

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS

**PROPAGAÇÃO *EX VITRO* E *IN VITRO* DE  
*Heliconia angusta* VELL.**

**ALESSANDRA MARANGONI**

Florianópolis  
Julho de 2001.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS

ALESSANDRA MARANGONI

**PROPAGAÇÃO *EX VITRO* E *IN VITRO* DE  
*Heliconia angusta* VELL.**

Dissertação apresentada ao Curso  
de Pós-Graduação em Recursos  
Genéticos Vegetais  
da Universidade Federal de Santa  
Catarina para obtenção do título de  
Mestre em Recursos Genéticos  
Vegetais.

Orientador: Dr. Enio Luiz Pedrotti

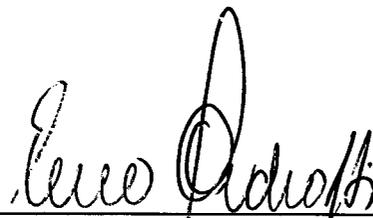
Florianópolis  
Julho de 2001.

# **“PROPAGAÇÃO VEGETATIVA *IN VIVO* E *IN VITRO* DE *Heliconia angusta*.”**

**ALESSANDRA MARANGONI**

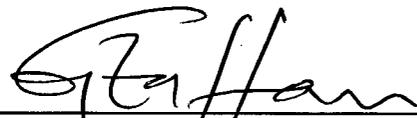
**Dissertação julgada e aprovada em sua  
forma final, pelo Orientador e membros  
da Comissão Examinadora.**

**Comissão Examinadora:**



---

**Prof. Dr. Enio Luiz Pedrotti**  
FIT/CCA/UFSC



---

**Pesq. Dr. Gilmar Roberto Zaffari**  
EPAGRI/SC



---

**Prof. Dr. Marcelo Maraschin**  
FIT/CCA/UFSC

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Plaucido e Cecília, pelo amor, compreensão, exemplo de vida e incentivo durante a realização deste trabalho. É para vocês que dedico com amor este trabalho.

A Marinês, Valdir, Patricia e Rodrigo por serem muito mais do que minha família, mas sim grandes amigos, pela paciência e compreensão nos momentos de ausência.

Ao meu namorado Henrique pelo apoio e carinho, sempre presente em vários momentos, principalmente os mais difíceis.

Ao Prof. Dr. Enio Luiz Pedrotti pelos ensinamentos, orientação e estímulo no decorrer dos trabalhos desta dissertação.

Ao Prof. Dr. Maurício dos Reis pela amizade, paciência e auxílio nas análises estatísticas.

Ao Prof. Dr. Jairo dos Santos pela identificação dos microrganismo.

À Suzana pelo incentivo, conversas, estudos e principalmente pela amizade.

À Ieda pela amizade e desenhos que ajudam a ilustrar este trabalho.

A Márcia Dubiella e a EPAGRI por possibilitar a coleta de plantas.

Aos colegas e funcionários do laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal, que de uma forma ou de outra colaboraram com a realização deste trabalho, em especial a Claudete e ao Rudiney.

Aos colegas e amigos do curso de Pós-Graduação em recursos Genéticos Vegetais pelo convívio.

# ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS .....	I
RESUMO .....	1
ABSTRACT .....	2
<b>1-INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>3</b>
1.1.1 –CARACTERIZAÇÃO DE <i>HELICONIA ANGUSTA</i> .....	11
1.1.2 –CARACTERIZAÇÃO DE <i>HELICONIA PSITTACORUM</i> L.....	14
1.1.3 –CARACTERIZAÇÃO DE <i>HELICONIA VELLOZIANA</i> L.....	15
<b>2- OBJETIVOS .....</b>	<b>17</b>
2.1. OBJETIVO GERAL .....	17
2.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	17
<b>3- MÉTODOS DE PROPAGAÇÃO.....</b>	<b>18</b>
3.1 - PROPAGAÇÃO VEGETATIVA POR DIVISÃO DE RIZOMAS.....	18
3.1.2 – ANÁLISE DESCRITIVA DO DESENVOLVIMENTO.....	20
3.1.2.1 –MATERIAL E MÉTODOS .....	20
3.1.2.2 – RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	24
3.1.3-PROPAGAÇÃO VEGETATIVA POR DIVISÃO DE RIZOMAS COM UTILIZAÇÃO DE BAP.....	
3.1.3.1- MATERIAL E MÉTODOS.....	
3.1.3.2- RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	36
3.2- ASPECTOS DA MORFOGÊNESE <i>IN VITRO</i> .....	39
3.2.2-MATERIAL E MÉTODOS.....	43
3.2.2.1-CULTURA <i>IN VITRO</i> .....	43
3.2.2.2-EXPERIMENTO COM COMPOSIÇÕES HORMONAIS:.....	44
3.2.2.3-RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	45
<b>4- MÉTODOS DE CONTROLE DA OXIDAÇÃO DOS MERISTEMAS DE <i>Heliconia angusta</i>.....</b>	<b>47</b>
4.2-MATERIAL E MÉTODOS .....	52
4.2.1-AVALIAÇÃO DE ANTIOXIDANTES PARA CONTROLE DA OXIDAÇÃO DOS EXPLANTES EM CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE <i>HELICONIA ANGUSTA</i> ; <i>HELICONIA PSITTACORUM</i> E <i>HELICONIA VELLOZIANA</i> .....	52
4.3-RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
<b>5- MÉTODOS DE CONTROLE DA CONTAMINAÇÃO DOS MERISTEMAS DE <i>Heliconia angusta</i> 60</b>	
5.1- INTRODUÇÃO .....	60
5.2 – MATERIAL E MÉTODOS.....	63
5.2.1-COMBINAÇÕES DE ANTIBIÓTICOS E FUNGICIDA EM EXPLANTES DE <i>HELICONIA ANGUSTA</i> , <i>H. PSITTACORUM</i> E <i>H. VELLOZIANA</i> .....	63
5.2.1.2 –RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	65
<i>H. angusta</i> .....	65
<i>H. psittacorum</i> .....	65
<i>H. velloziana</i> .....	65
5.2.2 -EXPERIMENTO COM HIPOCLORITO DE CÁLCIO NOS RIZOMAS DE <i>HELICONIA ANGUSTA</i> .....	71
5.2.2.1- MATERIAL E MÉTODOS.....	71
5.2.2.2- RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	73
<b>6-CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS .....</b>	<b>76</b>
<b>7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>78</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

- BAP** - 6-benzilaminopurina  
**AIB**- ácido indolbutírico  
**ANA**- ácido naftalenoacético  
**MS**- meio de cultura de Murashige & Skoog (1962)  
**ABS**- absorbância  
**CFL** – câmara de fluxo laminar  
**EPAGRI**- Empresa de Pesquisa e Extensão Rural de Santa Catarina S. A .  
**RGV** – Recursos Genéticos Vegetais  
**CCA** – Centro de Ciências Agrárias  
**UFSC** - Universidade Federal de Santa Catarina  
**LMBV** – Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal  
**UR** – umidade relativa  
**PAL** fenilalanina amoníaco-liase  
**v/v**- volume/volume  
**ANOVA**- análise de variância  
**GL** – graus de liberdade  
**QM** – quadrado médio  
**NS** – não significativo  
**IBRAFLOR** – Instituto Brasileiro de Floricultura

## RESUMO

*Heliconia angusta* é uma espécie nativa da mata Atlântica muito valorizada pelo mercado internacional de plantas ornamentais. É uma das espécies do gênero *Heliconia* que apresenta menor porte, podendo ser cultivada em vaso, tolera muito bem a sombra, possibilitando seu cultivo em ambientes internos. Apresenta uma floração intensa nos meses de agosto a setembro, sendo uma das únicas do seu gênero que floresce no final do inverno. Sua inflorescência é ereta, o que permite ser utilizada como flor de corte. As helicônias no Brasil estão sendo cultivadas nos Estados do Rio de Janeiro, Alagoas, Pernambuco, Ceará, Santa Catarina, Bahia e São Paulo. Esta espécie tem poucas áreas de cultivo devido à falta de técnicas adequadas para sua propagação. Considerando as limitações das técnicas convencionais de propagação vegetativa para esta espécie, o estabelecimento de metodologia para a propagação vegetativa é de fundamental importância para ampliar as áreas de cultivo e atender a demanda do mercado consumidor. Assim, no presente trabalho, objetivou-se realizar estudos visando otimizar as formas de propagação vegetativa desta espécie. Dois sistemas foram empregados para propagação vegetativa de *Heliconia angusta*. No primeiro, foi avaliada a propagação vegetativa através da divisão de rizomas, sendo que uma parte do trabalho foi de observação do seu desenvolvimento, durante dois anos. Outro estudo relacionado com a divisão de rizomas onde foi avaliada as respostas destas estruturas frente a utilização de benzilaminopurina (BAP), nas concentrações 500 mgL<sup>-1</sup>; 1000 mgL<sup>-1</sup>; 1500 mgL<sup>-1</sup>. No segundo sistema de produção, procurou-se estabelecer parâmetros para cultura *in vitro* desta espécie, em especial o controle da oxidação e da contaminação dos explantes. E, por fim, comparou-se o comportamento desta espécie com outras duas helicônias (*H. psittacorum* e *H. velloziana*), quanto ao controle da oxidação e da contaminação para a cultura *in vitro*. Foi constatado que a propagação vegetativa é uma forma eficiente de propagação. Após dois anos as plantas estudadas apresentaram um produção de aproximadamente oito rebentos por rizoma cultivado. Os resultados com BAP também foram positivos, durante noventa dias, 70% das plantas produziram no mínimo dois rebentos por rizoma. Quanto a cultura *in vitro* há necessidade de otimizar a técnica para esta espécie, pois a *H. angusta* apresentou sérios problemas de oxidação e contaminação que requerem estudos mais detalhados.

## ABSTRACT

*Heliconia angusta* is a native species to the Atlantic rainforest with a raised interest by the international market of ornamental plants. It is one of the species of the *Heliconia* genus that presents smaller size, which allows its cultivation in flowerpot, and acceptance shadow very well, which allows indoor growing. It blossoms from August to September, being of the few in its genus to produce flowers as the end of winter. It presents erected inflorescence, which allows it to be cut as ornamental flower. In Brazil, helicons have been cultivated in the States of Rio de Janeiro, Alagoas, Pernambuco, Ceara, Santa Catarina, Bahia and São Paulo, but this species has few areas of cultivation due to the lack of proper techniques to its propagation. Considering the limitations of conventional techniques of vegetative propagation for this species, the establishment of a methodology for its vegetative propagation has fundamental relevance so as to increase the cultivated areas to fulfil market demands. Thus, this work aims at carrying out studies in order to optimise the forms of vegetative propagation of this species. Two systems of propagation were applied for the propagation of *Heliconia angusta*. In the first system, the vegetative propagation was evaluated through rhizome division; part of the work consisted of observing its development for two years. The behaviour of the species was assessed and described during that period. Another study related to rhizome division consisted of the observation of the response of these structures to the use of benzylaminopurine (BAP), with 500 mgL<sup>-1</sup>, 1000 mgL<sup>-1</sup> and 1500 mgL<sup>-1</sup>. In the second system of production, attempts were made in order to establish parameters for *in vitro* cultivation of the species, with special interest in the control of oxidation and contamination of the explants. Finally, the behaviour of the species was compared to that of two other helicons (*H. psittacorum* and *H. velloziana*) concerning the control of oxidation and contamination of the *in vitro* culture. The results showed that the vegetative propagation is an efficient means of propagation. After two years, the plants showed production of approximately eight sprouts for each cultivated rhizome. The results with BAP were also positive, as 70% of the plants produced at least two sprouts for each rhizome in ninety days. With regard to the *in vitro* culture, it is necessary to optimise the technique for this species, as *H. angusta* presented serious problems of oxidation and contamination, which requires further studies.

# INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O mercado mundial de flores e plantas ornamentais está hoje em plena fase de expansão. Inicialmente, a produção estava concentrada em alguns países europeus como Holanda, Itália e Dinamarca, sendo o Japão na Ásia, outros grandes produtores. Atualmente, o mercado mundial apresenta uma crescente saturação na oferta de flores tradicionais (rosas, crisântemos, cravos, etc.), beneficiando a comercialização de flores e plantas tropicais provenientes de países da América Tropical, África e sudoeste da Ásia (Castro & Graziano 1997).

A produção mundial de flores e plantas ocupa uma área estimada de 190.000 ha, movimentando valores próximos a US\$ 16 bilhões/ano a nível de produtor e US\$ 44 bilhões/ano a nível de varejo (Motos 2000 b). Por movimentar cifras medidas em bilhões de dólares, a produção e comercialização de flores e plantas ornamentais nos países de primeiro mundo tem a conotação de “flower industry” (Doesburg 1992). Matsunga (1997) considera esta denominação apropriada porque a produção e comercialização de flores envolve, profissionalmente, todos os segmentos da cadeia produtiva. Essa indústria é importante da perspectiva de consumo de flores e plantas ornamentais no mundo. A Suíça apresenta uma taxa per capita de consumo de flores na ordem de US\$ 174/ ano, a Austrália de US\$ 109/ ano, os Estados Unidos de US\$ 58/ano e o Brasil de US\$ 6/ ano (Motos 2000 b).

A produção e comercialização de plantas ornamentais no Brasil começou em escala comercial na década de 50 com imigrantes portugueses. Na década de 60, entraram neste mercado os imigrantes japoneses e finalmente os imigrantes holandeses, que, no início da década de 70, deram um impulso maior a comercialização, implantando um sistema de distribuição pelo país inteiro (Motos 2000 b). Nos últimos 5 anos, a floricultura brasileira apresentou um crescimento significativo, na ordem de 15 a 20 % ao ano (Bongers 2000).

No ano de 1999, o setor de floricultura exportou o equivalente a US\$ 10 milhões, sendo a floricultura o principal item na pauta de exportações brasileiras no ano de 1999 (Motos 2000 a). Com o desenvolvimento de pesquisas e incremento à produção, a floricultura está se tornando uma nova realidade econômica. Motos (2000 c) cita que o Brasil tem todas as condições para se tornar um grande produtor e exportador de flores e

plantas ornamentais no cenário mundial, e os principais desafios para alcançar a competitividade são: a aplicação de tecnologias avançadas no sistema de produção; uso de material genético adequado; treinamento e capacitação da mão-de-obra; melhorias das tecnologias de pós colheita.

A tendência da globalização da economia também está presente no mercado de flores e plantas ornamentais e desfez barreiras. Hoje os produtos importados chegam com grande impacto, exigindo que os produtos nacionais estejam dentro dos melhores padrões de qualidade e padronização. Qualidade e preço deixaram de ser um critério para a diferenciação dos produtos no mercado, e sim se tornaram uma premissa básica de sobrevivência dos produtores (Bongers 2000).

Outro fator importante é a competitividade neste setor entre as plantas tropicais. O mercado mundial se consolida a cada ano e algumas espécies do gênero *Heliconia* tem conseguido grande destaque, tanto na Europa como nos Estados Unidos (Castro & Graziano 1997). Outro fator favorável ao cultivo de flores tropicais é que há uma forte identificação da população, em geral, com as plantas oriundas da Mata Atlântica.

Dentro do panorama mundial, as flores tropicais ocupam 3% do mercado internacional de flores (Castan 1997). Com técnicas de propagação pode-se melhorar a produtividade e diminuir os custos, tornando as flores tropicais brasileiras competitivas em relação aos maiores produtores que são Costa Rica e Hawai, podendo ainda, competir com os produtores europeus, Itália, Alemanha, Holanda e Dinamarca, que apresentam um custo de produção mais elevado devido ao cultivo ser protegido (Castan 1997).

Echeverry (1987) cita que está ocorrendo mundialmente um incremento na área de plantio de helicônias, as quais recebem manejo que aumentam a produção em relação às áreas naturais. O número das espécies utilizadas comercialmente vem crescendo, tanto em nível nacional como internacional, principalmente como flores de corte, em função do colorido e da longa durabilidade das suas brácteas florais (Castro 1993, 1995). As espécies mais comercializadas têm sido *H. psittacorum*, *H. bihai*, *H. chartaceae*, *H. caribaea*, *H. angusta*, *H. orthotrica*, *H. rostrata*, *H. velloziana* e *H. X. rauliniana* (Castro 1995).

Com a crescente procura por estas plantas no mercado, os produtores estão buscando tecnologias mais adequadas para incrementar a produção, diminuir custos e aumentar a rentabilidade desta atividade. Após esta etapa, os produtores terão condições de

atender as exigências de mercado com maior qualidade, preço e ofertas durante todo o ano, tornando-se assim competitivo no mercado internacional.

A dificuldade de produzir plantas tropicais é evidenciada pela falta de informações confiáveis sobre as espécies (Castan 1997). A falta de conhecimento sobre o manejo, sazonalidade e produção insuficiente para atender a demanda limitando a expansão da comercialização das helicônias, tanto em nível nacional como mundial (Castro & Graziano 1997).

O Brasil apresenta condições adequadas para a produção de flores tropicais, as condições climáticas são favoráveis, e a maior parte do território apresenta temperatura e umidade elevadas, condições necessárias para o desenvolvimento destas espécies. Já existem algumas áreas de cultivo nos estados do Rio de Janeiro, Alagoas, Pernambuco, São Paulo, Bahia, Ceará e Goiás (Motos 2000 c). O Estado de Santa Catarina também apresenta alguns produtores, mas com incentivos e pesquisa pode-se aumentar este número.

Por outro lado, a propagação vegetativa das *Heliconiaceas* foi estudada por Nathan *et al.* (1992), que estudou micropropagação de *H. psittacorum*, Goh *et al.* (1995); Kumar *et al.* (1996) e Read & Szendrak (1998) realizaram estudos sobre plantas tropicais, incluindo as helicônias. Estes estudos evidenciam como melhor alternativa para propagação vegetativa das espécies de helicônias a utilização de técnicas de cultura *in vitro*, pois permitem a obtenção de grande quantidade de plantas com alta qualidade genética e fitossanitária (Castro & Graziano 1997).

Os produtores do Norte Catarinense relataram, através de comunicação verbal, que a *Heliconia angusta* apresenta problemas no que tange a propagação. Nas condições ambientais do Estado, as plantas não produzem sementes viáveis e a sua propagação vegetativa apresenta baixa produção de rebentos, onerando muito o custo de produção. Eles relatam que quando cultivada em canteiros a pleno sol, a divisão dos rizomas só pode ser feita depois de dois anos, com a produção de no máximo três rebentos. Isto dificulta muito a produção comercial desta espécie, pois o tempo que a planta fica no viveiro até atingir tamanho de mercado é muito grande. Estes fatores determinam um elevado custo de produção das flores e por consequência chegam ao varejo com um valor

elevado, o que restringe o seu consumo.

Além do exposto esta espécie estar incluída nas Lista Oficial de Espécies da Flora Brasileira Ameaçada de Extinção do IBAMA, através da portaria no 37-N, de 3 de abril de 1992. O desenvolvimento de tecnologia de propagação vegetativa desta espécie pode tornar viável a utilização de mais esse recurso genético da Mata Atlântica, sem causar danos ao meio ambiente, muito pelo contrário, auxiliando na sua conservação e preservação, evitando assim a extinção desta espécie.

Desta forma, este trabalho visa elucidar alguns pontos referente à propagação vegetativa de *H. angusta*. Além disso, procura traçar um paralelo com outras duas espécies de *Heliconias* em relação aos principais problemas da propagação vegetativa desta espécie. Adicionalmente, espera poder contribuir no desenvolvimento de tecnologia para produção de mudas de *H. angusta* dentro do padrão exigindo no mercado nacional e internacional, dentro dos padrões de mudas do IBRAFLOR.

## CARACTERIZAÇÃO DO GÊNERO *Heliconia*

A família *Heliconiaceae* compreende um único gênero, *Heliconia* L. (Tomlinson 1969, Cronquist 1981). O nome do gênero foi estabelecido por Linnaeus, em 1771, numa alusão ao Monte Helicon, na Beócia, Grécia, local onde viviam Apolo e as Musas, segundo a mitologia grega (Castro 1995).

A família *Heliconiaceae* pertence a ordem *Zingiberales*, que por sua vez, está incluída na subclasse *Zingiberidae*, juntamente com a ordem *Bromeliales* (Cronquist 1981). A ordem *Zingiberales* é atualmente é constituída por oito famílias com aproximadamente 1800 espécies (Tomlinson 1962, Cronquist 1981, Dahlgren *et al.* 1985).

A classificação infragenérica proposta por Andersson (1981), divide o gênero em quatro subgêneros e 19 seções. As espécies brasileiras de *Heliconias* incluem-se nos quatro subgêneros e em 10 seções propostas por Anderson (1981). Kress (1990a) sugere que no Brasil ocorre a distribuição das principais linhas evolutivas do grupo.

De acordo com Kress (1990a), não existe um consenso com relação ao número de espécies de helicônias, mas é estimado que existam de 200 a 250 espécies, sendo que apenas seis espécies ocorrem nas Ilhas do Sul do Pacífico, Samoa e Indonésia. O restante está distribuído na América Tropical, desde o sul do México ao sul do Brasil.

Existem dúvidas com relação ao número de espécies de helicônias que ocorrem no Brasil, Kress (1990a) apresentou uma revisão filogenética das *Zingiberales* e os padrões de distribuição geográficas de *Heliconia* no Brasil. Para o gênero foram referidos 65 espécies. Castro (1993) sugere que dentro do levantamento de Kress (1990a) das 65 espécies referidas 28 sejam sinônimas, restando apenas 37 espécies. Este gênero ocorre naturalmente em duas áreas primárias de distribuição: a Região Amazônica e a Floresta Atlântica Costeira (Kress 1990a).

Poucos são os estudos taxonômicos das espécies de helicônia com ocorrência no Brasil. Há alguns trabalhos sobre espécies que ocorrem nos Estados do Rio de Janeiro (Mello-Filho 1975, Santos 1978), Espírito Santo (Burle-Max 1974) e Amazonas (Barreiros 1972). Para o restante dos Estados existem apenas listagens de espécies (Barreiros 1974, Dubbs 1998).

Kress (1990b), afirma que o pequeno número de espécies de helicônias encontradas no Brasil, quando comparado com outros países como Equador com 45 espécies, é devido a distância entre estas espécies e ao centro de diversidade, e não a fatores ambientais.

Segundo Andersson (1989), este gênero é representado por plantas de origem tropical, com ampla distribuição na América Central e na América do Sul (Figura 1). A taxa de diversidade atual indica como centro de origem do gênero o noroeste da América do Sul, região caracterizada pelo alto índice pluviométrico e solos ricos em nutrientes (Andersson 1989).

As espécies de *Heliconia* ocorrem predominantemente nas florestas tropicais em sub-bosques, nas margens de rios e em clareiras. Algumas espécies ocorrem no cerrado (*H. psittacorum* L. f.), matas de galerias (*H. hirsuta* L.f.) ou pântanos (*H. marginata* (G.) Pittier) (Andersson 1989). A maioria vive em locais úmidos ou inundados, mas algumas espécies são encontradas em áreas sazonalmente secas, ocorrendo em sua maioria a 800-1500 m de altitude, embora encontrem-se espécies abaixo de 500 m e acima de 2000 m (Kress 1990a).

Segundo Castro (1995), estas plantas se desenvolvem em solos argilo-arenosos, com pH entre 4,5 e 6,5, e podem crescer tanto em locais sombreados ou a pleno sol, com solos úmidos a levemente secos.

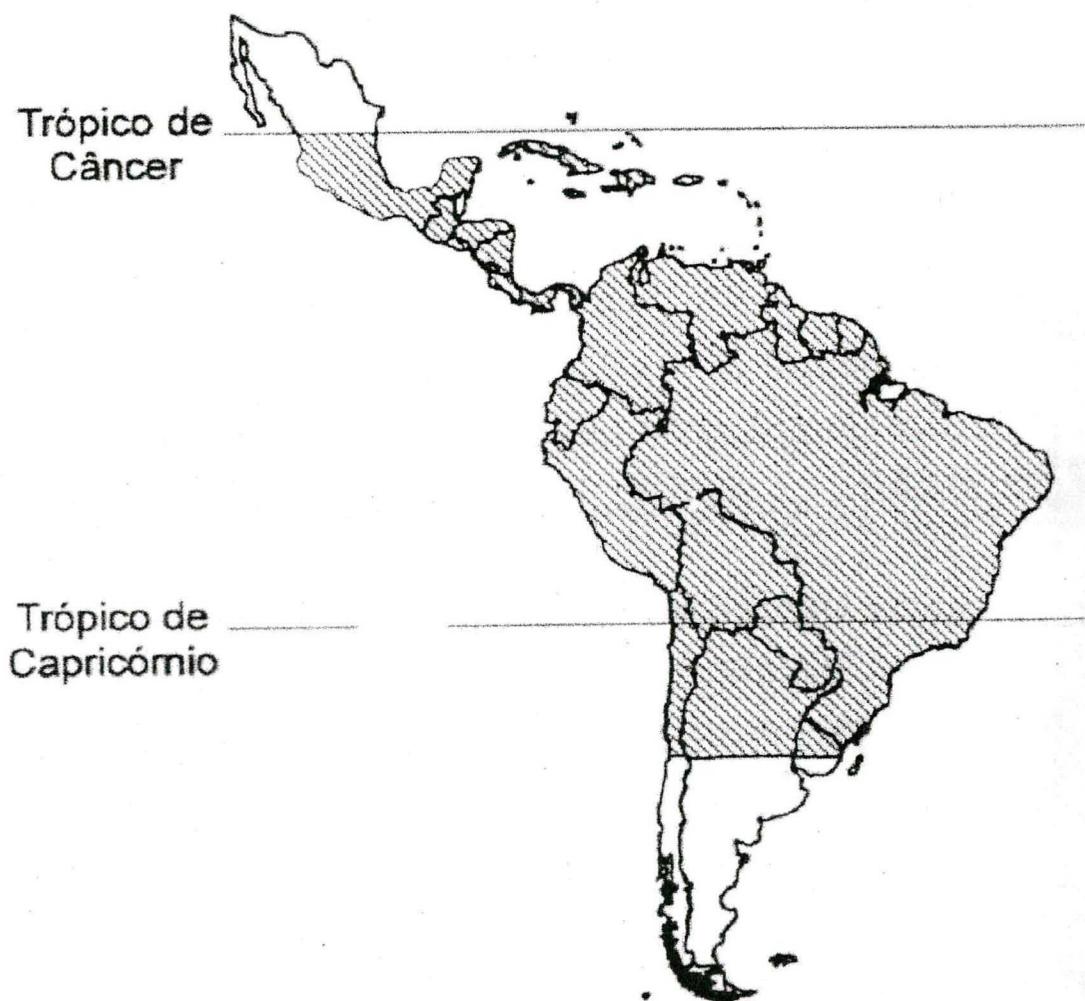
O gênero *Heliconia* é caracterizado por plantas herbáceas, rizomatosas, eretas, com altura variando de 0,5m até 10m, conforme a espécie (Paiva 1999). As inflorescências das espécies neotropicais são hermafroditas e apresentam seis estames, um deles estéril e cinco funcionais. Com flores coloridas, com antese diurna, e são polinizadas por beija-flores, enquanto as espécies paleotropicais, das ilhas do Pacífico, apresentam inflorescências e flores verdes, com antese noturna, e são polinizadas por morcegos nectarívoros (Kress 1985, Berry & Kress 1991). O florescimento é afetado pelas condições edafoclimáticas. O fruto é do tipo baga, geralmente com três sementes.

O hábito de crescimento é musáioide, possuindo pecíolos longos assemelhando-se a bananeiras, e as folhas são orientadas verticalmente em relação ao pseudo-caule (Castro & Graziano 1997).

As helicônias são plantas geófitas tuberosas, ou seja, que se perpetuam não somente por suas sementes, mas também por seus caules especializados, cuja função principal é servir como fonte de reservas, nutrientes e água para o crescimento e desenvolvimento sazonal e, assim, assegurar a sobrevivência das espécies (Castro & Graziano 1997). A propagação por via sexuada e distante de seu habitat natural, podem ser dificultadas por falta de polinizadores, não produzindo sementes. Muitas vezes, as sementes apresentam baixa viabilidade, não permitindo armazenamento por longos períodos. Para germinar necessitam de luz, além de apresentarem problemas de germinação devido á dormência, ou de desenvolvimento por apresentar embriões imaturos. Outro fator de importância é que apresentam uma assincronia na germinação das sementes, dificultando o plantio comercial (Criley 1986).

A propagação assexuada é feita através da divisão de rizomas. A unidade mínima para propagação é uma porção de um pseudo-caule de 20 a 30 cm, unido a uma porção de rizoma de 10 a 12,5 cm de comprimento (Castro 1995).

Devido à importância que as helicônias apresentam no mercado de plantas ornamentais, alguns autores estudaram a sua propagação vegetativa (Criley 1988a, 1989, 1995, Geertsen 1989, 1990, Castro 1995). Estes autores estudaram aspectos de cultivo como técnicas de plantio, irrigação, influência da temperatura e do fotoperíodo no desenvolvimento das plantas, mas não detalharam os aspectos morfológicos ligados à propagação vegetativa (Simão 1999).



**Figura 1-** Mapa do continente Americano mostrando na área hachurada a distribuição natural do gênero *Heliconia* (Berry & Kress 1991).

## 1 – Caracterização de *Heliconia angusta*.

A *Heliconia angusta* (Figura 2 a, b) foi escolhida para este estudo por ser uma espécie que apresenta grande potencial ornamental, devido a algumas características que lhe diferenciam das demais espécies do gênero (Barreiros 1974). Além disso, é uma das poucas flores tropicais com florescimento nos meses de julho a agosto, na região Sudeste do Brasil e nos meses de setembro a março no Nordeste e Centro Oeste (Castro & Graziano 1997). Segundo Buzato (1995), esta espécie floresce por um período, de 120 a 180 dias, constituindo-se numa das principais fontes de néctar para os beija-flores. Apresenta característica ornamental de alto valor, pois sua inflorescência é ereta sendo utilizada como flor de corte. Ao contrário da grande maioria das helicônias, esta espécie apresenta um porte menor e pode ser cultivada em locais com intensidade luminosa variando de 20% a 80% (Berry & Kress 1991).

*Heliconia angusta* tem como seu centro de origem o Brasil, Gávea, (RJ), cujo clima é caracterizado pelo alto índice pluviométrico e solos ricos em nutrientes (Barreiros 1974).

Nathan *et al* (1992) descreve que as helicônias apresentam sérios problemas com bactérias do gênero *Pseudomonas spp*, que são transmitidas através dos rizomas contaminados. Estas bactérias atacam o sistema vascular das plantas causando vários danos inclusive a diminuição na produção de flores. Em alguns casos, a contaminação pelas bactérias torna inviável a produção desta espécie.

Para produção comercial desta espécie é necessário que as plantas matrizes tenham alto valor genético, devem estar livres de patógenos e apresentar uniformidade na lavoura. Uma alternativa é a utilização de mudas micropropagadas, pois estão livres de agentes patogênicos, como as bactérias *Pseudomonas* (Kumar *et al.* 1996). Outra vantagem é que as mudas micropropagadas apresentam uniformidade genética, assim as lavouras plantadas

com estas mudas são uniformes, facilitando os tratos culturais e a colheita das flores, tornando o plantio economicamente mais rentável.

Até o momento, poucos trabalhos foram realizados em relação à biologia, bem como quanto as formas de propagação desta espécie. Simão (1999), realizou um estudo sobre morfo-anatomia, comparando com trabalhos semelhantes realizados para outras espécies do gênero. Em função do pouco conhecimento disponível, é de fundamental importância realizar estudos sobre esta espécie.



**Figura 2a** - Detalhe da inflorescência de *Heliconia angusta*



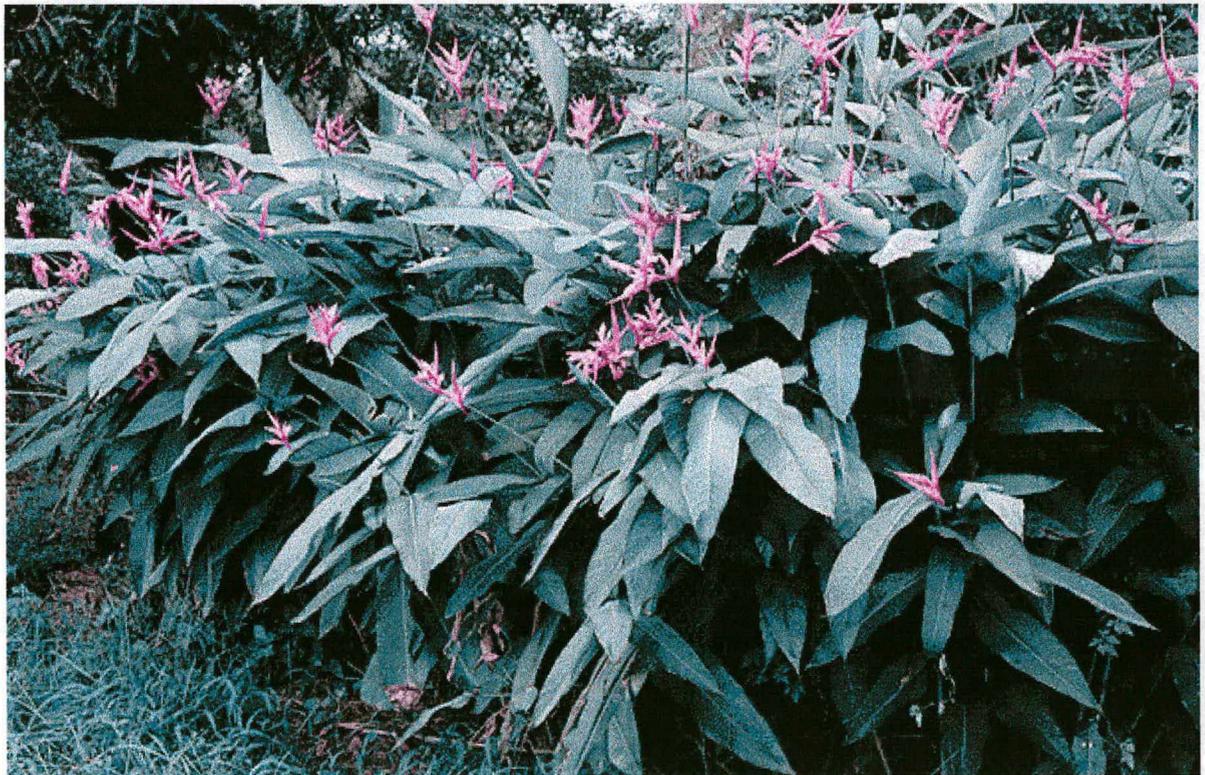
**Figura 2b** – Plantas de *Heliconia angusta*, em condições *in vivo* (Lorenzi & Souza 2001).

## 2 –Caracterização de *Heliconia psittacorum* L.

Arbusto rizomatoso, entouceirado (Figura 3), de 1,5-2,0 m de altura. Com folhas ovalado-lanceoladas, coriáceas, com pecíolo curto. Inflorescências eretas com as brácteas distribuídas em um único plano, com coloração vermelhas e amarelas (Lorenzi & Souza 2001). Embora o florescimento ocorra durante o ano todo, existe uma florada mais acentuada de dezembro a maio.

Apresentando ampla distribuição por todo o território nacional (Castro & Graziano 1997). Desenvolve-se tanto a pleno sol coma até 50% de sombra.

Esta espécie é utilizada para comercialização das suas flores e como planta de jardim.



**Figura 3-** Plantas de *Heliconia psittacorum*, em condições *in vivo*(Lorenzi & Souza 2001).

### 3 – Caracterização de *Heliconia velloziana* L.

A *Heliconia velloziana* (Figura 4), é uma planta herbácea de grande porte, com 2,20-3,50 m de altura. A parte subterrânea é constituída pela raízes que são adventícias e pelo rizoma. Bell (1991) descreve o rizoma desta espécie como um caule simpodial, carnoso ou lenhoso, que cresce horizontalmente, abaixo do nível do solo, com escamas foliares ou apenas cicatrizes.

A parte aérea é formada pelas folhas, pelo escapo e pelas inflorescências. As folhas, 5 por indivíduo, são alternadas. A inflorescência é terminal, ereta, composta, com 27-34 cm de comprimento, sustentada pelo escapo. É composta por 8-10 brácteas vermelho-alaranjadas, cimbiformes, dísticas, distribuídas em um único plano, que vão diminuindo o tamanho na direção do ápice (Kress 1990a). As flores apresentam sépalas e pétalas amarelo-esverdeadas. A floração ocorre de janeiro a abril (Berry & Kress 1991). Os frutos são do tipo drupa e, quando maduros, apresentam coloração azul-escura. A semente é elíptica e possui um tegumento fino de coloração castanho clara. A germinação é hipógea e a plântula é criptocotiledonar.

Dados da literatura relatam a ocorrência de *H. velloziana* desde o Estado do Rio de Janeiro até o Rio Grande do Sul (Santos 1978, Mello-Filho 1975, Citadini-Zanette & Baptista 1989).

Cultivadas a pleno sol ou meia-sombra, forma grandes touceiras em áreas mais abertas (Lorenzi & Souza 2001). No seu habitat natural, ocorre em áreas com 50% de sombreamento (Berry & Kress 1991).



**Figura 4-** Plantas de *Heliconia velloziana*, em condições *in vivo* (Lorenzi & Souza 2001).

## 2-OBJETIVOS

Levando em consideração ao aspectos discutidos anteriormente e em decorrência do crescente interesse no mercado nacional e internacional de flores desta espécie de *Heliconia*. O presente trabalho teve como objetivos:

### 2.1. Objetivo Geral

a) Elucidar alguns pontos que limitam a propagação vegetativa de *Heliconia angusta* e estabelecer parâmetros que determinam a morfogênese *in vitro* ;

### 2.2- Objetivos Específicos

- a) Avaliar o tempo necessário e o número de mudas produzidas pelo sistema de divisão de rizomas;
- b) Avaliar a ação de diferentes antioxidantes para o controle do processo de oxidação dos explantes na cultura *in vitro*;
- c) Otimizar a assepsia dos meristemas para introdução *in vitro*;
- d) Comparar o processo de propagação através da divisão de rizomas com da cultura *in vitro*;
- e) Traçar um paralelo entre de *H. angusta*; *H. psittacorum* e *H. velloziana* com relação à assepsia dos explantes e ao controle da oxidação, quando introduzidas *in vitro*.

## 3- MÉTODOS DE PROPAGAÇÃO

### 3.1 - Propagação Vegetativa por Divisão de Rizomas

#### 3.1.1 – Introdução

A propagação vegetativa resulta na geração de novos indivíduos com a mesmo material genético do indivíduo que lhe deu origem. Essa técnica é fundamentada na propriedade de regeneração dos tecidos, sendo que, as plantas obtidas terão constituição genética idêntica a dos genitores (Pádua 1983). As vantagens da utilização destas técnicas é a perpetuação sem alteração de material heterozigótico, torna possível a propagação de clones que não produzem sementes e o tempo para obtenção de novos indivíduos também é menor (Hartmann *et al.* 1990).

Os métodos de propagação vegetativa são realizados através da utilização de estruturas vegetativas especializadas (bulbos, rizomas, estolhos, etc.); sementes apomíticas; enxertia e através da produção de raízes ou caules adventícios (Janick 1990).

A forma de propagação vegetativa utilizada pelos produtores para *Heliconia angusta* é a divisão de rizomas, por esta razão os primeiros trabalhos foram realizados no sentido de conhecer o comportamento desta espécie perante os métodos de propagação vegetativa empregados.

Os rizomas são caules especializados que crescem horizontalmente, tanto acima como abaixo da superfície do solo (Simão 1999). Apresentam uma estrutura segmentada devido a presença de nós e entrenós. Próximo aos nós, se desenvolvem raízes adventícias e pontos de crescimento lateral. Os brotos são eretos, aéreos, assim como os ramos floríferos, e se desenvolvem tanto na ponta terminal do rizoma como a partir de ramos laterais (Hartmann *et al.* 1990).

A estrutura anatômica do rizoma é composta por feixes de fibras na região cortical; feixes vasculares colaterais no córtex com arcos de fibras junto ao floema; os feixes vasculares no cilindro central (Simão 1999). O cilindro central é um tecido fibroso, interno

a partir do qual se formam as raízes e as gemas laterais e a apical. A gema apical é responsável pela formação das folhas e das gemas laterais de brotação. Após gerar todas as folhas, a gema apical se diferencia em inflorescência que sobe verticalmente pelo interior do pseudocaule até lançar as flores.

As helicônias apresentam um rizoma do tipo simpodial, ou seja, ramificado. Normalmente, novas brotações se desenvolvem na base de um pseudocaule vertical (Criley 1988). A divisão dos rizomas envolve tanto o rizoma horizontal como os pseudocaulos verticais (Castro 1995).

Segundo Criley (1988 a, b, 1995), os rizomas de algumas espécies de *Heliconias*, demoram um mês para iniciar o desenvolvimento das raízes e cerca de quatro a seis semanas para o início do desenvolvimento das gemas.

A unidade mínima para propagação é uma porção de um pseudocaule vertical com 20 a 30 cm, unindo a porção de rizoma de 10 a 12,5 cm. O melhor crescimento é obtido, entretanto, quando se utilizam rizomas com mais biomassa, incorporando maior número de pseudocaulos (Castro 1995). Os rizomas seccionados devem estar livres de partículas de solo, bem como de todas as partes necrosadas (Criley 1986). Cuidados fitossanitários devem ser tomados com a porção de rizoma, visando o controle de microorganismos nocivos ao desenvolvimento das plantas.

Echeverry (1987), recomenda acondicionar as secções de rizomas desinfetadas em sacos plásticos escuros, fechados e protegidos do sol, durante duas ou três semanas, quando se inicia o desenvolvimento das raízes. Quando estas já se encontram bem expandidas, as secções podem ser plantadas em substrato adequado para o seu crescimento.

## 3.1.2 – Análise Descritiva do Desenvolvimento

### 3.1.2.1 – Material e Métodos

Este experimento teve como objetivo de caracterizar a relação entre a produção de mudas e a quantidade de gemas presentes no rizoma. Buscando determinar qual rizoma apresenta uma maior proliferação de mudas após um período de 24 meses.

O material vegetal utilizado no experimento foi coletado em um jardim residencial no município de Antônio Carlos – SC. Os rizomas foram divididos em três grupos, conforme a quantidade de gemas que apresentavam (Figura 5a,5b,5c).

Grupo 1 – Rizomas com uma gema;

Grupo 2 – Rizomas com duas gemas;

Grupo 3 – Rizomas com três gemas.

A preparação dos rizomas para o plantio foi realizada segundo metodologia descrita por Criley (1988 a, b, 1995) e Castro (1995) para produção de mudas de *Heliconia*. As mudas selecionadas foram reduzidas para porções de rizomas de 10 a 12,5 cm de comprimento com 20 a 30 cm de parte aérea, sendo que parte das raízes foi removida.

Os segmentos dos rizomas foram desinfetadas, mergulhando-as numa solução aquosa de hipoclorito de sódio (1:4 v/v) por um minuto (Criley 1995), e então etiquetadas e plantadas em vasos plásticos, com 40 cm de diâmetro e 20 cm de altura. O substrato utilizado foi Plantamax® e vermiculita (1:1 v/v). Os vasos foram acondicionados na casa de vegetação do Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, sob um fotoperíodo de 16 horas de luz, cuja radiação solar foi reduzida em 20%, através da cobertura de polietileno da casa de vegetação. As plantas receberam solução nutritiva conforme descrita por Pouget (1984) (Quadro 1), através de gotejadores. A solução nutritiva foi fornecida as rizomas durante os 24 meses do experimento.

Os parâmetros avaliados foram: 1) altura das plantas; 2) número de folhas por planta; 3) tamanho das folhas; 4) número de brotações; 5) altura das brotações; 6) número de folhas das brotações; 7) presença de inflorescência.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, composto por três tratamentos e cada tratamento era continha três repetições. Sendo, que uma parcela correspondia a um vaso com um rizoma. As análises experimentais e interpretações dos dados obtidos ao longo do trabalho foram baseados na Análise de Variância (ANOVA) e no teste de separação de médias o teste de Ducan ( $\alpha=0,05$ ).



**Quadro 1. Formulação da solução nutritiva utilizada na propagação vegetativa de *Heliconia angusta* por divisão de rizomas, segundo Pouget (1984).**

Nutrientes	Quantidade (mg/l)
N	104,5
P	17,5
K	100
Mg	12,5
Ca	30
Na	35
S	16
Fe	1,47
Mn	0,34
B	0,25
Cu	0,015
Zn	0,04
Mo	0,005

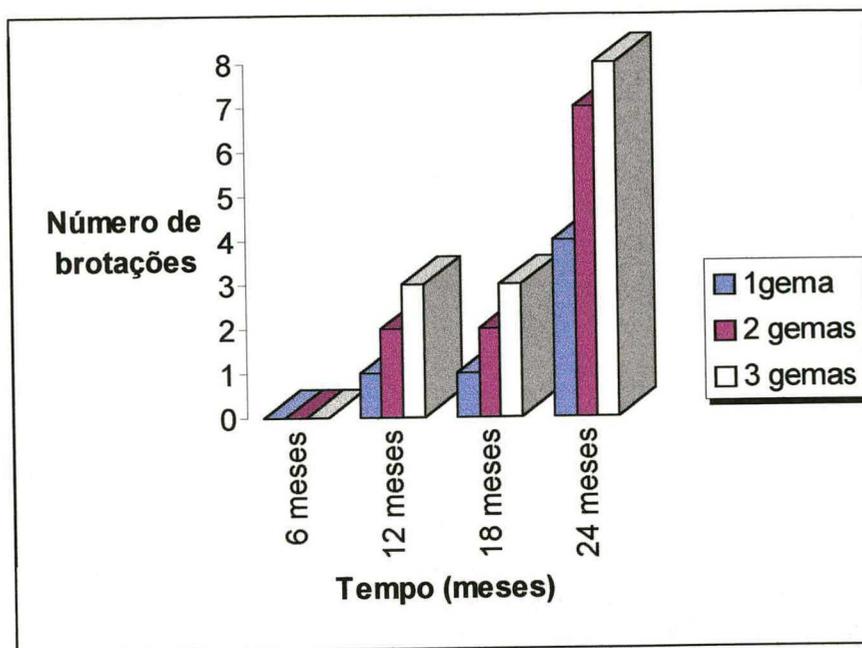
### 3.1.2.2 – Resultados e Discussão

Os estudos realizados em relação a quantidade de gemas existentes no rizoma e a proliferação de mudas após um período de 24 meses não revelaram a existência de diferenças significativas entre os tratamentos (Quadro 2).

Os rizomas que apresentavam 3 gemas obtiveram uma média de 8 brotos por rizoma. Os rizomas com 2 gemas continham ao final de 24 meses, 6,66 brotos e os rizomas que apresentavam uma gema, no início do experimento, formaram 5,33 brotos em média (Figura 6).

**Quadro 2** : Análise de variância para os dados referentes à quantidade de gemas nos rizomas e proliferação de mudas de *Heliconia angusta*, após um período de 24 meses, onde as parcelas do experimentos foram mantidas em casa de vegetação do LMBV/CCA/UFSC, Florianópolis – SC, no período de agosto de 1998 a agosto de 2000.

Causa de Variação	GL	QM	
Tratamentos	2	5,33	NS
Erro	4		
C.V.	14.042		



**Figura 6:** Número de brotações formados em rizomas de *Heliconia angusta*, cultivados em substrato de plantmax e vermiculita (1:1 v/v), irrigados por gotejamento com solução nutritiva descrita por Pouget (1984) e mantidos em casa de vegetação do LMBV/CCA/UFSC, Florianópolis – SC, no período de agosto de 1998 a agosto de 2000.

Nos primeiros três meses, ocorreu uma redução de 90% no volume da parte aérea, causada pela desidratação excessiva das folhas levando à morte dos tecidos. Este fato ocorreu em todas as plantas, indiferente do número de gemas que continha o rizoma.

A primeira coleta de dados foi realizada 6 meses após o início do experimento (Quadro 3). A segunda coleta de dados foi realizada 12 meses após o plantio, e a terceira coleta de dados foi realizada 18 meses após o início do experimento, sendo que, a última observação foi realizada 24 meses após (Figura 7).

**Quadro 3-** Desenvolvimento dos rizomas de *Heliconia angusta* mantidos em casa de vegetação, avaliados durante 24 meses, mensurando altura do pseudo-caule; número de folhas; dimensões das folhas (comprimento/altura); número de brotações; altura das brotações; número de folhas das brotações e a presença de inflorescência.

	Altura das plantas cm	Número de folhas	Comprimento / Largura das folhas cm/cm	Número de brotações	Altura das brotações cm	Número de folhas das brotações	Presença de inflorescência
<b>6 meses</b>							
Grupo 1	10	3	07 /05	—	—	—	—
Grupo 2	08	4	10 /07	—	—	—	—
Grupo 3	06	3	05 /3,5	—	—	—	—
<b>12 meses</b>							
Grupo 1	45	4	20 /08	1	5	—	—
Grupo 2	37	6	19 /9,4	2	8	2	—
Grupo 3	21	3	25 /09	3	14	2	—
<b>18 meses</b>							
Grupo 1	80	4	50 /10	1	40	3	Sim
Grupo 2	72	6	48 /7,6	2	58	4	Sim
Grupo 3	83	3	37 /6,5	3	74	4	Sim
<b>24 meses</b>							
Grupo 1	80	6	50 /09	5,33	50	3	—
Grupo 2	72	5	51 /10	6,66	43	3	—
Grupo 3	83	5	37 /6,5	8	55	3	—

Os resultados (Quadro 3) permitem observar que a divisão de rizomas de *Heliconia angusta* é um método eficiente para a produção de mudas (Figura 9). As plantas que apresentaram maior número de brotos foram aquelas constituídas por rizomas com 3 gemas, seguida pelas plantas composta por 2 gemas. Estas plantas ao final de 24 meses produziram uma média 8 brotações (Figura 7) e 6,66 brotações (Figura 8), respectivamente por planta. As plantas do grupo 1, compostas por rizomas com 1 gema, na última avaliação apresentavam 5,3 brotações. Os resultados mesmo não apresentando diferenças significativas estatisticamente, fica evidenciado que o melhor tratamento é o composto por rizomas com três gemas.

As novas brotações só foram detectadas visualmente após a emissão da inflorescência, isto pode ser um indicativo que esta espécie apresente algum tipo de dominância apical, onde a formação de novos rebentos está vinculado a quebra da dominância apical. Cline (1991, 1994) descreve que as auxinas apresentam uma forte ação no desenvolvimento de brotos laterais. Barker & Steward (1962), demonstraram a existência da dominância apical do caule em *Musa sp.*, onde não ocorre o desenvolvimento de novos brotos a partir do rizoma até que tenha sido formado um certo número de primórdios foliares. No caso de *Musa sp.*, a gema apical do rizoma é responsável pela síntese de AIA e pelo controle da formação de gemas laterais (Sachs, 1991). Debiasi (2000), sugeriu que a eliminação ou diminuição da dominância apical pode ser controlada pelo balanço hormonal entre auxinas e citocininas endógenas. Simão (1999), relata que no plantio de *H. velloziana* quando as partes aéreas não foram cortadas não houve desenvolvimento das raízes. Com que foi observado no experimento, pode-se sugerir que exista uma dominância apical, nos rizomas de *Heliconia angusta*, dominância esta que impede a formação de brotos laterais, contudo, são necessários estudos morfo-anatômicos, para determinar se esta espécie apresenta dominância apical. E se no caso deste experimento o tratamento que obteve melhores resultados foi devido ao fato de por apresentar três gemas ter uma dominância apical já quebrada. Também deve estudar a dosagem hormonal, para realmente determinar a existência de dominância.

Os resultados obtidos neste experimento (Quadro 3) diferem do relato feito pelos produtores que após 24 meses de cultivo os rizomas desta espécie de *Heliconia* produzem somente 3 novas mudas. As diferenças nos resultados podem estar relacionados com a

metodologia empregada no experimento que difere da metodologia utilizada pelos produtores catarinenses de plantas ornamentais. A utilização de solução nutritiva pode ter sido fundamental para o bom desenvolvimento desta espécie neste experimento, o que sugere o aprofundamento deste tema através de experimentos que avaliem as necessidades nutricionais para esta espécie. Será necessário determinar a dosagem e formulação ao longo do cultivo para obter uma maior produção de mudas por rizoma.

Outro fator que pode ter influenciado nos resultados é que a produção de mudas nos viveiros comerciais, normalmente, não é feita com cultivo protegido, o plantio é realizado diretamente no campo. E a irrigação só é realizada nos primeiros meses, e normalmente não se realizam adubações periódicas. Enquanto que neste experimento as plantas foram mantidas em casa de vegetação, protegidas de intempéries, em condições mais próximas do seu habitat natural. Kress (1990a), descreve *H. angusta* como uma espécie encontrada em lugares sombreados no interior da mata. Normalmente, este extrato da floresta apresenta um microclima com maior temperatura e umidade, além de serem protegidos de ventos.



**Figura 7-** Vaso com mudas de *Heliconia angusta*, após 24 meses de cultivo protegido em casa de vegetação, com fornecimento de solução nutritiva (Pouget 1984). Experimento realizado no LMBV-CCA-UFSC.



**Figura 8** – Mudas produzidas pelo rizoma de *H. angusta* composto por 2 gemas, após 24 meses sobre cultivo em casa de vegetação, com fornecimento de solução nutritiva.



**Figura 9**- Muda individualizada de *H. angusta* das touceiras produzidas no experimento com diferentes tipos de rizoma, conduzido na casa de vegetação do LMBV/CCA/UFSC, Florianópolis –SC, no período de agosto de 1998 a agosto de 2000.

### 3.1.2.3 – Conclusões

01) A divisão de rizomas é uma prática viável para produção de mudas de *Heliconia angusta*, desde que se utilize solução nutritiva e cultivo protegido.

02) O rizoma deve conter três gemas no momento do plantio.

03) Os rizomas devem ser mantidos sob cultivo protegido e irrigados com solução nutritiva ao durante 24 meses.

04) No momento do plantio, há a necessidade de realizar o corte da parte aérea nos rizomas de *Heliconia angusta*.

### 3.1.3-Propagação Vegetativa por Divisão de Rizomas com Utilização de BAP

Os métodos de propagação *in vivo* com a utilização de reguladores de crescimento são métodos de propagação intermediários entre a propagação convencional e a produção *in vitro* realizada nos laboratórios de cultura de tecidos (Godinho 1994).

Os reguladores de crescimento são substâncias sintéticas as quais, quando aplicadas nas plantas, produzem efeitos semelhantes aos hormônios vegetais. O mecanismo de ação do regulador de crescimento vai depender da concentração utilizada e também da sensibilidade diferencial do tecido (Salisbury & Ross 1992).

As citocininas são reguladores de crescimento que promovem a divisão celular o alongamento e a diferenciação celular, também retardam a senescência das células vegetais e promovem a quebra da dominância apical, induzindo a proliferação de gemas auxiliares (Salisbury & Ross 1992). As citocininas são indispensáveis para quebra de dominância apical e indução de proliferação de gemas auxiliares (George, 1993). O tipo de citocinina e a sua concentração são os fatores que mais influenciam o sucesso na propagação vegetativa. A 6-benzilaminopurina (BAP) tem sido muito eficaz para promover multiplicação em diversas espécies e parece ser a citocinina por excelência para multiplicação de partes (Grattapaglia & Machado, 1990).

A propagação vegetativa por divisão de rizomas com a utilização de BAP poderá contribuir para solução do problema de produção de mudas desta espécie, uma vez que a mesma é de fácil execução e exige estruturas simples, acessível aos pequenos viveristas e produtores.

Este experimento teve como objetivo avaliar a resposta de diferentes concentrações de BAP, determinando qual concentração é a mais eficiente para a maior proliferação de gemas de *H. angusta*.

### 3.1.3.1- Material e Métodos

O material vegetal utilizado foi coletado em um jardim residencial no município de Antônio Carlos – SC. Os segmentos de rizomas utilizados foram retirados de touceiras (Figura 10). A preparação dos rizomas seguiu metodologia descrita por Criley (1988a, b, 1995). Os segmentos de rizomas, de 10 a 12,5 cm de comprimento com 20 a 30 cm de parte aérea, possuindo apenas uma gema (Figura 11), foram desinfestados, mergulhando-os numa solução aquosa de hipoclorito de sódio comercial (1:4 v/v) por um minuto (Criley 1995).

Para o experimento com diferentes concentrações de benzilaminopurina (BAP), a metodologia utilizada foi a proposta por Godinho (1991). Os rizomas receberam BAP através de pulverização. Os rizomas foram transplantados em vasos plásticos, com 15 cm de diâmetro e 8 cm de altura, contendo um substrato composto por Plantamax® e vermiculita (1:1 v/v) (Figura 12). Estes foram cultivados por 60 dias em casa de vegetação do Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, com temperatura de  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 16 horas, intensidade luminosa em (RFA) de  $450 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  e umidade relativa do ar de  $70 \pm 5\%$ . Os vasos foram irrigados a cada dois dias.

O experimento com BAP foi instalado com os seguintes tratamentos:

- 1)  $500 \text{ mgL}^{-1}$  de BAP
- 2)  $1000 \text{ mgL}^{-1}$  de BAP;
- 3)  $1500 \text{ mgL}^{-1}$  de BAP;
- 4) Testemunha.

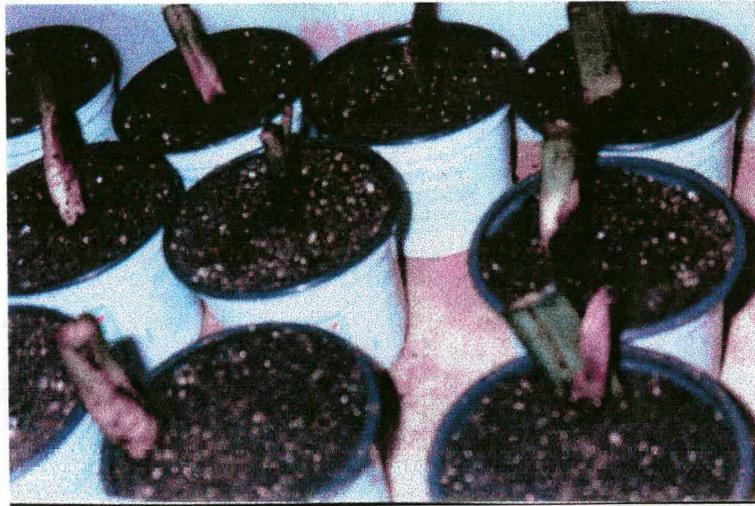
No experimento foi utilizado delineamento experimental inteiramente casualizado, com duas repetições por tratamento, contendo 5 rizomascada parcela. As análises experimentais e interpretação dos dados obtidos ao longo do trabalho foram baseados na Análise de variância (ANOVA). Foi avaliado o número médio de brotos tratados por rizoma.



**Figura 10-** Aspecto geral da touceira de *H. angusta* utilizadas no experimento de divisão de rizomas com utilização de BAP. Conduzido no LMBV/CCA/UFSC, Florianópolis – SC.



**Figura 11-** Detalhe dos rizomas de *H. angusta* utilizados no experimento de divisão de rizomas com utilização de BAP. Conduzido no LMBV/CCA/UFSC, Florianópolis – SC.



**Figura 12-** Conjunto de vasos do experimento de propagação vegetativa por divisão de rizomas de *H. angusta* com utilização de BAP, na casa de vegetação do LMBV/CCA/UFSC.

### 3.1.3.2- Resultados e Discussões

Neste experimento foi avaliada a quantidade de mudas produzidas por rizoma e todos os tratamentos apresentaram 2 mudas, independente da aplicação de BAP. A análise de variância mostrou que não há efeito significativo entre os tratamentos (Quadro 4). Godinho (1991) obteve 29,63 mudas por rizoma em *Musa sp*, com rizomas de 20 cm, com diferentes concentrações de BAP em um período de 104 dias. Esta diferença entre *Musa* e *Heliconia* pode ser atribuída entre a fatores bioquímicos e ao tamanho do rizoma, sendo que os rizomas de *H. angusta* apresentavam tamanho de 10 a 12,5, conforme recomendado por Criley (1988 a,b,1995) e Castro (1995), enquanto os rizomas das *Musa sp* eram de 20 cm. os rizomas de helicônia continham uma menor quantidade de reservas associadas ao estágio muito prematuro dos pontos meristemáticos. Por outro lado, Menegucci *et al* (1995) obtiveram resultados semelhantes a este experimento com rizomas de *Musa* cultivar Prata, em que o BAP não possibilitou efeito sobre a produção de brotos. Estudos fisiológicos devem ser realizados para avaliar o desenvolvimento dos pontos meristemáticos, determinando qual é o período mínimo de permanência dos rizomas em viveiro para a produção de novas mudas. Outro fator foi que este experimento continha um número muito reduzido de repetições o que pode ter ocasionado problemas na análise estatística dos dados, visto que não havia material vegetal em maior quantidade para realização de mais repetições devido ao alto custo desta espécie no mercado e a sua baixa proliferação de mudas na forma natural.

Neste experimento não foi observado este fator pois a temperatura era de  $28^{\circ}\text{C} \pm 1$ , é não houve aumento na proliferação de mudas, resultados semelhantes ao de Dantas (1986) que também mesmo com temperaturas em trono de  $26^{\circ}\text{C}$  não obteve aumento na proliferação das mudas de *Musa spp*. Pereira *et al*. 2001 afirmam que o controle das condições ambientais, principalmente temperatura, parecem ser mais importante que o uso de reguladores de crescimento. Champion (1963); Simmonds (1963) consideram que temperaturas inferiores a  $16^{\circ}\text{C}$  são prejudiciais à cultivo de *Musa* Também é de fundamental importância ser levado em consideração a dominância apical, que impede a proliferação de novas mudas. Neste experimento não foi possível identificar este fenômeno, no entanto através de estudos histológicos possivelmente poderia ser detectado. Os eventos

fisiológicos de crescimento e desenvolvimento que ocorrem nas plantas representam um processo integrado, complexo e de conhecimento limitado. A interdependência dos eventos metabólicos reflete-se no desenvolvimento da planta como um todo. No caso da dominância apical, o controle exercido pelo ápice caulinar sobre o crescimento das gemas laterais é influenciado em diferentes graus por fatores ambientais, genéticos e fisiológicos (Debiasi 2000). Simão (1999) descreve a presença de dominância apical na *H. angusta* que somente é quebrada após o corte da parte aérea, possibilitando o desenvolvimento das gemas laterais. Baker & Steward (1962) demonstraram a existência da dominância apical do caule de *Musa*, onde não se observa o desenvolvimento de novos brotos a partir do rizoma até que tenha sido formado um certo número de primórdios foliares.

Fica evidenciada a necessidade de novos para que se possa conhecer os mecanismos bioquímicos e fisiológicos através dos quais os reguladores de crescimento controlariam a formação de um órgão, especialmente a formação de gemas laterais para esta espécie.

**Quadro 4** - Análise de variância para os dados referentes ao experimento de propagação vegetativa por divisão de rizomas com utilização de BAP.

Causas de Variação	GL	QM	
Tratamentos	3	0,0733	NS
Erro	3	0,1400	
C.V	23.09		

### 3.1.3.3 – Conclusões

01) Dentro das condições que foi conduzido este experimento podemos concluir que a utilização de BAP não foi eficiente no aumento da proliferação de mudas de *H. angusta*.

02) Novos trabalhos devem ser feitos no sentido de quantificar o tempo necessário para proliferação de mudas

03) Estudos histológicos para avaliação da existência de dominância apical, determinando quais procedimentos devem ser feitos para aumentar a proliferação das gemas nos rizomas de *H. angusta*.

04) Estudos sobre o crescimento e desenvolvimento da espécie também devem ser realizados, determinando qual a velocidade de crescimento.

## 3.2- Aspectos da Morfogênese *In Vitro*

### 3.2.1 – Introdução

A floricultura é uma atividade agrícola dinâmica e exigente em relação à qualidade do produto pelo mercado consumidor. Neste sentido, a propagação *in vitro* de plantas oferece ao produtor de mudas alto padrão em quantidade suficiente para atender à demanda em curto espaço de tempo (Tombolato & Costa 1998).

As técnicas da propagação *in vitro* permitem a produção massal de indivíduos com características genéticas desejáveis, com alto padrão de sanidade das mudas, além de facilitar o trânsito nacional e internacional de material genético *in vitro*. Com a utilização do cultivo *in vitro* é possível explorar comercialmente espécies nativas, sem causar prejuízos para o meio ambiente, auxiliando na conservação da Mata Atlântica, habitat da *H. angusta*, pois o material necessário para produção das matrizes é pequeno e sua exploração comercial causa impactos reduzidos a este ambiente. Sandoval & Acuña (1996) citam que deve-se adaptar ou desenvolver procedimentos que melhoram a produtividade dos sistemas de exploração agrícola, deste que sejam ecologicamente sustentáveis.

A cultura de tecidos com plantas ornamentais iniciou com Morel e Martins em 1952 e a técnica se difundiu devido a possibilidade de se obter várias plantas a partir de pequenas quantidades de material vegetal, chamando atenção dos produtores de orquídeas (Murashige 1990). As espécies ornamentais são um grupo com grande importância econômica, onde a micropropagação causou grande impacto, histórica, científica e economicamente (Debergh & Zimmerman 1991). Pois, a produção de ornamentais é uma atividade com grande valor agregado ao produto, tornando a atividade rentável ao produtor. Exemplos disto podem ser notados nos cultivos de violetas; crisântemos, orquídeas e bromélias.

A micropropagação tem larga aplicação dentro da indústria hortícola mundial. Os laboratórios comerciais de micropropagação trabalham com plantas para vaso, corte, bulbos e espécies utilizadas em projetos de paisagismo (George 1993). Esta técnica implica em adotar estratégias que sejam funcionais e se ajustem às necessidades e expectativas da pesquisa (Krikorian 1993). O conceito original de cultivo de tecidos vegetais abrange o cultivo asséptico de células e órgãos, dentro de um conjunto de técnicas que são fundamentadas em vários princípios. Os mais importantes são a totipotência celular e a hipótese do balanço hormonal (Skoog & Miller 1957), onde o desenvolvimento do explante depende do controle da interação entre as concentrações de auxinas e citocinias (George 1993). O cultivo *in vitro* é possível devido à totipotência das células vegetais, isto significa que cada célula contém uma capacidade latente de produzir uma planta completa (George 1993). As células são autônomas e têm a potencialidade de regenerar plantas inteiras, desde que submetidas a condições de cultivos que induzam a expressão morfo genética adequada (Kerbaui 1996).

Estes fundamentos são aceitos na maioria dos modelos biológicos empregados no estudo de morfogênese *in vitro* (Villalobos & Thorpe 1991). A micropropagação compreende em um sentido amplo, um heterogêneo grupo de técnicas mediante as quais um explante é cultivado assepticamente em um meio de cultura em condições ambientais controladas (Mroginski & Roca 1991). Estes autores salientam que os objetivos que podem ser atingidos com o uso do cultivo *in vitro* são:

- a) Estudos básicos de fisiologia, genética, bioquímica e ciências afins;
- b) Bioconversão e produção de compostos de interesse;
- c) Incremento da variabilidade genética;
- d) Obtenção de plantas livres de patógenos;
- e) Propagação de plantas;
- f) Conservação e intercâmbio de germoplasma

Uma vez estabelecidos os objetivos com a cultura *in vitro* de um determinado explante, é necessário utilizar um meio apropriado, onde as proporções de auxinas e citocininas determinam o padrão de desenvolvimento do explante (George 1993). Basicamente, o meio de cultura deve conter uma fonte de carbono, elementos minerais,

vitaminas, agentes gelificantes (em caso de meio sólido), substâncias reguladoras de crescimento e outros compostos (Mroginski & Roca 1991).

Segundo Villalobos & Thorpe (1991), as vantagens da cultura *in vitro* em comparação com os outros sistemas convencionais de propagação são: incremento acelerado do número de plantas derivadas de genótipos selecionados; redução do tempo de multiplicação; possibilidade de multiplicar grandes quantidades de plantas em uma superfície reduzida, diminuindo os custos; maior controle sobre a sanidade do material a ser propagado; é possível se multiplicar rapidamente uma variedade do qual existem poucos indivíduos; na câmara de crescimento as condições ambientais são adequadas para o desenvolvimento e crescimento da planta. A cultura *in vitro* requer habilidade e conhecimento técnico do produtor além de equipamentos e metodologia adequada (Janick 1990).

Na cultura *in vitro* segundo Debergh & Zimmerman (1991) e George (1993) & Murashige (1990), cinco são os estágios críticos :

Estágio 0- Preparação das plantas matrizes sob condições de maior cuidado fitossanitário em casa de vegetação, com o controle das condições.

Estágio 1- Iniciação da cultura asséptica, incluindo o preparo e assepsia do explante.

Estágio 2- Propagação do material vegetal e o sistema de propagação.

Estágio 3- Elongação e indução ao enraizamento,

Estágio 4- Transferência para as condições de casa de vegetação, aclimatização.

A composição do meio de cultura e os fatores ambientais podem resultar na intensificação das respostas morfogênicas, bem como em maior número de explantes responsivos (George, 1993). A concentração de auxinas, citocininas e giberilinas, utilizadas em combinações ou isoladamente em diferentes estágios da cultura, associada ao balanço de nutrientes salinos, vitaminas, aminoácidos e fontes de nitrogênio, e luminosidade, fotoperíodo e umidade relativa, são fatores que afetam de modos distintos as diferentes espécies e explantes submetidos a cultura *in vitro* (George 1993).

Além das condições do meio de cultura, os efeitos ambientais podem determinar a viabilidade da propagação de plantas. Esses efeitos afetam o crescimento e o desenvolvimento das espécies vegetais. Entre eles, o nível nutricional, condições de luz

(intensidade e comprimento de onda), temperatura e umidade. Estas interações devem ser monitoradas para controlar o crescimento das plantas (Kozai & Smith 1995).

Avaliando os aspectos apresentados, julga-se de grande importância desenvolver tecnologias para otimizar a produção em massa de *Heliconia angusta*, minimizando os custos de produção, viabilizando sua produção comercial, tornando a atividade rentável economicamente, além de disponibilizar tecnologias para a exploração racional e sustentável de recursos genéticos vegetais nativos da Mata Atlântica. Também realizou-se experimentos com as espécies *H. psittacorum* e *H. velloziana* para traçar um paralelo entre as três espécies, correlacionar os problemas e identificar se são comuns ao gênero.

## 3.2.2-Material e Métodos

### 3.2.2.1-Cultura *In Vitro*

Os experimentos de cultura *in vitro* foram conduzidos nos Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina.

Para o estudo da propagação vegetativa da *H. angusta*, através da cultura *in vitro*, foi utilizado protocolo desenvolvido por Nathan *et al.* (1992). Os meristemas de *Heliconia angusta* foram extraídos de porções de rizomas de plantas coletadas no jardim do Centro de Treinamento da EPAGRI em Florianópolis. Os meristemas de *H. psittacorum* e *H. velloziana* foram coletados no morro do Canto da Lagoa da Conceição, Florianópolis, (SC). Para a extração dos meristemas, as raízes e as folhas da base das plantas matrizes foram removidas, permanecendo somente o rizoma. Estes foram lavados com água para retirar os resíduos de substrato e foram desinfestadas, mergulhando-os numa solução aquosa de hipoclorito de sódio (1:4 v/v) por um minuto, conforme metodologia proposta por Criley (1995). Após, foram colocados em sacos plásticos pretos em uma câmara de climatização com temperatura de  $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ , por 48 horas, conforme recomendações de Nathan *et al.* (1992).

Após 48 horas, os rizomas selecionados de cada tratamento foram reduzidos para aproximadamente 2 a 3 cm de diâmetro, lavados com água corrente, e foram submetidos ao tratamento de assepsia em soluções contendo hipoclorito de sódio (NaOCl) à 33% (v/v) com algumas gotas de detergente neutro, por 15 minutos, e enxaguadas por três vezes em água destilada e autoclavada. Em câmara de fluxo laminar, foram submetidos a uma nova desinfestação, onde em solução de álcool a 70% o material vegetal permaneceu por 2 minutos e em seguida em solução de hipoclorito de sódio comercial a 33% (v/v), adicionadas a algumas gotas de detergente neutro, por 20 minutos, sendo então reduzidos a um tamanho aproximado de 5x5x10 mm e transferidos para o meio de cultura.

O meio de cultura utilizado nos experimentos foi constituído pelos sais de MS (Murashige e Skoog, 1962), com 30 g/l de sacarose, mioniositol  $0,5 \text{ ml}^{-1}$ , 7 g/l de ágar e vitaminas MS. O pH do meio de cultura foi ajustado em 5,7 antes da autoclavagem à  $121^\circ\text{C}$ , durante 15 minutos. As culturas foram manipuladas sob condições assépticas, em câmara de fluxo laminar (CFL), e transferidas para sala de crescimento sob temperatura de  $25\pm 1^\circ\text{C}$ , umidade relativa (UR) de  $60\pm 5\%$ , irradiação de  $50 \mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$  e fotoperíodo de 16 horas de luz.

### 3.2.2.2-Experimento com Composições Hormonais:

Para o experimento com composições hormonais, de acordo com Nathan *et al* (1992), os explantes foram inoculados em tubos de ensaio (25 x 150 mm), contendo 15 ml de meio de cultura basal, acrescido da respectivo concentração de reguladores de crescimento.

**Tratamento 1:** Testemunha

**Tratamento 2:**  $143,64 \text{ mg.L}^{-1}$  BAP;

**Tratamento 3:**  $287,28 \text{ mg.L}^{-1}$  BAP;

**Tratamento 4:**  $619,02 \text{ mg.L}^{-1}$  BAP;

**Tratamento 5:** MS +  $24,13 \text{ mg.L}^{-1}$  AIB;

**Tratamento 6:** MS +  $24,13 \text{ mg.L}^{-1}$  AIB +  $143,64 \text{ mg.L}^{-1}$  BAP;

**Tratamento 7:** MS +  $24,13 \text{ mg.L}^{-1}$  AIB +  $287,28 \text{ mg.L}^{-1}$  BAP;

**Tratamento 8:** MS +  $24,13 \text{ mg.L}^{-1}$  AIB +  $619,02 \text{ mg.L}^{-1}$  BAP;

**Tratamento 9:** MS +  $26,45 \text{ mg.L}^{-1}$  ANA +  $143,64 \text{ mg.L}^{-1}$  BAP;

**Tratamento 10:** MS +  $26,45 \text{ mg.L}^{-1}$  ANA +  $287,28 \text{ mg.L}^{-1}$  BAP;

**Tratamento 11:** MS +  $26,45 \text{ mg.L}^{-1}$  ANA +  $614,02 \text{ mg.L}^{-1}$  BAP.

O parâmetro avaliado foi a capacidade de proliferação *in vitro* de *Heliconia angusta*. O período de avaliação foi de 60 dias.

O experimento foi composto por delineamento experimental inteiramente casualizado, com 3 repetições por tratamento, sendo 5 explantes igual a uma parcela. As análises experimentais e interpretações dos dados obtidos ao longo do trabalho foram baseados na Análise de Variância (ANOVA).

### 3.2.2.3-Resultados e Discussões

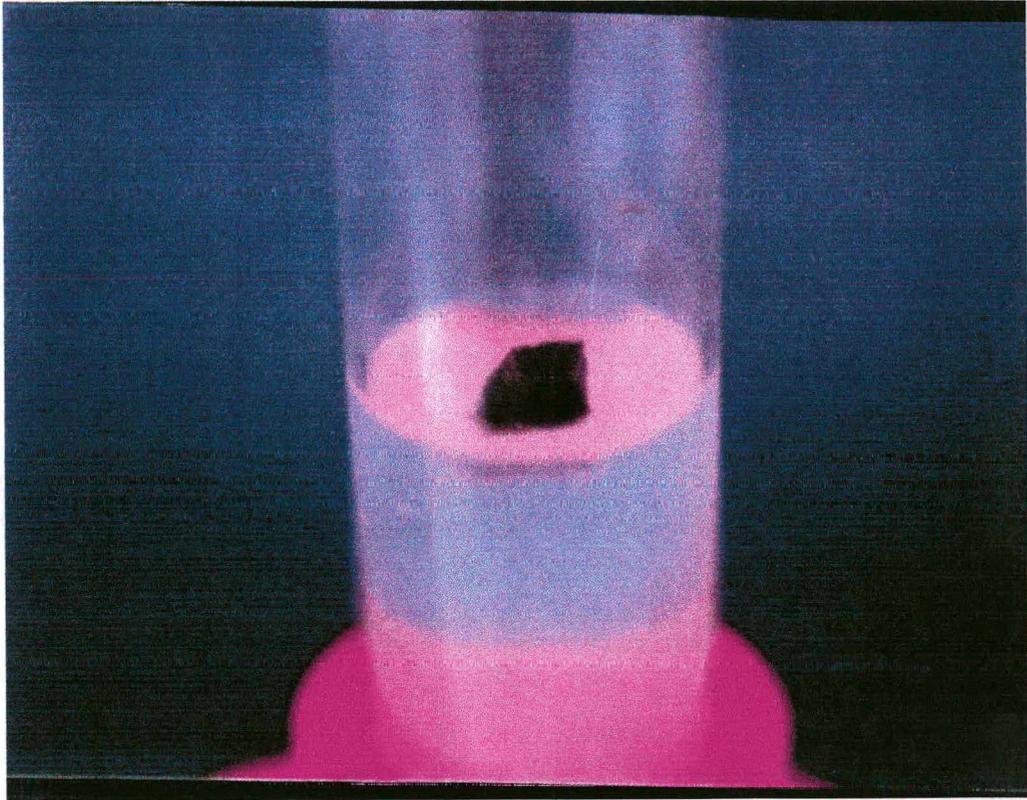
Não foi possível realizar a avaliação deste experimento, pois na primeira semana todos os explantes isolados haviam oxidado, ocasionando a morte do meristema. O experimento foi montado novamente, mas o resultado se repetiu, todo material isolado e introduzido oxidava. A oxidação ocorria no primeiro corte no rizoma. Imediatamente após o corte do tecido já apresentava escurecimento, provocando a morte dos meristemas. Após vinte quatro horas no escuro, o tecido isolado já estava com toda superfície necrosada. (Figura13).

Além da oxidação, foi observada grande contaminação dos explantes. Com este experimento ficou evidenciado que o protocolo que estava sendo usado como padrão (Nathan *et al* 1992), não era eficiente para esta espécie de helicônia. A partir destes resultados ficou claro que era necessário realizar estudos mais detalhados sobre oxidação e contaminação para *Heliconia angusta*.

Os trabalhos publicados sobre cultura *in vitro* para helicônias não relacionam este dois problemas encontrados no decorrer destes experimentos. Tratam o assunto como se não ocorressem dificultando seguir a metodologia para outras espécie do mesmo gênero. Através de comunicação verbal pesquisadores do Instituto Agrônômico de Campinas, estes relataram encontrar problemas sérios de contaminação e oxidação em espécies de helicônias no cultivo *in vitro* realizados naquela instituição, havendo pouco progresso na geração de metodologias de propagação *in vitro* para este gênero.

Devido a estes problemas, os quais não são citados na bibliografia encontrada referente ao assunto (Nathan *et al.* 1992; Kumar *et al.* 1995; Goh *et al.* 1995; Luc-Cayol & Fereol 1997) foi necessário realizar estudos específicos sobre estes temas. No experimento

de oxidação e um de desinfecção foi testado o comportamento de outras duas espécies de helicônias, para verificar se o problema é restrito a *Heliconia angusta*.



**Figura 13** – Explante de *Heliconia angusta* que sofreu processo oxidativo, durante experimento com diferentes concentrações de reguladores de crescimento.

# 4- MÉTODOS DE CONTROLE DA OXIDAÇÃO DOS MERISTEMAS DE *HELICONIA angusta*

## 4.1. Introdução

Como mencionado no capítulo anterior, os experimentos de cultivo *in vitro* para a espécie de *Heliconia angusta* apresentaram intensa oxidação nos tecidos, inviabilizando a continuidade dos estudos da cultura *in vitro*. Com este problema, tornou-se necessária uma análise mais detalhada deste fenômeno, para estabelecer um protocolo que evite a perda dos explantes.

A oxidação é uma reação de oxidação-redução que envolve a perda de elétrons por uma espécie química, que é oxidada, e ganho por outra que é reduzida. Em compostos altamente oxidados o átomo de carbono está ligado a mais oxigênio do que a hidrogênio (Voet & Voet 1995).

A oxidação é um processo dinâmico que evolui ao longo do tempo. É um fenômeno puramente químico e bastante complexo, envolvendo reações radicalares capazes de auto-propagação, e que dependem dos fatores catalíticos (temperatura, íons metálicos, radicais livres, pH). A seqüência reacional do processo oxidativo é classicamente dividida em iniciação, propagação e terminação, sendo possível distinguir três etapas da evolução oxidativa: 1) diminuição da concentração dos substratos de oxidação (oxigênio); 2) aumento na concentração dos produtos primários de oxidação (peróxidos e hidrperóxidos), cuja estrutura depende da natureza das células oxidadas; 3) formação dos produtos secundários de oxidação, obtidos por cissão e rearranjo dos peróxidos (fenóis, compostos voláteis e não voláteis), cuja natureza e proporção dependem de diversos parâmetros (Silva *et al* 1999). Na oxidação, ocorre um partilhamento desigual de elétrons em favor do átomo mais eletronegativo (Voet & Voet, 1995). A transferencia de elétrons pode ocorrer

espontaneamente e depende da afinidade relativa do receptor de elétrons. Este processo ocorre nas vias de oxidação (Mahler & Cordes 1996).

Na oxidação de tecidos vegetais, as hidroxilases são responsáveis pela introdução de um átomo de oxigênio no substrato, convertendo em monohidroxiderivado. As plantas produzem uma gama variada de produtos secundários que contém o grupo fenol com função hidroxil ligada ao núcleo.

A oxidação é uma reação das células dos tecidos vegetais à algum tipo de agressão, que pode ser um ataque de patógeno ou um ferimento. Como resposta à esta agressão, as células iniciam a produção de compostos fenólicos para proteção das células (Smith *et al* 1983, Beckman 2000).

Os radicais livres dos compostos fenólicos iniciam o processo de oxidação, reagindo com o oxigênio, passando o grupo hidroxil da posição *ortho* (o) para posição *para* (p) (Taylor & Battersby 1967; Haines 1985). Nas células vegetais, os compostos fenólicos são produzidos por duas vias principais, a via do ácido chiquímico e a via do ácido malônico. A via do ácido chiquímico inicia com carboidratos e cadeias aromáticas oriundos de aminoácidos em muitas espécies são derivados da fenilalanina e da tirosina, com conversão de fenilalanina em ácido cinâmico com a eliminação da molécula de amônia (Debergh & Zimmerman 1991). Esta reação é catalisada pela fenilalanina amônia-liase (PAL). O controle da oxidação pode ser realizado através do monitoramento da atividade da PAL, este controle, depende de fatores externos e internos como quantidade de açúcares; taxas hormonais; nível de nutrientes; presença de luz e ferimentos (Taiz & Zeiger 1991).

### 4.1.2. Oxidação na Cultura *In Vitro*

Na cultura *in vitro* para realização do isolamento do meristema é necessário a realização de cortes, causando ferimentos que por consequência desencadeiam a produção de PAL, iniciando o processo oxidativo destas células vegetais. Algumas espécies apresentam escurecimento dos tecidos quando introduzidas *in vitro*, visto que liberam substâncias originadas da oxidação, ao meio de cultura. O crescimento do explante na maioria dos casos é inibido por estas substâncias, que são normalmente inibidores de crescimento e podem causar a morte do tecido (George 1996). O resultado causado pela oxidação, normalmente, é muito severo nos estágios iniciais da cultura, sendo uma barreira para o crescimento do explante. A oxidação é genotipo-dependente e normalmente ocorre com mais severidade em espécies com altos teores de tanino ou outros hidrofênóis (George 1996), como em espécies do gênero *Costanea*, *Hamamelis*, *Juglans*, *Rhododendron*. A origem do explante também tem grande importância no processo oxidativo dos tecidos, sendo que os mais jovens tendem a sofrer menos injúrias. Para Christiansen & Fønnesbech (1975); Hutchinson (1984); Howard & Marks (1988); Kerns & Meyer (1985) a estação do ano é outro fator que influencia na oxidação de tecidos na cultura *in vitro*. Willian (1995) cita que em explantes de maçã Northern Spy, houve uma maior oxidação dos tecidos extraídos no período da primavera e verão, com declínio nas outras épocas e em magnolia houve uma maior oxidação na época da floração, atribuindo estes fatos à atividade metabólica das plantas. O autor concluiu que quanto mais atividades metabólicas a planta estiver realizando no momento da extração do meristema, maiores serão os níveis de oxidação daquelas células.

O possível controle da oxidação pode ser obtido através de algumas ações como: diminuição dos danos causados no explante e remoção dos compostos fenólicos produzidos. Taiz & Zeiger (1991) citam que é possível controlar o processo oxidativo dos explantes através de pré-tratamentos, tornando o isolamento possível. Estas técnicas compreendem lavar o explante sob água corrente, por duas ou três horas após o isolamento, antes da introdução no frasco, realizar trocas frequentes do meio de cultura ( 3 a 4

semanas); utilização de meio líquido, onde os fenóis se diluem, ou ainda a utilização de adsorventes, como o PVP, ou carvão ativado.

Os meios físicos também podem ser controlados auxiliando na diminuição dos danos causados pela oxidação. Um dos catalizador da enzima PAL é a luz. Controlando-se a luminosidade em alguns casos, é possível obter uma diminuição da atividade da enzima (Taiz & Zeiger 1991). A temperatura também é um fator de importância no processo oxidativo, é que pode ser controlada, pois, a oxidação ocorre entre 21°C a 24°C. George (1996) cita o tratamento com baixas temperaturas na cultura do café, com armazenamento a 2°C por curtos períodos para prevenir a oxidação. Outros fatores também podem ser controlados para diminuir a oxidação como: a modificação do potencial redox do tecido e redução da atividade da polifenoloxidase. A polifenoloxidase é ativa em pH 6.5, mantendo o pH mais baixo ocorre a diminuição da oxidação (Willian 1995). Haines (1985) afirma que as reações químicas da oxidação dependem do pH do meio, normalmente elas são favorecidas por meios alcalinos.

Os carboidratos são necessários na biossíntese de compostos fenólicos e a partir da redução na concentração de sacarose em 1% no meio de cultura, é possível diminuir os polifenóis nos tecidos vegetais isolados. Os reguladores de crescimento também têm influência no processo de oxidação (George, 1996). Quanto maior a concentração de reguladores maior a oxidação, principalmente com reguladores como 2-4D e kinetina. Então quando for utilizado espécies suscetíveis à oxidação é interessante que nos primeiros cultivos estes explantes com propensão a oxidar devam ser colocados em meio de cultura que sem a presença dos reguladores de crescimento ou em níveis inferiores (Benson 1990).

Para realizar o controle da oxidação, além do controle dos fatores físicos e químicos, é possível também adicionar ao meio de cultura substâncias que interagem durante o processo oxidativo, diminuindo os danos causados pela oxidação (Creemerers-Molenaar & Oortvany 1990). Os antioxidantes mais utilizados na cultura *in vitro* são o ácido cítrico; ácido ascórbico; L-cisteína e carotenos (Biasi *et al* 1994). Os antioxidantes podem ser definidos como substâncias que, numa concentração consideravelmente menor que a do substrato oxidável, retardam o processo oxidativo diminuindo a velocidade da reação. O emprego de antioxidantes é muitas vezes empírico, de tal modo que a garantia da sua eficácia nem sempre existe (Silva *et al* 1999).

O objetivo deste trabalho foi o de estudar o efeito de antioxidantes e suas combinações no controle da oxidação dos explantes de *Heliconia angusta*, usando um protocolo de controle do processo oxidativo para esta espécie, possibilitando a continuidade dos estudos de cultura *in vitro*. Procurou-se também correlacionar o processo oxidativo de outra duas espécies de helicônias, *H. psittacorum* e *H. velloziana*, com a *H. angusta* para identificar se o problema de oxidação é específico desta espécie, ou está relacionado com o gênero.

## 4.2-Material e Métodos

### 4.2.1-Avaliação de Antioxidantes para Controle da Oxidação dos Explantes em Cultivo *In Vitro* de *Heliconia angusta*; *Heliconia psittacorum* e *Heliconia velloziana*.

Neste trabalho foram utilizados antioxidantes para o controle do processo oxidativo dos explantes de *H. angusta*; *H. psittacorum* e *H. velloziana*. Os explantes de *H. angusta* utilizados foram extraídos de rizomas provenientes do jardim da EPAGRI – Florianópolis – SC. Os explantes de *H. psittacorum* e *H. velloziana* provenientes do Canto da Lagoa da Conceição – Florianópolis – SC.

Após a coleta no campo, os rizomas foram reduzidos para aproximadamente 2 a 3 cm, lavados em água corrente, e desinfestadas em solução de álcool 70% durante 2 minutos e em seguida em solução de hipoclorito de sódio comercial a 8% (v/v) com algumas gotas de detergente neutro, durante 30 minutos e enxaguados três vezes em água destilada esterilizada. Em câmara de fluxo laminar, foram submetidos a uma nova desinfestação, onde em solução de álcool a 70% o material vegetal permaneceu por 2 minutos e, em seguida, em solução de hipoclorito de sódio 33%(v/v), por 15 minutos, sendo então reduzidos a um tamanho aproximado de 5x5x10mm e transferido para o meio de cultura Murashige & Skoog (1962) (MS), adicionados de 150 mg.L<sup>-1</sup> do antioxidante a ser testado. O meio de cultura foi suplementado com 30g/l de sacarose, 7g/l de ágar e vitaminas MS. O pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem. Os antioxidantes foram adicionados após a autoclavagem, por filtroesterilização com 0,45 µm . Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo 15 ml de meio de cultura acrescido do respectivo tratamento. Os explantes foram mantidos em sala de crescimento do Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, na ausência de luz.

A oxidação foi medida através da quantificação dos níveis de fenóis totais nos explantes, através da análise dos compostos fenólicos totais por espectrofotometria na faixa do visível,

com a utilização da leitura dos resultados nos comprimentos de onda de 500 e 750 nm, através do método de Lowry *et al* (1951). Para obtenção da curva padrão foi utilizado o ácido cinâmico.

Para determinação do antioxidante que melhor controla a oxidação dos explantes foram utilizados os seguintes tratamentos:

- 1) Meio MS com adição de  $150 \text{ mgL}^{-1}$  de extrato de carotenóide no extrato de cenoura;
- 2) Meio MS com  $150 \text{ mgL}^{-1}$  de ácido ascórbico;
- 3) Meio MS com  $150 \text{ mgL}^{-1}$  de ácido cítrico;
- 4) Meio MS com  $75 \text{ mgL}^{-1}$  de ácido ascorbico +  $75 \text{ mgL}^{-1}$  de extrato de carotenóide de cenoura;
- 5) Meio MS com  $75 \text{ mgL}^{-1}$  de ácido cítrico +  $75 \text{ mgL}^{-1}$  de extrato de carotenóide de cenoura;
- 6) Meio MS com  $75 \text{ mgL}^{-1}$  de ácido ascórbico +  $75 \text{ mgL}^{-1}$  de ácido cítrico;
- 7) Meio MS sem a adição de antioxidante.

As avaliações foram feitas após 24, 48 e 64 horas do isolamento. O explante foi retirado do frasco com o tratamento e colocado em solução de metanol para extração dos fenóis. Os explantes ficaram incubados naquele solvente por 48 horas, na ausência de luz. As alíquotas de extratos metanoólicos de cada tratamento foram avaliadas pela espectrofotometria na faixa do visível para quantificação dos fenóis.

Cada tratamento foi composto por três repetições com oito explantes cada. Os resultados foram submetidos á análise de variância (ANOVA) e para comparação das médias o teste de separação o teste de Ducan ( $\alpha= 0,05$ ). Os dados foram transformados em  $\sqrt{x+1}$ . As equações relacionam-se com os dados transformados, porém, todas as discussões foram feitas com os valores dos dados não transformados.

### 4.3-Resultados e Discussão

As análises de variância detectaram diferenças significativas pelo F ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos para os dois comprimentos de ondas, (ABS 500 e 750 nm), nas três espécies de helicônias avaliadas. O período de avaliação também apresentou diferenças significativas. O coeficiente de variação para *H. angusta* foi de 15,8 para comprimento de onda 500 nm e 20,8 para o comprimento de onda 750 nm. A *H. psittacorum* apresentou coeficiente de variação de 18,2 para o comprimento de onda de 500 nm e 15,8 para 750 nm. Os explantes de *H. velloziana* apresentaram respectivamente coeficientes de variação de 12,9 e 20,5.

As três espécies de *Heliconia* apresentaram resultados muito similares o que indica que provavelmente o processo oxidativo é um problema associado ao gênero. As respostas aos tratamentos também foram semelhantes, a separação de médias (Quadro 5), para os dois comprimentos de onda demonstram que não houve diferenças significativas entre os tratamentos de ácido ascórbico; carotenóides de cenoura + ácido cítrico; ácido cítrico; carotenóides de cenoura e a testemunha, apresentando somente diferenças significativas entre os tratamentos com ácido ascórbico + ácido cítrico e carotenóide de cenoura + ácido ascórbico para todas as espécies. Estes resultados indicam que os antioxidantes nestas condições não são eficientes no controle oxidativo dos tecidos das helicônias estudadas. Resultados semelhantes foram encontrados por Carvalho *et al* (1990) com segmentos nodais de *Eucalyptus grandis*; por Siqueira & Inoue (1991) na cultura *in vitro* de coqueiro e por Biasi *et al* (1994) com segmentos nodais de abacateiro.

Os tratamentos de carotenóides de cenoura + ácido ascórbico e ácido ascórbico + ácido cítrico demonstram ser os tratamentos como os maiores teores de compostos fenólicos, (Figura 14 e 15). No caso destas espécies, é melhor não utilizar antioxidantes do que a combinação entre eles. Não foi possível afirmar o que ocorreu, mas pode ter havido uma interação entre os antioxidantes, e por esta razão tornaram-se ineficientes no controle do processo oxidativo.

**Quadro 5-** Efeito de diferentes antioxidantes para o controle da oxidação de *H. angusta*, *H. psittacorum* e *H. velloziana* para ABS 500 e 750 nm. Experimento realizado no LMBV/CCA/UFSC.

TRATAMENTOS	<i>Heliconia angusta</i>				<i>Heliconia psittacorum</i>				<i>Heliconia velloziana</i>			
	Média ABS 500 nm		Média ABS 750 nm		Média ABS 500 nm		Média ABS 750 nm		Média ABS 500nm		Média ABS 750 nm	
Ácido ascorbico	1,00189	a	1,00033	a	1,00256	a	1,00048	a	1,00287	a	1,00046	a
Cenou + Ác. cítrico	1,002544	a	1,00539	a	1,00387	a	1,00099	a	1,00486	a	1,00095	a
Ác. Cítrico	1,003284	a	1,00780	a	1,00411	a	1,00358	a	1,00499	a	1,00356	a
Carotenoide de cenoura	1,005211	a	1,01125	a	1,00536	a	1,00689	a	1,00596	a	1,00882	a
Testemnuha	1,017365	a	1,02573	a	1,00599	a	1,01328	a	1,00599	a	1,05374	a
Ác. Ascor + Ác. cítrico	1,250831	b	1,19318	b	1,15899	b	1,32897	b	1,1299	b	1,19277	b
Carot. Cenou + Ac. asc.	1,55974	b	1,41595	b	1,3289	b	1,51114	b	1,52124	b	1,39752	b

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Duncan 5% de probabilidade.

A Atividade do antioxidante varia de acordo com o composto e a sua concentração. No caso deste experimento os resultados demonstraram (Quadro 5) que estes antioxidantes e nestas concentrações são ineficientes no controle do problema.

Com relação ao tempo de inoculação, o teste de Duncan (Quadro 6) demonstra haver diferença significativa no terceiro dia, para as três espécies, havendo um incremento na concentração de fenóis nos tecidos. George (1996) cita que a oxidação tende a diminuir após haver cessado os fermentos. Com o passar do tempo o processo oxidativo diminui, mas neste experimento houve um aumento nos teores de fenóis no tecido com o passar do tempo. O aumento da oxidação, neste caso, pode ter sido causado pela concentração de sais no meio, sendo que este era composto por todos os sais que compõe o MS. Ainda, outro fator que pode ter influenciado é o pH do meio que era de 5,8, pois Willlian (1995) afirma que o pH influencia no processo de oxidação, que é favorecido por pHs mais alcalinos. Como o processo oxidativo ocorre em maior intensidade no início do isolamento do explante, é ativado pelos fermentos causados na extração do mesmo, pode-se sugerir para esta espécie que nos primeiros subcultivos utilize-se meios de cultura com uma menor concentração de sais. Já que para George, (1996) os explantes sobrevivem em meios com

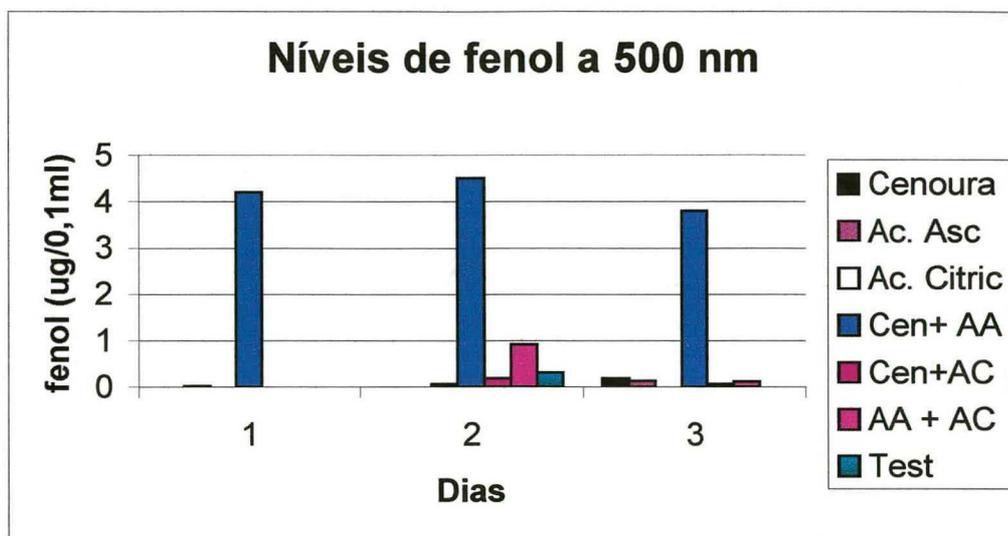
menores quantidades de nutrientes no início da cultura *in vitro*. Biasi *et al* (1994) afirmam que com uma menor concentração de sais no meio de cultura ocorre um melhor controle do processo oxidativo do que o uso de antioxidantes, sugerindo que uma redução em 50 % na concentração de sais do meio de cultura MS. Novos estudos devem ser conduzidos para testar o comportamento dos explantes de *H. angusta* com níveis mais baixos de sais e meios de cultura com pH mais básico.

Também devem ser realizadas experimentos com a utilização de substâncias adsorventes como o carvão ativado, que não controla a oxidação mas absorve os compostos fenólicos que estão sendo produzidos nos tecidos, diminuindo o dano. Nestes experimentos deve-se avaliar o tempo mínimo e a dosagem em que esta substância consegue controlar a oxidação dos tecidos sem causar danos ao desenvolvimento do explante, sendo que as substâncias adsorventes não adsorvem somente os compostos fenólicos, mas também os demais componentes do meio.

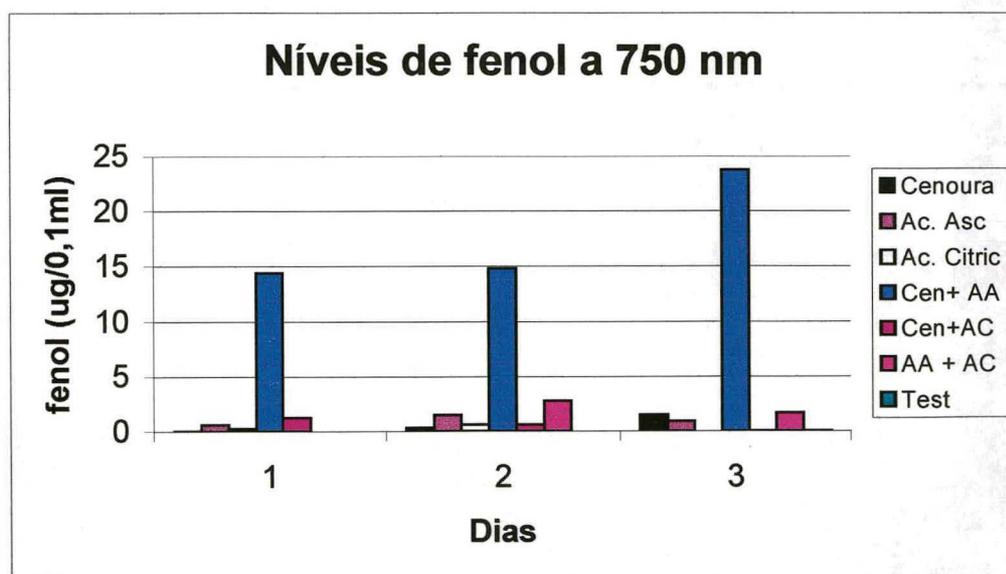
**Quadro 6-** Separação de médias dos períodos de avaliação do experimento com diferentes antioxidantes para o controle da oxidação de *H. angusta*; *H. psittacorum* e *H. veloziana*, realizado no LMBV/CCA/UFSC – Florianópolis – SC.

Período de avaliação	<i>Heliconia angusta</i>		<i>Heliconia psittacorum</i>		<i>Heliconia veloziana</i>							
	Média ABS 500 nm		Média ABS 750 nm		Média ABS 500nm	Média ABS 750 nm						
1	1,0744	a	1,0656	a	1,110	a	1,0952	a	1,0598	a		
2	1,1131	a	1,0828	a	1,099	a	1,0974	a	1,1001	a	1,0872	a
3	1,1723	b	1,1342	b	1,182	b	1,1008	b	1,1899	b	1,1436	b

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Duncan 5% de probabilidade.



**Figura 14-** Teor total de fenóis na fração metanolica extraída de tecidos de *Heliconia angusta* segundo os tratamentos com antioxidantes (ABS 500nm). Ac.Asc: ácido ascórbico; Ac. Citric: ácido cítrico; Cen+AA: carotenoide de cenoura + ácido ascórbico; Cen+AC: carotenoides de cenoura + ácido cítrico; AA+AC: ácido ascórbico + ácido cítrico; Test: testemunha.



**Figura 15-** Teor total de enóis na fração metanolica extraída de tecidos de *Heliconia angusta* segundo os tratamentos com antioxidantes (ABS 750nm). Ac. Asc: ácido ascórbico; Ac. Citric; ácido cítrico; Cen+AA: carotenoides de cenoura + ácido ascórbico; Cen+AC: carotenoide de cenoura + ácido cítrico; AA+AC: ácido ascórbico + ácido cítrico; Test: testemunha.

## 4.4-CONCLUSÕES

- 1- Os antioxidantes ácido ascórbico, ácido cítrico, carotenóides de cenoura e suas respectivas combinações não foram eficientes no controle da oxidação de explantes de *H. angusta*; *H. psittacorum* e *H. velloziana*.
- 2- O tempo de avaliação demonstrou que não houve diferenças nos teores de compostos fenólicos com relação a 24 horas e 48 horas, ocorrendo diferença somente no período de 64 horas. Após 64 horas ocorre um aumento significativo nos teores de compostos fenólicos nos tecidos de todas as espécies estudadas.
- 3- As três espécies de helicônias estudadas apresentaram resultados muito similares, o que leva a concluir que o problema oxidativo é semelhante para as três, nestas condições em que este experimento foi realizado.

# 5- CONTROLE DA CONTAMINAÇÃO DOS MERISTEMAS DE *Heliconia angusta* NA CULTURA *IN VITRO*.

## 5.1- Introdução

A assepsia dos explantes é uma fase muito importante na cultura *in vitro*, pois a dificuldade maior nesta etapa reside em obter tecidos livres de microorganismos sem conduzi-lo à morte quando isolado.

Os passos necessários para desinfestação dependem da natureza do explante (Riordain 1988). São determinantes os pré-tratamentos aplicados na planta matriz para o sucesso dessa etapa do trabalho, principalmente no que se refere aos microorganismos endógenos (Grattapaglia & Machado 1990). Os componentes do meio de cultura, bem como as condições físicas nas quais os explantes são incubados, formam um ambiente que favorece a proliferação de microorganismos, principalmente bactérias e fungos, os quais podem destruir totalmente as culturas ( Mroginski & Roca 1991).

Quando o meristema for extraído de partes como raízes, túberas, cornos, e bulbos, que são estruturas, que, normalmente, estão mais contaminadas, sendo necessário fazer a retirada de todas as partículas de solo ali existente. Uma prática eficiente nestes casos, é a imersão da parte da planta utilizada é uma solução aquosa de uma substância com ação germicida por algumas horas. Esta desinfestação superficial pode auxiliar na redução dos agentes contaminantes (George 1993). Após esta etapa, é utilizado o método de desinfestação adequado para o tipo de explante, com os agentes químicos já recomendados pela literatura (Grattapaglia & Machado 1990). Após a exposição às soluções esterilizantes, o explante deve ser lavado com água estéril para remover os resíduos destas soluções (George 1993).

Existem várias substâncias com ação germicida que podem ser utilizados na desinfestação dos meristemas, mas é importante levar em conta a fitotoxicidade da substância utilizada. Normalmente, são utilizados o etanol e os compostos a base de cloro, tais como hipoclorito de sódio e de cálcio. Quando a desinfestação tem que ser mais severa

são utilizados outros agentes como alguns metais pesados, fungicidas e antibióticos. Em caso de contaminações mais sérias são necessárias as combinações de agentes desinfestantes (Villalobos & Thorpe 1991).

Geralmente o etanol é aplicado à 70 ou 80% (v/v), porque concentrações maiores são menos eficientes e ainda podem desidratar rapidamente os tecidos (Grattapaglia & Machado 1990). Além da ação germicida, o etanol é surfactante, e, aplicado inicialmente, facilita a ação dos outros produtos. Juntamente com o etanol, o cloro é o princípio ativo mais utilizado, em geral na forma de hipoclorito de sódio, sendo facilmente encontrado em formulações comerciais de água sanitária. O hipoclorito de cálcio encontrado em pó, precisa ser dissolvido e filtrado. A concentração final do hipoclorito de sódio deve ser de 0,25 a 2% (v/v), de acordo com o tipo de tecido usado e o tempo de exposição (George 1993). O potencial germicida do hipoclorito, tanto de sódio como de cálcio, está relacionado com a sua capacidade de oxidação. Segundo Van Waes & Debergh (1986) o hipoclorito de cálcio é menos tóxico para os tecidos que o de sódio. Algumas gotas de detergente são comumente adicionadas às soluções a base de cloro para melhorar o contato destas com os tecidos. O Tween 20 é o mais utilizado em concentrações de 0,01 a 0,05% (v/v), porém detergentes normais de cozinha são bons substitutos (Grattapaglia & Machado 1990, Mroginski & Roca 1991).

A escolha do desinfestante e a duração do tratamento variam com o tipo; o grau da infestação e a sensibilidade do tecido (Nathan *et al* 1992; Frey *et al* 1992; Roca & Mroginski 1991; Grattapaglia & Caldas 1987). Levando-se em consideração a sensibilidade do tecido a ser desinfestado, manipula-se a concentração da solução e o tempo de exposição de maneira inversamente proporcional. Normalmente o tempo de exposição não passa de algumas dezenas de segundos, mas quando se trata de órgãos das plantas com tecidos mais lignificados, pode chegar até alguns minutos (Lu & Thorpe 1987; Von Arnold & Eriksson 1991).

Quando o material a ser desinfestado apresenta superfícies muito irregulares, como reentrâncias ou grande quantidade de pêlos superficiais, algumas medidas podem ser tomadas para permitir uma completa exposição dos tecidos. Durante a imersão dos tecidos nas soluções, é necessário promover a agitação (Flancllet & Boulay 1982).

O processo de desinfestação deve ser realizado em capela de fluxo laminar em condições assépticas, utilizando vidraria previamente esterilizada. Após a desinfestação deve ser feita a lavagem com água destilada ou deionizada e autoclavada, sucessivamente. Esta fase do trabalho deve ser executada com muito cuidado, uma vez que a permanência de resíduos de cloro pode ser prejudicial aos tecidos, comprometendo seu desenvolvimento (Grattapaglia & Macahdo 1990).

Podem ser utilizados fungicidas e antibióticos durante a desinfestação, ou incorporá-los ao meio nutritivo de isolamento. A utilização de antibióticos é interessante para o controle de bactérias endógenas que freqüentemente representam sério problemas no estabelecimento das culturas.

O objetivo deste trabalho foi o de estudar os efeitos de substâncias desinfestantes no cultivo *in vitro* de *Heliconia angusta*, visando o controle da contaminação *in vitro* desta espécie.

## 5.2 – Material e Métodos

### 5.2.1-Combinações de Antibióticos e Fungicida em Explantes de *Heliconia angusta*, *H. psittacorum* e *H. velloziana*.

A partir de plantas matrizes de *H. angusta* foram obtidas no jardim do CETRE/EPAGRI, em Florianópolis – SC, foram obtidos os explantes para o estabelecimento dos experimentos. As plantas matrizes de *H. psittacorum* e *H. velloziana* foram obtidas no morro do Canto da Lagoa – Florianópolis – SC.

Neste experimento testou-se o efeito de antibióticos e fungicida acrescidos ao meio de cultura visando o controle da contaminação da cultura *in vitro*. O experimento foi dividido em duas fases: a primeira que constituía na colocação dos explantes em solução de sacarose com o tratamento correspondente em agitação por 24 horas. Na segunda fase o explante era retirado da solução de sacarose(3%) e introduzido *in vitro* com meio de cultura MS adicionado do tratamento, por um período de 20 dias.

Na primeira fase, os explantes foram colocados numa solução de sacarose a 3% adicionado do tratamento. A solução foi agitada por uma moto bomba (Better 250 l/h).

Após as 24 horas os explantes foram transferidos para tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo 15 ml de meio de cultura MS, com 7g. L<sup>-1</sup> de agar, acrescido do respectivo tratamento. Os explantes foram mantidos em sala de crescimento do LMBV-CCA-UFSC.

Os tratamentos foram compostos por antibióticos, fungicidas e a combinação deles. Os antibióticos foram microfiltrados (Power & Chapman 1985) em filtro de 0,22µm e acrescentados ao meio após a autoclavagem antes da sua solidificação. O fungicida foi adicionado ao meio antes da autoclavagem. A concentração dos antibióticos e fungicidas foi de acordo com o indicado no catálogo da Sigma (1999).

Os ensaios com diferentes substâncias para o controle da contaminação foram:

1-Benlate 3g.L<sup>-1</sup>;

2-Penicilina 100.000u/L;

3-Sulfa 50mg.L<sup>-1</sup>;

4-Tetraciclina 10 mg.L<sup>-1</sup>;

5-Benlate 3g.L<sup>-1</sup> + Penicilina 100.000u/L + Sulfa 50mg.L<sup>-1</sup> + Tetraciclina 10 mg.L<sup>-1</sup>

6-Testemunha.

Os parâmetros avaliados foram a presença de contaminação. Também foi realizado uma análise comparativa entre as espécies de helicônias.

O experimento foi em delineamento experimental inteiramente causalizado, três repetições por tratamento, sendo 8 explantes igual a uma parcela. As análises experimentais e interpretações dos dados obtidos ao longo do trabalho foram baseados na Análise da Variância (ANOVA) e no teste de separação de médias Ducan a 5%. As avaliações eram realizadas semanalmente, por um período de 21 dias.

Os microorganismos encontrados foram enviados ao Laboratório de Micologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, onde estudantes de pós-graduação, sobre a responsabilidade do Dr. Jairo Ivo Dos Santos realizaram a identificação dos patógenos.

### 5.2.1.2 – Resultados e Discussão

A análise de variância detectou diferenças significativas ( $P < 0,05\%$ ) entre os tratamentos e entre os períodos de avaliação, mas a interação entre os tratamentos e o período de avaliação não foi significativa para as 3 espécies de helicônias (Quadro 7). Demonstrando que o tratamento composto por todas as substâncias antimicrobianas, tratamento 6, foi o melhor tratamento independente do período de avaliação, sendo o resultado igual para as três espécies de helicônia.

**Quadro 7-** Análise de variância para os dados referentes ao efeito de diferentes substâncias antimicrobianas relacionados aos dias de cultivo, para explantes de *H. angusta*, *H. psittacorum* e *H. velloziana*. Experimento realizado no LMBV-CCA-UFSC- Florianópolis –SC.

Causa de Variação	GL	<i>H. angusta</i>		<i>H. psittacorum</i>		<i>H. velloziana</i>	
		QM		QM		QM	
Tratamentos	5	456,018	*	413,98	*	487,45	*
Período de avaliação	2	1357,06	*	1259,95	*	1470,05	*
Tratamento x Avaliação	10	131,36	NS	131,89	NS	140,57	NS
C.V	10,4						

O coeficiente de variação foi de 10,4% para *H. angusta*, de 9,45% para *H. psittacorum* e de 11,2% para *H. velloziana*. Haldemann *et al* (1987) obtiveram resultados semelhantes com a utilização de benlate em *Camellia*.

Na separação de médias (Duncan a nível de 5%) não houve diferenças significativas entre os tratamentos.

Com relação ao período de avaliação (Quadro 8 e 9), o tratamento composto por todas as substância possibilitou um efeito maior durante o período de sete dias. Com este dado é possível recomendar que após sete dias é necessário realizar a troca do explante do meio de cultura. Pode-se explicar a diminuição da eficiência das substâncias utilizadas ao

fato delas serem degradadas pelas luz, o que provavelmente aconteceu neste experimento. Vianna *et al.*(1997), no experimento com a utilização de rifampicina na descontaminação de explantes de manoeiro, as contaminações surgiram a partir do 3<sup>o</sup> dia de cultivo prolongando-se até o 12<sup>o</sup> .

**Quadro 8-** Percentagem de contaminação dos explantes de *H. angusta*, *H. psittacorum* e *H. velloziana* em experimento com diferentes antibióticos e fungicida, realizado no LMBV-CCA-UFSC- Florianópolis – SC..

TRATAMENTOS	<i>H.angusta</i>		<i>H.psittacorum</i>		<i>H. velloziana</i>	
Todos	81.9444	A	83.001	A	81.988	A
Benlate	86.1111	AB	85.668	AB	82.055	AB
Sulfa	93.0556	BC	92.777	BC	93.002	BC
Penicilina	97.2222	C	97.888	C	96.888	C
Tetraciclina	97.2222	C	99.0111	C	97.999	C
Testemunha	100	C	99.6666	C	100	C

**Quadro 9-** Separação de médias de acordo com o período de avaliação para os tratamentos com diferentes fungicida e antibióticos em explantes de *H. angusta*, *H. psittacorum* e *H. velloziana* em experimento realizado no LMBV-CCA-UFSC- Florianópolis- SC .

PERÍODO DE AVALIAÇÃO	<i>H. angusta</i>		<i>H. psittacorum</i>		<i>H. velloziana</i>	
7 dias	82.638	A	81.987	A	80.888	A
14 dias	96.527	B	93.994	B	95.874	B
21 dias	98.611	B	100	B	98.999	B

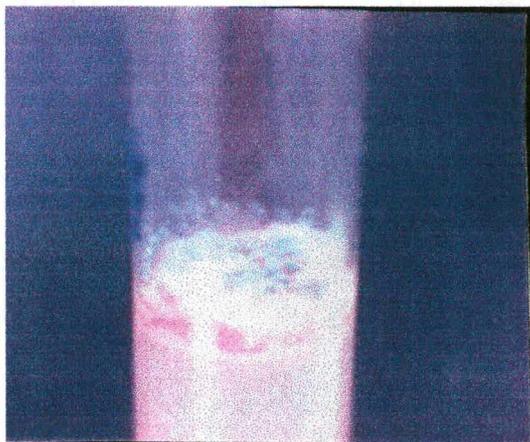
Dois foram os principais patógenos que atacaram as culturas deste experimento. O ataque de fungos do gênero *Fusarium* (Figura 16 a, b) e outro microorganismo, que cuja a visualização era possível aproximadamente 20 dias após a inoculação, pode ser uma levedura (Figura 17), só que este microorganismo não apresentou

esporulação, dificultando a identificação. Os pesquisadores que realizaram a identificação sugeriram que poderia ser um microrganismo de ambientes naturais, por esta razão pouco conhecido e de difícil identificação. Este microrganismo foi encontrado em praticamente todos os tratamentos. Simão (1999), relatou em seu trabalho que *H. angusta* e *H. velloziana* apresentam fungos nas células corticais, sugerindo que a planta com estes microrganismos realizam um mutualismo, permitindo que elas possam sobreviver em locais mais inóspitos. A presença de fungos nas células do córtex das raízes de plantas que crescem em ecossistemas complexos como a Floresta Atlântica pode estar relacionada com uma maior eficiência na absorção de nutrientes (Sajo & Menezes 1986; Scatena & Menezes 1996, Souza 1997).

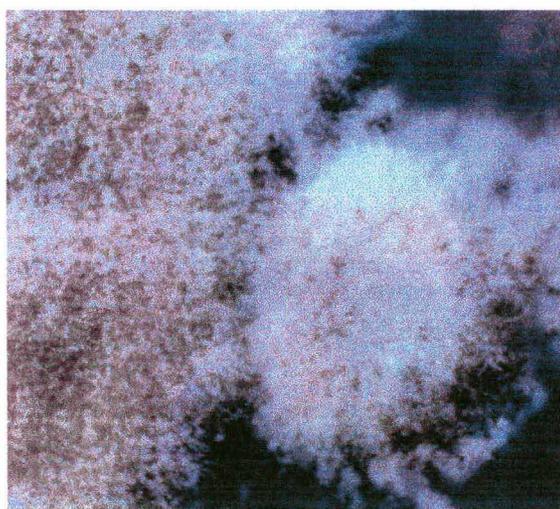
Sandoval (1991) cita que os elevados percentuais de contaminação podem ser atribuídos ao fato das plantas matrizes serem provenientes de campos com problemas de drenagem. As helicônias utilizadas neste experimento são espécies de habitat bastante úmido, terrenos de baixadas com difícil drenagem, sendo que as plantas matrizes foram retiradas do campo diretamente para a montagem do experimento. Litz & Conover (1978) afirmam que 95% dos explantes provenientes de plantas do campo, introduzidas *in vitro*, revelam contaminação microbiana, mesmo após a descontaminação.

Deve-se também realizar estudos de identificação dos microrganismos através de técnicas de alta precisão como os métodos moleculares para identificação de patógenos de plantas (Batista, 1993), como sondas de ácido nucléico; restriction fragment length polymorphism (RFLP); polymerase chain reaction (PCR); marcadores RAPD entre outras técnicas determinando a espécie do patógeno. Após a identificação dos patógenos realizar experimentos com antibiogramas para determinação da substância mais eficiente no seu controle e qual a dosagem mais recomendada.

Com estes resultados podemos concluir que os agentes microbianos que atacam o cultivo *in vitro* destas três espécies, dentro destas condições, é semelhante. Os resultados obtidos levam a concluir que provavelmente estes organismos sejam comuns ao gênero. É necessário realizar mais experimentos para determinar um protocolo eficiente para este gênero de plantas tão importantes.



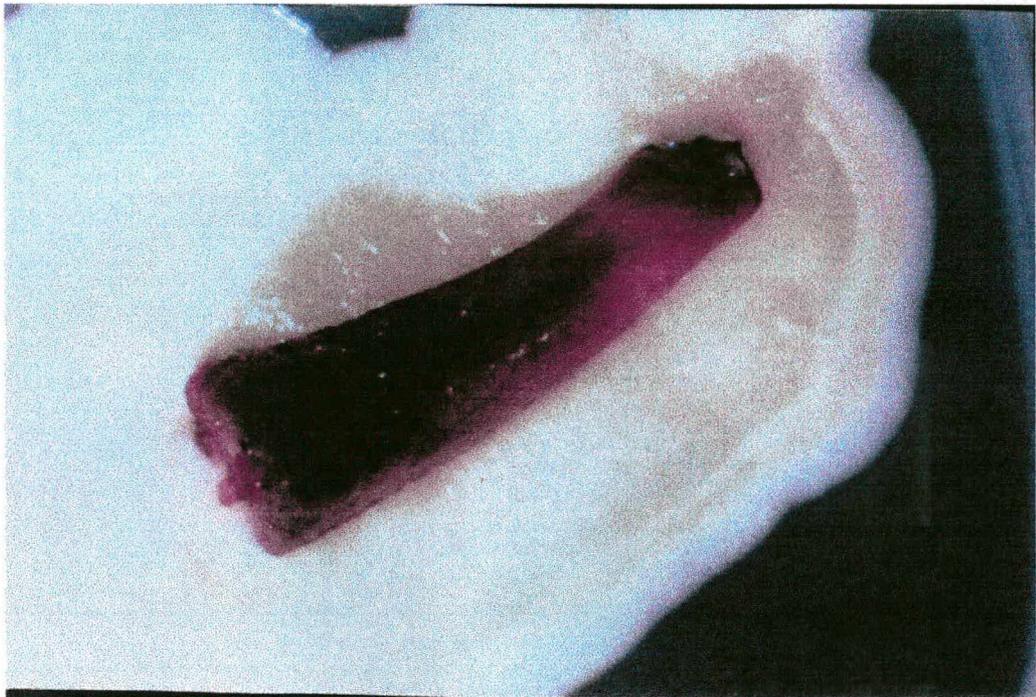
a



b

**Figura 16-a)** Aspecto geral de um explante de *H. angusta* infectada por *Penicilium*.

**b)** Detalhe da colônia de *Penicilium* em explantes de *H. angusta*.



**Figura 18-** Aspecto geral do explante de *H. angusta* contaminada por microorganismo.

### 5.2.1.3- Conclusões

01)O melhor tratamento foi o composto por benlate  $3\text{g.L}^{-1}$  + penicilina  $100.000\text{ u/L}$  + sulfa  $50\text{mg.L}^{-1}$  + tetraciclina  $10\text{ mg.L}^{-1}$ .

02)O tempo de permanência dos explantes no meio de cultura deve ser de no máximo 7 dias.

03)Os microrganismos que contaminam as culturas *in vitro* foram semelhantes para os três tipos de helicônias.

## 5.2.2 -Experimento com Hipoclorito de Cálcio nos Rizomas de *Heliconia angusta*

### 5.2.2.1- Material e Métodos

Várias substâncias com ação germicida são utilizadas para fazer a desinfestação dos explantes. Os compostos a base de cloro são comumente utilizados com bons resultados no controle da contaminação dos cultivos *in vitro*. A concentração e o tempo de exposição deve ser determinado pela sensibilidade dos tecidos (Grattapaglia & Machado 1990).

Tripathi & Bitailon (1985) esterilizaram rizomas de *Hedychium roxburghi*, uma monocotiledônea da família Zingiberaceae, utilizando uma solução de 6% de hipoclorito de cálcio por 30 minutos. O experimento com rizomas de *Hedychium roxburghi* foi realizado com uma espécie da mesma família das helicônias, por este motivo o experimento foi repetido para *Heliconia angusta*.

Neste experimento foram avaliados: concentrações de hipoclorito de cálcio e o tempo de contato com o explante. A análise deste dois fatores permite avaliar qual é a melhor concentração a ser usada e também quanto tempo o rizoma deve ficar em contato com ela, para otimizar o controle de patógenos no cultivo *in vitro* desta espécie.

Os tratamentos eram os seguintes:

- 1) 1% (v/v) de hipoclorito de cálcio por 24 horas de imersão;
- 2) 1% (v/v) de hipoclorito de cálcio por 48 horas de imersão;
- 3) 5% (v/v) de hipoclorito de cálcio por 24 horas de imersão;
- 4) 5% (v/v) de hipoclorito de cálcio por 48 horas de imersão;
- 5) 10% (v/v) de hipoclorito de cálcio por 24 horas de imersão;
- 6) 10% (v/v) de hipoclorito de cálcio por 48 horas de imersão;

Os rizomas da *Heliconia angusta* foram colocados em solução de hipoclorito de cálcio e ficaram em agitação por 24 e 48 horas. Após este período os rizomas foram levados a câmara de fluxo para extração do meristema. Os meristemas sofreram uma nova desinfestação, onde em solução de álcool a 70% o material vegetal permaneceu por 2 minutos e em seguida em solução de hipoclorito de sódio comercial a 33% (v/v), por 20

minutos, sendo então enxaguada 3 vezes em água destilada autoclavada. Então foram transferidos para o meio de cultura MS e colocados na câmara de crescimento.

Os tratamentos eram compostos por três repetições com oito tubos de ensaio contendo um explante cada. A amostragem foi pequena pela falta de material vegetal para realização dos experimentos.

O experimento foi avaliado a cada sete dias por um período de vinte um dias. Os dados foram submetidos a análise de variância e ao teste de separação de médias (Duncan 5%),

### 5.2.2.2- Resultados e Discussão

A análise de variância demonstrou haver diferença significativa ( $P < 0,05\%$ ) entre os tratamentos e entre os períodos de avaliação. A interação entre os tratamentos e o período não foi significativa, o que demonstra que os tratamentos se comportaram da mesma forma em todos os períodos, ou seja, o tratamento que foi o melhor na primeira avaliação comportou-se assim durante todas as outras avaliações. O erro experimental foi de 83.912, provavelmente devido ao número reduzido de amostras.

Na separação de médias (Duncan 5%) o tratamento que apresentou melhor desempenho foi o tratamento 10% de hipoclorito de cálcio por 24 horas diferindo estatisticamente dos demais tratamentos. Nos outros tratamentos o teste de separação de médias demonstrou que não há diferenças significativas entre eles (Quadro 10).

Com relação ao período de inoculação o teste de separação de médias (Duncan 5%) demonstra que o melhor período é o de 7 dias, mas não há diferenças significativas com relação ao segundo melhor período de 14 dias, que por sua vez não apresenta diferenças significativas com período de 21 dias, que apresentou maior índice de contaminação (Quadro 11).

A análise de variância para o melhor período (7 dias) demonstra haver diferenças significativas entre os tratamentos para este período (Quadro 12). Na separação de médias dos tratamentos no primeiro período o de 10% de hipoclorito de cálcio por 24 horas não apresentou diferenças significativas do tratamento de 10% de hipoclorito de cálcio por 48 horas.

Com este experimento conclui-se que o melhor tratamento é o 10% de hipoclorito de cálcio por 24 horas por um período de 7 dias, é necessário a realização de mais experimentos, com uma amostragem maior. Górecka (1987) com a utilização de hipoclorito de cálcio a 2,75% (v/v) conseguiu controlar a contaminação de *Cochilearia armoracia* L. por um período de 28 dias, e no caso da *H. angusta* não respondeu da mesma forma ao tratamento, o que pode ter influência no resultado é que o rizoma da helicônia tem uma camada de cortex bastante lignificada, dificultando a assepsia.

Os resultados obtidos neste trabalho servem como os primeiros passos para o controle da desinfecção na cultura *in vitro* de *H. angusta*, muitos estudos devem ser feitos

avaliando o efeito do hipoclorito de cálcio sobre os patógenos que atacam esta espécie inviabilizando o cultivo *in vitro*.

**Quadro 10** - Separação de médias dos tratamentos com diferentes concentrações de hipoclorito de cálcio para rizomas de *H. angusta* para o controle da desinfecção.

TRATAMENTOS	Médias	
10% por 24 horas	81.944	A
10% por 48 horas	94.444	B
1% por 24 horas	100	B
1% por 48 horas	100	B
5% por 24 horas	100	B
5% por 48 horas	100	B

**Quadro 11** - Separação de médias dos tratamentos por período de tempo diferentes para rizomas de *H. angusta* para o controle da desinfecção.

Período de Avaliação	Médias	
7 dias	91.666	A
14 dias	97.222	AB
21 dias	99.305	B

**Quadro 12** - Separação de médias dos tratamentos com diferentes concentrações de hipoclorito de cálcio para o período de 7 dias dos rizomas de *H. angusta*.

TRATAMENTOS	Médias	
10% por 24 horas	62.50	A
10% por 48 horas	87.50	AB
1% por 24 horas	100	B
1% por 48 horas	100	B
5% por 24 horas	100	B
5% por 48 horas	100	B

### 5.2.2.3 - Conclusões

01) Com os resultados obtidos neste experimento conclui-se que o melhor tratamento é o 10% de hipoclorito de cálcio por imersão dos rizomas por 24 horas em agitação.

02) Nas condições deste experimento conclui-se que o período com melhores resultados no controle de desinfestação dos explantes de *Heliconia angusta* na cultura *in vitro* é o de 7 dias.

## 6-CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

*Heliconia angusta* é uma espécie pouco estudada, por esta razão é de fundamental importância a realização de estudos sobre ela, conhecer sua morfo-anatomia, fisiologia, interação com seu habitat, entre outros, possibilitando assim realizar correlações que auxiliaram no desenvolvimento de protocolo para sua propagação em massa sem causar danos ao meio ambiente. Muitos passos ainda devem ser realizados até a obtenção de um protocolo viável de cultivo *in vitro* para esta espécie, mas os estudos devem continuar devido ao seu grande potencial econômico.

Este trabalho permitiu evidenciar que a propagação vegetativa através da divisão de rizomas é viável. Os experimentos mostraram que é possível propagar vegetativamente esta espécie utilizando algumas técnicas simples, como fertirrigação e cultivo protegido. Sendo que, estas técnicas podem perfeitamente ser utilizadas nos viveiros comerciais. Mas, ainda há necessidade de melhorar esta técnica, determinando, por exemplo, o tamanho ideal de rizoma para uma obtenção de um número maior de mudas como ocorre na produção de mudas de banana.

No entanto, os resultados indicam a necessidade de serem estabelecidos experimentos futuros visando otimizar os processos de propagação vegetativa através da divisão de rizomas e as técnicas de cultivo *in vitro*.

O cultivo *in vitro* tem fundamental importância para esta espécie, pois através desta técnica torna-se possível a obtenção de mudas geneticamente selecionadas, livres de patógenos para produção de plantas matrizes para formação de cultivos comerciais de *H. angusta*, bem como a sua conservação genética.

No cultivo *in vitro* deve-se elucidar aspectos fisiológicos e bioquímicos dos explantes visando avaliar o comportamento desta espécie perante esta técnica. Realizar também, experimentos com os de curvas de dissimilação determinando o crescimento do explante e a necessidade de nutrientes e outros componentes do meio.

O controle do processo oxidativo é de fundamental importância para o estabelecimento desta espécie *in vitro*. Estudos realizados com outras formas de controle

devem ser instalados. Testando as diferentes concentrações de açúcares no meio; concentrações de sais; pH do meio e a utilização de substâncias absorventes.

Outro ponto fundamental é a desinfestação, com pesquisas que possam identificar os agentes patogênicos. E após a identificação a realização de antibiogramas que determinem os produtos e sua dosagem para o controle destes microorganismos.

Os estudos realizados com *Heliconia angusta* neste trabalho poderá servir de base para estudos mais aprofundados com esta espécie e outras do gênero.

## 7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSSON,L. Revisew of *Heliconia* sect. *Heliconia* (Musaceae). **Nord. J. Bot.** v.1, n. 6, p. 759-784. 1981.
- ANDERSSON,L. An evolutionary scenario for genus *Heliconia*. In: Holm-Nielsen.L.B.; Nielsen, I.C.; Baslev, H.(ed). **Tropical forests, botanical dynamics, speciation and diversity**. Academic Press, New York. p.173-184.1989.
- BARREIROS,H. S. *Heliconia Nova Brasiliana et Varietas* (Heliconeaceae (End.)Nakai)-III. **Rev. Brasil. Biol.**v.32, n.2, p.205-208. 1972.
- BARREIROS, H.S. Espécies críticas de *Heliconia* (*Heliconiaceae*). III. Com duas espécies brasileiras sendo uma nova. **Bradea**, Rio de Janeiro, v.1,n.46, p.459-464. 1974.
- BATISTA,M.de F. Métodos moleculares para identificação de patógenos de plantas. **Métodos Moleculares para Identificação de Patógenos**.v.1, p. 165-197. 1993.
- BARKER,W.G.; STEWARD,F.C. Growth and development of banana plant. I. The growing regions of the vegetative shoot. **Annals of Botany**, v.26, n. 103, p.389-411. 1962.
- BECKMAN,C.H. Phenolic-string cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants? **Physiol. Mol. Plant Pathol.** v. 57, n. 3, p. 101-110. 2000.
- BELL,A . **Plant form – An illustrated guide to flowering plant morphology**. Oxford University Press, New York. 341p. 1991.
- BENSON,E.E. Free radical damage in store germoplasma. Chapter 6, **IBPGR**, Roma. 1990.
- BERRY,F.; KRESS,J. **Heliconia – An identification guide**. Smithsonian Institution Press, Washington, D.C. 334p. 1991.
- BIASI,L.A; KOLLER,OC.; KAMPF,A M. Micropropagação do abacateiro ‘ouro verde’ a partir de seguimentos nodais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.29, p.1051-1058.1994.
- BONGERS, F.J.G. **IBRAFLOR – Informativo**. Maio. ano V no. 22 p.12. 2000.

- BURLE-MAX, R. *Heliconiae novae brasiliensis* II. *Bradea* . v.1, p.38, p. 379-382. 1974.
- BUZATO, S. **Estudo comparativo de flores polinizadas por beija-flores em três comunidades de Mata Atlântica no Sudeste do Brasil**. 1995. 105 p. Tese (Doutorado) – Instituto de Biologia, Unicamp, Campinas.
- CASTAN,J.B. Tecnologia em Floricultura Tropical. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental*. v. 3, n. 2, p. 05-09. 1997.
- CASTRO,C.E.F. **Helicônias como flores de corte: adequação de espécies e tecnologia pós-colheita**. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, USP, Piracicaba. 191p.1993.
- CASTRO,C.E.F. **Heliconia para exportação: aspectos técnicos da produção**. EMBRAPA-SPI, Brasília, DF. p.44. 1995.
- CASTRO,C.E.F.; GRAZIANO, T. T. Espécies do Gênero *Heliconia* (Heliconiaceae) no Brasil. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental*. v. 3, n. 2, p. 15-28. 1997.
- CARVALHO, D. de; PINTO,J.E.B.P.; PASQUAL, M. Uso de fungicida e antioxidantes em cultura *in vitro* de segmentos nodais de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden. *Ciência e Prática*. Lavras. v.14, n.1, p. 97-106. 1990.
- CHRISTIANSEN, H. J. ; FONNESBECH. H. Prevention by polyvinylpyrrolidone of growth inhibition of *Hamamelis* shoot tips grown *in vitro* and browning of the agar meduim. *Acta. Hort.*, v.54, p. 101-104. 1975.
- CITADINI-ZANETTE,V.; BAPTISTA,L.R.M. Vegetação herbácea terrícola de uma comunidade florestal em Limoeiro, município de Torres, RS, Brasil. *B. Inst. Bioc.* n. 45 p. 01-87. 1989.
- CLINE,M.G. Apical dominance. *Bot. Rev.*, v.57. p. 318-358. 1991.
- CLINE,M.G. The role of hormones in apical dominance. New approaches to an old problem in plant development. *Physiol. Plantarum*, v.90. p. 230-237. 1994.
- CREEMERS-MOLENAAR,J.; ORTVANY,Y. Antioxidant influences the plating efficiency and microcallus-growth of protoplasts in *Lolium perene* L. *Plant Cellular and Molecular Biology*. 1990.
- CRILEY, R. A . Hawaii ornamental short course and fertilizer conference. *The Bulletin Heliconia Society Internacional*. USA, v.1, n.3, spring, p. 7-9.1986.

- CRILEY, R. A. . Propagation of tropical cut flowers: *Strelitzia*, *Alpinia* and *Heliconia*. *Acta Hort.* 226, p. 509-517. 1988a.
- CRILEY, R. A. . Propagation methods for gingers and heliconias. *The Bulletin Heliconia Society International*. USA, v.3 n.2, winter, p.1-4. 1988b.
- CRILEY, R. A. .Development of *Heliconia* and *Alpinia* in Hawaii: cultivar selection and culture. *Acta Hort.* 246, p. 247-258. 1989.
- CRILEY, R. A. .Propagation of Zingiberaceae and Heliconiaceae. *Rev. Bras. Hort. Orn.* v.1, n.1, p. 14-21.1995.
- CRONQUIST,A. In *integrated system of classification of flowering plants*. Colombia University Press, New York.p.1157-1172. 1981.
- DAHLEGREN,R.M.T.; CLIFFORD,H.T.; YEO,P.F. *The families of the monocotyledeous*. Springer-Verlag, Berlin. p. 350-358. 1985
- DEBERGH, P.C. ; ZIMMERMAN,R.H. *Micropropagation: Technology and Applicatio*. Kluwer Academic Pub., Dordrecht. p.484. 1991.
- DEBIASI,C. Efeito de antiauxinas sobre a dominância apical em gemas de bananeira *in vitro* Cvs. Grand Naine (AAA), Nanicão (AAA) e Enxerto(AAB). Dissertação (Mestre em Recurso Genéticos Vegetais). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis 96p. 2000.
- DOESBURG,J. van. Flower industry in Europe: countries around the world aiming at large markets. *Farming Japan*, v. 26, n. 4, 1992.
- DUBBS,B. *Prodromus Florae Matogrossensis*. Part I. Checklist of Angiosperms. Series B. v. 3. Betrona-Verlag. p.206. 1998.
- ECHEVERRY, B.E. Collections in transporting heliconias in Colombia. *The Bulletin Heliconia Society Internacional*. USA, c.3,n.1, fall, p.6.1987.
- FLANCET, A. ; BOULAY,M. Micropropagation of frost resistant eucalyptus clones. *Aust. For. Res.*, v.13,p.83-89. 1982.
- FREY,L.; SARANGA, Y. ; JANICK,J. Organogenesis in carnation. *Amer. Soc. Hort. Sci.*, Alexandria, v.27, n.1, p. 63-65., 1992.
- GEERTSEN, V. Effect of photoperiod and temperature on the growth and flower production of *Heliconia psittacorum* "Tay". *Acta Hort.* 252.p.117-122. 1989.

- GEERTSEN, V. Influence of photoperiod and temperature on the growth and flower production of *Heliconia aurantiaca*. **HortScience**. v.25, n. 6, p. 646-648. 1990.
- GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture**. Exegetics, Edington. 1993.v.1,p.555
- GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture**. Exegetics, Edington. 1996.v.2
- GODINHO, F. de P. Efeito de doses de 6-benzilminopurina na produção de mudas de bananeira (*Musa sp*) cultivar Prata pelo método de propagação rápida "in vivo". Dissertação de mestrado. Lavras, M.G.: ESAL. 1991.
- GOH, C.J.; NATHAN, M. J.; KUMAR, P.K. Direct organogenesis and induction of morphogenic callus through thin section culture of *Heliconia psittacorum*. **Scientia Horticulturae**, 62. p.113-120. 1995.
- GORECKA, K. In vitro propagation of horse-radish/ *Cochearia armoracia L.*. **Acta horticulturae**. 212, p. 671-672. 1987.
- GRATTAPAGLIA, D.; CALDAS, L.S. Micropropagação do porta enxerto tangerina Sunki (*Citrus sunki*) a nível comercial. In: **SIMPÓSIO NACIONAL DE CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS**, 2., 1987, Brasília, DF. Resumos... Brasília, p.10.1987.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A Micropropagação. In: TORRES, A. ; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicação da cultura de tecido de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA – CNPH. p.99-169. 1990.
- HAINES, A. H. **Methods for the Oxidation of Organic Compounds. Alkanes, Alkanes, Alkynes, and Arenes**. Academic Press, London. p. 04-21. 1985.
- HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; DAVES JR, S.T.B. **Plant Propagation, Principles And Practices**. Prendice Hall, Inland Wood Cliffs. New Jersey, 647p. 1990.
- HOWARD, B.; MARKS, T. Interaction between micropropagation and conventional propagation. **Comb. Proc. Int. Plant. Prop. Soc.**, v. 38, p. 247-251. 1988.
- HUTCHINSON, J. F. In vitro propagation of *Dionea muscipula* Ellis (Venus fly trap). **Scientia Hort.**, v. 22, p. 189-194. 1984.
- JANICK, J. **Handbook of plant cell culture, ornamente specie**. New York. Copyright. v.5. 828p. 1990.
- KERBAUY, G.B. Competência e Determinação Celular. In: **Curso de Biologia e Transformação de Plantas**. CBAB/CNPH, Brasília. 1996.
- KERNS, H. R. ; MEYER, M. M. In vitro propagation of red-silver hybrid maples. **HortScience**. v. 20, p.593, 1985.

- KOZAI,T.; SMITH,M.L. Enviromental control in plant tissue culture-general introduction. In: AITKEN-CHRISTIE,J.; KOZAI,T.; SMITH,M.L. **Automation and enviromental control in palnt tissue culture**. Netherlands: Kluver Academic Publishers. p. 301-317. 1995.
- KRESS,W.J. Bat pollination of an Old World *Heliconia*. **Biotropica**. v.17, n.4, p.302-308. 1985.
- KRESS,W.J. The phylogeny and classification of Zingiberales. **Ann. Missouri Bot. Gard.** v.77,n.4, p.698-721.1990a.
- KRESS,W.J. The phylogeny and classification of Zingiberales. **Ann. Missouri Bot. Gard.** v.77, n. 4. p. 698-721. 1990b.
- KRIKORIAN,AD. Propagación clonal in vitro. In: ROCA,W.M.; MROGINSKI,L.A . (eds). **Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos Y Aplicaciones**.CIAT, Cali. 969p. 1993.
- KUMAR, P.P.; NATHAN,M.J. & GOH,C.J. Involvement of ethylene on growth and plant regeneration in callus cultures of *Heliconia psittacorum* L.f. **Plant Growth Regulation**. n.19,p. 145-151. 1996.
- LITZ, R. E. ; CONOVER, R. In vitro propagation of papaya. **HortScience**, Alexandria, v.13, p.241-242. 1978.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR,A. L.; RANDALL,R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal Chemistry**. N. 193, p. 265-275. 1951.
- LORENZI, H.; SOUZA,H.M. de. **Plantas Ornamentais no Brasil : arbustivas, herbáceas e trepadeiras**. Editora Plantarum Ltda. 3 ed. Nova Odessa – SP. 1088p. 2001.
- LU, C. ; THORPE, T. A . Somatic embryogenesis and plantled regeneration in culture immature embryos of *Picea glauca*. **Journal of Plant Physiology**, Lancaster, v. 128, p. 297-302, 1987.
- LUC-CAYOL,F.; FERREOL,L. X *Alpingera martinica* (Zingiberaceae): in Intergeneric Hybrid between *Alpinia purpurata* and *Etilingera elatior*. **HortScience**. v.32, n. 5, p.914-915. 1997.
- MAHLER, H. ; CORDES,E.H. **Biological Chemistry**. Copyright. 1996.

- MATSUNAGA, M. Indústria da Flor no Mundo e o Comércio Internacional do Brasil. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**. v. 3, n. 2, p. 01-04. 1997.
- MELLO-FILHO, L.E. O gênero *Heliconia* na *Flora Fluminensis* de Frei José Mariano da Conceição Vellozo. **Rev. Brasil. Biol.** v.35, n.2, p.331-337. 1975.
- MENEGUCCI, J.L.P.; SOUTO, R.F.; SILVA, C. R.R. Influência do diâmetro do rizoma e doses de benzilaminopurina na propagação "in vivo" da bananeira cultivar prata. **Rev. Fruticultura**. Cruz das Almas. v. 17, n.2, p.85-92. 1995.
- MOREL G. ; MARTINS, C. Guérison de dahlias atteints d'une maladie à virus. **Compt. Rend Acad. Sci.**, Paris. v. 235, p.1324-1325. 1952.
- MOTOS, J.R. **IBRAFLOR – Informativo**. Janeiro. ano V, no. 19 p. 05-07. 2000a.
- MOTOS, J.R. **IBRAFLOR – Informativo**. Maio. ano V no. 22 p. 05-07. 2000b.
- MOTOS, J.R. **Flores de Corte**. Flortec. Dezembro .p. 25-32. 2000c.
- MROGINSKI, L.A. ; ROCA, W.M. Estabelecimento de cultivos de tecidos vegetales *in vitro*. In: ROCA, W.M.; MROGINSKI, L.A, (Ed.) **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones**. Cali; CIAT. P., p.19-40. 1991.
- MURASHIGE, T. ; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossays with tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p. 473-497. 1962.
- MURASHIGE, T. Plant Propagation by Tissue Culture: A practice with Unrealized Potential. In: AMMIRATO, P.V., EVANS, D.R., SHARP, W.R. e BAJA, Y.P.S. **Handbook of plant cell culture, ornament specie**. vol 5. New York: Copyright . 828p. 1990
- NATHAN, M.J.; GOH, C.J. & KUMAR, P.P. In vitro propagation of *Heliconia psittacorum* by bud culture. **HortScience**. v.27, n.5, p.450-452. 1992.
- PADUA, T. Propagação das Árvores Frutíferas. **Informe Agropecuário**. Belo Horizonte. v. 9, n.101. p.11-19. 1983
- POUGET R., Action de la concentration de la solution nutritive sur quelques caractéristiques physiologiques et technologiques chez *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon. I - Vigueur, rendement, qualité du moût et du vin. **Agronomie**, v.4, n.5, 437-442p. 1984.
- POWER, J. B. ; CHAPMAN, J. V. Isolation and genetic manipulation of plant protoplasts. In: DIXON, R. ed. **Plant cell culture a practical approach**. Oxford, IRL Press, p.37-66. 1985.
- READ, P.E.; SZENDRAK, E. Micropropagation and Biotechnology of tropical and subtropical ornamentals. **Acta Hort**. n.461, p. 93-103. 1998.
- RIORDÁIN, F.O. Final discussion and conclusions. **Acta Horticulture**. p.223- 225: 1988.

- ROCA, W.M.; MROGINSKI, L.A e EDITORES TÉCNICOS. **Cultivo de tejidos en la agricultura**. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical. P. 969. 1991.
- SACHS, T. **Pattern formation in plant tissues**. Cambridge University Press, New York. 1991.
- SAJO, M.G.; MENEZES, N.L. Considerações anômicas sobre raízes de espécies de *Vernonia* Scrib. (Compositae) da Serra do Cipó (MG). **Hoehnea**. v.13, 51-58p. 1986.
- SALISBURY, F.B.; ROSS, C.W. Hormonal and Growth Regulators. In: \_\_\_\_\_ & \_\_\_\_\_, eds. **Plant Physiology**, Belmont, California. Wadsworth Publishing, p.357-407. 1992.
- SANDOVAL, J.A; ACUNÁ, P. Prospectiva de La nueva Biotecnología en el cultivo del banana. Corbana, San José – Costa Rica. v.21, n. 45, p. 63-65. 1996.
- SANDOVAL, J.A ; BRENES, G.; PEREZ-SANCHES, L. **Micropropagation de plátano y banana (Musa AAB, AAA) en el CATIE**. Turrialba: CATIE, 24p. (Informe Técnico, 186). 1991.
- SANTOS, E. Revisão das espécies do gênero *Heliconia* L. (Musaceae s.l.) espontâneas na região fluminense. **Rodriguésia** . v.30, n. 45, p. 99-201. 1978.
- SCATENA, V.L.; MENEZES, N.L. Anatomia de raízes de *Syngonanthus* Ruhl. (Eriocaulacea). **Rev. Brasil. Biol.** v 56, n. 2, 333-343p. 1996.
- SILVA, F.A ; BORGES, M.F.M.; FERREIRA, M.<sup>a</sup> Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**. V. 22 n.1 jan/fev.1999.
- SIQUEIRA, E.R. de; INOUE, M. T. Controle de oxidação na cultura de tecidos do coqueiro. **Pesq. Agrop. Bras.** Brasília, v. 26, n.7, p.949-953. 1991.
- SIMÃO, D.G. **Morfo-anatomia de *Heliconia angusta* VELL. e *H. velloziana* L. EMYGD. (Heliconiaceae) do núcleo Picinguaba, Ubatuba, SP**. Dissertação (Mestre em Ciências Biológicas)- Área de Biologia Vegetal. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 1999.
- SKOOG, F. & MILLER, C.O Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured in vitro. **Symp. Soc. Exp. Biol.** n.11, p. 118-30.1957.
- SMITH, E.L.; HILL, R.L.; LEHMAN, R.I.; LEFKOWITZ, R.J.; HANDLER, P.; WHIETE, A . **Bioquímica Aspectos Gerais**. Editora Guanabara Koogan S. A . Rio de Janeiro. p. 785. 1983
- SOUZA, H.C. **Estudos comparativos de adaptação anatômicas em órgãos vegetativos de espécies de *Lavoisiera* Dc. (Melastomataceae) da Serra do Cipó, MG**. Tese (Titulo de Doutorado) Instituto de Biociências, USP, São Paulo. 121p. 1997.

TAIZ, L. & ZEIGER, E. **Plant Physiology**. The Benjamin, California. 1991.

TAYLOR, W.L.; BATTERSBY, A. R. **Oxidative Coupling of Phenols**. Marcel Dekker, INC. New York. p. 387. 1967.

TOMBOLATAO, A. F.C.; COSTA, AM.M. Micropropagação de Plantas Ornamentais. Boletim Técnico, IAC. Campinas n. 174. maio . 72p.1998.

TOMLINSON, P.B. Phylogeny of the Scitamineae – morphological and anatomical considerations. **Evolution**, n.16, p.192-213. 1962.

TOMLINSON, P.B. Commelinales-Zingiberales. In: Metcalfe, C.R. (ed) **Anatomy of the Monocotyledoneous**. Oxford University Press, Oxford. p.295-324.1969.

TRIPATHI, B.K.; BITAILLON, C. *In vitro* plant regeneration of *Hedychium roxburghii* Blume through rhizome meristem culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.4, p.11-17, 1985.

VAN WAES, J.M. & DEBERGH, P.C. *In vitro* germination of some Western European orchids. **Physiol. Plantarum**. n.67, p.253-261. 1986.

VIANNA, G. R. ; COUTO, F. A. ; OLIVEIRA, A. B. de; ZAMBOLIM, L. ; MARIA, J. A. Rifampicina na descontaminação bacteriana de explantes de mamoeiro provenientes do campo. **Bragantia**. v. 56, n. 2. 1997.

VILLALOBOS, A. V.M.; THORPE, T. A. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. In: ROCA, W.M.; MROGINSKI, L.A. , (Ed.) **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones**. Cali; CIAT, p.127-141. 1991.

VOET, D.; VOET, J.G. **Biochemistry**. 2ª ed. New York. John Wiley & Sons, INC. p. 1361. 1995.

VON ARNOLD, S.; ERIKSSON, T. *In vitro* studies of adventitious shoot formation in *Pinus contorta*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.59, p.870-874, 1991.

WILLIAN, R.R. The chemical micro environment. In: **Automation and Environmental Control In Plant Tissue Culture**. Kleuwer Academic Publishers, New Zeland. 1995.