



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Botânica

**Germinação, micropropagação e aclimatização de
Lobelia brasiliensis A. O. S. Vieira & Shepherd
(Campanulaceae), espécie ameaçada e endêmica do
Distrito Federal com potencial ornamental**

Rafael Pereira Niemeyer

Brasília, DF

2017

RAFAEL PEREIRA NIEMEYER

**Germinação, Micropropagação e Aclimatização de *Lobelia
brasiliensis* A. O. S. Vieira & Shepherd (Campanulaceae),
Espécie Ameaçada e Endêmica do Distrito Federal com
Potencial Ornamental**

Orientadora: Prof^a. Dra. Lucia Helena Soares-Silva

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Botânica, da Universidade de Brasília, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Botânica.

Brasília, DF
2017

Dedico este trabalho aos meus antepassados.
Aos meus pais, Aloysio e Analice e à minha
irmã, Ana Cláudia, pelo sentimento de
amor incondicional que têm por mim e às minhas
filhas Ananda e Flora por serem a luz em
minha caminhada e me fazerem
entender o que é o amor sem condições.

AGRADECIMENTOS

À nossa Grande Mãe Terra, a verdadeira fonte de inspiração e motivadora para todas as minhas ações neste plano.

À minha família por ser meu porto seguro. Minha mãe Analice, e minha irmã Ana Cláudia por sempre estarem ao meu lado, ao meu pai Aloysio por sempre incentivar e apoiar minhas loucuras. Às minhas filhas amadas, por nunca me deixarem esquecer de como a vida é maravilhosa. Ananda, sua maturidade e sabedoria me inspiram a ser um homem melhor. Flora sua alegria e descontração me faz um homem mais feliz.

À minha querida companheira Ju, a qual eu poderia agradecer pela ajuda no campo, na coleta dos dados, na análise dos dados, na escrita, pelos incentivos, pela positividade, pela parceria, pela compreensão, ainda sim seria pouco! Então, gatinha, prefiro agradecer sua existência nesse mundo, pois sei que por onde você passou fez a diferença e em minha vida não está sendo diferente.

Aos meus amigos pelo apoio, conselhos e reflexões.

À minha “irmã acadêmica” Renata Uchoa (Rê) por compartilhar das dores e alegrias dessa jornada. Sua força, competência e profissionalismo são fonte de inspiração para mim. Sem você não sei se fecharia esse ciclo!

À Maria Rosa Zanatta (Rosinha) minha amiga, conselheira, parceira de incontáveis momentos de felicidade e aprendizados. Que me acolheu na botânica e me mostrou o caminho das pedras.

À Tayna Oliveira (Tata) pela ajuda em campo e por ser um espírito de luz em minha vida.

À Carlos Vinicius Olenka (Vini) sua ajuda dentro do laboratório foi crucial para o desenvolvimento desse estudo, nossas conversas e desabafos foram ótimos também.

Ao querido amigo Luiz Felipe Silvestre (Formiga) que além da ajuda na estatística me deu valiosos conselhos.

À André Moreira (Bába) por ter sido sempre prestativo e atencioso comigo.

À todos os amigos do programa de pós-graduação, vocês são muito queridos!

À minha orientadora Dra. Lucia Helena pelo apoio e confiança.

Aos professores: Dr. Anderson Padilha e Dra. Conceição Eneida Silveira pelo auxílio com o delineamento experimental.

À técnica Aliny e ao secretário Natanael (Natan) por sempre serem prestativos, colaborativos, eficientes e atenciosos comigo.

À todos da equipe de apoio do CRAD, Patrícia, Lucileide, Vera, Izenilda e Luzinei pelas conversas, momentos de descontração na hora do almoço e a preocupação comigo.

Às estagiárias Malu, Nay, Mila, Gabi e Marcela por toda a ajuda.

À linda *Lobelia brasiliensis* que permeou meus pensamentos nesses últimos 2 anos, e que muito colaborou para realização deste estudo.

À minha cachorra Mel, que me fez companhia em diversas noites frias de trabalho.

E a todos irmãos de luz, encarnados e desencarnados, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADO!

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1 - Descrição Morfológica de Fruto, Semente, Plântula e da Germinação de *Lobelia brasiliensis* A. O. S. Vieira & G. J. Shepherd (Campanulaceae)

Figura 1 - Frutos de *Lobelia brasiliensis* A. O. S. Vieira & G. J. Shepherd A: Fruto com o perianto; B: Cápsula; C: Abertura loculicida parcial da cápsula; D: Estrias transversais do perianto.23

Figura 2 - Distribuição da biometria de fruto e semente de *Lobelia brasiliensis* A. O. S. Vieira & G. J. Shepherd.24

Figura 3 - Semente de *Lobelia brasiliensis*. A. O. S. Vieira & G. J. Shepherd AL: ala; FU: zona da cicatriz do funículo; NS: núcleo seminífero.25

Figura 4 - Fases da germinação da *Lobelia brasiliensis* A.O.S. Vieira & G. J. Shepherd *in vitro*. A (1º dia) início do desenvolvimento; B (5º dia) protusão da radícula; C (6º dia) diferenciação da raiz e do hipocótilo; D (8º dia) emergência do hipocótilo; E (10º dia) expansão dos cotilédones; F (20º dia) desenvolvimento de raiz adventícia; G (30º dia) plântula com eofilos parcialmente expandidos; H (60º dia) plântula com eofilos expandidos. (rd: radícula, cl: coleto, hp: hipocótilo, rp: raiz primária, ga: gema apical, co: cotilédone, eo: eofilo, ra: raiz adventícia, rs: raiz secundária).27

Capítulo 2 - Germinação *in vitro* e *ex vitro* de *Lobelia brasiliensis* A. O. S. Vieira & G. J. Shepherd (Campanulaceae)

Figura 1 – Aspecto morfológico das plantulas de *Lobelia brasiliensis* A.O.S. Vieira & G. J. Shepherd após 60 dias da semeadura/inoculação sob a influência de 5 tratamentos. A. Terra do Cerrado; B. Areia; C. Vermiculita; D. Bioplant[®]; E. Ágar-água. (eo= eofilo; co= cotilédone; ra= raiz adventícia; rp= raiz primária; rs= raiz secundária.)49

Capítulo 3 - Micropropagação e Aclimatização de *Lobelia brasiliensis* A. O. S. Vieira & G. J. Shepherd (Campanulaceae)

Figura 1 – Plântulas de *Lobelia brasiliensis* A. O. S. Vieira & G. J. Shepherd cultivadas *in vitro* e aclimatizadas. A-B-C= Fotos do primeiro, segundo e terceiro subcultivo com o número do tratamento relativo a cada frasco (1= 0,0 BAP-0,0 AIB; 2= 0,01 BAP-0,0 AIB; 3= 0,1 BAP- 0,0 AIB; 4= 1,0 BAP- 0,0 AIB; 5= 0,0 BAP-0,01 AIB; 6= 0,01 BAP-0,01 AIB; 7= 0,1 BAP- 0,01 AIB; 8= 1,0 BAP- 0,01 AIB todas concentrações são de mg.L-1); D= Plântulas pré-aclimatizadas no teste piloto; E= Plântula aclimatizada no teste piloto; F= Plântulas em fase de adaptação em condições de sala de crescimento; G= Plântulas na pré-aclimatização, H=Plântulas aclimatizadas.67

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2 - Germinação *in vitro* e *ex vitro* de *Lobelia brasiliensis* A. O. S. Vieira & G. J. Shepherd (Campanulaceae)

Tabela 1 –Tempo Médio de Germinação (TM), Velocidade de Germinação (V), Índice de Velocidade de Emergência (IVE), Porcentagem de Germinação e Porcentagem de Sobrevivência da Plântulas de *Lobelia brasiliensis* A.O.S. Vieira & G. J. Sherpherd Semeadas em 5 tratamentos diferentes.....44

Tabela 2 - Médias dos parâmetros medidos das plântulas de *Lobelia brasiliensis* A.O.S. Vieira & G. J. Sherpherd, com 30, 45 e 60 dias de cultivo *in vitro* e *ex vitro*.44

Tabela 3 - Médias dos parâmetros medidos das plântulas por tratamento de *Lobelia brasiliensis* A.O.S. Vieira & G. J. Sherpherd, ao final de 60 dias de cultivo *in vitro* e *ex vitro*.48

Tabela 4 - Tempo Médio de Germinação (TM), Velocidade de Germinação (V), Índice de Velocidade de Germinação (IVE), Porcentagem de Germinação e Sobrevivência das plântulas de *Lobelia brasiliensis* A.O.S. Vieira & G. J. Sherpherd submetidas a três tratamentos de desinfestação.....48

Capítulo 3 - Micropropagação e Aclimatização de *Lobelia brasiliensis* A. O. S. Vieira & G. J. Shepherd (Campanulaceae)

Tabela 1 – Média do número de brotos por explantes de *L. brasiliensis* A. O. S. Vieira & G. J. Shepherd em cada tratamento de cada subcultivo (Médias seguidas pela mesma letra minúscula (em cada coluna) não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade e médias seguidas pela mesma letra maiúscula (cada linha) não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade).63

Tabela 2 – Média do comprimento dos brotos por explantes de *L. brasiliensis* A. O. S. Vieira & G. J. Shepherd em cada tratamento e subcultivo em resposta aos diferentes tratamentos (Médias seguidas pela mesma letra minúscula (em cada coluna) não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade e médias seguidas pela mesma letra maiúscula (cada linha) não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade).64

Tabela 3 – Média da quantidade de raiz por explantes de *L. brasiliensis* A. O. S. Vieira & G. J. Shepherd em cada tratamento e cada subcultivo (Médias seguidas pela mesma letra minúscula (em cada coluna) não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade e médias seguidas pela mesma letra maiúscula (cada linha) não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade).65

Tabela 4 – Percentual de sobrevivência nas fases de aclimatização para os clones de *L. brasiliensis* A. O. S. Vieira & G. J. Shepherd em resposta aos diferentes tratamentos.66

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERENCIAL TEÓRICO	4
OBJETIVOS	9
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	10

CAPÍTULO 1 - Descrição Morfológica de Fruto, Semente, Plântula e da Germinação de *Lobelia brasiliensis* A. O. S. Vieira & G. J. Shepherd (Campanulaceae)

RESUMO.....	17
ABSTRACT.....	18
INTRODUÇÃO	19
METODOLOGIA	21
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
CONCLUSÃO	28
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29

CAPÍTULO 2 - Germinação *in vitro* e *ex vitro* de *Lobelia brasiliensis* A. O. S. Vieira & G. J. Shepherd (Campanulaceae)

RESUMO.....	34
ABSTRACT.....	35
INTRODUÇÃO	36
METODOLOGIA	37
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
CONCLUSÃO	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50

CAPÍTULO 3 - Micropropagação e Aclimatização de *Lobelia brasiliensis* A. O. S. Vieira & G. J. Shepherd (Campanulaceae)

RESUMO.....	57
ABSTRACT.....	58
INTRODUÇÃO.....	59
MATERIAL E MÉTODOS.....	60
RESULTADOS.....	62
DISCUSSÃO.....	68
CONCLUSÃO.....	71
REFERÊNCIAS.....	71
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	76



Fotos de *Lobelia brasiliensis* A. O. S. Vieira & G. J. Shepherd (Campanulaceae).

INTRODUÇÃO GERAL

O bioma Cerrado é a segunda maior formação vegetal brasileira depois da Amazônia e se classifica como a Savana Tropical mais rica do mundo em biodiversidade (Ribeiro e Walter, 1998). Concentra um terço da biodiversidade nacional e 5% da flora e da fauna mundiais, sendo 44% de sua flora endêmica (Klink e Machado, 2005). Diante de tamanha riqueza e endemismo no Cerrado, a necessidade de preservação se torna presente. Porém, quando se observam dados de 2002, 55% da porção original já foi devastada, o que demonstra que a ação caminhou no sentido contrário ao da preservação (Machado *et al.*, 2004). Tais dados podem se agravar para um cenário ainda pior, caso políticas e ações não sejam implantadas para conter a devastação do bioma.

Entre os anos 60 a 70, do século XX, começou uma onda de ocupação efetiva do Centro-Oeste brasileiro, quando a urbanização passou a se fazer mais presente, trazendo consigo estradas e cidades. Além disso, a agropecuária passou a desenvolver técnicas eficientes para a utilização massiva dessas terras. O resultado disso foi uma forte pressão antrópica sobre as áreas nativas desse bioma (Marinho-Filho *et al.*, 2010). O crescimento do agronegócio, no Cerrado, proporcionou um aumento significativo na produção agropecuária no Produto Interno Bruto (PIB). Em 2006, por exemplo, o agronegócio na região do Centro-Oeste já contribuía com 33% do total do PIB referente aos produtos gerados pelo agronegócio e empregava aproximadamente 40% da população economicamente ativa. Esta expressiva contribuição dos produtos gerados pelo agronegócio ao PIB se contrapõe com a perda acelerada e desregulada de áreas nativas e toda sua biodiversidade (Faleiro *et al.*, 2008).

Este conflito de cenários gera uma necessidade iminente de buscar uma solução para a conservação das espécies nativas do bioma junto à manutenção da produtividade que está alocada na região do Cerrado. Deve ser considerado ainda que várias das espécies vegetais são raras, endêmicas ou estão ameaçadas, o que aumenta a preocupação com a conservação.

Muitas dessas espécies, além de estarem enquadradas em alguma das categorias de risco da União Internacional para Conservação da Natureza (IUCN) pelo Centro Nacional de Conservação da Flora (CNCFlora), apresentam um grande potencial ornamental, como por exemplo, espécies

pertencentes às famílias: Acanthaceae Juss., Bignoniaceae Juss., Campanulaceae Juss., Combretaceae R. Br., Convolvulaceae Juss. e Malpighiaceae Juss. (Ramalho e Proença, 2004; Mendonça *et al.*, 2008).

A família Campanulaceae, abriga centenas de espécies espalhadas por todo o globo, distribuídas em zonas tropicais e subtropicais. Presentes em lugares úmidos ou paludosos, as espécies desta família são encontradas em altitudes que variam de 0 a 4.000 metros (Borio, 1959). Está subdividida em cinco subfamílias, das quais duas (Campanuloideae e Lobelioideae) estão representadas no Brasil. Sendo constituídas por seis gêneros com 56 espécies, sendo 39 delas endêmicas da flora brasileira (Vieira e Godoy, 2012).

Para Lammers (2011), a América é considerada a região do mundo onde se encontra o maior número de espécies de *Lobelia* L.: 415. No Brasil, este gênero está representado por 21 espécies e está distribuído nas regiões Norte (Acre, Amazonas, Roraima, Pará,), Nordeste (Bahia, Ceará, Pernambuco, Piauí), Centro-Oeste (Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul), Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo) e Sul (Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina) (Vieira e Godoy, 2012).

As plantas do gênero *Lobelia* L. são herbáceas, robustas e não ramificadas acima do nível do solo, com caules frequentemente fistulosos. A base do caule apresenta numerosas raízes adventícias que servem para dar apoio à planta, comumente encontrada em lugares brejosos. As folhas são simples, alternas, sem estípulas e diminuem o seu tamanho na direção do ápice (Borio, 1959; Vieira, 1998; Lammers, 2011).

As plantas do gênero *Lobelia* L., frequentemente, possuem tricomas nas estruturas florais. São encontradas floridas a partir de 1 metro de altura e, como a inflorescência é politélica (indeterminada), seu comprimento contribui para o comprimento total da planta. As inflorescências podem ser racemosas e carregadas em um cacho terminal, onde são encontrados concomitantemente botões florais, flores e frutos (Vieira, 1998; Lammers, 2011). Devido às flores vistosas, as espécies da família Campanulaceae têm grande potencial ornamental, mas apenas algumas espécies exóticas são

cultivadas no país, como exemplo a *Campanula medium* (L.) Schur, espécie europeia e comercializada no Brasil (Moreira *et al.*, 2016).

Além das questões expostas, o gênero *Lobelia* L., que possui espécies nativas em nosso bioma que se desenvolvem em lugares brejosos, normalmente não utilizados pela agricultura, também possui várias espécies que apresentam alcalóides com propriedades broncodilatadoras, anti-inflamatórias, antiasmáticas, antitumorais e analgésicas conhecidas (Felpin e Lebetron, 2004; Ma e Wink, 2008; Li *et al.*, 2016; Brown *et al.*, 2016; Stolom *et al.*, 2016). São raros os estudos realizados até o momento com a *Lobelia brasiliensis* e considerando a possibilidade de novas propriedades terapêuticas, a realização de um estudo fitoquímico, morfoanatômico e de atividades biológicas desta espécie justificam a realização dessas pesquisas.

Como a redução e modificação de habitats são as ameaças prementes para a conservação de Campanulaceae no Brasil (CNCFlora, 2012), estudos que ajudem na identificação, propagação e conservação de espécies raras e ameaçadas são bem vindos. Ainda que o cultivo *in vitro* seja um procedimento relevante na propagação de diferentes espécies (Ledo *et al.*, 2007), o nível de conhecimento sobre essa técnica em nativas arbustivas e herbáceas do Cerrado com potencial ornamental é incipiente, pois essas plantas encontram-se, ainda, como uma espécie não domesticada, apresentando grande variabilidade genética (Almeida, 2009). Dentre as aplicações da cultura de tecidos vegetais, a micropropagação é a técnica de maior impacto e de resultados mais concretos (Grattapaglia e Machado, 1998); engloba diferentes etapas que vão desde o estabelecimento da cultura *in vitro* até seu enraizamento, culminando com a aclimatização da microplanta (Bastos *et al.*, 2007). Desta forma este trabalho se propõe a contribuir com informações que auxiliam na identificação e propagação de *Lobelia brasiliensis* A. O. S. Vieira & G. J. Shepherd (Campanulaceae). A partir do estudo da morfologia do fruto, semente, plântula e processo de germinação da espécie. Assim como a influência de diferente substrato, incluindo a germinação *in vitro*, na sua germinação e o emprego da técnica de micropropagação e aclimatização.

REFERENCIAL TEÓRICO

1. Plantas raras e ameaçadas

São consideradas espécies ameaçadas aquelas que, por algum motivo, o número de seus indivíduos diminuíram na natureza, comparados a suas populações naturais, associado a diminuição da área de distribuição, tendendo à extinção. Sendo assim, diversos são os motivos que levam uma espécie a ser considerada ameaçada. Um mecanismo usado para a ciência destas espécies são as Listas Vermelhas (Redlist). Por meio destas, temos acesso a informações reunidas de modo regional, nacional ou mundial, sendo que o Centro Nacional de Conservação da Flora (CNCFlora) é responsável por diagnosticar, atualizar e propor novos mecanismos de gestão da Lista Oficial da Flora Brasileira Ameaçada de Extinção (CNCFlora, 2012).

Uma espécie geralmente é considerada rara quando seus representantes estão confinados a uma pequena área (área de ocorrência restrita), quando ocorrem sob condições específicas (área de ocupação restrita) e/ou quando são escassos ao longo de sua distribuição (baixa densidade) (Kruckeberg e Rabinowitz, 1985). Reveal (1981), afirma que:

"... raridade é meramente o estado atual de um organismo existente o que, por qualquer combinação de fatores biológicos ou físicos, é restrito ou em número ou área para um nível que é demonstravelmente menor do que a maioria de outros organismos ou entidades taxonômicas comparáveis".

O conceito de raridade, neste caso, está intimamente relacionado ao conceito de endemismo, uma vez que uma espécie endêmica tende a ter uma distribuição restrita e muitas vezes um baixo número de indivíduos. Dentre a gama de espécies presentes nessas categorias, endêmicas, raras e/ou ameaçadas, algumas apresentam um potencial ornamental.

2. Plantas com potencial ornamental

O prazer de cultivar plantas apenas pela composição estética acompanha as atividades humanas há milênios. Civilizações antigas já haviam despertado o interesse de aumentar o bem estar social e a qualidade de vida através desta prática.

O conceito de planta ornamental é muito amplo. Mello Filho (1986) conceitua planta ornamental como aquela capaz de despertar estímulos derivados de suas características intrínsecas, como colorido, textura, porte, forma, aspectos fenológicos, ou extrínsecas, como o balanço ao vento, a sombra projetada ou a composição estrutural com a vizinhança. Biondi (1990), por sua vez, enfatiza o aspecto estético, que se refere às características da beleza e harmonia e que as plantas são passíveis de manipulação por meio de suas qualidades físicas e estéticas visando uma relação perfeita unificada com outros elementos da composição. Esta autora ainda afirma que as plantas podem ser analisadas esteticamente de acordo com as seguintes variáveis:

- a) **Linha e forma;**
- b) **Cor;**
- c) **Porte;**
- d) **Textura;**
- e) **Estrutura;**
- f) **Simetria;**

O bioma Cerrado, com seu alto nível de espécies endêmicas e suas diversas fitofisionomias, tem um grande potencial para descoberta de espécies com esses atributos ornamentais e que podem ser exploradas comercialmente para esta finalidade. Um fato muito importante é de que muitas destas plantas de potencial ornamental do Cerrado estão enquadradas em alguma categoria de risco de extinção pelo CNCFlora, presente em alguma Lista Vermelha. Logo, a propagação destas espécies ornamentais pode ser uma forma de conservação e reintrodução das mesmas no bioma.

3. Germinação

A germinação das sementes pode ser definida como a emergência e o desenvolvimento das estruturas essenciais do embrião, em que se manifesta a sua capacidade para dar origem à uma plântula normal, em condições ambientais favoráveis (Borghetti e Ferreira, 2004). Esse é um processo biológico caracterizado por uma sequência ordenada de eventos bioquímicos, morfológicos e fisiológicos que resultam na retomada do crescimento do embrião, originando uma plântula (Costa e Marchi, 2008).

Os principais fatores ambientais que influenciam a germinação das sementes são o oxigênio, a temperatura, a luz e a água. A água é o fator que exerce maior influência sobre o processo germinativo (Carvalho e Nakagawa, 2000), estando envolvida direta ou indiretamente em todas as etapas do processo. Segundo Costa e Marchi (2008), a absorção de água pelas sementes contribui para amolecer o tegumento, intensificar a atividade respiratória, favorecer as trocas gasosas e induzir a atividade e síntese de enzimas e hormônios. A entrada de água nas sementes também promove o aumento do volume do embrião e dos tecidos de reserva, resultando na ruptura do tegumento e na protusão da raiz primária (Marcos Filho, 2005).

Outro fator ambiental que interfere tanto na porcentagem final como na velocidade de germinação é a temperatura. As sementes germinam em uma faixa de temperatura variável de acordo com a espécie, sendo que a temperatura ótima aquela quando ocorre o máximo de germinação em um menor período de tempo (Carvalho e Nakagawa, 2000; Bezerra et al., 2002).

O substrato também é importante para a germinação, pois a capacidade de retenção de água e oxigênio, a presença de patógenos e a estrutura física, dentre outros fatores, podem variar de um substrato para outro, interferindo na porcentagem de germinação das sementes (Perez et al., 1999; Wendling e Gatto, 2002; Floriano, 2004). Setubal e Afonso Neto (2000) citam que o substrato também pode ocasionar a ausência ou irregularidade de germinação, má formação de plantas e o aparecimento de sintomas de deficiência ou excesso de alguns nutrientes. Sendo assim, o substrato deve apresentar condições adequadas ao desenvolvimento do sistema radicular.

Em muitas espécies, a presença de luz, de alguma forma, favorece a germinação das sementes - fotoblastismo positivo; e, em outras espécies, o comportamento germinativo das sementes é melhor na ausência do que na presença de luz - fotoblastismo negativo (Labouriau e Valadares, 1976). Klein e Felipe (1991) denominaram o caráter fotoblástico positivo de “preferencial”, quando alguma germinação ocorre na ausência de luz, e de “absoluto”, quando a germinação é nula na ausência de luz.

Um procedimento recomendado para trabalhos de germinação de espécies não domesticadas é a germinação *in vitro*, uma vez que auxilia na identificação da existência ou não de mecanismos de dormência das sementes. Além disso, também possibilita identificar técnicas para acelerar e uniformizar a germinação, principalmente com o uso de giberelinas (Pinto e Lameira, 2001).

4. Micropropagação

A micropropagação é uma técnica dentro da cultura *in vitro* de propagação assexuada, que consiste em inocular e cultivar pequenos segmentos do caule contendo gema apical ou axilar em meio nutritivo previamente esterilizado (Grattapaglia e Machado, 1998). Em muitos casos onde não há disponibilidade de semente ao longo do ano, baixa produtividade de sementes ou material vegetativo escasso, essa técnica pode ser utilizada como alternativa para a produção de mudas em larga escala, principalmente para aquelas ameaçadas de extinção (Wochok, 1981).

De acordo com Guerra *et al.* (1999), a principal vantagem da micropropagação é a fixação de ganhos genéticos nas populações clonais e a obtenção de um grande número de plantas saudáveis e de alta qualidade em pequeno espaço físico e em curto tempo, independentemente de fatores climáticos limitantes. Estes fatos de interesse para o cultivo de plantas frutíferas e ornamentais.

Murashige (1974) e Deberg e Maene (1981) sugerem que o procedimento da micropropagação deve ser realizado seguindo as seguintes etapas:

Etapa I: seleção da matriz e do tipo de explante.

Etapa II: seleção do explante, desinfestação e inoculação em meio nutritivo sob condições assépticas;

Etapa III: multiplicação em meio de cultura;

Etapa IV: alongamento dos brotos.

Etapa V: transferência das partes aéreas produzidas para meio de enraizamento e transplante para solo ou substrato e aclimatização.

Na fase de multiplicação, alguns reguladores de crescimento vegetal são usados, principalmente as citocininas, para o crescimento de gemas adventícias e propagação da parte aérea (Shahzad *et al.*, 2012). Para isto, são usadas substâncias como: etanol 70%, cloreto de mercúrio e compostos inorgânicos derivados do cloro, sendo o mais usado hipoclorito de sódio e hipoclorito de cálcio (Gomes *et al.*, 2010). Já a fase de aclimatização das plantas oriundas do cultivo *in vitro* é apontada como uma das mais críticas do processo, onde ocorre a maioria das perdas (Guerra *et al.*, 1999). Para a redução destas perdas, a descontaminação dos explantes é imprescindível.

Diversos protocolos de micropropagação têm sido pesquisados para viabilizar a produção de espécies do Cerrado, sejam elas com valor comercial, ornamental, medicinal ou ecológico, como é o caso das espécies: *Lychnophora ericoides* Martins (Pereira *et al.*, 2005); *Jacaranda ulei* Bureau & K. Schum. (Fukuda, 2011); *Ruellia nitens* (Nees) Wassh., *Ruellia incompta* (Nees) Lindau e *Justicia lanstykii* Riz. (Lima, 2012). Em se tratando da espécie *Lobelia brasiliensis*, pesquisada neste trabalho, não existem estudos de germinação e micropropagação que possibilitem a elaboração de protocolos que venham a auxiliar a propagação e a conservação desta espécie de potencial ornamental, rara, ameaçada de extinção e endêmica do Distrito Federal.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

- Obter plantas de *Lobelia brasiliensis* enraizadas e prontas para o transplante, por meio da micropropagação ou germinação.

Objetivos Específicos

- Descrever as características morfológicas do fruto, semente e plântula de *Lobelia brasiliensis*;
- Estabelecer protocolos de germinação para *Lobelia brasiliensis*, testando vários substratos para a espécie;
- Estabelecer protocolos de micropropagação para *Lobelia brasiliensis*;
- Estabelecer protocolos de aclimatização para *Lobelia brasiliensis*;
- Comparar as plântulas originadas por germinação *in vitro* com aquelas germinadas *ex vitro*;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, L.F.P. Propagação por enxertia de araticum (*Annona crassiflora* Mart.) e atemóia (*Annona squamosa* L. x *Annona cherimola* Mill) em diferentes porta-enxertos de Annonaceae. Dissertação de Mestrado em Ciências Agrárias, Universidade de Brasília – DF, 2009. 98p.

BASTOS, L.P.; MOREIRA, M. J. S.; CARVALHO-COSTA, M. A. P.; ROCHA, M. C.; HANSEN, D. S.; SILVA, S. A.; DANTAS, A. C. V. L.; SOUSA, C. S. Cultivo *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa*). *Revista Brasileira de Biociências*, v.5, supl.2, p.1122-1124, 2007.

BEZERRA, A.M.E. MOMENTE, V.G., ARAÚJO, E.C., MEDEIROS FILHO, S. Germinação e desenvolvimento de plântulas de melão-de-são-caetano em diferentes ambientes e substratos. *Revista Ciência Agronômica*, v.33, p.39-44, 2002.

BIONDI, D. Paisagismo. Recife: Ed. UFRPR, 1990.

BORGHETTI, F.; FERREIRA, A. G. Interpretação de resultados de germinação. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (Org.). *Germinação do básico ao aplicado*. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 209-222.

BORIO, E. B. L. *Lobelia langeana* Dusén: contribuição para o estudo farmacognóstico. Tese para concurso à docência livre da cadeira de farmacognosia, Faculdade de Farmácia, Universidade do Paraná, 1959. 86p.

BROWN, D. P.; ROGERS, D. T.; POMERLEAU, F.; SIRIPURAPU, K. B.; KULSHRESTHA, M.; GERHARDT, G. A.; LITTLETON, J. M. Novel multifunctional pharmacology of lobinaline, the major alkaloid from *Lobelia cardinalis*. *Fitoterapia*, v.111, p.109–123, 2016.

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

CNCFLORA. Manual Operacional: Avaliação de Risco de Extinção das Espécies da Flora Brasileira. Ministério do Meio Ambiente. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro: MMA/JBRJ, 2012. 64p.

COSTA, C.J.; MARCHI, E.C.S. Germinação de sementes de palmeiras com potencial para produção de agroenergia. *Informativo Abrates*, v. 18, n. 1, p. 39-50, 2008.

DEBERG, P. C.; MAENE, L.V. A SHEME for a commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Scientia Horticulturae*, v. 14, p. 335-345, 1981.

FALEIRO, F. P.; GAMA, L. P.; FARIAS NETO, A. L.; SOUSA, E. S. In: FALEIRO, F.G.; FARIAS NETO, A.L. (Ed.) *Savanas: desafios e estratégias para o equilíbrio entre sociedade, agronegócio e recursos naturais*. Planaltina – DF: EMBRAPA, 2008. p.33- 46.

FELPIN, F.X.; LEBETRON, J. History, chemistry and biology of alkaloids from *Lobelia inflata*. *Tetrahedron*, v. 60, p.10.127-10.153, 2004.

FLORIANO, E. P. Germinação e dormência de sementes florestais. Santa Rosa: Anorgs, 2004. (Caderno didático, 2).

FUKUDA, W. S. Propagação *in vitro* de *Jacaranda ulei* Bureau & K. Schum. (Bignoniaceae). Brasília. Universidade de Brasília. Dissertação de mestrado. p.111, 2011.

GOMES, G. A. C.; PAIVA, R.; HERRERA, R. C.; PAIVA, P. D. O. Micropropagation of *Maclura tinctoria* L.: Na endangered wodyspecies. *Revista Árvore*, v.34 n.1, p.25-30, 2010.

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

GUERRA, M. P., DAL VESCO, L. L., PESCADOR, R., SCHUELTER, A. R., NODARI, R. O. Estabelecimento de um protocolo regenerativo para a micropropagação do abacaxizeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 34, n.9, p1557–1563, 1999.

KLEIN, A.; FELIPPE, G. M. Efeito da luz na germinação de sementes de ervas invasoras. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 26, n. 7, p. 955-966, 1991.

KLINK, C.A.; MACHADO, R.B. A conservação do Cerrado brasileiro. *Megadiversidade*, v.1, p.147-155, 2005.

KRUCKEBERG, A.R.; RABINOWITZ, D. Biological Aspects of Endemism in Higher Plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, v.16, p. 447-479, 1985.

LABORIAU, L. G.; VALADARES, M. E. B. On the germination of seeds of *Calotropis procera* (Ait). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 48, p. 263-284, 1976.

LAMMERS T. G. Revision of the Infrageneric Classification of *Lobelia* L. (Campanulaceae: Lobelioideae). *Annals of the Missouri Botanical Garden*, v. 98, p. 37-62, 2011.

LEDO, A. S.; SECA, G. S. V.; BARBOZA, S. B. S. C.; JUNIOR, J. F. S. Crescimento inicial de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) em diferentes meios de cultivo *in vitro*. *Ciência e Agrotecnologia*, v.5, n.4, p.989-993, 2007.

LI, X. J., BAO, W. R., LEUNG, C. H., MA, D. L., 4, ZHANG, G., LU, A. P., WANG, S. C., HAN, Q. H. Chemical Structure and Immunomodulating Activities of an Glucan Purified from *Lobelia chinensis*. *Lour. Molecules*, v.21, 779, 2016.

LIMA M. R. Estratégia de propagação para espécie subarbutiva de Acanthaceae Juss. com potencial ornamental. Brasília. Universidade de Brasília. Dissertação de mestrado. p.151, 2012.

MA, Y.; WINK, M. Lobeline, a piperidine alkaloid from *Lobelia* can reverse P-gp dependent multidrug resistance in tumor cells. *Phytomedicine*, v. 15, p.754-758, 2008.

MACHADO R.B., NETO M. B. R., PEREIRA P. G.P., F CALDAS E. F., GONÇALVES D. A., SANTOS N. S.TABOR K., STEININGER M. *Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro. Conservation International do Brasil*, Brasília: 2004.

MARCOS FILHO, J. *Fisiologia de sementes de plantas cultivadas*. FEALQ, 2005. p.197-252.

MARINHO-FILHO, J., MACHADO, R.B. E HENRIQUE, R.P.B. *Evolução do conhecimento e da conservação do Cerrado brasileiro*. In: DINIZ, I.R.; MARINHO-FILHO, J.; MACHADO, R.B.;

MELLO FILHO, L. E. Plantas ornamentais em paisagismo. *Anais do Encontro Nacional sobre Floricultura e Plantas Ornamentais*. Org. Kampf, A. N. P. p. 55-63, 1986.

MENDONÇA, R. C.; FELFILI, J. M.; WALTER, B. M. T.; SILVA JÚNIOR, M. C.; REZENDE, A. V.; FILGUEIRAS, T. S. E NOGUEIRA, P. E. Flora Vascular do Cerrado. In: SANO, S.M. e ALMEIDA, S.P. (Ed.). *Cerrado: ambiente e flora*. Planaltina – DF: EMBRAPA-CPAC, 2008. p. 289-556.

MOREIRA, A. L.; MUÇOUÇA, M. F. S.; MUÇOUÇA, F. J.; PEREIRA, T. C. C. P. L. Produção de campânula: um estudo sobre a viabilidade financeira. *Revista do Agronegócio*, v.5, p.24, 2016.

MURAGISHE, T. Plant propagation through tissue culture. *Annual Review of Plant Physiology*. v.25 p.135-166, 1974.

PEREIRA, A. M. S.; BERTONI, B., W.; FONSECA, V. S.; AMARANTE, M. F. C. FRANÇA, S. C. Micropropagação e conservação de *Lychnophora ericoides* Mart.: uma espécie medicinal do cerrado brasileiro. *Revista Fitos*, v.1, p.69–73, 2005.

PEREZ, S. C. J. G. A.; FANTI, S. C.; CASALI, C. A. Influência do armazenamento, substrato, envelhecimento precoce e profundidade de semeadura na germinação de canafístula. *Bragantia*, v. 58, n. 1, p. 57-68, 1999.

PINTO, J. E. B. P.; LAMEIRA, O. A. Micropropagação e metabólitos secundários *in vitro* de plantas medicinais. Lavras: UFLA/FAEPE. 2001, p.102.

RAMALHO, C. L.; PROENÇA, C.E.B. *Trepadeiras ornamentais do Cerrado*. Planaltina - DF: Embrapa Cerrados, UNB, 2004. p.59.

REVEAL, J.L. The concepts of rarity and population threats in plant communities. In: MORSE, L.E. E HENEFIN, M.S. *Rare plant conservation*. Bronx: New York Botanical Garden, 1981.

RIBEIRO, J. F.; WALTER, B.M.T. Fitofisionomias do Bioma Cerrado. In: SANO, S.M. e ALMEIDA, S.P. (Ed.). *Cerrado: ambiente e flora*. Planaltina – DF: EMBRAPA-CPAC, 1998. p.89–166.

SETUBAL, J.W.; AFONSO NETO, F.C. Efeito de substratos alternativos e tipos de bandejas na produção de mudas de pimentão. *Horticultura Brasileira*, v.18, p.593-594, 2000.

SHAHZAD, A; FAISAL, M.; AHMAD, N.; ANIS, M.; ALATAR, A.; HEND, A. A. Na eficiente system for in vitro multiplication of *Ocimum basilium* through node culture. *African Journal of Biotechnology* v.11 n.22, p.6055-6059, 2012.

STOLOM, S., OYEMITAN, I. A. MATEWU, R., OYEDEJI, O. O., OLUWAFEMI, S. O., NKEH-CHUNGAG, B. N. SONGCA, S. P., OYEDEJI, A. O. Chemical and biological studies of *Lobelia flaccida* (C. Presl) A.DC leaf: a medicinal plant used by traditional healers in Eastern Cape, South Africa. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, v.15, n.8, p.1.715-1.721, 2016.

VIEIRA, A. O. S. Estudos taxonômicos das espécies de *Lobelia* L. Campanulaceae Juss. que ocorrem no Brasil. Dissertação de Mestrado em Biologia Vegetal, Universidade de Campinas – SP, 1998.

VIEIRA, A. O. S.; GODOY, S. A. P. de (2012). Campanulaceae. In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB6633>>. Acesso em Junho de 2017.

WENDLING, I.; GATTO, A. Substratos, adubação e irrigação na produção de mudas. Viçosa: Aprenda Fácil, 2002.

WOCHOK, Z. S. The role of tissue culture in preserving threatened and endangered plant species. *Biological Conservation* v. 20 p. 83-89, 1981.

CAPÍTULO 1

Capítulo formatado para submissão na Botany (Impressa) -Qualis B1

Descrição Morfológica dos Frutos, Sementes, Plântulas e da Germinação de *Lobelia brasiliensis* A. O. S. Vieira & G. J. Shepherd (Campanulaceae)

Rafael Pereira Niemeyer*¹, Renata Uchôa Alves¹, Lúcia Helena Soares-Silva², Conceição Eneida dos Santos Silveira²

RESUMO

Objetivou-se neste trabalho descrever as características morfológicas de frutos, sementes, plântulas e da germinação de *Lobelia brasiliensis* A. O. S. Vieira & G. J. Shepherd. Para a descrição de frutos e sementes foram analisados o formato, cor, textura, brilho, peso, dimensões (comprimento e largura) e número de sementes. Para descrever as fases da germinação e plântulas foram selecionadas, aleatoriamente, 40 indivíduos germinados em substrato vermiculita, em casa de vegetação, irrigadas por aspersão e 40 indivíduos germinados *in vitro* em meio ágar-água e mantidos em sala de crescimento a 25 °C (± 2 °C), fotoperíodo de 16h e intensidade luminosa de 41 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Foram analisados o tipo, forma e coloração da raiz, pilosidade, forma e coloração do hipocótilo, textura, forma, tipo de margem, ápice e base dos cotilédones e eofilos. As sementes iniciaram a germinação, aproximadamente, 5 dias após a sementeira com a protrusão radicular. As plântulas de *L. brasiliensis*, após 60 dias, apresentaram hipocótilo curto, cilíndrico, ereto, de coloração verde claro e glabro. A germinação foi epígea e fanerocotiledonar, formando plântulas com sistema radicular ramificado e raízes adventícias, eofilos distintos, morfológicamente, dos metafilos. A descrição do processo germinativo, juntamente com a morfologia de plântulas, constitui importante elemento de reconhecimento da espécie.

Termos para indexação: Biometria de sementes, Cerrado, Endemismo, Espécie ameaçada, Potencial Ornamental.

*1 Mestrandos do Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade de Brasília, rpniemeyer@gmail.com.
2 Docente do Departamento de Botânica da Universidade de Brasília. 70910-100, Brasília, DF.

Morphological Description of Fruit, Seed, Seedling and Germination of *Lobelia brasiliensis* A. O. S. Vieira & G. J. Shepherd (Campanulaceae)

ABSTRACT

The objective of this work was to describe the morphological characteristics of the fruit, seeds, seedlings and germination of *Lobelia brasiliensis* A. O. S. Vieira & G. J. Shepherd. For the description of the fruit and seed were analyzed the shape, color, texture, gloss, weight, dimensions (length and width) and number of seeds. In order to describe the germination and seedling phases, were selected, randomly, 40 individuals germinated on vermiculite substrate in a greenhouse, irrigated by spraying and 40 individuals germinated in vitro in agar-water medium and kept in a growth room at 25 °C (± 2 ° C), photoperiod of 16h, and light intensity of 41 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. The type, shape and color of the root, hairiness, shape and color of the hypocotyl, texture, shape, type of margin, apex and base of cotyledons and eofilos were analyzed. The seed germination started about 5a days after sowing with radicle protrusion. The *L. brasiliensis* seedlings after 60 days presented short, cylindrical, erect hypocotyl, light green and glabrous. The germination was epigeous and phaneroconuclear, forming seedlings with a branched root system and adventitious roots, and the morphologically distinct phylum of the metaphyls. The description of the germination process, together with the seedling morphology, constitutes an important element of species recognition.

Index terms: Seed biometry, Cerrado, Endemic, Threatened species, Ornamental Potential.

INTRODUÇÃO

A família Campanulaceae Jussieu é de distribuição cosmopolita, presente em uma grande variedade de habitats e compreendem 84 gêneros e cerca de 2400 espécies (Antonelli, 2008). Esta família é dividida em cinco subfamílias: Campanuloideae, Nemacladoideae, Lobelioideae, Cyphocarpoideae e Cyphioideae, sendo Lobelioideae a maior delas com 29 gêneros e cerca de 1200 espécies, das quais metade são nativas da América do Sul (Lammers, 2007).

Espécies da subfamília Lobelioideae, apresentam formas de vida variadas, destacando a paquicaulia, desenvolvimento de caules eretos em plantas herbáceas, resultando em ervas com até 4 m de altura (Godoy, 2003). Representante importante desta subfamília é o gênero *Lobelia* L, que abriga centenas de espécies espalhadas por todo o globo, distribuídas em zonas tropicais e subtropicais, em lugares úmidos ou paludosos (Lammers, 2011).

A *Lobelia brasiliensis* A. O. S. Vieira & G. J. Shepherd (Campanulaceae), foco deste trabalho, está geograficamente isolada das demais espécies da subseção *Lobelia*. Sua área de distribuição está concentrada no Distrito Federal-Brasil, em locais úmidos próximos a matas ciliares e cerrados ou espaços abertos (Vieira e Sherpherd, 1998). Pouco se conhece sobre a *Lobelia brasiliensis*. No entanto, a espécie já está presente na lista vermelha (Redlist) do CNCFlora, visto que se enquadra nos critérios de extinção da União Internacional para Conservação da Natureza - IUCN (Martinelli et al., 2014).

Na Botânica Sistemática somente os caracteres de planta adulta são, frequentemente, utilizados, enquanto as características das plântulas são pouco usadas, talvez pela limitação de dados e ausência de tradição em usá-las (Silva et al. 2008). O reconhecimento morfológico das espécies em suas fases iniciais de vida agrega valores importantes para a taxonomia de diversos grupos vegetais, pois amplia a quantidade de informações morfológicas que podem ser utilizadas em conjunto com os caracteres tradicionalmente empregados para a identificação das espécies, proporcionando maiores chances para a correta identificação (Gurgel et al., 2012), assim como nos trabalhos realizados por Sousa et al. (2009, 2011) e Carvalho-Sobrinho e Queiroz (2011). No entanto, ainda observa-se uma

enorme lacuna de estudos sobre a caracterização morfológica de plântulas para vários grupos e uma escassez de espécimes no estágio de plântula nos herbários, restringindo, conseqüentemente, o conhecimento referente à taxonomia e biologia das espécies vegetais (Alves et al., 2013).

Estudos morfológicos de frutos, sementes, plântulas e mudas são essenciais para o reconhecimento das espécies em campo, estudos de recuperação de áreas degradadas e catalogação de espécies, porque possibilita uma identificação imediata e segura no campo (Barretto e Ferreira, 2011). Além disso, o uso de caracteres morfológicos contribui para estudos ecológicos relacionados ao conhecimento da espécie, mecanismos de dispersão, sucessão ecológica e regeneração natural, como pode ser visto no trabalho desenvolvido por Alves et al. (2013) e Gogosz et al. (2015).

A biometria de frutos e sementes pode ser utilizada em programas de melhoramento, pois, segundo Macedo et al. (2009) e Gonçalves et al. (2013), os caracteres biométricos permitem a diferenciação de espécies do mesmo gênero, a identificação da variabilidade genética dentro de populações da mesma espécie e a análise da relação entre esta variabilidade e fatores ambientais, como foi observado nos trabalhos desenvolvidos por Faria et al. (2009), Silva et al. (2013) e Matos et al. (2014).

Assim sendo, torna-se relevante o conhecimento sobre os caracteres morfológicos dos frutos, sementes e plântulas de *L. brasiliensis* (Campanulaceae) para fornecer subsídios para estudos de conservação e propagação da espécie. Nesse sentido, o estudo teve por objetivo ilustrar e descrever as características morfológicas externas dos frutos, sementes, plântulas e descrição do processo germinativo.

METODOLOGIA

Frutos de *Lobelia brasiliensis* foram coletados em Abril de 2016 na zona de chácaras do Córrego do Urubu - Região Administrativa do Lago Norte, Brasília-DF (15°42'33.70"S e 47°51'35.76"O). A população com aproximadamente 10 indivíduos desta espécie se encontrava em uma área de solo alagado, dentro de uma propriedade particular.

Foram utilizadas 100 cápsulas (frutos) e 100 sementes, escolhidas aleatoriamente, de frutos manualmente coletados. As cápsulas foram coletadas em momentos diferentes de maturação e dispersão. Após colhidas, as cápsulas foram acondicionadas em sacos de papel kraft e armazenadas à temperatura ambiente de 25 °C (± 2 °C). As sementes utilizadas estavam soltas dentro do saco e já se encontravam fora do fruto.

A análise dos frutos e das sementes foi realizada no Laboratório de Sementes Florestais e Cultura de Tecidos e na Casa de Vegetação do Centro de Referência em Conservação da Natureza e Recuperação de Áreas Degradadas – CRAD-UnB.

Um material testemunho foi depositado no Herbário da Universidade de Brasília- UB. (Niemeyer *et al.* 01)

Morfologia de frutos e sementes – Para descrição dos frutos foram utilizadas 100 unidades escolhidas, aleatoriamente, ao montante coletado e os caracteres analisados foram: formato, cor, textura, brilho, peso, dimensões (comprimento e largura) e número de sementes por fruto. As características consideradas para a descrição das sementes foram: formato, cor, brilho, dimensões (comprimento e largura) e textura. As observações foram feitas a olho nu e com auxílio de lupa de mesa e as medições foram feitas utilizando paquímetro digital (Digital Caliper[®]) e balança de precisão (Ohaus[®] Adventurer). O registro de imagem foi feito utilizando câmera digital (Nikon[®] Coolpix P510). Os métodos e termos adotados foram baseados nos trabalhos de Souza (2009), Almeida Jr. et al. (2010), Gordin et al. (2012) e Duarte et al. (2016). A análise estatística dos dados foi do tipo

descritiva (média, mediana e desvio padrão), utilizando o programa RStudio versão 0.99.903, 2009-2016.

Peso seco das sementes – A determinação do peso seco foi feita segundo as recomendações das “Regras para Análise de Sementes” (Brasil, 2009). Como não foi possível analisar o peso individual das sementes, por ser inferior ao peso percebido pela balança de precisão (0,0001g), 1.000 sementes foram pesadas visando indicar a média do peso fresco do lote e, posteriormente, foram acondicionadas em estufa sem ventilação forçada, a 80°C. As sementes permaneceram na estufa até atingir peso constante e as medições foram feitas em intervalos de 24 horas. O teor de água foi calculado pela seguinte fórmula: $U = \text{Peso da água}(\text{Pa}) / \text{peso da matéria seca}(\text{Pms})/100$.

Descrição do processo da germinação e do desenvolvimento de plântulas - Foram semeadas 200 sementes em bandeja de germinação (isopor) utilizando como substrato vermiculita de granulação média, em casa de vegetação com irrigação por aspersores (2x ao dia por 20'). Dessas foram selecionadas 40 unidades para o acompanhamento do desenvolvimento das plântulas até atingir o estágio de tirodendro. Considerou-se germinação a etapa compreendida entre emissão da radícula e a expansão total dos eofilos, quando a plântula foi considerada estabelecida (Souza, 2003). Os autores utilizados para categorização de tipo de plântula foram Duke (1965), Rizzini (1965) e Souza (2003).

Para visualizar o desenvolvimento das plântulas e seu sistema radicular, foram inoculadas 54 sementes em tubos de ensaio com 15mL de meio de cultura ágar-água (18 tubos com 3 sementes/tubo), mantidos em sala de crescimento a 25 °C (± 2 °C), fotoperíodo de 16h e intensidade luminosa de 41 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Dessas, foram selecionadas 40 unidades para avaliação dos caracteres morfológicos das plântulas. A análise desses caracteres foi feita até o 60º dia após a semeadura, sendo observados o comprimento, largura, tipo, forma, textura e coloração da raiz, hipocótilo, coleto, cotilédones e eofilos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A *Lobelia brasiliensis* apresenta fruto seco do tipo cápsula ovoide, bilocular e deiscência parcial, pilosa, acompanhada por parte do perianto do tipo marcescente (Figura 1A-C), com estrias transversais até a cápsula ovóide (Figura 1-D), e mais de 500 sementes por fruto.

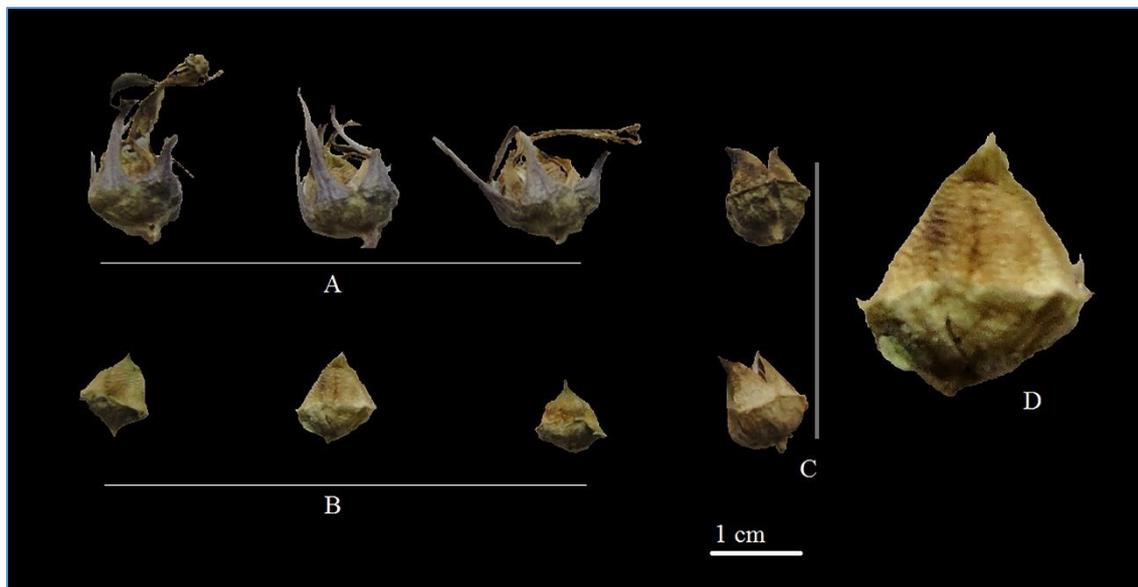


Figura 1: Frutos de *Lobelia brasiliensis* A. O. S. Vieira & G. J. Shepherd A: Fruto com o perianto; B: Cápsula; C: Abertura loculicida parcial da cápsula; D: Estrias transversais do perianto.

O epicarpo apresenta-se, externamente, castanho-claro, opaco, áspero e sem odores. As sépalas apresentam cor púrpura-clara e as pétalas, de coloração castanho-claro e aparência desidratada. A coloração do fruto varia de acordo com a maturação, modificando de castanho-claro quando imaturo a castanho escuro, quando maduro. Evento parecido ocorre com as sépalas, as quais variam de cor púrpura-clara quando o fruto está imaturo a castanho-claro quando maduros e as pétalas passam de castanho-claro quando o fruto está imaturo para castanho-escuro e aparência desidratada quando maduro. As descrições morfológicas para o fruto estão de acordo com as características de Campanulaceae, subgênero *Lobelia* L. (Lammers, 2007), bem como corroboram com as informações descritas para a espécie (Vieira e Shepherd, 1998).

Os frutos apresentam, em média, $9,33 \pm 0,74$ mm de comprimento sendo o tamanho máximo encontrado de 11,79 mm e o mínimo de 7,99 mm (Figura 2). Para a largura, a média foi de $8,62 \pm 0,71$ mm sendo o tamanho máximo encontrado de 10,71 mm e o mínimo de 6,73 (Figura 2). O comprimento dos frutos analisados neste estudo, coincidiu com a média descrita por Vieira e Sherperd (1998), porém houve uma grande discrepância na média da largura das cápsulas medidas, que foi de 20-25 mm. Essa diferença pode ser por conta das variações ambientais entre as populações estudadas.

A espessura média do pericarpo foi de $0,09 \pm 0,02$ mm, variando de 0,05 a 0,12 mm. Já o peso médio fresco do fruto foi de $0,04 \pm 0,01$ g, com variação de 0,004 a 0,07 g.

Os dados de frequência das características biométricas mostraram que os frutos tiveram maior uniformidade quanto à largura e o comprimento, sendo que 62% dos frutos encontravam-se entre 8 a 9 mm de largura. Para o comprimento do fruto 63% da amostra estavam compreendidos entre 9 a 10 mm. Em relação ao peso, 67% dos frutos encontravam-se entre 0,03 a 0,05g. A espessura do pericarpo teve uma concentração entre 0,08 mm e 0,10 mm (Figura 2).

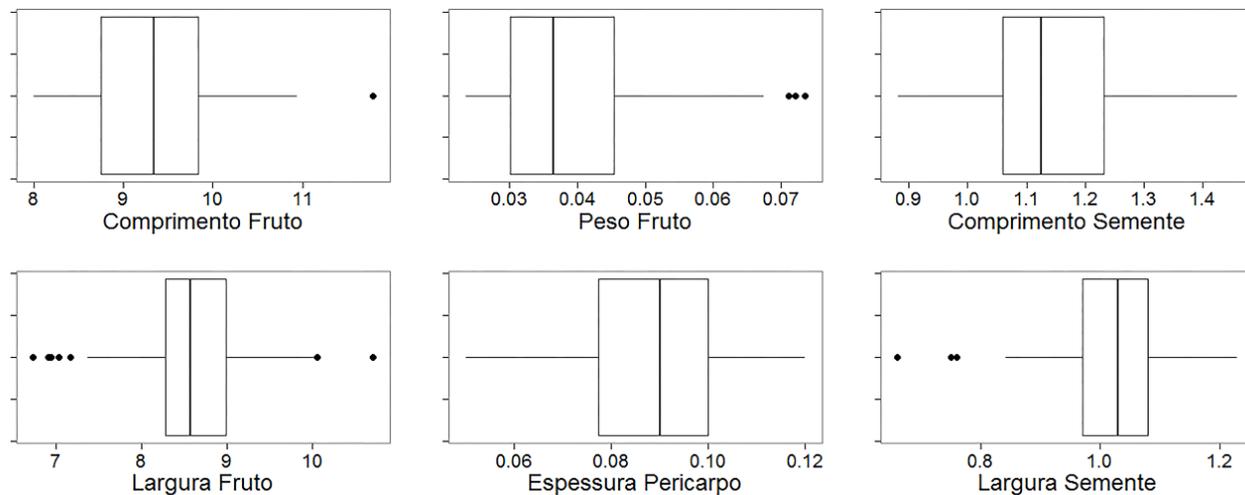


Figura 2: Distribuição da biometria de fruto e semente de *Lobelia brasiliensis* A. O. S. Vieira & G. J. Shepherd.

Em relação às sementes, essas são lenticulares, bitegmentadas e exalbuminadas. Apresentam testa levemente rugoso, fina e frágil, núcleo seminífero central com coloração castanho mais escura, circundada por uma ala amarela, apenas na zona do funículo a ala sofre uma leve reentrância no

tegumento (Figura 3). Pouca ou nenhuma variação morfológica foi visualizada no lote observado. O teor de água foi 8,45%, o que sugere ser uma semente ortodoxa (Sert et al., 2009).

Os dados obtidos para morfologia da sementes corroboram com os resultados descritos por Vieira e Sherpherd (1998) que descrevem-na como lenticulares, suborbiculares, amarelas, medindo 1,2 mm de comprimento e 1,0 mm de largura, descrições que são semelhantes com as obtidas neste estudo. Estas são muito numerosas dentro do fruto e, por serem aladas, sugerem dispersão pelo vento (Lammers, 2007).

O comprimento médio das sementes foi de $1,14 \pm 0,12$ mm, variando de 1,46 mm a 0,88 mm, enquanto a média da largura foi de $1,02 \pm 0,01$ mm variando de 1,23 mm a mais larga a 0,66 mm a mais estreita (Figura 2). A maior parte do lote (53%) apresentou sementes entre 0,95 a 1,5mm de comprimento. Houve uma maior homogeneidade nos dados da largura da semente, onde 73% da amostra, encontrou-se no intervalo de 0,9-1,1 mm (Figura 2).

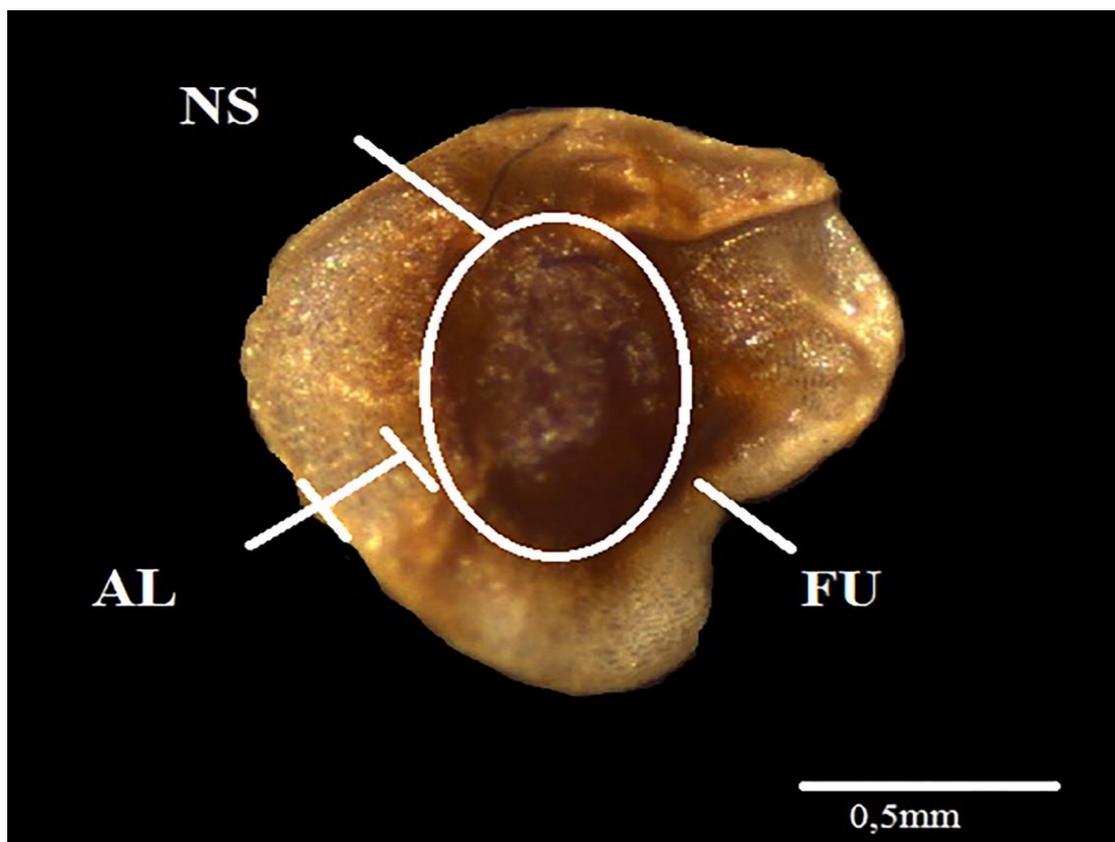


Figura 3: Semente de *Lobelia brasiliensis*. A. O. S. Vieira & G. J. Shepherd AL: ala; FU: zona da cicatriz do funículo; NS: núcleo seminífero.

A germinação teve início com o intumescimento do núcleo seminífero nas primeiras 24 horas (Figura 4A). A ala da semente tornou-se branco-translúcida e a protusão da radícula ocorreu na zona da cicatriz do funículo, a partir do 5º dia após a sementeira. Esta é de cor verde escura, glabra, curta, espessa (Figura 4B). No 7º dia ocorreu uma expansão na zona do coleto e a diferenciação da raiz primária e do hipocótilo (Figura 4C). A partir dessa fase, o hipocótilo, que é de cor verde-claro e glabro, se alonga podendo elevar o resto do tegumento para longe do substrato. A raiz primária apresenta-se bem formada e com diversos tricomas curtos e translúcidos e a coifa apresenta-se diferenciada (Figura 4D). Após 10 dias da sementeira os cotilédones estão totalmente expandidos, de coloração verde-escuro (indicativo de tecido fotossintetizante), foliáceos, com lâmina ovado, ápice levemente retuso, base arredondada e margem inteira; nesta mesma fase também foi possível observar a gema apical (Figura 4E). Com 20 dias o primeiro eofilo estava bem formado, mas parcialmente expandido. Já o lado abaxial do eofilo e porção do hipocótilo próximo ao cotilédone apresentaram-se de coloração púrpuro escuro. A raiz primária apresenta uma coloração róseo-claro e ocorre o surgimento de raízes adventícias (Figura 4F). No 30º dia após a sementeira, o eofilo estava parcialmente desenvolvido, os cotilédones um pouco maiores que na fase anterior e de coloração verde claro; o hipocótilo não se expandiu e a raiz primária e a raiz adventícia se alongaram (Figura 4G). Após 60 dias da sementeira, a plântula estava com dois eofilos totalmente expandidos, que são simples, com pecíolo côncavo convexo de coloração púrpura, lado abaxial e adaxial da lâmina verde escuro com manchas nas tonalidades que vão de púrpuro escuro a púrpuro claro; sua lâmina era elíptico, de ápice e base arredondados, margem crenada e com tricomas. Nessa fase, o hipocótilo mostra-se curto, cilíndrico, ereto de coloração verde claro e glabro e o sistema radicular apresenta-se bem desenvolvido, com diversas raízes secundárias (Figura 4H).

A porcentagem de sementes germinadas para estas observações foram de: 63% para as colocadas em vermiculita e 85% para as germinadas *in vitro*.

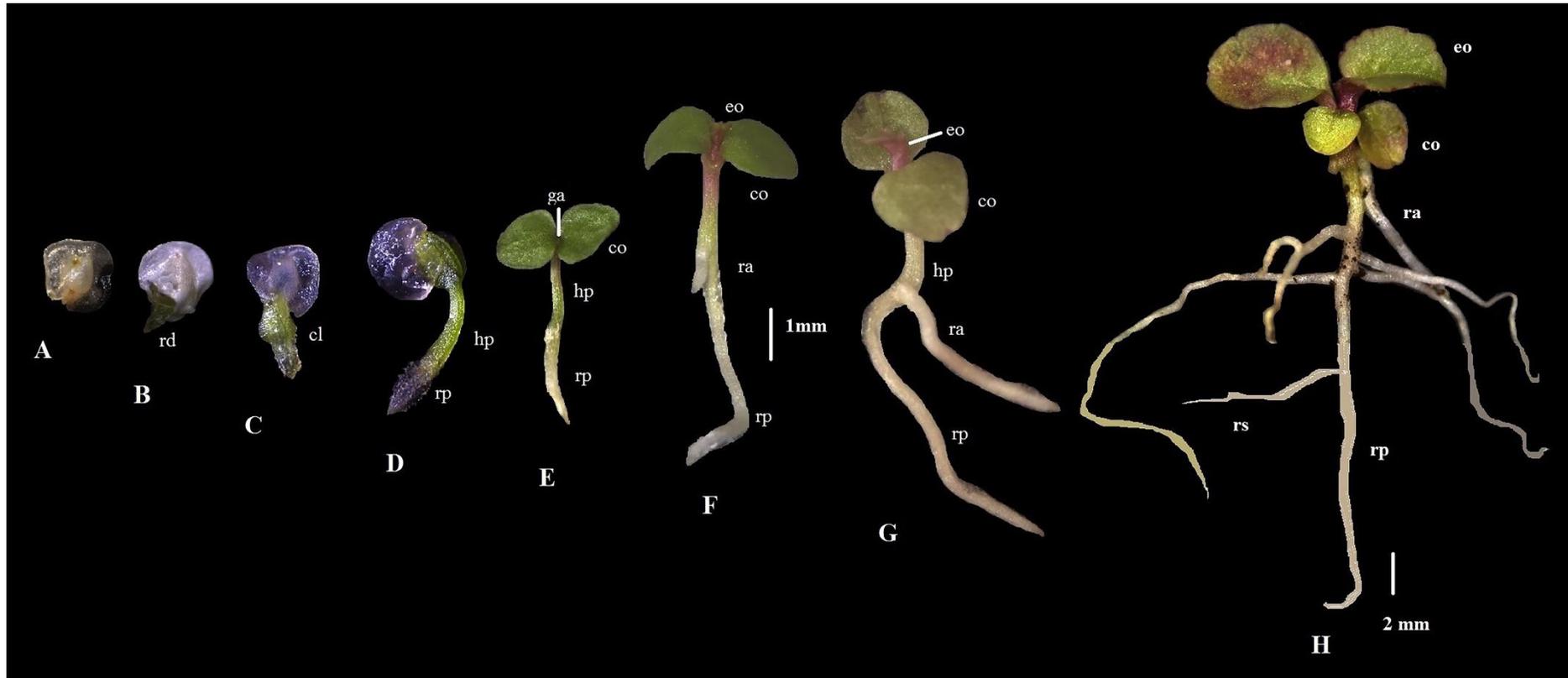


Figura 4: Fases da germinação da *Lobelia brasiliensis* A.O.S. Vieira & G. J. Sherpherd *in vitro*. A (1º dia) início do desenvolvimento; B (5º dia) protusão da radícula; C (6º dia) diferenciação da raiz e do hipocótilo; D (8º dia) emergência do hipocótilo; E (10º dia) expansão dos cotilédones; F (20º dia) desenvolvimento de raiz adventícia; G (30º dia) plântula com eofilos parcialmente expandidos; H (60º dia) plântula com eofilos expandidos. (rd: radícula, cl: coleto, hp: hipocótilo, rp: raiz primária, ga: gema apical, co: cotilédone, eo: eofilo, ra: raiz adventícia, rs: raiz secundária).

A plântula de *L. brasiliensis* é do tipo fanerocotiledonar epígea. O hipocótilo se alonga pouco nos primeiros 60 dias, deixando os cotilédones muito próximos ao substrato, sendo funcionais até o desenvolvimento tardio da plântula. O epicótilo é muito reduzido, o que torna muito difícil sua visualização e os dois eofilos diferem, morfológicamente, dos metafilos descrito por Vieira e Sherpherd (1998). Até o 60º dia da semeadura, as plântulas não apresentaram nenhum metafilo e o sistema radicular era ramificado, com a presença de raízes adventícias na base do caule. Para o acompanhamento da formação de metafilos um tempo maior de observação será necessário.

Assim como Lammers (2011) descreve para as plantas do gênero *Lobelia* L, a plântula de *L. brasiliensis* é do tipo fanerocotiledonar e apresenta formação de raízes adventícias no começo de seu desenvolvimento, mostrando sua aptidão para se estabelecerem em lugares brejosos.

CONCLUSÃO

A observação por mais de 60 dias após a semeadura, é necessário para a descrição morfológica do epicótilo e dos metafilos.

Os aspectos morfológicos do fruto, semente, fases da germinação e plântula de *L. brasiliensis* são bastantes homogêneos em todas as fases, portanto confiáveis para a identificação da espécie em campo, identificação taxonômica, estudos de regeneração natural, interpretação de testes de germinação e produção de mudas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA JR., E.B.; LIMA, L.F.; LIMA, P.B.; ZICKEL, C.S. Descrição morfológica de frutos e sementes *Manilkara salzmannii* (Sapotaceae). *Floresta*, v.40, n.3, p.535-540, 2010.

<http://revistas.ufpr.br/floresta/article/view/18915/12233>

ALVES, M.C.J.L.; LIMA, P.B.; LIMA, L.F.; ZICKEL, C.S. Descrição morfológica para identificação das plântulas de nove espécies lenhosas de uma floresta de restinga. *Biota Neotropica*, v.13, n.3, p.374-383, 2013. <http://www.scielo.br/pdf/bn/v13n3/1676-0603-bn-13-03-374.pdf>

ANTONELLI, A. Higher level phylogeny and evolutionary trends in campanulaceae subfam. Lobelioideae: Molecular signal overshadows morphology. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v.46, p.1-18, 2008. http://www.antonelli-lab.net/pdf/Antonelli_MPE-2008Lobelioideae.pdf

BARRETTO, S.S.B.; FERREIRA, R.A. Aspectos morfológicos de frutos, sementes, plântulas e mudas de Leguminosae mimosoideae: *Anadenanthera colubrina* (Vellozo) Brenan e *Enterolobium contortisiliquum* (Vellozo) Morong. *Revista Brasileira de Sementes*, v.33, n.2, p.223-232, 2011.

<http://www.scielo.br/pdf/rbs/v33n2/04.pdf>

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 395p.

http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/2946_regras_analise_sementes.pdf

CARVALHO-SOBRINHO, J. G.; QUEIROZ, L. P. Morphological cladistic analysis of *Pseudobombax Dugand* (Malvaceae, Bombacoideae) and allied genera. *Revista Brasil. Bot.*, v.34, n.2, p.197-209, 2011. <http://www.scielo.br/pdf/rbb/v34n2/a07v34n2.pdf>

DUARTE, M. M.; PRADO DE PAULA, S. R.; FERREIRA, F. R. L.; NOGUEIRA, A. C. Morphological characterization of fruit, seed and seedling and germination of *Hymenaea courbaril* L. (Fabaceae) ('Jatobá'). *Journal of Seed Science*, v.38 n.3, p.204-211, 2016. <http://www.scielo.br/pdf/jss/v38n3/2317-1545-jss-v38n3159734.pdf>

DUKE, J. A. Keys for the identification of seedling of some prominent woody species in eight forest types in Puerto Rico. *Annal of the Missouri Botanical Garden*, v.52. n.3, p. 314-350, 1965. <http://www.jstor.org/stable/2394796>

FARIA, R.A.P.G.; SILVA, A.N.; ALBUQUERQUE, M.C.F.; COELHO, M.F.B. Características biométricas e de plântulas de *Brosimum gaudichaudii* Tréc. oriundas de diferentes procedências do cerrado mato-grossense. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, v.11, n.4, p.414-421, 2009. <http://www.scielo.br/pdf/rbpm/v11n4/a09v11n4.pdf>

GODOY, S. A. P. Campanulaceae In: WANDERLEY, M.G.L.; SHEPHERD G.J.; GIULIETTI, A.M; MELHEM, T. S.; KIRIZAWA, M. Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo. v. 3. São Paulo: Editora Rima/FAPESP, 2003. 373p. <http://botanica.sp.gov.br/files/2016/06/FFESP-Volume-III.pdf>

GOGOSZ, A.M.; BOEGER, M.R.T.; COSMO, N.L.; NOGUEIRA, A.C. Morfologia de diásporos e plântulas de espécies arbóreas da floresta com araucária, no sul do Brasil. *Floresta*, v.45, n.4, p.819-832, 2015. <http://ojs.c3sl.ufpr.br/ojs/index.php/floresta/article/view/35017/27442>

GONÇALVES, L.G.V.; ANDRADE, F.R.; MARIMON JUNIOR, B.H.; SCHOSSLER, T.R.; LENZA, E.; MARIMON, B.S. Biometria de frutos e sementes de mangaba (*Hancronia speciosa*

Gomes) em vegetação natural na região de Mato Grosso, Brasil. *Revista de Ciências Agrárias*, v.36, n.1, p.31-40, 2013. <http://www.scielo.mec.pt/pdf/rca/v36n1/v36n1a06.pdf>

GORDIN, C. R. B.; MARQUES, R. F.; MASETTO, T. E.; SCALON, S.P.Q. Germinação, biometria de sementes e morfologia de plântulas de *Guizotia abyssinica* Cass. *Revista Brasileira de Sementes*, v. 34, n.4 p.619-627, 2012. <http://www.scielo.br/pdf/rbs/v34n4/13.pdf>

GURGEL, E.S.C., SANTOS, J.U.M., LUCAS, F.C.A. e BASTOS, M.N. C. Morfologia de plântulas de Leguminosae e o potencial sistemático. *Rodriguésia*, v.63, n.1, p.065-073, 2012. <http://www.scielo.br/pdf/rod/v63n1/a06v63n1.pdf>

LAMMERS T.G. Campanulaceae Flowering Eudicot plants In: Kadereit, J.W.; Jeffrey, C. The Families and Genera of Vascular Plants, v.8. Berlin: SPRINGER, 2007. p.26-56.

LAMMERS T. G. Revision of the infrageneric classification of *Lobelia* L. (Campanulaceae: Lobelioideae). *Annals of the Missouri Botanical Garden*, v.98, n.1, p.37-62, 2011. <http://dx.doi.org/10.3417/2007150>

MACEDO, M.C.; SCALON, S.P.Q.; SARI, A.P.; SCALON FILHO, H.; ROSA, Y.B.C.J.; ROBAINA, A.D. Biometria de frutos e sementes e germinação de *Magonia pubescens* St. Hil (Sapindaceae). *Revista Brasileira de Sementes*, v.31, n.2, p.202-211, 2009. <http://www.scielo.br/pdf/rbs/v31n2/v31n2a24.pdf>

MARTINELLI, G.; MESSINA, T.; SANTOS-FILHO, L. Livro vermelho da flora do Brasil – Plantas raras do Cerrado. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro/ CNCFlora, 2014. 320p. <http://dspace.jbrj.gov.br/jspui/handle/doc/27>

MATOS, F. S.; NUNES, Y. R.F.; SILVA, M. A. P.; OLIVEIRA, I. S. Variação biométrica de diásporos de buriti (*Mauritia flexuosa* L.f. – Arecaceae) em veredas em diferentes estágios de conservação. *Ciências Florestais*, v.24, n.4. p.833-842, 2014.

<http://www.scielo.br/pdf/cflo/v24n4/0103-9954-cflo-24-04-00833.pdf>

RIZZINI, C. T. Experimental studies on seedlings development of cerrado woody plants. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, v.52, n.3 p.410-426, 1965. <http://www.jstor.org/stable/2394803>

SERT, M. A.; BOMATO, C. M.; SOUZA, L. A. Germinação de sementes. In: SOUZA, L.A. (Org.). Sementes e plântulas: germinação, estrutura e adaptação. Ponta Grossa, PR: TODAPALAVRA, 2009. p.89-118.

SILVA, K. B.; ALVES, E. U.; BRUNO, R. L. A.; MATOS, V. P.; GONÇALVES, E. P. Morfologia de frutos, sementes, plântulas e plantas de *Erythrina velutina* Willd., Leguminosae-Papilionideae. *Revista Brasileira de Sementes*, v.30, n.3, p.104-114, 2008.

<http://www.scielo.br/pdf/rbs/v30n3/14.pdf>

SILVA, G. L.; FILHO, S. M.; ZANDAVALLI, R. B.; PEREIRA, D. S.; SOUSA, G. G. Biometria e emergência de *Amburana cearensis* (Allemão) A.C. Smith em função da coloração do fruto. *Ciência Florestal*, v.23, n.4, p.635-642, 2013. <http://www.scielo.br/pdf/cflo/v23n4/1980-5098-cflo-23-04-00635.pdf>

SOUZA, L. A. Morfologia e anatomia vegetal: célula, tecidos, órgãos e plântula. Ponta Grossa, PR: UEPG, 2003. 558p.

SOUZA, L. A. Sementes e Plântulas: Germinação, estrutura e adaptação. Ponta Grossa, PR: TODAPALAVRA, 2009. 280p.

SOUSA, J. S.; BASTOS, M. N. C.; ROCHA, A. E. S. Mimosoideae (Leguminosae) do Litoral Paraense. *Acta Amazonica*, v.39 n.4, p.799-812, 2009.
<http://www.scielo.br/pdf/aa/v39n4/v39n4a08.pdf>

SOUSA, J. S.; BASTOS, M. N. C.; GURGEL, E. S. C. O gênero *Inga* (Leguminosae-Mimosoideae) na Província Petrolífera de Urucu, Coari, Amazonas, Brasil. *Rodriguésia*, v.62, n.2, p.283-297, 2011.
<http://www.scielo.br/pdf/rod/v62n2/2175-7860-rod-62-02-0283.pdf>

VIEIRA A. O. S.; G. J. SHEPHERD. A new species of *lobelia* (Campanulaceae) from Brazil. *Missouri Botanical Garden*, v.8, n.4, p.457-460, 1998. <http://www.jstor.org/stable/3391874>

CAPÍTULO 2

Capítulo formatado para submissão na Journal of seeds Science (Impressa) - Qualis B2

Germinação *in vitro* e *ex vitro* de *Lobelia brasiliensis* A. O. S. Vieira & G. J.

Shepherd (Campanulaceae)

RESUMO

Lobelia brasiliensis A. O. S. Vieira & G. J. Shepherd é uma espécie de Campanulaceae rara, ameaçada, endêmica do Distrito Federal e com potencial ornamental. Conhecer o processo da germinação e o desenvolvimento de plântulas desta espécie é fundamental como estratégia de cultivo, para futura reintrodução da mesma em seu meio natural. Com esse intuito, sementes foram coletadas, em terreno alagado, próximo ao córrego do Urubu, Brasília – DF. Para a germinação e estabelecimento de plântulas de *L. brasiliensis* foram testados 5 diferentes substratos (areia lavada, Bioplant[®], terra do Cerrado, vermiculita e ágar-água). Os experimentos foram avaliados aos 30, 45 e 60 dias de cultivo e foram avaliadas as porcentagens de germinação, sobrevivência e contaminação (cultivo *in vitro*), tamanho do hipocótilo e distância entre o ápice dos cotilédones (DAC). Com 60 dias, foram retirados indivíduos dos substratos e mensurados o tamanho e a quantidade total de raízes. As plântulas germinadas *in vitro* obtiveram as maiores médias e as germinadas na areia apresentaram as menores médias de germinação. Todos os tratamentos de desinfestação foram eficientes. Algumas pequenas diferenças morfológicas entre as plântulas foram observadas entre os tratamentos de germinação. Sementes de *L. brasiliensis* apresentaram altas taxas de germinação em todos os substratos avaliados, porém a sobrevivência e o estabelecimento da plântula foram diretamente relacionados a capacidade do substrato de reter água.

Palavra-chave: Cerrado, espécie ameaçada, plântula, substratos.

Germination *in vitro* e *ex vitro* of *Lobelia brasiliensis* A. O. S. Vieira & G. J. Shepherd. (Campanulaceae)

ABSTRACT

Lobelia brasiliensis A. O. S. Vieira & G. J. Shepherd is a species of rare, endangered Campanulaceae endemic to the Distrito Federal and with ornamental potential. To know the process of germination and the development of the seedling of this species is fundamental as a strategy of cultivation and for future reintroduction of the same in its natural environment. For this purpose, seeds were collected on flooded land near the Urubu stream, Brasília - DF. For the germination and establishment of *L. brasiliensis* seedlings, 5 different substrates (washed sand, Bioplant®, Cerrado soil, vermiculite and agar-water) were tested. The experiments were evaluated at 30, 45 and 60 days of cultivation and the percentage of germination, survival and contamination (in vitro quantitative), hypocotyl size and distance between the apex of the cotyledons (DAC) were evaluated. At 60 days, individuals were removed from the substrates and the total root size and amount were measured. The germinated seedlings in vitro obtained the highest averages and the germinated ones in the sand presented the smallest means. All disinfestation treatments were efficient. Some small morphological differences between the seedlings were observed among the germination treatments. Seeds of *L. brasiliensis* germinated well in all substrate evaluated, but survival and establishment of the seedling are directly related to the ability of the substrate to retain water.

Index terms: Cerrado, threatened species, seedlings, substrates.

INTRODUÇÃO

O Cerrado brasileiro é caracterizado por sua sazonalidade pluviométrica e baixa disponibilidade nutricional no solo (Goodland e Pollard, 1973), sendo esses estresses marcantes na determinação das suas fisionomias e na composição florística (Ribeiro e Walter, 1998). A sazonalidade pluviométrica no Cerrado é marcada por “verões” (Outubro a Abril) quentes e chuvosos e “invernos” (Maio a Setembro) frios e secos (Ratter et al., 1997). A alta sazonalidade do bioma influencia diretamente nos padrões reprodutivos e vegetativos das espécies nele presentes. Desta forma, as populações vegetais são altamente adaptadas aos fatores bióticos e abióticos do Cerrado (Mantovani e Martins, 1988; Franco, 2002). Em relação ao processo germinativo, havendo disponibilidade de oxigênio e de água no solo, a temperatura e a luz são os fatores ambientais que mais influenciam a germinação das sementes (Barbosa et al., 1999; Vieira et al., 2007).

A natureza do substrato impacta diretamente a germinação, pois a capacidade de retenção de água e oxigênio, presença de patógenos, estrutura física, entre outros, podem variar de um substrato para outro, interferindo na porcentagem de germinação das sementes (Aguilar et al., 1993; Perez et al., 1999, Wendling e Gatto, 2002; Floriano, 2004). O substrato deve apresentar condições adequadas ao desenvolvimento do sistema radicular. Setubal e Afonso Neto (2000) citam que o substrato pode ocasionar a ausência ou irregularidade de germinação, má formação de plantas e o aparecimento de sintomas de deficiência ou excesso de alguns nutrientes.

O período inicial do ciclo de vida, da maioria das espécies vegetais, é considerado o mais crítico. Esse estágio é caracterizado por apresentar acentuada vulnerabilidade às condições ambientais (Kozlowski, 1971; Duke e Polhill, 1981).

Uma alternativa para o êxito da germinação e desenvolvimento inicial das plantas são as culturas *in vitro*, que apresentam condições muito estáveis, que se adaptadas para as demandas de cada espécie, tendem a propiciar um bom desenvolvimento das plântulas e obtenção de mudas mais homogêneas.

A técnica da propagação *in vitro* de plantas possibilita a preservação e a reprodução das características desejáveis da planta matriz, além de possibilitar a obtenção de elevado número de plantas em um curto período de tempo e espaço reduzido, em excelentes condições fitossanitárias (Grattapaglia e Machado, 1998; Pasqual et al., 2001).

Lobelia brasiliensis A. O. S. Vieira & G. J. Shepherd é uma espécie rara e ameaçada (Martinelli et al., 2014) com potencial ornamental e fitoquímico (Tamboli et al., 2012), sendo que estudos que explorem o processo germinativo desta espécie é nulo.

Diante do exposto, estudos que explorem os processos germinativos da espécie em questão são de extrema importância para a preservação, cultivo e reintrodução da espécie em seu ambiente natural.

METODOLOGIA

Sementes de *Lobelia brasiliensis* foram coletadas em Abril de 2016 na zona de chácaras do Córrego do Urubu - Região Administrativa do Lago Norte, Brasília-DF (15°42'33.70"S e 47°51'35.76"O). A população com, aproximadamente, 10 indivíduos se encontrava em uma área de solo alagado, dentro de uma propriedade particular.

As sementes utilizadas nos testes não passaram por qualquer tratamento pré-germinativo nem de quebra de dormência e foram armazenadas por 6 meses em sacos de papel Kraft, no escuro e temperatura ambiente.

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Sementes Florestais e Cultura de Tecidos, Laboratório de Tecnologia de Sementes e Biotecnologia e na Casa de Vegetação do Centro de Referência em Conservação da Natureza e Recuperação de Áreas Degradadas - CRAD, da Universidade de Brasília.

Germinação *ex vitro*

O experimento comparou a germinação da semente e o desenvolvimento da plântula de *Lobelia brasiliensis* em quatro diferentes substratos, sendo cada um considerado um tratamento:

vermiculita (granulação média), areia lavada, terra do cerrado (latossolo vermelho do horizonte B) peneirada e Bioplant®.

Foram semeadas 200 sementes por tratamento, em bandejas de isopor, de modo que as sementes ficassem na superfície, totalizando 800 sementes (2 sementes/célula). As bandejas foram colocadas em casa de vegetação com irrigação diária controlada por aspersores com 1 rega de 20´ por dia e iluminação indireta (sombrite 50%). O experimento foi conduzido por 60 dias e a emergência e sobrevivência das plântulas foram avaliados de acordo com a metodologia recomendada por Maguire (1962). Foram consideradas emergentes, as plântulas que apresentavam hipocótilo expandido acima do nível do substrato, observações feitas com o auxílio de lupa de mão.

Com 30, 45 e 60 dias após a semeadura, foram medidas as distâncias entre os ápices cotiledonares, quantidade de eofilos e suas dimensões (comprimento x largura).

Os parâmetros calculados foram: o tempo médio de germinação (TM), a velocidade de germinação das sementes (V) em porcentagem e o índice de velocidade de germinação, assim como o índice de velocidade de emergência (IVE), de acordo com Labouriau e Valadares (1976).

Ao final de 60 dias, até 40 plântulas normais (com aspecto morfológico “saudável”) de cada tratamento, foram retiradas do substrato com o sistema radicular completo e colocadas em placas de petri com água de torneira para evitar a desidratação durante as análises. Foram feitas as seguintes medidas: distância entre o ápice dos cotilédones, número de eofilos, dimensões do eofilo (comprimento x largura), comprimento do hipocótilo e o número de raízes (secundárias e adventícias).

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado e os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA). As médias foram comparadas utilizando o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Germinação *in vitro*

Dois experimentos foram realizados em condições *in vitro* com sementes de *L. brasiliensis*:

Experimento 1: Desinfestação

O primeiro foi um experimento de desinfestação, em que as sementes foram separadas em três lotes de 100 para serem desinfestadas (este procedimento foi necessário devido ao diminuto tamanho das sementes) e testadas em diferentes tempos de imersão em hipoclorito de sódio (NaClO). Cada lote foi imerso em álcool 70% (v/v) por 5 segundos, depois em hipoclorito de sódio (Qboa[®]) de 2,0-2,5% de cloro ativo (v/v) por 5, 10 e 15 minutos, seguido de 3 enxágues em água ultrafiltrada autoclavada por 1, 2 e 3 minutos. Após o processo de desinfestação foram inoculadas 54 sementes por tratamento, em tubos de ensaio de 150 x 25 mm contendo 15 mL de ágar-água (8 g.L⁻¹), em câmara de fluxo laminar horizontal (ESCO[®]). Foram utilizados 18 tubos por tratamento, com 3 sementes por tubo. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5.7±0.1 antes de ser autoclavado a 120 °C e 1 atm de pressão por 20 minutos. Após esse processo, os tubos com as sementes inoculadas, foram mantidos por 30 dias em sala de crescimento a 25 °C (±1 °C), fotoperíodo de 16h e intensidade luminosa de 41 μmol.m⁻².s⁻¹. As observações foram feitas, diariamente, para avaliar a porcentagem de germinação e de contaminação.

Experimento 2: Avaliação do desenvolvimento das plântulas

Um segundo experimento foi implementado para avaliar o crescimento das plântulas de *L. brasiliensis* em condições *in vitro*. Os resultados deste experimento foram comparados com aqueles obtidos *ex vitro*.

As sementes foram desinfestadas, em lotes de 100, com álcool 70% (v/v) por 5 segundos e depois com hipoclorito de sódio (Qboa[®]) de 2,0-2,5% de cloro ativo (v/v) por 5 minutos, seguido de 3 enxágues em água ultrafiltrada autoclavada por 1, 2 e 3 minutos. Duzentas sementes foram inoculadas em tubos de ensaio de 150 x 25 mm contendo 15 mL de ágar-água (8 g.L⁻¹) usando câmara de fluxo laminar horizontal (ESCO[®]). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5.7±0.1 antes de ser autoclavado a 120 °C e 1 atm de pressão por 20'. As culturas foram mantidas por 60 dias em sala de crescimento a 25 °C (±1 °C), fotoperíodo de 16h e intensidade de luz de 41 μmol.m⁻².s⁻¹ e

inspeccionadas, diariamente, com contagem das germinadas. Foi calculada a sobrevivência das plântulas, de acordo com a metodologia recomendada por Maguire (1962). As sementes foram consideradas germinadas quando da protrusão da radícula; essas observações foram feitas com o auxílio de lupa de mão.

Com 30, 45 e 60 dias após a semeadura, foram medidas as distâncias entre os ápices dos cotilédones, quantidade de eofilos e suas dimensões (comprimento x largura).

Foram avaliados a percentagem de germinação, tempo médio de germinação e velocidade de emergência. Os cálculos foram realizados de acordo com a metodologia proposta por Labouriau e Agudo (1987).

Ao final de 60 dias, 40 plântulas normais (aspectos morfológicos “saudáveis”) foram retiradas do meio de cultura e colocadas em placas de Petri com água de torneira para evitar a desidratação. Os parâmetros avaliados, assim como a metodologia usada para o peso fresco e seco, foram os mesmos da germinação *ex vitro*.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado. Para obter a normalidade dos dados foi aplicado o teste de Shapiro-Wilk e, quando necessário, os dados foram transformados por $\sqrt{x+1}$. Foi feita uma análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade usando o programa SISVAR (Ferreira, 2015).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O tempo médio de germinação (TM) variou significativamente entre os tratamentos. O maior tempo para os tratamentos *ex vitro* foi a vermiculita (16,3 sementes por dia) e a areia (15,13 sementes por dia) e o menor para o cultivo *in vitro* (7,9 sementes por dia). Para a velocidade de germinação (V), a germinação mais lenta foi para a vermiculita (0,06 sementes por dia) e a germinação mais rápida para o cultivo *in vitro* (0,13 por dia). O índice de velocidade de germinação (IVG) para o cultivo *in vitro* foi de 21,95 e para os tratamento *ex vitro* o índice de velocidade de emergência (IVE) o maior foi do tratamento terra com 12,79 e o menor foi do areia com 9,35 (Tabela 1).

A taxa de germinação em ágar-água foi de 86% e a maior porcentagem obtida nos cultivos *ex vitro* foi de 77% em 2 tratamentos: terra e vermiculita. A menor porcentagem foi obtida para areia com 66,5% (Tabela 1). As sementes de *Lobelia brasiliensis* não apresentaram nenhum tipo de dormência, uma vez que as sementes da maioria das espécies germinaram prontamente quando as condições ambientais são favoráveis (Carvalho e Nakagawa, 2000), e as taxas de germinação para todos os tratamentos foram altas, passando dos 65%, sem nenhum tratamento pré-germinativo.

Assim como a porcentagem de germinação, a taxa de sobrevivência de plântulas na cultura *in vitro* (100%) foi superior aos demais tratamentos. Para as culturas *ex vitro*, a maior porcentagem de sobrevivência das plântulas foi em vermiculita (78,6%) e a menor foi no tratamento areia, com apenas 7,5% (Tabela 1). Como as características do substrato, e as condições ambientais estão diretamente relacionadas a velocidade de germinação, taxas de germinação e de sobrevivência das plântulas (Barbosa et al., 1999; Borghetti, 2000; Allison, 2002; Shirlyne et al., 2005; Andrade et al., 2006), era esperado que as sementes germinadas em condições *in vitro* apresentassem as maiores taxas e índices. Os substratos com maiores capacidades de retenção de água propiciaram as melhores condições de germinação e sobrevivência para a espécie. Por apresentarem tamanho muito pequeno, as sementes possuem pequena quantidade de reservas e precisam retirar do substrato o aporte necessário para continuar seu desenvolvimento, o mais rápido possível, até seu estabelecimento. Ressalta-se ainda que, geralmente, sementes que germinam mais rapidamente são menos afetadas por microorganismos patogênicos (Lewis e Clements, 1999; Lanza et al., 2004).

Ao comparar o desenvolvimento das plântulas, entre os cultivos *ex vitro* e *in vitro*, os resultados do cultivo *in vitro* foram superiores em quase todas as etapas. Com 30 dias, a distância entre os cotilédones (DAC), para plântulas cultura *in vitro*, (2,12 mm) foi maior do que em todos os tratamentos *ex vitro*. Com relação ao comprimento do hipocótilo, não houve diferenças entre os tratamentos, em todos foi menor que 1 mm. O número total de eofilos no tratamento *in vitro* (1,19) foi, significativamente, superior aos tratamentos com areia (1,00) e Bioplant® (1,05), mas não quando comparados com a vermiculita (1,10) e a terra do Cerrado (1,07).

Com 45 dias de cultivo, o DAC foi estatisticamente igual para todos os tratamentos. No entanto, o comprimento do hipocótilo no tratamento *in vitro* foi, estatisticamente, superior a todos os outros tratamentos *ex vitro*. O mesmo resultado foi observado em relação ao número total de eofilos, onde o tratamento *in vitro* foi de 1,46, significativamente superior a todos os outros tratamentos *ex vitro* (Tabela 2).

No 60º dia de cultivo, o DAC do tratamento *in vitro* foi de 2,57 mm, superior a todos os outros tratamentos, e esses não diferiram entre si. A média do comprimento do hipocótilo também foi superior para a cultura *in vitro* (2,08 mm) e a maior média dos tratamentos *ex vitro* foi em vermiculita (1,71 mm) e a menor em Bioplant[®] (1,47 mm). Para o número de eofilos, o cultivo *in vitro* também teve a maior média (1,71) estatisticamente superior a todos os outros tratamentos (Tabela 2).

Ao final de 60 dias, apenas os tratamentos *in vitro*, Bioplant[®] e vermiculita apresentaram 40 indivíduos, os quais foram usados para as análises. As médias do tratamento “areia” foram realizadas com 10 indivíduos e a do tratamento “terra” com 20, uma vez que a taxa de sobrevivência foi muito baixa (Tabela 1).

Para o DAC, o cultivo *in vitro* foi significativamente superior (5,62 mm) comparado aos outros tratamentos. Para o número total de eofilos a média da cultura *in vitro* foi de 1,71 e as dimensões do eofilo também foram superiores (2,21 mm x 2,12 mm). O comprimento do hipocótilo teve a média de 2,08 mm, nos tratamentos *ex vitro* e a média mais alta foi a da vermiculita com 1,71 mm (Tabela 3).

Os dados referentes à baixa porcentagem de germinação das sementes em solo arenoso, desenvolvimento e sobrevivência (Tabela 1 e 2) foi possivelmente em decorrência da estrutura física da areia. Tal substrato apresenta alta porosidade, com partículas de maior diâmetro que têm menor eficiência na adsorção de moléculas de água devido à sua menor área superficial, em comparação a solos com maiores proporções de argila ou que retenham mais água (Reis et al., 2002). Acredita-se que, por ser o habitat natural de *L. brasiliensis* lugares com solo bastante úmido e encharcado, os

tratamentos que mantiveram essas características (*in vitro*, terra do Cerrado, Bioplant[®], vermiculita) possibilitaram as maiores taxas de germinação e sobrevivência.

Em areia, a água é drenada rapidamente e o processo de embebição da semente diminui, apesar da irrigação diária. De maneira semelhante, Scalon et al. (2003) observaram que o substrato areia não é o mais adequado para a germinação de sementes de *Caesalpinia pelthophoroides* Benth. e Lima e Dornelles (2002) observaram que, para três espécies de *Annona* (*A. crassiflora* Mart., *A. squamosa* L. e *A. muricata* L.), o substrato areia resultou nos menores percentuais de germinação.

Desse modo o elevado tempo médio de germinação para o tratamento areia possivelmente foi em função da baixa retenção de água desse substrato, tornando a embebição da semente mais demorada pela baixa disponibilidade de água ao longo do tempo. E para a vermiculita, que apresenta uma grande porosidade, as sementes possivelmente ficaram menos expostas a luz, fator determinante para a germinação das plantas pertencentes às Campanulaceae, que apresentam fotoblastismo positivo (Koutsovoulou et al., 2014).

Tabela 1 –Tempo Médio de Germinação (TM), Velocidade de Germinação (V), Índice de Velocidade de Emergência (IVE), Porcentagem de Germinação e Porcentagem de Sobrevivência da Plântulas de *Lobelia brasiliensis* A.O.S. Vieira & G. J. Sherpherd Semeadas em 5 tratamentos diferentes.

Tratamento	TM	V	IVE*	Germinação (%)	Sobrevivência (%)
Terra do Cerrado	12,38 b	0,08 b	12,79 b	77 b	13,0 d
Bioplant®	13,48 b	0,07 b	10,77 c	70 b	47,1 c
Areia	15,13 c	0,07 b	9,35 d	66,5 b	7,5 d
Vermiculita	16,34 c	0,06 b	10,29 c	77 b	78,6 b
In vitro	7,96 a	0,13 a	21,95 a	86 a	100,0 a

* Para o tratamento *in vitro* foi analisado o índice de velocidade de germinação (IVG). Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 2 - Médias dos parâmetros medidos das plântulas de *Lobelia brasiliensis* A.O.S. Vieira & G. J. Sherpherd, com 30, 45 e 60 dias de cultivo *in vitro* e *ex vitro*.

Tratamentos	DAC* (mm)			Compr. hipocótilo (mm)			Nº eofilos/plântula		
	30	45	60	30	45	60	30	45	60
Areia	1,82 a	2,02 a	2,05 a	1,00 a	1,00 a	1,54 ab	1,00 a	1,00 a	1,41 b
Bioplant	1,99 b	2,04 a	2,06 a	1,00 a	1,00 a	1,47 a	1,05 a	1,08 ab	1,15 a
Vermiculita	2,00 b	2,06 a	2,14 a	1,00 a	1,00 a	1,71 b	1,10 ab	1,22 b	1,37 b
Terra	2,04 bc	2,07 a	2,15 a	1,00 a	1,00 a	1,49 ab	1,07 ab	1,14 ab	1,43 b
In Vitro	2,12 c	2,25 a	2,57 b	1,00 a	1,85 b	2,08 c	1,19 b	1,46 c	1,71 c

*Distância entre os ápices dos cotilédones. Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Em relação ao sistema radicular, o cultivo de *L. brasiliensis in vitro*, também foi estatisticamente superior em relação à média do número total de raízes (2,51) e a quantidade de raízes adventícias (2,09), comparando aos demais tratamentos (Tabela 3). Para a média do total de raízes secundárias não houve diferenças estatísticas entre os tratamentos. Entretanto, para o comprimento da maior raiz, os tratamentos Bioplant® (6,50 mm) e a vermiculita (6,23 mm) foram estatisticamente superiores aos demais tratamentos, inclusive o cultivo *in vitro* (4,04 mm) (Tabela 3).

Para os experimentos realizados *in vitro*, o tratamento de 5 minutos de imersão em NaClO apresentou o menor tempo médio de germinação (TM) 8,52; maior velocidade de germinação (V) 0,12 e o maior índice de velocidade de germinação (IVG) 5,61 (Tabela 4). A taxa de sobrevivência foi de 100% para todos tratamentos e a taxa de contaminação foi de 0% para todos tratamentos (Tabela 4). Possivelmente devido a área de superfície da semente de *L. brasiliensis* ser muito pequena, um curto tempo de exposição ao agente desinfetante já foi o suficiente para eliminar qualquer fonte de contaminação. A concentração e o tempo de exposição de sementes em hipoclorito de sódio são fatores importantes para promover germinação *in vitro* livre de microrganismos. Em sementes de *Calendula officinalis* (L) Moench germinadas *in vitro*, o aumento do tempo de imersão dessas em solução de hipoclorito de sódio a 2,5% reduziu a ocorrência de contaminantes fúngicos e bacterianos, sendo que a imersão por 30 minutos se mostrou a mais eficiente dentre as avaliadas (Bevilacqua et al., 2011).

Em relação a morfologia, algumas diferenças sutis foram observadas nas plântulas de cada tratamento. Nas plântulas germinadas em terra do Cerrado, o hipocótilo e os eófilos apresentam cor púrpuro-escuro e o sistema radicular alongado com presença de raízes adventícias (Figura 1A).

No substrato areia, os cotilédones eram pequenos em relação aos dos outros tratamentos, assim como o eófilo que apresentava coloração verde escuro. O sistema radicular era bastante alongado, com raízes estreitas e presença de raízes adventícias (Figura 1B).

As plântulas germinadas em vermiculita apresentaram cotilédones grandes em relação aos outros tratamentos, hipocótilo grande e de cor púrpuro claro, hipocótilo púrpuro escuro e o sistema radicular era muito alongado com raízes secundárias e adventícias (Figura 1C).

No tratamento Bioplant[®], as plântulas apresentavam cotilédones e eofilos grandes, de coloração verde escuro com tonalidades púrpuro claro. O hipocótilo apresentou coloração verde escuro e o sistema radicular era muito ramificado, com diversas raízes secundárias e adventícias (Figura 1D).

O cultivo *in vitro*, por sua vez, apresentou plântulas com cotilédones e eofilos bem desenvolvidos de coloração verde claro, o hipocótilo era espesso e de cor verde claro. O sistema radicular apresentava maior número raízes adventícias que eram espessas e pouco alongadas (Figura 1E).

Os substratos de cultivo afetam sensivelmente o desenvolvimento das plântulas de diversas espécies tropicais (Bernadino et al., 2005). Apesar da maioria das espécies do Cerrado estar adaptada a solos oligotróficos, essas plantas respondem positivamente à aplicação de cálcio e à adubação (Cuzzuol et al., 2003). Além disso, vários estudos indicam que a adição de nutrientes ao solo favorece o desenvolvimento da parte aérea das plântulas de espécies do Cerrado (Charlo et al., 2006; Marques et al., 2006; Fernandes et al., 2007). No entanto, sendo necessários experimentos com substratos enriquecidos com macro e micro nutrientes para afirmar que no caso da *L. brasiliensis* isso não acontece, pois o comportamento dito não corrobora com as informações deste estudo, uma vez que a média do DAC, eofilos (quantidade e dimensões) para Bioplant[®], que teria maior quantidade de matéria orgânica e nutrientes, não apresentou as maiores medidas.

A *L. brasiliensis* está adaptada em solos bastante úmidos ou encharcados, logo o comprimento das raízes das plantas que estavam no substrato areia, que não retém água por muito tempo, apresentou raízes finas e bastante alongadas. Provavelmente este comportamento esteja relacionado ao maior alongamento do sistema radicular para aumentar a superfície de absorção de água das raízes. O comprimento e o peso da parte aérea das plântulas que foram cultivadas *in vitro* teve as maiores

médias, indicando como a espécie desenvolvesse melhor em ambientes mais úmidos, já que neste tratamento a disponibilidade de água é maior que os demais. O melhor desenvolvimento da parte aérea na germinação *in vitro* mostra a dependência desta espécie a habitat com solos hidromórficos e proximidade de corpos d'água, o que pode explicar o desaparecimento desta espécie, junto com a destruição do seu habitat natural.

As médias de germinação foram altas para todos tratamentos. Entretanto o desenvolvimento e sobrevivência das plantas com substrato que retém pouca água foram baixas. Desta maneira a *L. brasiliensis* deve provavelmente apresentar alta taxa de germinação em quase todos os substratos em ambientes naturais que tenham água e incidência de luz, entretanto se não houver uma grande disponibilidade de água no solo para seu estabelecimento e desenvolvimento, ela não sobrevive.

Este fato ajuda a entender porque esta espécie está ameaçada e é considerada rara. A *Lobelia brasiliensis* é considerada endêmica do Distrito Federal e, para sua germinação, é necessário luz e água. Para seu estabelecimento, muito água no solo. Esta combinação reduz muito as possibilidades da espécie de ocupar novos ambientes e estabelecer novas populações. Logo a germinação e cultura *in vitro* para a espécie podem ser alternativas de sucesso para a preservação e cultivo da espécie.

Tabela 3 - Médias dos parâmetros medidos das plântulas de *Lobelia brasiliensis* A.O.S. Vieira & G. J. Sherpherd, ao final de 60 dias de cultivo *in vitro* e *ex vitro*.

Tratamento	DAC* (mm)	Eofilos			Comprimento do hipocótilo (mm)	Total de raízes			Comprimento da maior raiz (mm)
		Nº total	Comprimento (mm)	Largura (mm)		Nº total	Secundárias	Adventícias	
Areia (N= 10)	3,20 a	1,41 b	1,67 bc	1,48 b	1,54 a	1,68 a	1,14 a	1,20 ab	5,48 b
Bioplant® (N=40)	3,25 a	1,15 a	1,22 a	1,21 a	1,47 a	1,68 a	1,28 a	1,09 a	6,50 c
Vermiculita (N=40)	3,57 a	1,37 b	1,44 ab	1,47 b	1,71 b	1,81 a	1,34 a	1,19 ab	6,23 c
Terra (N=20)	3,65 a	1,43 b	1,70 c	1,66 b	1,49 c	1,82 a	1,21 a	1,30 b	5,42 b
In vitro (N=40)	5,62 b	1,71 c	2,21 d	2,12 c	2,08 d	2,51 b	1,36 a	2,09 c	4,04 a

*Distância entre os ápices do cotilédones. Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 4 - Tempo Médio de Germinação (TM), Velocidade de Germinação (V), Índice de Velocidade de Germinação (IVE), Porcentagem de Germinação e Sobrevivência das plântulas de *Lobelia brasiliensis* A.O.S. Vieira & G. J. Sherpherd submetidas a três tratamentos de desinfestação.

Tratamento *	TM /DIA	V/DIA	IVG	Germinação (%)	Sobrevivência (%)	Contaminação (%)
5´	8,52 a	0,12 a	5,61 a	85,19 a	100,00 a	0,00 a
10´	8,93 a	0,11 a	5,24 a	83,33 a	100,00 a	0,00 a
15´	9,24 a	0,11 a	4,53 a	75,93 a	100,00 a	0,00 a

*Foi considerado tratamento o tempo de imersão em Hipoclorito de Sódio (NaClO). Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



Figura 1 – Aspecto morfológico das plantulas de *Lobelia brasiliensis* A.O.S. Vieira & G. J. Sherpherd após 60 dias da semeadura/inoculação sob a influência de 5 tratamentos. A. Terra do Cerrado; B. Areia; C. Vermiculita; D. Bioplant[®]; E. Ágar-água. (eo= eofilo; co= cotilédone; ra= raiz adventícia; rp= raiz primária; rs= raiz secundária.)

CONCLUSÃO

- Sementes de *L. brasiliensis* germinaram bem em todos os substratos testados, porém a sobrevivência e estabelecimento da plântula estava diretamente relacionado a um substrato que retenha água.
- Para o desenvolvimento de *L. brasiliensis* é necessário um substrato que retenha umidade.
- A germinação, estabelecimento e desenvolvimento *in vitro* da espécie *L. brasiliensis* são altamente indicados.
- O fato da espécie *L. brasiliensis* conseguir se estabelecer e desenvolver apenas em solos com grande capacidade de retenção de água pode explicar a sua distribuição geográfica limitada a áreas úmidas, o que, por sua vez, faz desta uma espécie ainda mais vulnerável à extinção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, I. B.; PIÑA-RODRIGUES, F. C. M.; FIGLIOLIA, M. B. Sementes florestais tropicais. Brasília: ABRATES. p. 137-174, 1993. 350p.

ALLISON, V.J. Nutrients, arbuscular mycorrhizas and competition interact to influence seed production and germination success in *Achillea millefolium*. *Functional Ecology*, v.16, p.742-749, 2002. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2435.2002.00675.x/epdf>

ANDRADE, A.C.S.; PEREIRA, T.S.; FERNANDES, M.J.; CRUZ, A.P.M.; CARVALHO, A.S.R. Substrato, temperatura de germinação e desenvolvimento pós-seminal de sementes de *Dalbergia nigra*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.41, p.517-523, 2006. <http://www.scielo.br/pdf/pab/v41n3/29125.pdf>

BARBOSA, A.R.; YAMAMOTO, K.; VÁLIO, I.F.M. Effect of light and temperature on germination and early growth of *Vochysia tucanorum* Mart., Vochysiaceae, in cerrado and forest soil under

different radiation levels. Revista Brasileira de Botânica, v.22, p.275-280, 1999.

[http://www.scielo.br/pdf/rbb/v22s2/\(2_s\)a7.pdf](http://www.scielo.br/pdf/rbb/v22s2/(2_s)a7.pdf)

BERNARDINO, D.C.S.; PAIVA, H N.; NEVES, J.C.L.; GOMES, J.M.; MARQUES, V.B. Crescimento e qualidade de mudas de *Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan em resposta à saturação por bases do substrato. Revista Árvore, v.29, n.6, p.863-870, 2005.

<http://www.scielo.br/pdf/rarv/v29n6/a04v29n6>

BEVILACQUA, C. B.; SILVEIRA, L. R.; REINIGER, R. S, GOLLE.; D. P. ROSA, F. C. Desinfestação superficial, germinação e regeneração in vitro a partir de sementes de calêndula. Ciência Rural, v. 41, n.5, p. 761-766, 2011. <http://www.scielo.br/pdf/cr/v41n5/a956cr4397.pdf>

BORGHETTI, F. Ecofisiologia da germinação das sementes. Universa, v.8, n.1, p.149-180, 2000.

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

CHARLO, H.C.O.; MÔRO, F.V.; SILVA, V.L.; SILVA E SILVA, B.M.; BIANCO, S.; MÔRO, J.R. Aspectos morfológicos, germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de *Archontophoenix alexandrae* (F. Mueller) H. Wendl. e Drude (Arecaceae) em diferentes substratos. Revista Árvore, v.30, n.6, p.933-940, 2006. <http://www.scielo.br/pdf/rarv/v30n6/a08v30n6.pdf>

CUZZUOL, G.R.F.; CARVALHO, M.A.M.; BARBEDO, C.J.; ZAIDAN, L.B.P. Crescimento e conteúdo de frutanos em plantas de *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby submetidas à adubação nitrogenada. Revista Brasileira de Botânica, v.26, n.1, p.81-91, 2003.

<http://www.scielo.br/pdf/rbb/v26n1/v26n1a09.pdf>

DUKE, J.A.; POLHILL, R.M. Seedlings of leguminosae. In: POLHILL, R.M.; RAVON, P.H. (Ed.). Advances in legume systematics. Londres: Kew Royal Botanical Gardens, 1981. p.941-956.

FERNANDES, A.R.; PAIVA H.N.; CARVALHO J.G.; MIRANDA, J.R.P. Crescimento e absorção de nutrientes por mudas de feijó (*Cordia goeldiana* Huber) em função de doses de fósforo e de zinco. Revista Árvore, v.31, n.4, p.599-608, 2007. <http://www.scielo.br/pdf/rarv/v31n4/04.pdf>

FERREIRA, D. F. Programa de análises estatísticas (statistical analysis software) e planejamento de experimentos – SISVAR 5.6 (Build 86). Lavras: DEX/UFLA, 2015. Disponível em: <http://www.dex.ufla.br/~danielff/programas/sisvar.html>. Acesso em: 23 de janeiro de 2017.

FLORIANO, E. P. Germinação e dormência de sementes florestais. Santa Rosa: ANORGS. (Caderno didático, 2), 2004. 19p.

FRANCO, A.C. Ecophysiology of woody plants. In: OLIVEIRA, P.S. e MARQUIS, R.J. (Ed.). The cerrados of Brazil. New York: Columbia University Press, 2002. p.178-197.

GOODLAND, R.; POLLARD, R. The Brazilian cerrado vegetation: a fertility gradient. Journal of Ecology, v.61, p.219-224, 1973. <https://www.researchgate.net/publication/242098358>

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

KOUTSOVOULOU K.; DAWS M. I.; THANOS, C. A. Campanulaceae: a family with small seeds that require light for germination. *Annals of Botany*, v.113, p.135–143, 2014.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3864721/>

KOZLOWSKI, T.T. Growth and development of trees. New York: Academic Press, 1971. 443p.

LABOURIAU, L.G.; AGUDO, M. On the physiology of germination in *Salvia hispanica* L. Temperature effects. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v.59, n.1, p.37-56, 1987.

LABOURIAU, L.G.; VALADARES, M.E.B. On the germination of seeds *Calotropis procera* (Ait.) Ait.f. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v.48, n.2, p.263-284, 1976.

LANZA, L.M.; MONTEIRO, A.C.; MAGALHÃES, E.B. População de *Metarhizium anisopliae* em diferentes tipos e graus de compactação do solo. *Ciência Rural*, v.34, n.6, p.1757-1762, 2004.
<http://www.scielo.br/pdf/cr/v34n6/a14v34n6.pdf>

LEWIS, G. G.; CLEMENTS, R. O. Effect of combined insecticide and fungicide treatments on newly sown swards of Italian and perennial ryegrass using two methods of sowing, two rates of seed and N fertilizer, with and without herbicide. *Grass and Forage Science*, v.54, p.155-162, 1999.

LIMA, A. L.; DORNELLES, A. L. C. Germinação de três espécies de *Annona* em diferentes substratos. *Anais do Congresso Brasileiro de Fruticultura*. Belém: SBF/Embrapa Amazônia Oriental, 2002.

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

<https://dl.sciencesocieties.org/publications/cs/abstracts/2/2/CS0020020176/preview/pdf>

MANTOVANI, W.; MARTINS, F.R. Variações fenológicas das espécies do Cerrado da Reserva Biológica de Moji-Guaçu, Estado de São Paulo. Revista Brasileira de Botânica, v.11, p.101-112, 1988. <https://www.researchgate.net/publication/286545057>

MARQUES, V.B.; NOGUEIRA, H.P.; GOMES, J. M.; NESVES, J.C.L.; BERNADINO, D.C.S. Efeito de fontes e doses de nitrogênio sobre o crescimento inicial e qualidade de mudas de jacarandá-da-bahia (*Dalbergia nigra* (Vell.) Fr. All. ex Benth.). Revista Árvore, v.30, n.5, p.725-735, 2006. <http://www.scielo.br/pdf/rarv/v30n5/a06v30n5.pdf>

MARTINELLI, G.; MESSINA, T.; SANTOS-FILHO, L. Livro vermelho da flora do Brasil – Plantas raras do Cerrado. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro/CNCFlora, 2014. 320p.

PASQUAL, M.; HOFFMANN, A.; RAMOS, J.D. Cultura de tecidos - tecnologia e aplicações. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 72p.

PEREZ, S. C. J. G. A.; FANTI, S. C.; CASALI, C. A. Influência do armazenamento, substrato, envelhecimento precoce e profundidade de semeadura na germinação de canafístula. Bragantia, v. 58, n. 1, p. 57-68, 1999. <http://www.scielo.br/pdf/brag/v58n1/0981.pdf>

RATTER, J.A., RIBEIRO, J.F., BRIDGEWATER, S. The Brazilian cerrado vegetation and threats to its biodiversity. Annals of Botany, v.80, p.223-230, 1997.

<http://ecologia.ib.usp.br/ecovegetal/leituras/Cerrado%20charac%20and%20threats%20Ratter%20et%20al%201987.pdf>

REIS, E. F.; SCHAEFER, C. E. G. R.; VIEIRA, L. B.; SOUZA, C. M.; FERNANDES, H. C. Avaliação do contato solo-semente em um solo argiloso sob plantio direto, com diferentes teores de água do solo. Engenharia na Agricultura, v.10, n.1-4, p.31-39, 2002.

<http://www.academia.edu/5390572>

RIBEIRO, J.F.; WALTER, B.M.T. Fitofisionomias do Bioma Cerrado. *In* Cerrado: ambiente e flora (S.M. Sano e S.P. Almeida, eds.). Embrapa/CPAC, Brasília, p.89-166, 1998.

SCALON, S. P. Q.; MUSSURY, R. M.; ALMEIDA, K. A.; RIGONI, M. R. Efeito do álcool e substrato na germinação de sementes de sibipiruna (*Caesalpinia pelthophoroides* Benth.) colhidas no chão e retiradas da vagem. Ciência e Agrotecnologia, v.27, n.2, p.389-392, 2003.

<http://www.scielo.br/pdf/cagro/v27n2/a19v27n2.pdf>

SETUBAL, J.W.; AFONSO NETO, F.C. Efeito de substratos alternativos e tipos de bandejas na produção de mudas de pimentão. Horticultura Brasileira, v.18, p.593-594, 2000.

http://www.abhorticultura.com.br/biblioteca/arquivos/Download/Biblioteca/olfg_4094c.pdf

SHIRLAYNE, S.U.; BARROSA, A.S.; AGUIAR, I.B. Germinação de sementes de *Gallesia integrifolia* (Spreng.) Harms (pau-d'alho) sob diferentes condições de temperatura, luz e umidade do substrato. Revista Brasileira de Botânica, v.28, p.727-733, 2005.

<http://www.scielo.br/pdf/rbb/v28n4/30372.pdf>

TAMBOLI, A. M.; RUB, R.A.; GHOSH, P.; BODHANKAR, S.L. Antiepileptic activity of lobeline isolated from the leaf of *Lobelia nicotianaefolia* and its effect on brain GABA level in mice. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, v.2, p.537-542, 2012.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3609340/>

VIEIRA, D.C.M, SOCOLOWSKI, F., TAKAKI, M. Germinação de sementes de *Dyckia tuberosa* (Vell.) Beer (Bromeliaceae) sob diferentes temperaturas em luz e escuro. Revista Brasileira de Botânica, v.30, p.183-188, 2007. <http://www.scielo.br/pdf/rbb/v30n2/v30n2a03.pdf>

WENDLING, I.; GATTO, A. Substratos, adubação e irrigação na produção de mudas. Viçosa: Aprenda Fácil, 2002. 145p.

CAPÍTULO 3

Capítulo formatado para submissão na revista *Árvore – Brazilian Journal of Forest Science.* – Qualis B3.

Micropropagação e Aclimatização de *Lobelia brasiliensis* A. O. S. Vieira & G. J.

Shepherd (Campanulaceae)

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi estabelecer protocolos eficientes de desinfestação, micropropagação e aclimatização para a espécie *Lobelia brasiliensis* A. O. S. Vieira & G. J. Shepherd, uma espécie rara e ameaçada de extinção, com potencial ornamental. Sementes de *L. brasiliensis* foram desinfestadas e inoculadas em meio ágar-água para o estabelecimento das culturas, dessas foi obtido 85,19% de germinação e 100% de descontaminação. Em seguida, plântulas *in vitro*, foram excisadas e inoculadas em 4 diferentes concentrações de BAP: 0,0; 0,01; 0,1; 1,0 mg.L⁻¹ combinadas com 2 concentrações de AIB: 0,0 e 0,01 mg.L⁻¹, totalizando 8 tratamentos. Verificou-se que nos tratamentos com as maiores concentrações de reguladores de crescimento, foi obtido o maior número de brotos, entretanto esses brotos não se alongaram e não desenvolveram raízes. Já o tratamento controle e os tratamentos com as menores concentrações de BAP apresentaram maior número de raízes. O regulador de crescimento AIB não influenciou no desenvolvimento radicular das plântulas. As plantas foram aclimatizadas em substrato de vermiculita e Bioplant[®] (1:2) mantidas a temperatura ambiente e, após 15 dias foram transferidas para uma casa de vegetação. Após 30 dias, a taxa de sobrevivência foi de 0% para o menor percentual de sobrevivência e de 50% para a maior porcentagem. Novos experimentos com diferentes substratos são necessários para aperfeiçoar esta fase. Os protocolos desenvolvidos para desinfestação e micropropagação mostraram-se eficientes, podendo ser utilizados para a propagação da espécie *L. brasiliensis*.

Palavra- chave: Cerrado, Cultura de Tecido, Espécie ameaçada

Micropropagation and Acclimatization of *Lobelia brasiliensis* A. O. S. Vieira & G. J. Shepherd. (Campanulaceae)

ABSTRACT

The objective of this work was to establish efficient protocols for disinfection, micropropagation and acclimatization for the species *Lobelia brasiliensis* A. O. S. Vieira & G. J. Shepherd, A rare and endangered species with ornamental potential. In addition, the genus has been studied as a source of chemicals with important active principles, such as alkaloids. Seeds of *L. brasiliensis* were disinfested and inoculated in agar-water medium for the establishment of cultures, of which 85.19% of germination and 100% of decontamination were obtained. These in vitro seedlings were then excised and inoculated at 4 different concentrations of BAP (0.0, 0.01, 0.1, 1.0 mg.L⁻¹) combined with 2 concentrations of IBA (0.0 And 0.01 mg.L⁻¹), totaling 8 treatments. In the treatments with the highest concentrations of growth regulators the highest number of shoots was obtained, however these shoots did not elongate and did not develop roots. On the other hand, the control treatment and the treatments with the lowest concentrations of BAP showed a higher number of roots. The AIB growth regulator did not influence the root development of the seedlings. The plants were acclimatized on vermiculite and Bioplant® substrate (1: 2) maintained at room temperature, after 15 days were transferred to a greenhouse. After 30 days, the survival rate was 0% for the lowest survival percentage and 50% for the highest percentage. New experiments with different substrates are needed to perfect this phase. The protocols developed for disinfection and micropropagation were efficient and could be used for the propagation of *L. brasiliensis* species.

Keyword: Cerrado, Tissue Culture, Threatened Species

1. INTRODUÇÃO

A micropropagação é uma técnica de propagação que consiste em inocular e cultivar pequenos segmentos do caule, raiz ou outros órgãos vegetativos contendo gema apical ou axilar em meio nutritivo previamente esterilizado (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Para espécies em que não há disponibilidade de semente ao longo do ano, baixa produtividade de sementes ou material vegetativo escasso (poucos indivíduos ou pequenas populações), essa técnica pode ser utilizada como alternativa para a produção de mudas em larga escala, principalmente para aquelas ameaçadas de extinção (WOCHOK, 1981; SIDDIQUE et al., 2003).

De acordo com Guerra et al. (1999), a principal vantagem da micropropagação é a fixação de ganhos genéticos nas populações clonais e a obtenção de um grande número de plantas saudáveis e de alta qualidade em pequeno espaço físico e em curto tempo, independentemente de fatores climáticos limitantes. Fato de interesse para o cultivo de plantas ornamentais, plantas com interesse na extração de fitoquímicos e conservação da genética de plantas raras e ameaçadas.

No Brasil, poucos são os relatos do emprego da técnica de cultura *in vitro* visando a conservação de espécies nativas ameaçadas. Para o Cerrado, estudos nesse sentido foram realizados com o intuito de conservação da espécie, propagação de espécies medicinais e com potencial ornamental, como foi o caso das espécies: *Anemopaegma arvense* (PEREIRA et al., 2003), *Gomphrena macrocephala* (MOREIRA et al., 1999), *Stryphnodendron polyphythum* (FRANÇA et al., 1995), *Ruellia nitens* e *R. incompta* (LIMA et al., 2015) e algumas espécies da família Bromeliaceae (MERCIER; KERBAUY, 1998). Os resultados obtidos com tais estudos foram promissores e indicam que a continuidade das pesquisas nessa área trará benefícios significativos para a propagação dessas espécies (MELO et al., 1998).

Lobelia brasiliensis A. O. S. Vieira & G. J. Shepherd é uma espécie do Cerrado considerada rara, endêmica do Distrito Federal e está ameaçada de extinção pela União Internacional para Conservação da Natureza - IUCN (MARTINELLI et al., 2014). Pertencente à família Campanulaceae, possui características na arquitetura e inflorescência que expressam um grande potencial ornamental (MENDONÇA et al., 2008; RAMALHO; PROENÇA, 2004) que pode ser explorado pelo mercado da floricultura e paisagismo, onde a procura por plantas nativas tem aumentado (SORIANO; TORRES, 1995).

Além deste potencial econômico de sua família, o gênero *Lobelia* L. vem sendo estudado por conta da grande quantidade de alcalóides de interesses farmacológicos. A presença de esteroides, triterpenos e flavonoides (FELPIN; LEBRETON, 2004; WANG et al.; 2007;

TAMBOLI et al., 2012) também indicam uma possível aptidão do gênero como potencial fonte de novas substâncias. Para isto, é necessário a integração do setor científico com o produtivo, tendo como medidas o incentivo de estudos básicos de fisiologia, bioquímica e biotecnologia. A espécie também compõe fitofisionomias do Cerrado que são extremamente sensíveis a ação antrópica, como as veredas e os campos alagáveis de solo hidromórfico.

Esse estudo teve como objetivo, desenvolver um protocolo eficiente de micropropagação de *Lobelia brasiliensis*, a fim de contribuir no processo de conservação da espécie e criar uma alternativa de fornecimento contínuo de mudas da espécie para o mercado de flores. Adicionalmente poderá auxiliar nas pesquisas farmacológicas e restauração ecológica.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Estabelecimento das culturas *in vitro* – Plântulas de *Lobelia brasiliensis* foram inicialmente estabelecidas *in vitro*, a partir de frutos coletados em uma área de solo alagado próximo ao Córrego do Urubu, Brasília-DF (15°42'33.70"S e 47°51'35.76"O) de uma única população, com, aproximadamente, 10 indivíduos. Um material testemunho foi tombado no Herbário da Universidade de Brasília- UB (Niemeyer et al., 01). Os frutos foram coletados em diferentes estados de maturação e armazenados em sacos de papel de Kraft no escuro e as sementes utilizadas já se encontravam soltas dentro do saco. Cem delas foram desinfestadas em álcool 70% (v/v) por 5 segundos e depois com hipoclorito de sódio (Qboa[®]) de 2,0-2,5% de cloro ativo (v/v) por 5 minutos, seguido de 3 enxágues em água ultrafiltrada autoclavada por 1, 2 e 3 minutos. Foram inoculadas 54 sementes, em câmara de fluxo laminar horizontal (ESCO[®]), em tubos de ensaio de 2,5 x 15 cm contendo 15 mL de ágar-água (8 g L⁻¹), previamente autoclavados a 120 °C e 1 atm de pressão por 20'. Depois de inoculadas, as culturas foram mantidas por 120 dias em sala de crescimento a 25 °C (±1 °C), fotoperíodo de 16 h e intensidade luminosa de 41 μmol.m⁻².s⁻¹. Durante o estabelecimento *in vitro*, as sementes e as plântulas foram monitoradas a procura de contaminantes e foi avaliado a porcentagem de germinação.

Fase de Multiplicação – Foram utilizados como explantes plântulas com 120 dias provenientes dos segmentos nodais axilares, terminais e nós cotiledonares das culturas estabelecidas previamente *in vitro*. Os segmentos nodais tinham de 1 a 2 gemas, filotaxia alterna e os nós possuíam comprimento mínimo de 1 cm. Foi utilizado, nos subcultivos, o meio de MS (MURASHIGUE; SKOOG, 1962) diluído à quarta parte, ágar (8 g L⁻¹), sacarose (30 g L⁻¹) e suplementado com 6-Benzylaminopurina (BAP) a 0,0; 0,01; 0,1 e 1,0 mg.L⁻¹ combinados com Ácido 3-Indolbutírico (AIB) a 0,0 e 0,01 mg.L⁻¹. O meio de cultura teve seu pH ajustado a

5.7±0.1 antes de ser autoclavado a 120 °C e 1 atm de pressão por 20 minutos. Foram montados oito tratamentos, de forma fatorial (4x2) em blocos inteiramente casualizados, em frascos de vidro transparente (de 250 mL) com 50 mL de meio de cultura com 5-6 explantes por frasco.

Os explantes foram inoculados verticalmente no meio de cultura, em câmara de fluxo laminar horizontal, e mantidos em sala de crescimento sob as mesmas condições reportadas no estabelecimento das culturas. Após 30 dias, foram quantificados o número de brotos, os seus comprimentos e o número total de raízes. Com 45 dias de cultura, os clones foram repicados e os explantes reinoculados, nos mesmos tratamentos descritos anteriormente. Esse procedimento foi repetido mais 2 vezes com 75/90 dias e 120/135 dias.

Fase de enraizamento – A fase de enraizamento foi avaliada durante a fase de multiplicação, uma vez que os explantes enraizaram espontaneamente durante essa fase. Ao final de 30, 75 e 120 dias da inoculação, períodos correspondentes as datas do final de cada subcultivo, foram quantificados o número total de raízes por explante em cada tratamento. Portanto, da fase de multiplicação passou-se para a fase de aclimatização diretamente, sem colocar os explantes em um meio específico para indução de raízes.

Fase de aclimatização – Um teste piloto foi conduzido com 20 plântulas, enraizadas do segundo subcultivo na fase anterior as quais foram transplantadas para copos plásticos (200 mL) contendo substrato vermiculita de granulação média autoclavada e mantidas em sala de crescimento por 20 dias (Figura-1F). Após esse período as plântulas foram transplantadas para areia lavada, vermiculita e Bioplant® (1:1:1) e mantidos em casa de vegetação coberta com sombrite 50% e irrigada por aspersores (1 rega ao dia por 20´) por mais 10 dias (Figura1-D).

Ao final deste teste piloto, um experimento foi realizado a partir das plantas enraizadas do terceiro subcultivo. Após 80 dias do terceiro subcultivo, 20 clones de cada um dos 8 tratamento proveniente da fase de multiplicação (total de 160 clones), passaram por uma pré-aclimatização onde estes foram retirados dos frascos e o sistema radicular de cada uma foi lavado com água ultra-filtrada e autoclavada para remover completamente qualquer resíduo do meio de cultura. As 20 plântulas de cada tratamento foram plantados em tubetes de 63 mL, contendo como substrato uma primeira camada de vermiculita de granulometria média e uma segunda camada de Bioplant® com vermiculita na proporção de 2:1, acomodados em um suporte próprio para os tubetes e cobertos por saco plástico transparente (Figura- 1H). Estas foram mantidas por 15 dias em uma sala a temperatura ambiente e regadas quando houvesse necessidade. Após essa etapa, foram transferidas para casa de vegetação com irrigação por aspersores (1 rega ao dia por 20´) e sombrite 50%. Ao final de 15 dias na casa de vegetação foi

avaliada a sobrevivência dos clones, totalizando 30 dias de aclimatização. Foi considerado como tratamento a origem da fase de multiplicação.

Análises estatísticas – Todos os ensaios foram conduzidos em blocos inteiramente casualizados. Para obter a normalidade dos dados, foi aplicado o teste de Shapiro-Wilk e, quando necessário, os dados foram transformados por $\sqrt{x+1}$. Foi feita uma análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade usando o programa SISVAR (FERREIRA, 2015).

3. RESULTADOS

Estabelecimento das culturas – Durante o estabelecimento das culturas *in vitro*, sementes e as plântulas de *Lobelia brasiliensis* foram monitoradas quanto a contaminação. Foi obtido um percentual de germinação 85,19% e um índice de descontaminação de 100%.

Fase de Multiplicação – Após a germinação e estabelecimento das culturas *in vitro*, explantes das plântulas de *L. brasiliensis* foram usados para o primeiro subcultivo (Figura 1A), em resposta a diferentes combinações de BAP e AIB. Para o primeiro subcultivo, não houve diferença significativa para o número de brotos nos explantes entre os diferentes tratamentos (Tabela 1), para o segundo subcultivo (Figura 1B), houve influência do regulador de crescimento BAP, onde os explantes nos tratamentos com as maiores concentrações de BAP (tratamento 4 e 8) apresentaram as maiores de médias de brotos por explantes; tratamentos com a segunda maior concentração de BAP (tratamentos 3 e 7) apresentaram a segunda maior quantidade de brotos por explante. Os demais tratamentos apresentaram menores quantidades de brotos e não apresentaram diferenças significativas entre si (Tabela 1). De forma semelhante, para o terceiro subcultivo (Figura 1C), os tratamentos com as maiores concentrações de BAP (tratamentos 4 e 8) apresentaram as maiores médias em relação a quantidades de brotos por explante e essa média diminuiu de maneira diretamente proporcional às concentrações de BAP. Assim, com o aumento das concentrações do regulador de crescimento BAP houve um aumento significativo na quantidade de brotos do segundo e terceiro subcultivo, no entanto, esses brotos não se alongaram.

Quando as médias foram comparadas em relação ao subcultivo, os tratamentos com 0,0 ou 0,01 mg.L⁻¹ de BAP (tratamentos 1, 2, 5 e 6) não apresentaram diferenças em relação à média de quantidade brotos por explante. Para os demais tratamentos, o primeiro subcultivo apresentou as menores médias em relação ao outros subcultivos (Tabela 1).

Tabela 1 – Média do número de brotos por explantes de *L. brasiliensis* A. O. S. Vieira & G. J. Shepherd em cada tratamento de cada subcultivo.

Tratamento	BAP*	AIB*	Subcultivo		
			1	2	3
1	0,0	0,0	1,13 aA	1,64 aA	1,69 aA
2	0,01	0,0	1,17 aA	1,65 aA	1,69 aA
3	0,1	0,0	1,13 aA	1,94 bA	2,34 cB
4	1,0	0,0	1,14 aA	2,24 cB	2,64 cC
5	0,0	0,01	1,17 aA	1,73 aA	1,58 aA
6	0,01	0,01	1,12 aA	1,75 aA	1,67 aA
7	0,1	0,01	1,17 aA	1,89 bB	2,05 bB
8	1,0	0,01	1,14 aA	2,43 cB	2,62 cB

*concentrações em mg.L⁻¹. (Médias seguidas pela mesma letra minúscula (em cada coluna) não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade e médias seguidas pela mesma letra maiúscula (cada linha) não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade).

Em relação ao comprimento dos brotos, não houve diferença significativa entre os explantes do primeiro subcultivo (Tabela 2). Entretanto, no segundo subcultivo o aumento da quantidade do BAP e AIB influenciaram negativamente o comprimento dos brotos, sendo que o tratamento 1 (controle) teve a maior média em todo o experimento. Os tratamentos com as menores concentrações de reguladores de crescimento (tratamentos 2, 5 e 6) não tiveram diferença entre si e apresentaram a segunda maior média de comprimento dos brotos, enquanto os tratamentos com as maiores concentrações de reguladores de crescimento (tratamentos 4 e 8) apresentaram as menores médias de comprimento de brotos (Tabela 2). Para o terceiro subcultivo, altas concentrações de BAP também continuaram influenciando negativamente no comprimento dos brotos (Tabela 2).

Quando as médias do comprimento dos brotos foram comparadas em relação ao subcultivo, todos os tratamentos do primeiro e segundo subcultivo foram iguais entre si, diferindo, estatisticamente, do terceiro subcultivo (Tabela 2).

Tabela 2 – Média do comprimento dos brotos por explantes de *L. brasiliensis* A. O. S. Vieira & G. J. Shepherd em cada tratamento e subcultivo em resposta aos diferentes tratamentos.

Tratamento	BAP*	AIB*	Sub cultivo		
			1	2	3
1	0,0	0,0	1.58 aA	1.39 cA	2,89 dB
2	0,01	0,0	1.57 aA	1.28 bA	2,43 bB
3	0,1	0,0	1.71 aA	1.16 aA	2,69 cB
4	1,0	0,0	1.67 aA	1.14 aA	2,32 aB
5	0,0	0,01	1.64 aA	1.32 bA	2,43 bB
6	0,01	0,01	1.59 aA	1.24 bA	2,80 dB
7	0,1	0,01	1.62 aA	1.16 aA	2,56 cB
8	1,0	0,01	1.72 aA	1.12 aA	2,37 aB

*concentrações em mg.L⁻¹. (Médias seguidas pela mesma letra minúscula (em cada coluna) não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade e médias seguidas pela mesma letra maiúscula (cada linha) não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade).

Fase de enraizamento – Esta fase ocorreu de forma simultânea à fase de multiplicação. Ou seja, em todos os três subcultivos ocorreu enraizamento dos explantes inoculados sem a necessidade de indução de raízes.

Nestas condições, foram encontradas respostas diferentes às concentrações dos reguladores de crescimento, em que os explantes inoculados nos meios de cultura com as maiores concentrações de reguladores de crescimento (tratamento 4 e 8) não enraizaram em nenhum dos subcultivos (Tabela 3). Para o primeiro e segundo subcultivos, todos os outros tratamentos enraizaram e não apresentaram nenhuma diferença significativa na quantidade de suas raízes. No entanto, para o terceiro subcultivo, o tratamento 2 apresentou a segunda maior média de quantidades de raízes, valor que o coloca em posição intermediária entre os demais tratamentos (Tabela 3).

Quando as médias da quantidade de raiz por explante foram comparadas em relação ao subcultivo, o tratamento controle e os tratamentos com as concentrações de 1,0 mg.L⁻¹ de BAP (tratamentos 4 e 8), não apresentaram diferença estatística entre os subcultivos. Para os tratamentos com 0,01 e 0,1 mg.L⁻¹ de BAP (tratamentos 2, 3, 5 e 6) tiveram as médias do

terceiro subcultivo menores se comparadas, estatisticamente, as médias do primeiro e segundo subcultivo, e essas não foram diferentes entre si (Tabela 3).

Tabela 3 – Média da quantidade de raiz por explantes de *L. brasiliensis* A. O. S. Vieira & G. J. Shepherd em cada tratamento e cada subcultivo.

Tratamento	BAP*	AIB*	Sub cultivo		
			1	2	3
1	0,0	0,0	2,41 aA	2,43 aA	2,47 aA
2	0,01	0,0	2,09 aB	2,11 aB	1,80 bA
3	0,1	0,0	1,79 aB	1,83 aB	1,27 cA
4	1,0	0,0	1,00 bA	1,00 bA	1,00 cA
5	0,0	0,01	2,41 aB	2,39 aB	2,29 aA
6	0,01	0,01	2,22 aB	2,20 aB	1,21 cA
7	0,1	0,01	1,84 aB	1,83 aB	1,15 cA
8	1,0	0,01	1,00 bA	1,02 bA	1,00 cA

*concentrações em mg.L⁻¹. (Médias seguidas pela mesma letra minúscula (em cada coluna) não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade e médias seguidas pela mesma letra maiúscula (cada linha) não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade).

Fase de aclimatização – Para o teste piloto, ainda na fase de pré-aclimatização, após 20 dias o percentual de sobrevivência foi de 90% (Figura-1D-E). Ao final dos 30 dias, 100% das plântulas mantidas nas condições de aclimatização sobreviveram.

Para o experimento de aclimatização, todos os tratamentos apresentaram elevada taxa de sobrevivência na fase de pré-aclimatização (acima de 65%). Por outro lado, ao final da fase de aclimatização em casa de vegetação, os clones de *L. brasiliensis* apresentavam uma grande queda neste percentual e, em apenas 15 dias, a porcentagem de sobrevivência de todos os tratamentos caiu drasticamente (Tabela 4).

Tabela 4 – Percentual de sobrevivência nas fases de aclimatização para os clones de *L. brasiliensis* A. O. S. Vieira & G. J. Shepherd em resposta aos diferentes tratamentos.

Tratamento	BAP*	AIB*	Pré-aclimatização (%)	Final da aclimatização (%)
1	0,0	0,0	70	5
2	0,01	0,0	65	10
3	0,1	0,0	70	15
4	1,0	0,0	90	10
5	0,0	0,01	80	20
6	0,01	0,01	85	0
7	0,1	0,01	95	45
8	1,0	0,01	100	50

*(concentrações em mg.L⁻¹)



Figura 1 – Plantas de *Lobelia brasiliensis* A. O. S. Vieira & G. J. Shepherd cultivadas *in vitro* e aclimatizadas. A-B-C= Fotos do primeiro, segundo e terceiro subcultivo com o número do tratamento relativo a cada frasco (1= 0,0 BAP-0,0 AIB; 2= 0,01 BAP-0,0 AIB; 3= 0,1 BAP-0,0 AIB; 4= 1,0 BAP- 0,0 AIB; 5= 0,0 BAP-0,01 AIB; 6= 0,01 BAP-0,01 AIB; 7= 0,1 BAP-0,01 AIB; 8= 1,0 BAP- 0,01 AIB - todas concentrações são de mg.L^{-1}); D= Plântulas pré-aclimatizadas no teste piloto; E= Plântula aclimatizada no teste piloto; F= Plântulas em fase de adaptação em condições de sala de crescimento; G= Plântulas na pré-aclimatização, H=Plântulas aclimatizadas.

4. DISCUSSÃO

O alto percentual de germinação (85,19%) e a contaminação nula demonstraram a eficiência dos processos de descontaminação e germinação *in vitro* para *Lobelia brasiliensis*, considerando que o maior índice aceitável é de 10% de contaminação (GEORGE, 1993; HARTMAN et al., 2002).

Para algumas espécies de *Campanula*, a ausência de reguladores de crescimento não interferiu nos percentuais de germinação (SEGLIE et al., 2012) e parece que o mesmo ocorre para a espécie *Lobelia brasiliensis*, uma vez que quando colocada em meio de MS (MURASHIGUE; SKOOG, 1962) a 25% e sem reguladores de crescimento apresentou relativamente alta taxa de germinação (56%) (NIEMEYER et al., 2016). Sendo assim, a germinação *in vitro* da *L. brasiliensis* pode ser feita em meios de cultura sem reguladores de crescimento, o que pode reduzir os custos e diminuir o trabalho técnico necessário.

Em relação ao número de brotos, o aumento das concentrações de BAP no primeiro subcultivo, não houve diferenças, estatisticamente, significativas entre os tratamentos (Figura 1A). No entanto o segundo e terceiro subcultivos (Figura 1 B-C) apresentaram uma média progressiva dos tratamentos, provavelmente por conta do efeito residual do regulador de crescimento nos tecidos das plântulas de um ao outro (NIEUWERK et al., 1986; GRATTAPAGLIA et al., 1987).

As maiores concentrações de BAP resultaram, em todos os subcultivos, numa maior quantidade de brotos por clone. Esse mesmo padrão foi observado para a espécie campanulácea *Siphocampylus betulifolius* (FIOR et al., 2011). Este resultado era esperado, pois uma das ações da citocinina BAP é estimular a divisão celular e promover a formação de gemas (TAIZ; ZEIGER, 2013). Como, por outro lado, esses brotos não se alongaram, o uso de concentrações maiores que 0,01 mg.L⁻¹ de BAP não é aconselhável para *L. brasiliensis*. Este resultado pode ser mais explorado se houver a intenção de adicionar uma fase de alongamento dos brotos e um protocolo de enraizamento para as culturas com as maiores concentrações de BAP. No presente estudo, altas concentrações de BAP (1.0 mgL⁻¹) não proporcionaram o enraizamento dos explantes.

A presença de AIB parece não ter influenciado na quantidade de brotos por clone, uma vez que não houve diferenças significativas entre os tratamentos sem esta auxina, testes com concentrações maiores de AIB seriam necessários para afirmar isso.

A média dos comprimentos dos brotos foi inversamente proporcional às concentrações de BAP, ou seja, quanto maior a concentração de BAP, menor o comprimento do broto, o que sugere que o aumento das concentrações dessa citocinina pode não ser benéfico para o

crescimento das plântulas de *L. brasiliensis*. Resultado contrário foi encontrado para a espécie ameaçada de extinção *Aegiphila verticillata* Vell. (ALMEIDA et al., 2015), em que o aumento das concentrações de citocinina BAP resultou em brotos “saudáveis” e dentro das características da espécie.

No primeiro subcultivo, as concentrações dos reguladores de crescimento aplicados aos tratamentos não interferiram no tamanho do broto, enquanto no segundo e terceiro subcultivos, a influência dessas concentrações foi significativa.

Foi possível observar um padrão de enraizamento da *L. brasiliensis*. Em todos os subcultivos, as maiores médias do número de raízes/explante foram obtidas no tratamento controle e em nenhum dos subcultivos houve o aparecimento de raízes nas concentrações de 1,0 mgL⁻¹ de BAP, corroborando com a afirmação de que muitas espécies enraizam facilmente *in vitro* e frequentemente produzem raízes sem nenhum tratamento específico (DEBERGH; MAENE, 1981). Esse padrão também foi observado em outras espécies de Campanulaceae, indicando ser possível conduzir a etapa de enraizamento mesmo na ausência de fitorreguladores (BRANDT, 1992; FRELLO et al., 2002).

Baixas concentrações de BAP foram satisfatórias para o desenvolvimento e crescimento do sistema radicular de *L. brasiliensis* enquanto a presença da auxina AIB não influenciou no enraizamento, resultado que diverge do obtido para *Lobelia bridgesii* Hook & Harn, em que a presença de AIB influenciou diretamente na quantidade de explantes com raízes (JARA; SEEMANN, 2007). Maiores concentrações dessa auxina podem influenciar positivamente no número e comprimento das raízes de *L. brasiliensis*, mas seriam necessários testes com maiores concentrações desse regulador de crescimento para poder afirmar isso.

Por conta dos promissores resultados do teste piloto de aclimatização (90% de sobrevivência), não foi testado a influência do substrato sobre os clones. Logo, assumiu-se como tratamento para o experimento de aclimatização a origem de cada clone na fase de multiplicação.

Embora no início do experimento de aclimatização, quando as plantas estavam sendo acomodadas na sala onde ficaram para iniciar o processo de pré-aclimatização, as plântulas tenham sofrido acidentalmente um choque físico, ao final da pré-aclimatização os resultados obtidos foram satisfatórios, com a menor percentagem de sobrevivência de 65% para o tratamento 2 e 100% de sobrevivência no tratamento 8. Com base nestes resultados, acredita-se que este evento não tenha interferido significativamente no processo de pré-aclimatização.

No entanto, ao final da fase de aclimatização, os resultados não foram satisfatórios: a maior percentagem de sobrevivência foi de 50% para o tratamento 8 e, para o tratamento 6,

nenhuma plântula sobreviveu. Estes resultados não corroboram com o padrão de sobrevivência encontrado para plântulas aclimatizadas, em que plântulas com o sistema radicular bem desenvolvido normalmente se adaptam melhor às condições *ex vitro* (SILVA et al., 2007; DORNELES; TREVELIN, 2011; ALMEIDA et al., 2015). Ainda que grande parte da sobrevivência e crescimento da plântula durante a fase de aclimatização dependa da obtenção de plantas *in vitro* com um sistema radicular bem desenvolvido (ROCHA et al., 2008), essa lógica não ocorreu neste estudo. Os explantes dos tratamentos que obtiveram as maiores médias em relação à quantidade de raiz (tratamento 1, 2, 3, 5, 6 e 7) obtiveram os menores percentuais de sobrevivência, enquanto o tratamento que não enraizou (tratamento 8) teve a maior porcentagem de sobrevivência. Uma possível explicação é que o contato com o AIB no meio de multiplicação tenha estimulado o enraizamento *ex vitro* destas plântulas, uma vez que as plântulas provenientes dos tratamentos que tinham AIB no meio tiveram uma porcentagem de sobrevivência um pouco maior que as que não tinham esse regulador de crescimento.

O enraizamento *ex vitro* tem sido observado com êxito para diversas espécies (CARVALHO et al., 1999; FERMINO JUNIOR et al., 2011). Esse procedimento tem sido estimulado, uma vez que se economiza materiais de insumo e acelera o processo, além das plantas sofrerem menos com a aclimatização (AUGUSTO et al., 2006).

Além do exposto acima, na fase final da aclimatização, foi constatado que as plântulas não foram irrigadas durante um final de semana e que o substrato estava extremamente seco e todas as plântulas do experimento apresentavam sinais de desidratação. Levando em consideração a elevada taxa de sobrevivência no teste piloto e que no final da pré-aclimatização as plântulas estavam respondendo bem ao processo de adaptação *ex vitro*, acredita-se que este evento influenciou negativamente no percentual final de sobrevivência das plântulas, especialmente porque o experimento foi realizado no mês de março, período em que as temperaturas foram elevadas em Brasília (INMET, 2017).

Por não ter sido encontrado na literatura caso semelhante em que plântulas enraizadas tivessem porcentagem de sobrevivência na aclimatização menor que as não enraizadas, novos testes de enraizamento *ex vitro* e aclimatização com diferentes substratos devem ser realizados para a espécie *L. brasiliensis*.

Este estudo é o primeiro de desinfestação, micropropagação e aclimatização para a espécie *L. brasiliensis* sendo relevante para a preservação da espécie e auxiliando os estudos para a descobertas de possíveis novos fitoquímicos, além de abrir caminhos para exploração do potencial ornamental da espécie.

5. CONCLUSÃO

Culturas de *L. brasiliensis* foram micropropagadas com sucesso, no tratamento controle e em resposta às combinações de 0,01 mg.L⁻¹ de BAP e 0,0 mg.L⁻¹ de AIB. Esses tratamentos também apresentaram as maiores médias em relação a quantidade de raízes. Foi possível o enraizamento dos explantes, ainda na etapa de multiplicação, economizando tempo e insumos. A espécie apresentou eficiente adaptação às condições *ex vitro*, porém são necessários outros testes com diferentes substratos para estabelecer o protocolo. Este é o primeiro estudo sobre propagação *in vitro* e aclimatização de *L. brasiliensis* e os resultados mostram que esta técnica é uma importante ferramenta para propagação e conservação desta espécie rara, ameaçada, com potencial ornamental e possível fonte de fitoquímicos de interesses farmacológicos. Estes resultados podem contribuir para o avanço da eficiência na produção de mudas, tanto para o mercado de flores como para a reintrodução da espécie no meio natural, reduzindo o risco de extinção provocado pela expansão urbana que ameaça esta espécie.

6. REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, L.M.S.; MORAIS, L.E.M.; RESENDE, C.F.R.; BRAGA, V.F.; PEREIRA, P.F.; CAMERINI, R.A.; PEIXOTO, P.H.P. Micropropagation and acclimatization of *aegiphila verticillata* vell.: an endangered woody species. **Revista Árvore**, v.39, n.2, p.305-314, 2015.
- AUGUSTO, C.S.S.; BIASI, L.A.; TELLES, C.A. Enraizamento e aclimatização de plantas micropropagadas de amoreira-preta cv. Brazos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.28, n.3, p.473-476, 2006.
- BRANDT, K. Micropropagation of *Campanula isophylla* Moretti. **Plant Cell. Tissue and Organ Culture**, v.29, n.1, p.31-36, 1992.
- CARVALHO, G.R.; PASQUAL, M.; RESENDE, E.; SCARANTE, M.J.; CARVALHO, G.R. Aclimatização de plântulas de cafeeiro *Coffea arabica* L. propagadas "in vitro". **Ciência e Agrotecnologia**, v.23, n.3, p.483-490, 1999.
- DEBERGH, P.C.; MAENE, L. A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture, **Scientia Horticulture**, v.14, p.335-345, 1981.

DORNELES, L.T.E; TREVELIN, V. Aclimatização e reintrodução de *Cattleya intermedia* Graham ex Hook (*Orchidaceae*) obtidas por propagação *in vitro*. **Iheringia Sér. Bot.**, v.66, n.2, p.167-174, 2011.

FELPIN, F.X.; LEBETRON, J. History, chemistry and biology of alkaloids from *Lobelia inflata*. **Tetrahedron**, v. 60, p.10127-10153, 2004.

FERMINO JÚNIOR, P.C.P.; ANDREA RAPOSO, A.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Enraizamento *ex vitro* e aclimatização de plantas micropropagadas de *Tectona grandis*. **Floresta**, v.41, n.1, p.79-86, 2011.

FERREIRA, D. F. **Programa de análises estatísticas (statistical analysis software) e planejamento de experimentos – SISVAR 5.6 (Build 86)**. Lavras: DEX/UFLA, 2015. Disponível em: <http://www.dex.ufla.br/~danielff/programas/sisvar.html>. Acesso em: 23 jan. 2017.

FIOR, C.S.; BRENTANO, A.M.; SAMPAIO, J.A.T.; RODRIGUES, L.R. **Iheringia Sér. Bot.**, v.66, n.2, p.257-264, 2011.

FRANÇA, S.C.; DUARTE, I.B.; MORAES, R.M.; PEREIRA, A.M.S. Micropropagação of *Stryphnodendron polyphythum* (barbatimão). **Plant Cell, Tiss. Org. Cult.**, v.24, p.291-293, 1995.

FRELLO, S.; STUMMANN, B.M.; SEREK, M. Shoot regeneration of *Campanula carpatica* Jacq. (*Campanulaceae*) via callus phase. **Scientia Horticulturae**, v.93, n.1, p.85-90, 2002.

GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture - Part 1: The technology**. Westbury: Exectics, 1993. 574 p.

GRATTAPAGLIA, D.; ASSIS, T.F.; CALDAS, L.S. Efeito residual de BAP (6-benzilaminourina) e NAA (ácido naftaleno acético) na multiplicação e enraizamento *in vitro* de *Eucalyptus*. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS, 2., 1987, Brasília. **Anais...** Brasília: EMBRAPA, 1987. p.8.

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

GUERRA, M.P.; DAL VESCO, L.L.; PESCADOR, R.; SCHUELTER, A.R.; NODARI, R.O. Estabelecimento de um protocolo regenerativo para a micropropagação do abacaxizeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, n.9, p.1557–1563, 1999.

HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; DAVIES JUNIOR, F.T.; GENEVE, R.L. **Plant propagation: principles and practices**. New Jersey: Prentice Hall, 2002. 880p.

INMET. Instituto Nacional de Meteorologia. Temperaturas diárias – Estação Brasília. Disponível em: www.inmet.gov.br-sim/gera_graficos.php. Acesso em 02 de jun. 2017.

JARA, G.; SEEMANN, P. Propagación *in vitro* de *Lobelia bridgesii* Hook.& Arn, espécie endêmica de la Provincia de Valdivia, Chile. **Agro Sur**, v.35, n.2, p.52-54, 2007.

LIMA, M.R.; PEREIRA, L.A.R.; SILVEIRA, C.E.S. In Vitro Multiplication from Seeds and Adult Explants of two Ornamental *Ruellia* (Acanthaceae) species of Brazilian Savanna (Cerrado) **Phyton**, v.55, n.2, p.233-249, 2015.

MARTINELLI, G.; MESSINA, T.; SANTOS-FILHO, L. **Livro vermelho da flora do Brasil – Plantas raras do Cerrado**. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro/CNCFlora, 2014. 320p.

MELO, J.T., SILVA, J.A., TORRES, R.A.A., SILVEIRA, C.E.S. & CALDAS, L.S. Coleta, propagação e desenvolvimento inicial de espécies do cerrado. In: SANO, M.S.; ALMEIDA, S.P. (Ed.). **Cerrado: ambiente e flora**. Planaltina – DF: EMBRAPA-CPAC, 1998. p.195-243.

MENDONÇA, R. C.; FELFI LI, J. M.; WALTER, B. M. T.; SILVA JÚNIOR, M. C.; REZENDE, A. V.; FILGUEIRAS, T. S. E NOGUEIRA, P. E. Flora Vascular do Cerrado. In: SANO, S.M. e ALMEIDA, S.P. (Ed.). **Cerrado: ambiente e flora**. Planaltina – DF: EMBRAPA-CPAC, 2008. p. 289-556.

MERCIER, H; KERBAUY, G.B. Endogenous IAA and cytokinin levels in bromeliad shoots as influenced by glutamine and ammonium nitrate treatments. **Rev. Bras. Fisiol. Veg.**, v.10, n.3, p.225-228, 1998.

MOREIRA, M.F., VIEIRA, C.C.J.; ZAIDAN, L.B.P. Efeito do fotoperíodo no crescimento em plantas aclimatizadas de *Gomphrena macrocephala* St.-Hil. (Amaranthaceae). **Rev. Bras. Bot.**, v.22, p.397-403, 1999.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. **Plant Physiology**, v.15, p.473-479, 1962.

NIEMEYER, R.P.; ALVES, R.U.; SILVEIRA, C.E.S.; SOARES E SILVA, L.H. Germinação *in vitro* de *Lobelia brasiliensis* A.O.S. Vieira & Shepherd uma espécie ameaçada, endêmica do Distrito Federal, com grande potencial ornamental. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 67., 2016, Vitória. **Anais...** Vitória: SBB, 2016.

NIEUWKERK, J. P.; ZIMMERMAN, R.H.; FORDHAM, I. Thidiazuron stimulation of apple shoot proliferation *in vitro*. **HortScience**, v.21, p.516-518, 1986.

PEREIRA, A.M.S., AMUI, S.F., BERTONI, B.W., MORAES, R.M.; FRANÇA, S.C. Micropropagation of *Anemopaegma arvense*: Conservation of an Endangered Medicinal Plant. **Planta Med.**, v.69, p.571-573, 2003.

RAMALHO, C. L.; PROENÇA, C.E.B. **Trepadeiras ornamentais do cerrado**. Planaltina - DF: Embrapa Cerrados, UNB, 2004. 59p.

ROCHA M.A.C.; COSTA, M.A.P.; SILVA, A.S.; LEDO, C.A.S.; MOREIRA, M.J.S.; BASTOS, L.P. Enraizamento *in vitro* e aclimatização de genótipos de jenipapeiro (*Genipa americana* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.30, p.769-774, 2008.

SEGLIE, L.; SCARIOT, V.; LARCHER, F.; DEVECCHI, M.; CHIAVAZZ, P. M.; (2012) In vitro seed germination and seedling propagation in *Campanula* spp. **Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology**, v.146, n.1, p.15-23, 2012.

SIDDIQUE, N.A.; BARI, M.A.; KHATUN, N.; RAHMAN, M.; RAHMAN, M.H.; HUDA, S. Plant regeneration from nodal segments derived callus in *Hemidesmus indicus* (L.) R. Br (*Anantamul*) an endangered medicinal plant in Bangladesh. **J. Biol. Sci.**, v.3, p.1158-1163, 2003.

SILVA, J.V.; HERNANDEZ, F.F.F.; BEZERRA, F.C.; DINIZ, J.D.N. Aclimatização “ex vitro” de mudas de antúrio em diferentes substratos. **Revista Ciência Agronômica**, v.38, n.2, p.188-191, 2007.

SORIANO, S.; TORRES, R.B. Descrição de plântulas de árvores nativas. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BOTÂNICA DE SÃO PAULO, 9., 1992, Ilha Solteira. **Anais...** Campinas: SBSP, 1995. p.27-46.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918p.

TAMBOLI, A. M.; RUB, R.A.; GHOSH, P.; BODHANKAR, S.L. Antiepileptic activity of lobeline isolated from the leaf of *Lobelia nicotianaefolia* and its effect on brain GABA level in mice. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v.2, p.537-542, 2012.

WANG, J.J., LIU, S.M.; CHEN, R.; LI, L.; GUO, X.S.; XUE, B.; HU, W.C. A novel effect of lobeline on vascular smooth muscle cell: inhibition of proliferation induced by endothelin-1. **Pharmazie**, v.62, p.620-624, 2007.

WOCHOK Z.S. The role of tissue culture in preserving threatened and endangered plant species. **Biol Conserv.**, v.20, p.83–89, 1981.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A descrição de frutos, sementes e do processo germinativo, juntamente com a morfologia de plântulas de *Lobelia brasiliensis* constituem importantes elementos de reconhecimento e caracterização desta espécie. Por se tratar de uma espécie rara, suas populações não são totalmente conhecidas e este trabalho pode contribuir para a identificação, até mesmo de plântulas, de *L. brasiliensis* no campo. Além de auxiliar na identificação de novas áreas de ocorrência natural da espécie, etapa fundamental para a conservação da espécie, este trabalho também pode ajudar nos estudos taxonômicos, de regeneração natural de áreas degradadas, uma vez que a mesma está associada a áreas e fitofisionomias de solos muito úmidos a encharcados (nascentes, campos úmidos, veredas, borda de matas e outros) sensíveis a intervenções antrópicas.

Em relação à germinação da *L. brasiliensis*, suas sementes germinam bem na incidência de luz e, principalmente, em substratos que retenham água. O mesmo foi observado para as plântulas desta espécie, que apresentaram maior taxa de estabelecimento e sobrevivência em substratos de maior retenção de água, como solos argilosos e ricos em matéria orgânica. Esses resultados contribuem para o entendimento das reais ameaças que a espécie está sujeita, facilitando o planejamento de estratégias de conservação da espécie. Além disso, como esta espécie possui características que podem ser exploradas comercialmente, conhecer a influência do substrato na germinação e estabelecimento da espécie é de fundamental importância para obtenção de mudas homogêneas, possibilitando a inserção da espécie no mercado de flores e paisagismo.

Considerando a dificuldade de estabelecimento da *L. brasiliensis*, uma alternativa para garantir altos níveis de germinação, estabelecimento e sobrevivência da espécie é a cultura *in vitro*. A técnica de micropropagação pode ser usada com êxito para a espécie, uma vez que a mesma apresenta uma ótima resposta aos reguladores de crescimento e mantém suas

características morfológicas ao longo de vários subcultivos. Desta maneira, a espécie pode ser propagada em larga escala e em um curto período de tempo, mantendo as características desejadas da planta matriz. Também foi constatada a aptidão da espécie de sair das condições controladas da cultura *in vitro* e ser aclimatizada em condições *ex vitro*; porém, pela desidratação em decorrência da falta de rega, não foi possível estabelecer o protocolo de aclimatização.

Este estudo é o primeiro a explorar a morfologia da sementes, frutos e plântulas de *L. brasiliensis*, assim como o primeiro a descrever o processo de germinação da espécie e testar a influência de alguns substratos nesse processo. Da mesma maneira, este é o primeiro estudo na cultura de tecido para a espécie, onde foram estabelecidos eficientes protocolos de micropropagação para a *L. brasiliensis*. A totalidade deste estudo pode contribuir para estratégias de conservação da espécie, ampliar as possibilidades no cultivo de plantas ornamentais e servir como etapa inicial para estudos fitoquímicos da espécie.