in vitro* é essencial para sua produção (FARIA *et al.*, 2004), bem como a seleção do melhor substrato e tipo de iluminação para a sobrevivência das plântulas no momento da retirada do laboratório para a inserção em casa de vegetação, processo esse denominado aclimatização (COLOMBO *et al.*, 2016).

Tendo em vista o apresentado até aqui, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver um protocolo de estabelecimento *in vitro*, identificando o melhor meio de cultura e sua respectiva concentração para a germinação e para o crescimento inicial, bem como identificar a melhor iluminação e substrato para a aclimatização em casa de vegetação.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletados escapos florais de *A. polyanthus* no mês de Abril de 2022 de cinco plantas matrizes em local de ocorrência natural da espécie, no Morro da Pedra Branca, Serra do Cadeado, Ortigueira, PR (23°58'02"S; 51°04'33"O) (Figura 2A). A maturidade fisiológica dos frutos foi caracterizada pelo desprendimento do pecíolo do capítulo floral da umbela.

O platô do Morro atinge elevação de 1273 metros e possui cerca de 79 hectares de área, formado por solos litólicos e afloramentos de arenito Botucatu, onde ocorrem campos de altitude, refletindo condições edáficas e climáticas locais (Figura 2B). Na região, a temperatura média anual varia entre 17,1 e 18 °C, com precipitação média anual entre 1700 e 1800 mm e umidade relativa média anual entre 72% e 74% (WREGGE *et al.*, 2012).

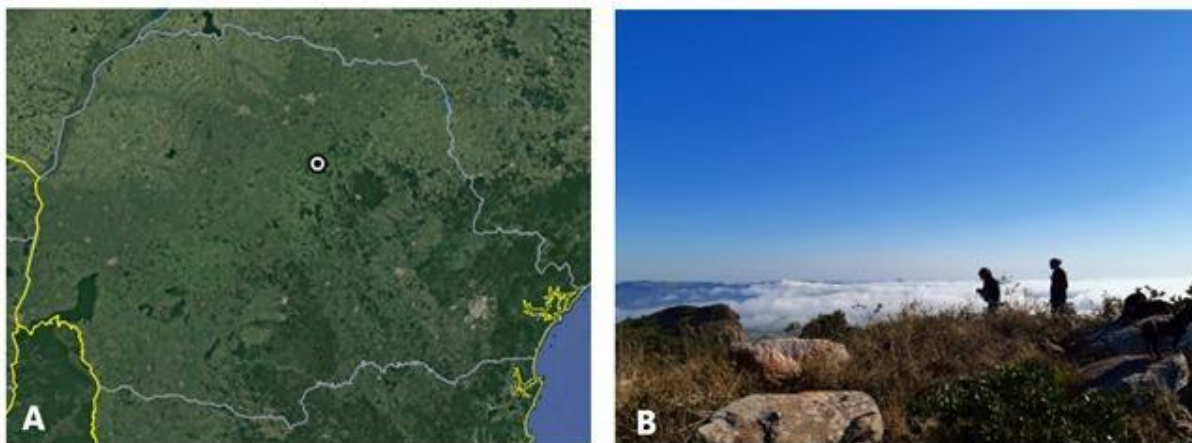


Figura 2. (A) Mapa do estado do Paraná, Brasil, com círculo marcando a localização do Morro da Pedra Branca, município de Ortigueira. (B) Foto no platô do Morro da Pedra Branca.

No presente trabalho, utilizou-se sementes como forma de propágulo devido a sua maior facilidade de esterilização, bem como a manutenção da variabilidade genética da espécie, justificativa que tem sido apresentada em todos os trabalhos de micropropagação para plantas desta família.

Após a coleta do material, as inflorescências foram levadas ao laboratório de cultura de tecidos vegetais no centro de ciências agrárias (CCA) da Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, PR, onde foram secos por 7 dias em papel kraft em temperatura ambiente. Os capítulos foram armazenados em sacos de papel em refrigerador com temperatura média de 10°C, por 15 dias.

Para o beneficiamento das sementes, os capítulos foram friccionados com auxílio de uma espátula sobre placa de petri (Figura 3A), sendo, posteriormente, passados por peneira com malha de 0,4 mm e, por fim, sendo realizada a sopragem dos restos florais com soprador elétrico De Leo®, com abertura de 2° (Figura 2B). Após esse processo, para aumento da pureza, as sementes foram separadas em microscópio estereoscópico (Figura 3C e D).

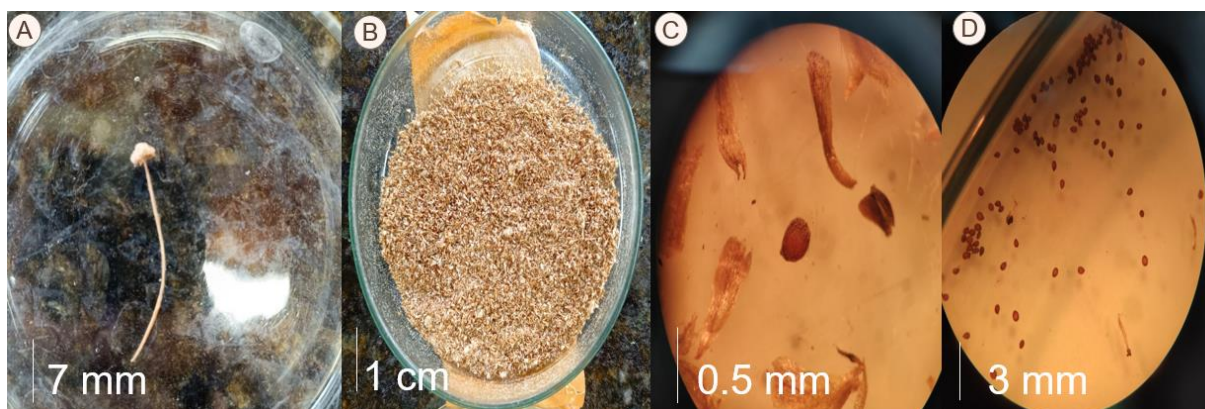


Figura 3 – Fases do beneficiamento das sementes de *Actinocephalus polyanthus* (Bong.) Sano. (A) Capítulos florais após serem retiradas da umbela. (B) Capítulos florais após processo de fricção, passagem pela peneira e sopragem. (C) Capítulos após processo de fricção, passagem pela peneira e sopragem visto em microscópio estereoscópico. (D) Sementes totalmente beneficiadas após separação das impurezas.

Para a caracterização do lote, duas repetições contendo 100 sementes foram secas em estufa de circulação forçada a 102°C, por 17 horas, como recomendado na RAS para sementes pequenas; e o seu teor de água foi obtido. Para obtenção da viabilidade do lote, foi realizado teste do tetrazólio em 4 repetições de 50 sementes, no qual foram embebidas por 16 horas à 30°C. Após este processo, foram cortadas no eixo longitudinal na porção mediana e colocadas para corar em sal de tetrazólio à 0,075%, por 4 horas (MAGALHÃES, 2018 adaptado). Foi considerado semente viável as que possuíam coloração como descrita na Figura 4.

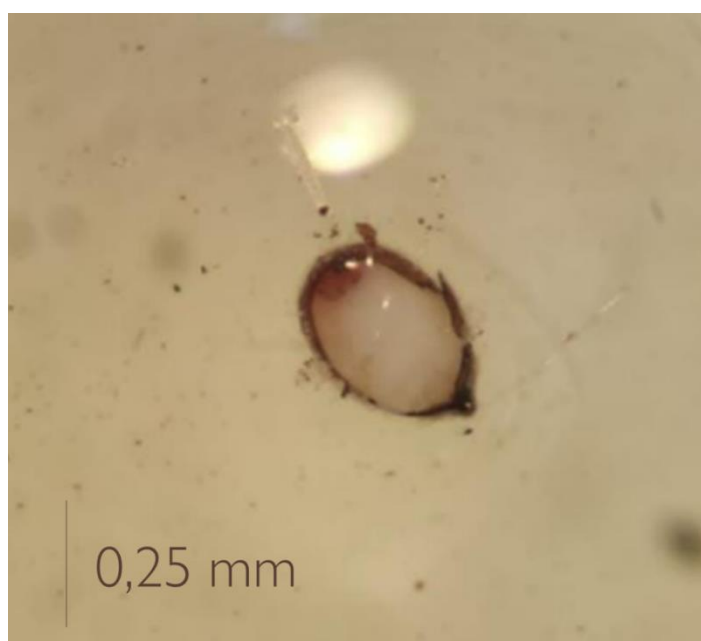


Figura 4 – Semente de *Actinocephalus polyanthus* (Bong.) Sano. cortada no eixo longitudinal apresentando embrião de coloração avermelhada após o teste do

tetrazólio, indicando semente viável.

A amostra de sementes utilizada apresentou teor de água de 63%;viabilidade de sementes, aferida pelo teste do tetrazólio, de 92%; e taxa de germinação de 89%

2.2.1 Experimento de germinação

Lotes de 50 sementes de *A. polyanthus* foram separados e desinfetados em fluxo laminar, com álcool 70% por 30 segundos, seguido de imersão em hipoclorito de sódio 2% por 10 minutos (MAGALHÃES, 2023), posteriormente, passando pelo processo de tríplice lavagem em água deionizada autoclavada. Cada lote de 50 sementes foi inoculado em frascos de vidro com capacidade de 250 ml contendo 50 ml de cada meio de cultura (figura 5A). Os tratamentos consistiram em dois meios de cultura, sendo eles MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) e WPM (LLOYD & MCCOWN, 1980), ambos com 100%, 75%, 50%, 25% e 0% das concentrações nutricionais de sais presentes nos meios originais. Para o meio 0%, utilizou-se água deionizada acrescida de ágar para solidificação. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com esquema fatorial (2x5), sendo o fator 1 os meios de cultura (WPM e MS) e o fator 2 as concentrações de sais (0, 25, 20, 75 e 100%). Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância e as médias foram comparadas com teste de Tukkey a 5% de probabilidade.

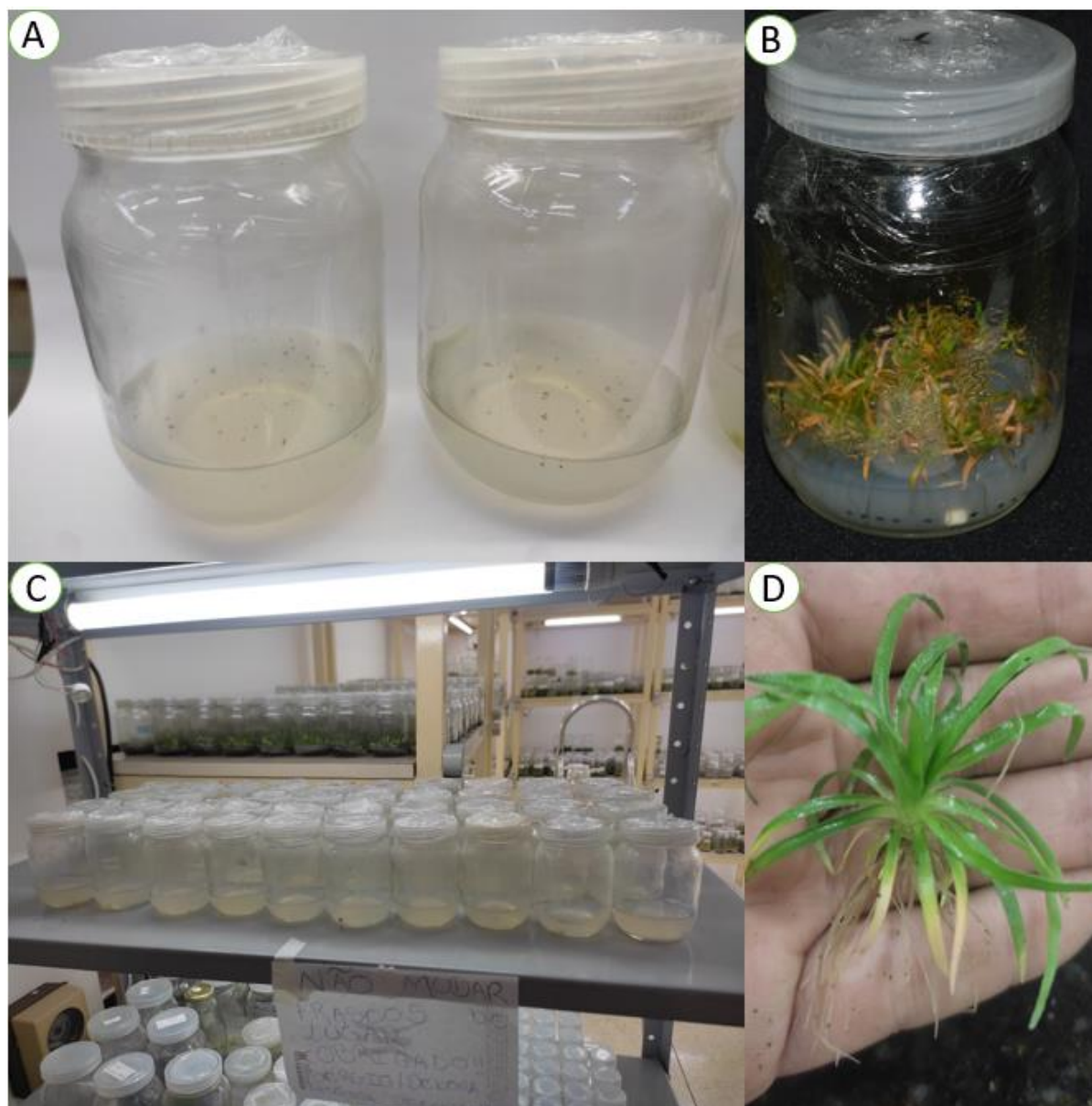


Figura 5 – (A) Frasco de 250ml contendo 50ml de meio de cultura e 50 sementes por frasco no dia da instalação do experimento. (B) Frasco com 50ml de meio de cultura e 50 sementes germinadas após 30 dias de instalação do experimento. (C) Experimento instalado na sala de crescimento do laboratório de cultura de tecidos vegetais na UEL. (D) Planta após período de 60 dias de crescimento inicial no meio MS 100% da concentração de sais.

Em todos os meios, foi adicionado 6g L^{-1} de ágar e 17g L^{-1} de sacarose (PEGÔ *et al.*, 2014). O pH dos meios foi ajustado para $5,8 \pm 0,2$ antes da autoclavagem, que foi realizada durante 20 minutos à 120°C e pressão de $1,5\text{atm}$. Os frascos foram mantidos em sala de crescimento sob irradiação de $47\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro, sob temperatura constante de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ (figura 5B e C).

O número de sementes germinadas foi analisado diariamente até estabilização por 7 dias consecutivos sem novas sementes germinadas, calculando-

se assim, ao final do experimento, a germinabilidade (%GERM), o Índice de Velocidade de Germinação (IVG) (MAGUIRE, 1968), o tempo médio de germinação (TMG) (LABOURACEAE, 1986), a primeira contagem (PC), realizada com 20 dias e determinada pelo número de plântulas normais (PEGÔ *et al*, 2014). Foram consideradas germinadas as sementes que apresentavam eixo embrionário clorofilado com mais de 2 mm de comprimento, ao fim do período do teste, sendo o único parâmetro a ser avaliado devido ao risco de contaminação do meio (PAIXÃO-SANTOS *et al.*, 2003).

2.2.2 Experimento de crescimento inicial

Plântulas provenientes do meio ágar-água com 40 dias e altura de aproximadamente 1 cm foram utilizadas como explante para o experimento de crescimento inicial, sendo inoculadas em diferentes meios de cultura. Os tratamentos consistiram em dois meios de cultura, sendo eles MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) e WPM (LLOYD & MCCOWN, 1980), ambos com 100, 75, 50, 25 e 0% das concentrações nutricionais de sais presentes nos meios originais. Para o controle, utilizou-se água deionizada acrescida de ágar para solidificação. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em um esquema bifatorial, sendo o fator 1 os meios de cultura (WPM e MS) e o fator 2 as concentrações de sais (0, 25, 50, 75 e 100%). Cada tratamento contou com 5 repetições, sendo cada repetição um frasco com 10 plantas cada. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas em teste de Tukkey à 5% de probabilidade, quando as concentrações diferiram-se entre si foi realizado análise de regressão.

Após 60 dias de inoculação dos explantes, foram realizadas as análises de crescimento nas plântulas em todos os tratamentos, sendo elas: comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da maior raiz (CMR), número de raízes (NR), número de folhas (NF), comprimento da maior folha (CMF), número de folhas vivas (NFV) e diâmetro da roseta (DR). Os dados referentes a tamanho foram retirados com auxílio de paquímetro digital com precisão de 0,0001 cm.

2.2.3 Experimento de aclimatização

Plântulas de *A. polyanthus* cultivadas *in vitro* por 90 dias, oriundas do meio de cultura MS com 100% das concentrações de sais, foram transferidas para vasos plásticos com 11 centímetros de diâmetro na borda superior (Figura 6A). Para isso, as plântulas retiradas dos frascos foram lavadas em água deionizada para remoção total do meio de cultura, tendo cuidado para as raízes serem mantidas, e então alocadas em 4 substratos diferentes, sendo eles: vermiculita expandida média, Carolina Soil®, areia média lavada e uma mistura de 1:1:1 dos três anteriores, todos eles envoltos por sacos plásticos transparentes para a manutenção da umidade interna (PEGÔ *et al.*, 2013).

Estes recipientes foram então distribuídos em duas casas de vegetação com luminosidades diferentes, sendo uma delas com irradiância de fótons de $47 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e a outra com irradiância de $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 6B). Os sacos plásticos foram cortados lateralmente a cada 7 dias até a completa remoção, sendo realizada com 28 dias (PRUDENTE *et al.*, 2015).

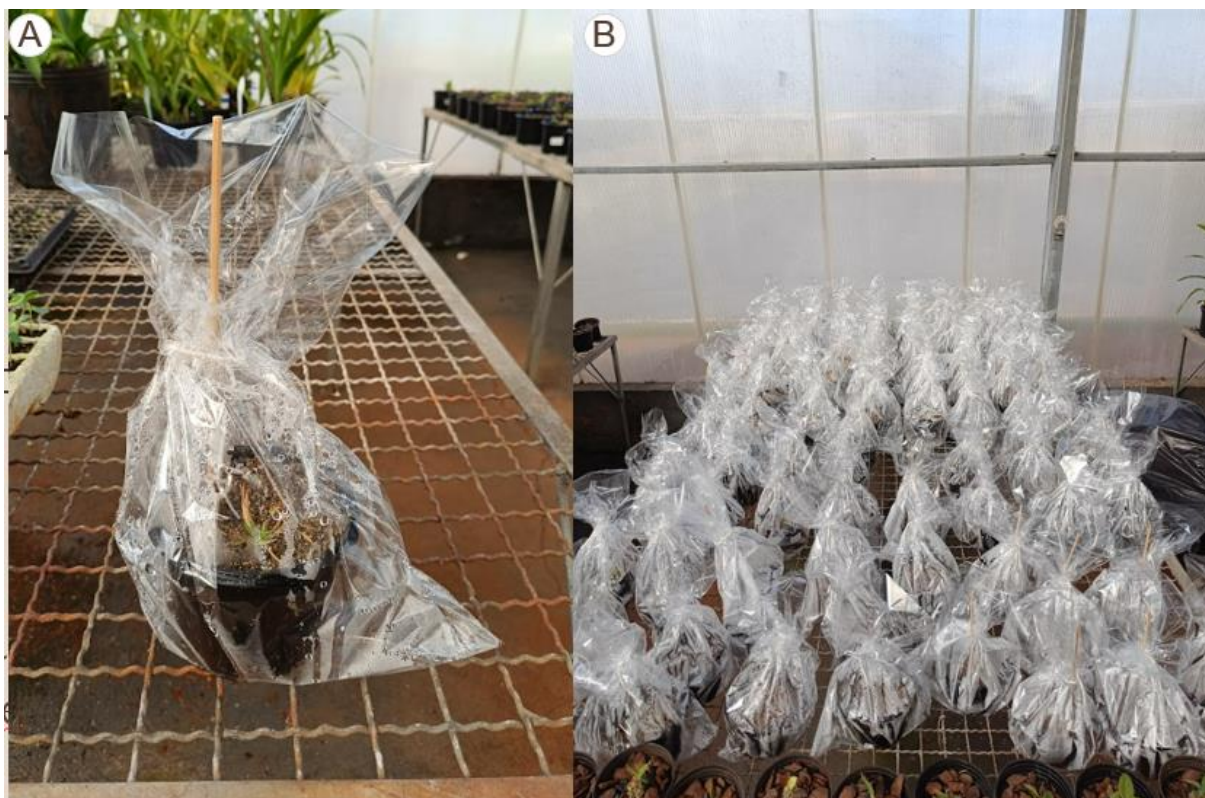


Figura 6 – Aclimatização de *Actinocephalus polyanthus* (Bong.) Sano após 90 dias de cultivo in vitro em vaso pote 11. (A) Sistema de aclimatização de *A. polyanthus* no dia instalação do experimento onde é possível observar a utilização de saco de polietileno para manutenção da umidade relativa do ar; (B) Experimento instalado na estufa sem sombrite.

30 dias após o início do experimento foi realizada a análise da sobrevivência das plântulas. O experimento contou com 20 repetições por tratamento, sendo cada repetição constituída de um vaso com uma planta. O experimento foi constituído então de 8 tratamentos e inteiramente casualizado. Os dados foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas com auxílio de teste de Tukkey a 5% de probabilidade.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O meio de cultura influenciou significativamente todos os parâmetros avaliados, sendo o WPM (Wood Plant Medium) superior ao meio MS. A %GERM foi de 94% no meio WPM e de 86% no meio MS, o IVG foi de 4,108 no meio WPM e

3,502 no meio MS, o TMG foi de 12,464 no WPM e 13,386 no MS e a PC foi de 42 no WPM e 36 no meio MS como mostra a Tabela 1.

Tabela 1 – Germinação (%GERM), índice de velocidade de germinação (IVG), tempo médio de germinação (TMG) e primeira contagem (PC) de sementes de *Actinocephalus polyanthus* (Bong.) Sano germinadas *in vitro* em diferentes meios de cultura após 30 dias.

Meios de cultura	%GERM	IVG	TMG (dias)	PC (%)
MS	86 b	3,502 b	13,386 b	76 b
WPM	94 a	4,108 a	12,464 a	84 a
P-valor	0,0367	0,02	0,003	0,0091
CV (%)	11,98	18,18	17,15	16,25

As letras nas colunas representam parâmetros onde as médias se diferiram no teste de Tukkey (P<0.05).

A %GERM pode ser considerada alta quando se comparada com outras espécies de Eriocaulaceae. *Actinocephalus bongardii*, por exemplo, se mostrou também mais responsiva com o meio WPM, porém tendo germinação de 74%, inferior ao observado neste experimento. Os percentuais de germinação de *A. polyanthus*, analisada neste trabalho, também se mostraram superiores a *Syngonanthus elegantulus* (61%), *S. elegans* (63%) e *Paepalanthus chiquitensis* (82%), todas da família eriocaulaceae (PEGÔ *et al.*, 2013; PEGÔ *et al.*, 2014; PRUDENTE *et al.*, 2015 e MAGALHÃES *et al.*, 2023).

A %GERM por sua vez também foi afetada pelas concentrações de sais utilizadas. No meio MS, a concentração mais alta (100%) teve uma germinação inferior as demais. Já no WPM a concentração de 0% foi inferior as demais, como é possível observar na tabela 2.

Os resultados observados corroboram com os obtidos por PEGÔ *et al.* (2013) para *S. elegantulus*; e com ALBUQUERQUE *et al.* (2016) para *Comanthera curralensis*, onde houve diminuição da germinação com o aumento da concentração de sais no meio MS, devido à maior concentração de compostos osmoticamente ativos, interferindo assim na água disponível para as sementes.

Tabela 2 – Germinação (%), Índice de velocidade de germinação, tempo médio de germinação (dias) e primeira contagem (%) de *Actinoccephalus polyanthus* germinadas *in vitro* após 30 dias em dois meios de cultura (MS e WPM) em cinco concentrações de sais diferentes (0, 25, 50, 75 e 100%).

meios de cultura	concentração de sais				
	0	25%	50%	75%	100%
Germinação (%)					
MS	81 a	93 Aa	92 Aa	85 Ba	71 Bb
WPM	81 b	91 Aa	93 Aa	95 Aa	95 Aa
Índice de velocidade de germinação					
MS	3,83 a	4,28 Aa	4,29 Aa	3,47 Ba	1,64 Bb
WPM	3,83b	3,98 Ab	4,19 Ab	4,62 Aa	3,92 Ab
Tempo médio de germinação (dias)					
MS	10,81 a	11,44 Aa	11,61 Ab	13,56 Bc	19,51 Bd
WPM	10,81 a	13,33 Bb	12,58 Bb	11,79 Aa	13,81 Ab
Primeira contagem (%)					
MS	76 a	88 Aa	88 Aa	76 Ba	38 Bb
WPM	76 b	78 Bb	88 Aa	94 Aa	86 Ab

As mesmas letras minúsculas mostram as concentrações de sais e as mesmas letras maiúsculas os meios que não se difeririam no teste de Tukkey ($P < 0,05$).

O IVG foi afetado pelas concentrações de sais nos meios. No MS, apenas a concentração mais alta (100%) diferiu negativamente, sendo inferior as demais. No WPM, o IVG mais alto foi obtido no tratamento de 75%, sendo superior as demais. Este índice pode ser usado para determinar a sensibilidade das sementes de uma espécie quanto a diferentes concentrações de sais nos meios de cultura e identificar as melhores condições para que as sementes atinjam a melhor expressão da sua qualidade fisiológica (BRASIL, 2009).

O TMG também sofreu influência das concentrações de sais nos meios de cultura, seguindo o mesmo padrão observado para o IVG. No MS, o aumento das concentrações afetou de forma negativa; já no WPM, o melhor desempenho foi observado na concentração de 75%. Em ambos os meios, o tratamento controle foi estatisticamente igual a melhor concentração.

O aumento do TMG e diminuição do IVG no meio MS pode ser devido à saturação de sais presentes, tendo em vista que, com o aumento das concentrações salinas, o processo de embebição das sementes pode ocorrer de forma mais lenta (PEGÔ et al, 2015). WINHELMANN *et al.* (2019) estudando *Angelonia integerrima*, outra espécie de sempre-viva, constatou que o aumento da presença de sais minerais

no meio aumenta o TMG, afetando assim o processo germinativo, tornando-o mais demorado, e não deixando as sementes explorarem seu potencial fisiológico total

O padrão observado em outras sempre-vivas nativas do Brasil não é seguido na maioria dos parâmetros analisados na germinação neste trabalho, tendo em vista que o IVG no meio WPM não foi afetado, como observado por PEGÔ et al (2013;2014) em *S. elegantulus* e *S. elegans*, respectivamente, podendo indicar uma menor sensibilidade da espécie para a variação de nutrientes neste meio.

A PC também nos mostra que no meio MS o aumento das concentrações é prejudicial para a germinação e posterior formação de uma plântula normal, tendo em vista que a maior concentração foi a com menor número de plântulas viáveis deste meio. No meio WPM, os melhores resultados foram obtidos nas concentrações de 75% e 50%. O meio WPM com 75% ou 100% das concentrações de sais é recomendado para germinação *in vitro* desta espécie.

Para o crescimento inicial das plântulas, após 90 dias, o meio MS se mostrou superior em quase todos os parâmetros analisados, sendo eles: comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da maior raiz (CMR), diâmetro da roseta (DR), número de folhas (NF), número de folhas vivas (NFV) e o comprimento da maior folha (CMF). O único parâmetro sem diferença foi o número de raízes (NR) (Tabela 3).

Tabela 3 – Comprimento da parte aérea (CPA), Comprimento da maior raiz (CMR), Diâmetro da roseta (DR), número de folhas (NF), número de raízes (NR), número de folhas vivas (NFV) e o comprimento da maior folha (CMF) de plântulas de *Actinocephalus polyanthus* (Bong.) Sano, após 90 dias de crescimento inicial *in vitro*

Meios de cultura	CPA (cm)	CMR (cm)	DR (mm)	NF	NR	NFV	CMF (cm)
MS	3,65 a	2,225 a	45,18 a	16 a	8 a	11 a	3,15 a
WPM	1,925 b	1,7 a	26,17 b	13 b	6 a	7 b	1,625 b
CV(%)	22,45	27,14	21,4	12,74	24	16,58	11,7

As letras minúsculas indicam médias que não diferiram no teste de Tukkey com 5% de probabilidade

O meio MS com 100% das concentrações de sais possibilitou o maior crescimento da parte aérea (CPA), com média de 4,5 cm, sendo superior as concentrações de 0, 25 e 50% de sais e estatisticamente igual a concentração de 75% (Tabela 4). O meio WPM teve respostas inferiores ao meio MS, mas seguindo o mesmo padrão onde o aumento das concentrações possibilitou um maior crescimento da parte aérea. A concentração com melhor resultado para este meio de cultura foi a

de 100%, com média de 3 cm, sendo superior as demais.

Tabela 4 – Comprimento da parte aérea (CPA), Comprimento da maior folha (CMF), Diâmetro da roseta (DR), número de folhas (NF), número de raízes (NR), número de folhas vivas (NFV) e o comprimento da maior raiz (CMR) de plântulas de *Actinocephalus polyanthus* (Bong.) Sano, após 90 dias de crescimento inicial *in vitro* em dois meios de cultura MS e WPM e em cinco concentrações de sais.

meios de cultura	concentração de sais				
	0	25%	50%	75%	100%
Comprimento da parte aérea (cm)					
MS	0,9 c	2,35 Ab	3,4 Ab	3,9 Aa	4,5 Aa
WPM	0,9 c	1,5 Ac	1,85 Bb	2 Bb	3 Ba
Comprimento da maior folha (cm)					
MS	0,9 c	2 Ab	3,1 Aa	3,55 Aa	3,95 Aa
WPM	0,9 c	1,3 Bc	1,5 Bb	1,75 Bb	2,45 Ba
Diâmetro da roseta (mm)					
MS	12,53 d	27,33 Ac	38,83 Ab	51,53 Aa	55,55 Aa
WPM	12,53 d	19,16 Bc	25,75 Bb	26,58 Bb	31,26Ba
Número de folhas					
MS	3 b	14 Aa	15 Aa	18 Aa	22 Aa
WPM	3 b	13 Aa	13 Aa	13 Ba	16 Ba
Número de folhas vivas					
MS	3 c	9 Ab	11 Ab	10 Ab	17 Aa
WPM	3 c	7 Ab	5 Bb	7 Bb	10 Ba
Número de raízes					
MS	3 b	7 Aa	7 Aa	9 Aa	7 Aa
WPM	3 b	6 Aa	7 Aa	9 Aa	5 Ba
Comprimento da maior raiz (cm)					
MS	0,6 b	2 Aa	2,45 Aa	2,5 Aa	1,9 Aa
WPM	0,6 b	1,9 Aa	1,5 Ba	2 Ba	1,5 Aa

As mesmas letras minúsculas mostram as concentrações de sais e as mesmas letras maiúsculas os meios que não se difeririam no teste de Tukkey ($P < 0,05$).

Para o CMF, no meio MS, as concentrações de 50, 75 e 100% se mostraram estatisticamente superiores as demais, com maior média (3,95 cm) sendo observada na concentração de 100%. Para o meio WPM, o maior CMF foi obtido também na concentração de 100% dos sais, com média de 2,45 cm, diferindo estatisticamente das demais concentrações (Tabela 4).

IVANOVA e STADEN (2009), em trabalho realizado com *Aloe polyphylla*, reportaram que para os parâmetros de crescimento, o aumento das concentrações de nitrogênio é fundamental, fato este observado neste trabalho onde os dois meios não diluídos foram os que apresentaram maior crescimento quando comparado com as outras concentrações do mesmo meio de cultura. Os níveis mais

altos de NH_4^+ encontrados no meio MS estimularam um crescimento mais rápido das plantas, este crescimento mais exacerbado pode também estar ligado ao fato de que o meio tem uma maior similaridade nutricional com o solo de origem da espécie, com baixas concentrações de SO_4^{2-} e Mg^{2+} (Anexo 2).

SCHNITZER *et al.* 2018 trabalhando com *Oncidium baueri* também já relatou que o aumento das concentrações de nitrogênio é essencial para um melhor desempenho de crescimento das plantas.

O DR também foi influenciado pelas concentrações de sais. O meio MS mais uma vez se mostrou mais efetivo, com melhor resultado obtido na concentração de 100%, com média de 55,55 mm, sendo superior às concentrações de 0, 25 e 50%. O meio WPM seguiu o mesmo padrão apresentado até o momento por ambos os meios em todas as características de crescimento, onde, com o aumento das concentrações de sais, ocorreu um maior desenvolvimento da característica em análise. A concentração de 100% no meio WPM mostrou melhor resultado, com média de 31,26 mm, superior às concentrações de 0, 25 e 50%.

Os parâmetros número de raízes (NR), comprimento da maior raiz (CMR) e número de folhas (NF) apresentaram diferença quando comparadas ao meio sem acréscimo de sais com os demais, sendo a concentração no 0% inferior às demais, 25, 50, 75 e 100%, que foram estatisticamente iguais entre si.

O número de folhas não foi afetado pelas concentrações de 25, 50, 75 e 100% em nenhum dos meios analisados. Todavia, a concentração de 0% foi inferior às demais. No entanto, para o parâmetro número de folhas vivas, as concentrações salinas foram responsivas em ambos os meios de cultura, sendo a concentração 100% mais efetiva e estatisticamente superior às demais.

O fato de não ter ocorrido alteração do número de folhas com o aumento da concentração de sais no meio pode indicar uma facilidade de crescimento da planta em condições menos favoráveis, como as encontradas em campos de altitude. Porém, o aumento do número de folhas vivas (e consequente diminuição de folhas cloróticas) é um indicativo de adaptações para solos de baixa fertilidade, sendo assim, nutrientes como o nitrogênio são assimilados das folhas mais antigas para crescimento das folhas novas. A morte das folhas mais antigas de *A. polyanthus* já é relatada na literatura, porém devido à falta de experimentos com o cultivo da espécie não é possível afirmar se provém da sua própria fisiologia ou da escassez de nutrientes à campo (CASTELLANI *et al.*, 2001)

O número de raízes e o comprimento da maior raiz não foram afetados por nenhuma das concentrações em nenhum dos dois meios analisados. Em ambos os meios, a concentração com melhor desempenho foi a de 75%, tanto para número de raízes como para comprimento da maior raiz.

O aumento das concentrações de sais influenciou o maior crescimento das mudas *in vitro* e conseqüentemente a qualidade das mudas (Figura 7 e 8), com um padrão de crescimento que não segue o encontrado em *S. mucugensis*, *S. elegantulus* e *S. elegans*, nas quais o meio WPM se mostrou mais efetivo. Neste trabalho, a espécie estudada cresceu melhor no meio MS com altas concentrações salinas, o que mostra que apesar de vir de um ambiente com solos arenosos e baixa fertilidade, a planta consegue se adaptar bem às condições laboratoriais e realizar a assimilação dos nutrientes presentes em meios altamente concentrados.

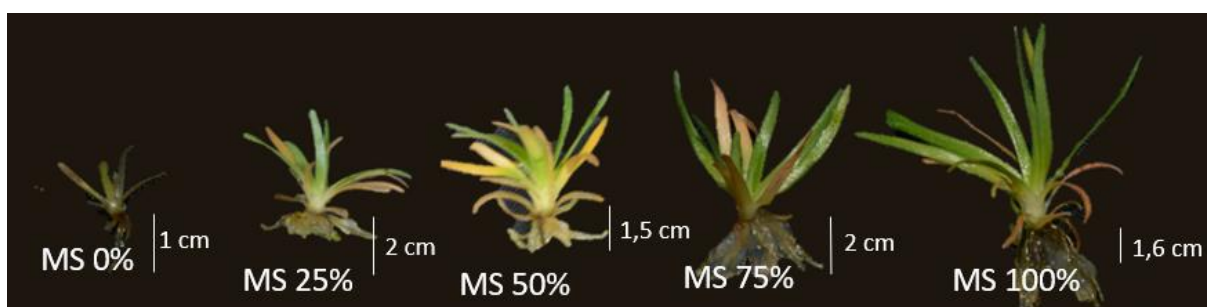


Figura 7 – Plântulas de *Actinocephalus polyanthus* (Bong.) Sano após 60 dias de crescimento *in vitro* em cinco meios de cultura: MS 0%, MS 25%, MS 50%, MS 75% e MS 100% das concentrações de sais.

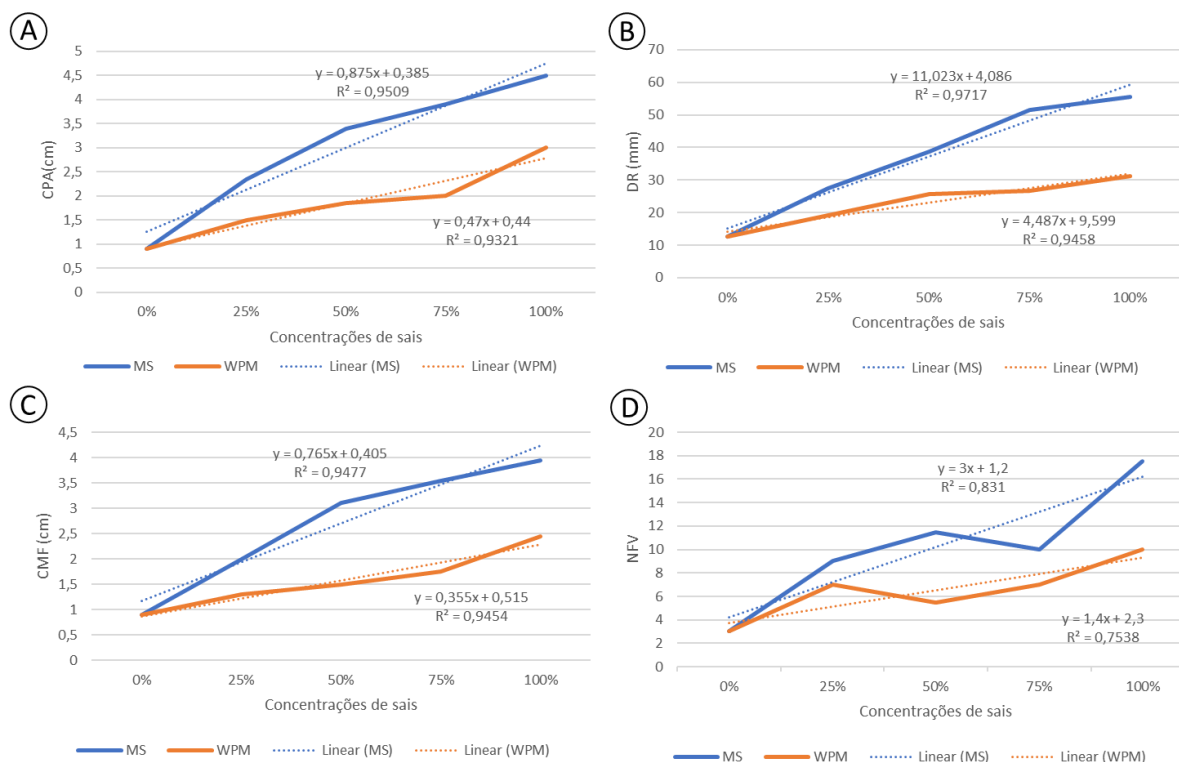


Figura 8 – Diferentes meios de cultura WPM (cor laranja) e MS (cor azul) em diferentes concentrações de sais (0, 25, 50, 75 e 100%) em parâmetros de crescimento. A) Comprimento da parte aérea (CPA). B) Diâmetro da roseta (DR). C) Comprimento da maior folha (CMF) e D) número de folhas vivas (NFV).

Após 30 dias da aclimatização das plantas em casa de vegetação com e sem sombrite e diferentes substratos, o índice de sobrevivência foi aferido e está apresentado na Tabela 5.

Tabela 5 – Porcentagem de sobrevivência de mudas de *Actinnocephalus polyanthus* (Bong.) Sano após 30 dias de aclimatização em casa de vegetação em diferentes substratos (areia lavada, vermiculita, Carolina Soil e uma mistura de 1:1:1 dos 3 substratos citados anteriormente) e dois tipos de sistema de iluminação (sombrite 50% e sol pleno).

tratamentos	% de sobrevivência
Sol pleno + Areia lavada	80%b
Sol pleno + Vermiculita	0%e
Sol pleno + Carolina Soil	45%d
Sol pleno + Mistura	75% b
Meia sombra + Areia lavada	100% a
Meia sombra + Vermiculita	50%c
Meia sombra + Carolina Soil	95% a
Meia sombra + Mistura	100% a

A estufa em meia sombra apresentou a maior parte dos tratamentos com taxa de sobrevivência mais elevada; com os substratos areia lavada e mistura apresentando taxa de 100% na meia sombra.

Em ambas as estufas, a vermiculita foi o pior substratos, o que também foi relatado por PEGÔ *et al* (2013), em *S. elegantulus*.

A utilização de areia foi efetiva nos dois tipos de estufa, na de sol pleno com sobrevivência de 80%; e na de meia sombra, com sobrevivência de 100%. Este fato pode estar relacionado com o ambiente de ocorrência natural se dar em um campo de altitude com solo do tipo arenoso, como apresentado no teste físico de solo realizado (anexo 1).

A estufa com sombrite de 50% proporcionou uma maior taxa de sobrevivência, possivelmente, pela similaridade da intensidade luminosa entre a estufa e a sala de crescimento, tendo em vista que com o aumento da luminosidade é possível que ocorra o aumento da evapotranspiração o que pode ocasionar a morte das plântulas durante a aclimatização.

Outro fator que pode ter interferido na maior taxa de sobrevivência das plântulas durante a aclimatização é o fato de no campo as plantas jovens não ficam, apesar do ambiente campestre, totalmente expostas ao sol, pois devido ao tamanho diminuto acabam por serem sombreadas por subarbustos e herbáceas de maior porte. Na prática elas crescem inicialmente em um ambiente de meia sombra (CASTELLANI *et al.*, 2001)

Este é o primeiro relato na literatura de um protocolo envolvido no processo de produção de *A. polyanthus*, e as informações presentes nesta dissertação quanto ao estabelecimento *in vitro* desta espécie podem contribuir para a domesticação e introdução no mercado desta linda planta nativa.

2.4 CONCLUSÃO

O uso do meio WPM com 75% ou 100% da concentração de sais é recomendado para a germinação *in vitro* das sementes, enquanto para o seu crescimento inicial é recomendado o meio MS com 75 ou 100% das concentrações de sais. Para a fase de aclimatização é recomendado estufa com sombrite de 50% e o substrato de areia lavada ou uma mistura de areia com vermiculita e Carolina Soil®.

3 CONCLUSÃO

O uso do meio WPM com 75% ou 100% da concentração de sais é recomendado para a germinação *in vitro* das sementes, enquanto para o seu crescimento inicial é recomendado o meio MS com 75 ou 100% das concentrações de sais. Para a fase de aclimatização é recomendado estufa com sombrite de 50% e o substrato de areia lavada ou uma mistura de areia com vermiculita e Carolina Soil®.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, M.M.S.. **Micropropagação e conservação in vitro de “sempre-vivas” nativas da Chapada Diamantina-BA**. Dissertação (Mestrado em agronomia), Universidade Estadual de Feira de Santana-UEFS. 2013.

ALBUQUERQUE, M. M. S.; BRITO, A. L.; LIMA, A. P. P. S.; ALVIM, B. F. M. & SANTANA, J. R. F. D. In vitro establishment of *Comanthera curralensis*, " sempre viva" native of Chapada Diamantina-Bahia. **Ciência Rural**, v. 46, p. 991-995, 2016.

AMBROSANO, M. N.. **Potencial ornamental e cultivo in vitro de Thaumatophyllum do Brasil**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2023.

BECKMANN-CAVALCANTE, M. Z.; AMARAL, G. C., SILVA, A. A., LIMA, M. P. D., & CAVALCANTE, I. H. L. Ornamental use of *Pfaffia glomerata* (spreng.) Pedersen. **Acta horticulturae**. p. 59-62, 2013.

BEDÊ, L. C. **Alternativas para o uso sustentado de sempre-vivas: efeitos do manejo extrativista sobre *Syngonanthus elegantulus* Ruhland (Eriocaulaceae)**. Tese (Doutorado em Ecologia, Conservação e Manejo da Vida Silvestre) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Mapa/ACS, 399p, 2009.

CASTELLANI, T. T.; D'EÇA-NEVES, F. F.. Population ecology of *Paepalanthus polyanthus*: predispersal hazards and seed production. **Acta Botanica Brasilica**, v. 14, p. 317-326, 2000.

CASTELLANI, T. T.; SCHERER, K. Z.; PAULA, G. de S.. Population ecology of *Paepalanthus polyanthus* (Bong.) Kunth: demography and life history of a sand dune monocarpic plant. **Brazilian Journal of Botany**, v. 24, p. 122-134, 2001.

COLOMBO, R. C., AVES, G. G. A. C., BERTONCELLI, D. J., VERO, F. da S., & FARIA, R. T.. In vitro multiplication and acclimatization of Heliconia hybrid (*Heliconia bihai* x *Heliconia caribaea* 'Jacquinii'). **Agronomy Science and Biotechnology**, 2(1), 1. 2016.

COSTA, F. N.; TROVÓ, M.; SANO, P. T. Eriocaulaceae na Cadeia do Espinhaço: riqueza, endemismo e ameaças. **Megadiversidade**, Belo Horizonte, v. 4, n. 1-2, p. 117-125, 2008.

COX, Douglas A. **Hartmann and Kester's plant propagation principles and practices**. HortScience, v. 53, n. 5, p. 741-741, 2018.

DA PAIXÃO SANTOS, J.; de DORNELLES, A. L. C.; PEREIRA, F. D.; & OLIVEIRA, L. M.. Indução de calos em sempre-viva (*Syngonanthus mucugensis* Giulietti), utilizando diferentes tipos de explantes e concentrações de BAP. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, 30(2), 127-131, 2008.

da SILVA, R. O.; CASSARINO-PEREZ, J.; STEENBOCK, W.; & SCHAFFRATH, R. V. Agroecologia, domesticação de plantas e sociobiodiversidade:(re) construindo o processo coevolutivo com as frutas nativas. **Desenvolvimento e meio ambiente** Vol. 59, p. 354-375, 2022.

DE CARVALHO, A. C. P. P.; TOMBOLATO, A. F. C.; RODRIGUES, A. D. J.; SANTOS, E. D. O.; & SILVA, F. D. (2009). Panorama da micropropagação no Brasil com ênfase em flores e plantas ornamentais.

DUARTE, D. M.. **Biometria de plantas e resistência térmica dos diásporos de "Sempre-Vivas" da família Eriocaulaceae**. Dissertação de mestrado – programa de pós graduação em botânica aplicada. UFLA 2020.

Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/> >. Acesso em: 04 nov. 2021

FARIA, R. T.; RODRIGUES, F. N.; OLIVEIRA, L. V. R.; & MÜLLER, C. *In vitro*

Dendrobium nobile plant growth and rooting in different sucrose concentrations. **Horticultura Brasileira** 22: 780-783, 2004.

FISCHER, S. Z.; STUMPF, E. R. T.; HEIDEN, G.; BARBIERI, R. L.; WASUM, R. A.; Plantas da flora brasileira no mercado internacional de floricultura. **Revista Brasileira de Biociências**, 5(1), 510-512, 2007

FLORES, R.; MAGGIO, L. P.; FLÔRES, P. Z.; BEMPK, G. S.; AULER, N. M.; CARVALHO, J. F.; & SILVEIRA, T. M. Otimização da produção de plantas *in vitro* de cultivares de *Ipomoea batatas*. **Revista de Ciências Agrárias**, 38(3), 429-437, 2015.

FORZZA, R. C. *et al.* (org.). **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. Rio de Janeiro: Editora JBRJ, 2010.

GIULIETTI, A. M.; SANO, P. T.; COSTA, F. N.; PARRA, L. R.; ECHTERNACHT, L.; TISSOT-SQUALI, M. L.; TROVÓ, M.; WATANABE, M. T. C.; HENSOLD, N.; ANDRINO, C. **Eriocaulaceae**. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Rio de Janeiro: **Jardim Botânico**, 2014.

GIULIETTI, N.; GIULIETTI, A. M.; PIRANI, J. R.; MENEZES, N. L. Estudos em sempre-vivas: importância econômica do extrativismo em Minas Gerais, Brasil. **Acta Botânica Brasilica**, Feira de Santana, v. 1, p. 179-193, dez. 1987.

GOEBEL, G. **Guia sobre plantas nativas ornamentais de restinga**. Biblioteca Universitária da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, ed, v. 1, 2019.

GONÇALVES-MAGALHÃES, C.; DE MORAIS, T. P.; DE SANTANA, D. G.; ASMAR, S. A.; RIBEIRO-OLIVEIRA, J. P.; & LUZ, J. M. Q.. *In vitro* propagation of *Paepalanthus chiquitensis* Herzog (Eriocaulaceae), an endangered everlasting flower species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, 153(2), 377-386, 2023.

HARTMANN, H. T. *et al.* **Plant propagation: principles and practices**. Ninth edition ed. NY, NY: Pearson, 2018.

HEIDEN, G.; BARBIERI, R. L.; STUMPF, E. R. T.. Considerações sobre o uso de plantas ornamentais nativas. **Ornamental Horticulture**, v. 12, n. 1, 2006.

HEIDEN, G.; STUMPF, E. R. T.; BARBIERI, R. L.; GROLLI, P. R. Uso de plantas subarborescentes e herbáceas nativas do Rio Grande do Sul como alternativa a ornamentais exóticas. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Paraná, v. 2, n. 1, p. 850-853, 2007.

HOEHNE, F. C. As plantas ornamentais da flora brasileira, e o seu papel como factores da salubridade publica, da estética urbana e artes decorativas nacionais. **São Paulo: Coleção de Separatas do Boletim de Agricultura**, v.1. 231p, 1930.

IVANOVA, M.; VAN STADEN, J.. Nitrogen source, concentration, and NH₄⁺: NO₃⁻ ratio influence shoot regeneration and hyperhydricity in tissue cultured *Aloe polyphylla*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 99, p. 167-174, 2009.

LABOURIAU, L. G. **A germinação das sementes**. Secretaria Geral da Organização dos Estados Americanos, Washington, Estados Unidos. 173p, 1983.

LIMA, A. P. P. S.; BRITO, A. L.; SANTANA, J. R. F.; In vitro culture of sempre-vivas species (*Comanthera*): a review. **Rodriguésia**, v. 72, 2021.

LIMA-BRITO, A.; ALBUQUERQUE, M. M. S.; RESENDE, S. V.; CARNEIRO, C. E.; & SANTANA, J. R. F.. Rustificação in vitro em diferentes ambientes e aclimatização de microplantas de *Comanthera mucugensis* Giul. subsp. mucugensis. **Revista Ciência Agronômica**, 47, 152-161, 2016.

LIMA-BRITO, A., RESENDE, S. V., LIMA, C. O. D. C., ALVIM, B. M., CARNEIRO, C. E., & SANTANA, J. R. F. D.. In vitro morphogenesis of *Syngonanthus mucugensis* Giul: subsp. mucugensis. **Ciência e Agrotecnologia**, 35, 502-510, 2011.

LLOYD, G. and MCCOWN, B.. Commercially-feasible micropropagation of mountain

laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **International Plant Propagation Society Proceedings** 30:421-427, 1980.

MYERS, N. MITTERMEIER, R. A., MITTERMEIER, C. G., DA FONSECA, G. A., & KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 853-858, 2000.

MAGALHÃES, C. G. **Germinação de diásporos e micropropagação da sempre-viva *Paepalanthus chiquitensis* Herzog (Eriocaulaceae)**. Dissertação (Mestrado em botânica). Universidade Estadual da Feira de Santana, 2018.

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

MARTINS, J. P. R., RODRIGUES, L. C. D. A., SILVA, T. D. S., GONTIJO, A. B. P. L., & FALQUETO, A. R.. Modulação das respostas anatômicas e fisiológicas de *Alcantarea imperialis* cultivadas in vitro induzidas por ANA e efeitos residuais de BAP. **Ornamental Horticulture**, 26, 283-297, 2020.

MEZZALIRA, F. K.; & KUHN, B. C.. Uso de ferramentas da bioinformática para determinação dos possíveis efeitos do β -caroteno no cultivo *in vitro* de *Phalaenopsis*. In: **Colloquium Agrariae**. ISSN: 1809-8215. p. 101-113, 2020.

MOREIRA, M. A., CARVALHO, J. G. D., PASQUAL, M., FRÁGUAS, C. B., & SILVA, A. B. D.. Efeito de substratos na aclimatização de mudas micropropagadas de abacaxizeiro cv. Pérola. **Ciência e Agrotecnologia**, 30, 875-879, 2006

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

NUNES, S. C. P.; NUNES, U. R.; FONSECA, P. G.; GRAZZIOTTI, P. H.; PEGO, R. G.; & MARRA, L. M.. Época, local de colheita e armazenamento na qualidade fisiológica da semente de sempre-viva (*Syngonanthus elegans* (Bong.) Ruhland-Eriocaulaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, 30, 32-39, 2008.

O' BRIEN, B. C. Xeriscaping: Sources of new native ornamental plants. In: JANICK, J., **Progress in new crops**. Arlington: ASHS. p. 536-539, 1996.

PAIXÃO-SANTOS, J. D., DORNELLES, A. L. C., SILVA, J. D. S., & RIOS, A. P. Germinação in vitro de *Syngonanthus mucugensis* Giulietti. **Sitientibus Série Ciências Biológicas**, 3(1), 571-589, 2003.

PÊGO, R. G.; PAIVA, P. D. de O.; PAIVA, R. Micropropagation of *Syngonanthus elegantulus*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 37, p. 32-39, 2013.

PÊGO, R. G.; PAIVA, P. D. de O.; PAIVA, R.; Micropropagation protocol for *Syngonanthus elegans* (Bong.) Ruhland: an ornamental species. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 36, p. 347-353, 2014.

PÊGO, R. G.; PAIVA, P. D. de O.; PAIVA, R.; *In vitro* establishment of *Syngonanthus paepalophyllus* in different culture media. **Acta Horticulturae**, p. 255-260, 2015.

PRUDENTE, D. D. O.; NERY, F. C.; DOS REIS, M. V.; DE OLIVEIRA PAIVA, P. D.; NERY, M. C.; AMIN, T. D. O. In vitro germination and acclimatization of everlasting flower. **Plant Cell Culture & Micropropagation** - ISSN 1808-9909, [S. l.], v. 11, n. 2, p. 62-69, 2015.

Reflora - Herbário Virtual. Disponível em:

<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/herbarioVirtual/ConsultaPublicoHVUC/ConsultaPublicoHVUC.do?idTestemunho=5242901> Acesso em 12/2/2024

Rural 46:991–995.

SANO, P. T. *Actinocephalus* (Körn.) Sano (*Paepalanthus* sect. *Actinocephalus*), a new genus of Eriocaulaceae, and other taxonomic and nomenclatural changes involving *Paepalanthus* Mart. **Taxon**, Paris, v. 53, p. 99–107, 2004.

SANO, P. T.; GIULIETTI, A. M.; COSTA, F. N.; TROVO, M.; ECHTERNACHT, L.;

TISSOT-SQUALLI, M. L.; WATANABE, M. T. C.; HENSOLD, N.; ANDRINO, C. O.; PARRA, L. R.. **Eriocaulaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015.

SATURNINO, H. M.; SATURNINO, M. A. C.; FERREIRA, M. B. Algumas considerações sobre exportação e importação de plantas ornamentais em Minas Gerais. In: **CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA**, 23., Belo Horizonte. 1977.

SCHNITZER, J. A.; BRITO, O. R.; & de FARIA, R. T.. Nitrogen fertilization in *Oncidium baueri* seedling growth. **African Journal of Agricultural Research**, 13(33), 1747-1753, 2018.

SOUSA, V. F.; VERSIEUX, L. M.. Ornamental potential of restinga plants from Rio Grande do Norte: towards a sustainable landscaping. **Plant Now**, v. 1, p. 28-37, 2020.

T ABACOW, J. Universalidade de Roberto Burle Marx. **Revista Brasileira de Horticultura**, Campinas, v. 2, p. 1-3, 1996.

TANNURE, M. P. **Filogenia molecular do gênero Actinocephalus (Koern.) Sano (Eriocaulaceae) e suas implicações taxonômicas**. Dissertação (Mestrado em genética) Universidade Federal de Minas Gerais, 2013.

UNEMOTO, L. K.; de FARIA, R. T.; MENEGUCE, B., & de ASSIS, A. M. Estabelecimento de um protocolo para a propagação *in vitro* de rainha-do-abismo, *Sinningia leucotricha* (Hoehne) Moore-(Gesneriaceae). **Acta Scientiarum. Agronomy**, 28(4), 503-506, (2006).

WINHELMANN, M. C., TEDESCO, M., LUCCHESI, J. R., FIOR, C. S., & SCHAFER, G.. Propagação *in vitro* de *Angelonia integerrima*. **Rodriguésia**, 70, 2019.

WREGGE, M. S. et al. **Atlas climático da região sul do Brasil: estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado;

Colombo: Embrapa Florestas, 2012.

ZILLER, S. R. Plantas exóticas invasoras: a ameaça da contaminação biológica.

Revista Ciência Hoje, Rio de Janeiro, v. 30, p. 77-79, 2001.

ANEXOS

ANEXO A

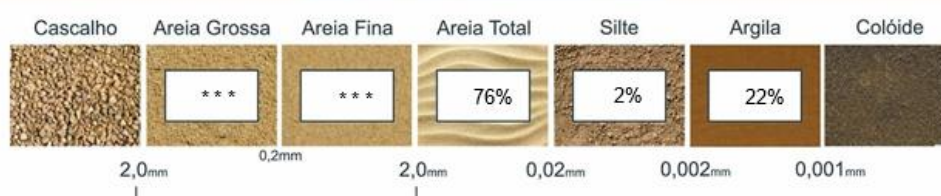
Teste físico de solo realizado no Morro da Pedra Branca, Ortigueira- PR.



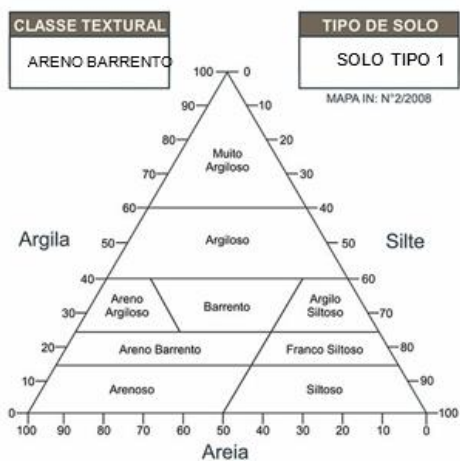
RELATÓRIO DE ENSAIO AGRÔNOMICO: FÍSICA DE SOLO

SOLICITANTE	SERGIO PEDRO JUNIOR	DATA COLETA	***
PROPRIETÁRIO	SERGIO PEDRO JUNIOR	DATA ENTRADA	22/04/2022
PROPRIEDADE	***	DATA SAÍDA	28/04/2022
TALHÃO	***	PROFUNDIDADE	***
MUNICÍPIO/UF	LONDRINA-PR	CÓD.LAB.	58384/370628
		ID AMOSTRA	03

COMPOSIÇÃO GRANULOMÉTRICA



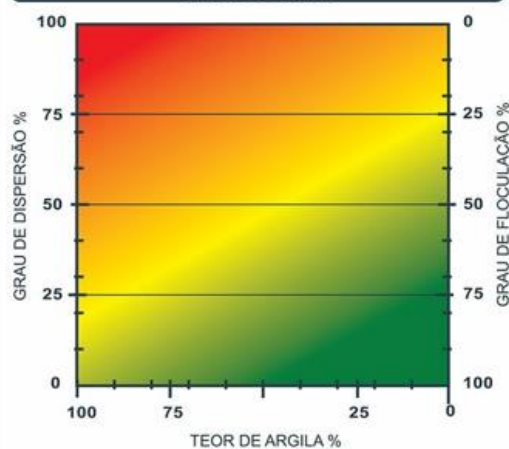
CLASSE TEXTURAL



CARACTERIZAÇÃO DAS ARGILAS

Argila Dispersa em Água	%	***
Grau de Floculação	%	***
Grau de Dispersão	%	***

ARGILOGRAMA



CARACTERIZAÇÃO FÍSICA

Densidade Global	g/cm ³	***
Densidade Real	g/cm ³	***
Densidade Crítica	g/cm ³	1,60
Densidade Relativa	%	***
Porosidade	%	***

Obs: Este relatório representa a amostra entregue ao laboratório e identificada pelo interessado.

ANEXO B

Teste químico de solo realizado no Morro da Pedra Branca, Ortigueira- PR.

LaborSolo

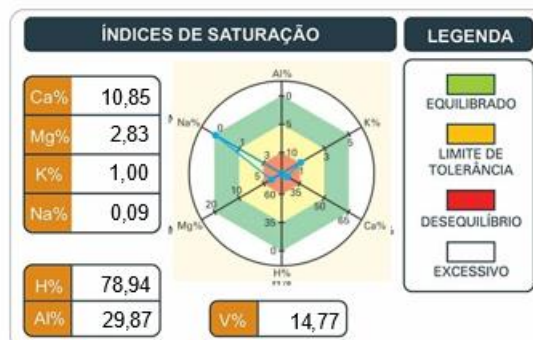
RELATÓRIO DE ENSAIO AGRÔNOMICO:
QUÍMICA DE SOLO

SOLICITANTE	SERGIO PEDRO JUNIOR	DATA COLETA	***
PROPRIETÁRIO	SERGIO PEDRO JUNIOR	DATA ENTRADA	22/04/2022
PROPRIEDADE	***	DATA SAÍDA	28/04/2022
TALHÃO	***	PROFUNDIDADE	***
		CÓD.LAB.	58384/370827
MUNICÍPIO/UF	LONDRINA-PR	ID AMOSTRA	02

PROPRIEDADES E CARACTERÍSTICAS			
DETERMINAÇÃO	cmol _e /dm ³	DETERMINAÇÃO	TEOR
CTC (pH 7,0)	10,97	Matéria Orgânica (M.O.S)	39,73
CTC (efetiva)	2,31	Fósforo Remanescente (P-Rem.)	35,40
CTC (determinada)	***		

REAÇÃO DO SOLO			
DETERMINAÇÃO	ÍNDICE	DETERMINAÇÃO	cmol _e /dm ³
pH em CaCl ₂	3,48	Acidez Potencial (H + Al)	9,35
pH em H ₂ O	4,34	Acidez Não Trocável (H ⁺)	8,66
pH em SMP	5,15	Acidez Trocável (Al ³⁺)	0,69

MACRONUTRIENTES CATIÔNICOS		NÍVEL DE SUFICIÊNCIA		
ELEMENTOS	cmol _e /dm ³	BAIXO	MÉDIO	ALTO
Cálcio (Ca ²⁺)	1,19			
Magnésio (Mg ²⁺)	0,31			
Potássio (K ⁺)	0,11			
Sódio (Na ⁺)	0,01			



MACRONUTRIENTES ANIÔNICOS		NÍVEL DE SUFICIÊNCIA		
ELEMENTOS	mg/dm ³	BAIXO	MÉDIO	ALTO
Fósforo Mehlich 1	5,95			
Fósforo Mehlich 3	12,89			
Enxofre (SO ₄ ²⁻)	7,34			

RESTITUIÇÃO DO EQUILÍBRIO DA SATURAÇÃO		
Bases Trocáveis	MÍNIMO cmol _e /dm ³	MÁXIMO cmol _e /dm ³
Cálcio (Ca ²⁺)	4,29	5,94
Magnésio (Mg ²⁺)	0,79	1,88
Potássio (K ⁺)	0,22	0,44

MICRONUTRIENTES		NÍVEL DE SUFICIÊNCIA		
ELEMENTOS	mg/dm ³	BAIXO	MÉDIO	ALTO
Boro (B)	0,12			
Cobre (Cu ²⁺)	0,37			
Ferro (Fe ²⁺)	410,26			
Manganês (Mn ²⁺)	3,68			
Zinco (Zn ²⁺)	1,08			

CAPACIDADE TAMPÃO - NÍVEL CRÍTICO		
mg/dm ³	mg/dm ³	mg/dm ³
18,13	10,85	1,82
Fósforo	Enxofre	Zinco

VALORES RELATIVOS		NÍVEL DE SUFICIÊNCIA		
PARÂMETRO	%	BAIXO	MÉDIO	ALTO
Fósforo Mehlich 1	33			
Enxofre (SO ₄ ²⁻)	68			
Zinco (Zn ²⁺)	59			

N.D. NAO DETECTADO. *** ENSAIO NÃO SOLICITADO.RG. 096 REV 03