

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA NO TRÓPICO ÚMIDO

MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* E ACLIMATIZAÇÃO DE MUDAS
MICROPROPAGADAS DE *Heliconia chartacea* (Lane x Barreiros) var. Sexy Pink

MARCELO DOMINGUES MARTINS RAIZER

MANAUS, AMAZONAS

AGOSTO, 2011.

MARCELO DOMINGUES MARTINS RAIZER

**MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* E ACLIMATIZAÇÃO DE MUDAS
MICROPROPAGADAS DE *Heliconia chartacea* (Lane x Barreiros) var. Sexy Pink**

Orientador: Dr. Jorge Hugo Iriarte Martel

Co-Orientadora: Dra. Regina Caetano Quisen

Dissertação apresentada ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agricultura no Trópico Úmido.

MANAUS, AMAZONAS

AGOSTO, 2011.

Folha de aprovação

A Banca Julgadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

TÍTULO: "MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* E ACLIMATIZAÇÃO DE
MUDAS MICROPROPAGADAS DE *Heliconia chartacea* (Lane x
Barreiros) var. *Sexy Pink*"

AUTOR:
MARCELO DOMINGUES MARTINS RAIZER

BANCA JULGADORA:



SUELY DE SOUZA COSTA, Dra. (INPA)
(Presidente)



PAULO DE TARSO BARBOSA SAMPAIO, Dr. (INPA)
(membro)



ANDRÉ LUIS WILLERDING, Dr. (CBA)
(membro)

Manaus, 09 de agosto de 2011

Ficha Catalográfica Preparada Pela Biblioteca Central do INPA

R161

Raizer, Marcelo Domingues Martins

Multiplicação *in vitro* e aclimatização de mudas micropropagadas de *Heliconia chartacea* (Lane x Barreiros) var. Sexy Pink / Marcelo Domingues Martins Raizer. --- Manaus : [s.n.],2011.
122 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) -- INPA, Manaus, 2011

Orientador : Jorge Hugo Iriarte Martel

Co-orientador : Regina Caetano Quisen

Área de concentração : Agricultura no Trópico Úmido

1. Helicônia. 2. Plantas ornamentais tropicais. 3. Multiplicação *in vitro*. 4. Biomassa. 5. Enraizamento. I. Título.

CDD 19. ed. 584.21

Sinopse:

Foram estudados meios de cultura para multiplicação *in vitro* de *Heliconia chartacea* var. Sexy Pink, assim como a influência das citocininas BAP e TDZ e diferentes concentrações de sacarose para o enraizamento, e também a influência de diferentes substratos sobre a aclimatização das mudas, no município de Manaus, Amazonas. Aspectos como massa seca e fresca da parte aérea e raiz, assim como a análise de macro e micronutrientes *ex vitro* foram avaliados.

Ao meu Avô e minhas avós, Mario Raizer, Maria da Conceição

Raizer e Maria Isabel Martins pelo amor e confiança incondicional.

Ofereço

*A minha mãe Maria Lídia Martins
Pereira que com muito carinho e
esforço não mediu esforços para que eu
chegasse a esta etapa da minha vida.*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus que, que sempre me guiou nas minhas conquistas me acalentando nos momentos de aflição;

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA, pela oportunidade de realização do Curso de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Agricultura do Trópico Úmido;

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA Amazônia Ocidental, pelo aporte institucional e disponibilidade da infraestrutura para a realização dos experimentos;

A FAPEAM, pela bolsa que viabilizou parte dos estudos;

Ao Centro de Biotecnologia da Amazônia – CBA, pela doação do material vegetal;

Ao Dr. Jorge Hugo Iriarte Martel, pela orientação;

A Dra. Regina Caetano Quisen, pela co-orientação e o valoroso esforço e apoio disponibilizado durante toda a realização do projeto;

Aos amigos e colegas de mestrado Chelzea Mara Mota Cabral Marques, Janderson Rodrigues Dalazen e Francis Raphael Cidade, pelo diálogo, apoio e conforto oferecido nas horas difíceis;

As funcionárias do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da EMBRAPA, Rosimar Fernandes e Déborah Araújo pela dedicação e disposição na transmissão do conhecimento;

A todos, que de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho;

Deixo aqui expresso meu muito obrigado!

RESUMO

As helicônias são plantas ornamentais tropicais de grande interesse na floricultura brasileira, e dentre elas destaca-se a *Heliconia chartacea* (Lane x Barreiros) var. *Sexy Pink*, cuja micropropagação permite a obtenção de mudas em larga escala, com genótipo idêntico ao do ancestral e alta qualidade fitossanitária. Com o objetivo de determinar a composição do meio de cultura e o efeito das citocininas Benzilaminopurina (BAP) e Tidiazuron (TDZ) para a multiplicação *in vitro*, o efeito de diferentes concentrações de sacarose no meio de cultura para o enraizamento *in vitro* e a influência de diferentes substratos sobre a aclimatização de plantas de *H. chartacea* var. *Sexy Pink*., foram testados diferentes níveis de nitrogênio e cálcio no meio básico de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) em combinações com BAP, TDZ e diferentes concentrações de BAP, associado ou não a água de coco. O tratamento com o meio de cultura MS acrescido de 0,25 mg L⁻¹ de TDZ, seguido do tratamentos MS e 3 mg L⁻¹ de BAP e MS com 220,00 mg L⁻¹ de CaCL₂.2H₂O e 0,25 mg L⁻¹ de TDZ foram os que apresentaram melhores respostas para a emissão e tamanho das brotações, corroborando com Nannetti & Pinto (1995), que verificaram a necessidade de diferentes concentrações de citocininas para diferentes níveis de nitrogênio e cálcio para o desenvolvimento de brotações de *Heliconia sp.* Verificou-se também que para as variações das concentrações de BAP não houve diferenças estatísticas entre os tratamentos com 2 e 3 mg L⁻¹ associados ou não com água de coco, porém, a concentração com 2 mg L⁻¹ e 10% de água de coco conferiu melhores resultados demonstrando ser o melhor meio de cultura para a multiplicação da *H. chartaceae* var. *Sexy Pink*. Para o enraizamento, mudas micropropagadas com 3 – 5 cm de altura foram inoculadas em meio de cultura MS com metade da concentração salina (MS/2) suplementado com diferentes concentrações de sacarose (0; 15; 30; 45 e 60 g L⁻¹). A ausência de uma fonte endógena de açúcar não inibiu a formação de raízes, porém estas foram poucas e muito finas. Quando a concentração de sacarose utilizada foi de 15 a 60 g L⁻¹, a produção da biomassa da raiz foi aumentada dando a planta uma possibilidade maior de estabelecimento para a fase de aclimatação. As doses de 45 e 60 g L⁻¹ provocaram redução na massa seca das raízes pois, propiciaram a formação de raízes mais grossas e quebradiças, devido ao maior acúmulo de água nos tecidos. Não foram observadas diferenças significativas no número médio de raízes emitidas por explante nas diferentes concentrações de sacarose à exceção do tratamento controle, porém comparando-se o peso seco das raízes, pode-se constatar que a adição de sacarose na concentração de 30 g L⁻¹ no meio MS, foi a que apresentou maior incremento de massa, demonstrando ser o melhor meio de cultura para o enraizamento da *H. chartacea* var.

Sexy Pink. Para a aclimatização, utilizaram-se seis tipos de substrato, T1: Bioplant[®]; T2: Fibra de coco; T3: Fibra de coco + Bioplant[®]; T4: Fibra de coco + Húmus de minhoca; T5: Fibra de coco + Bioplant[®] + Húmus de minhoca e T6: Areia + Vermiculita. A taxa de sobrevivência variou de 83 % a 92 % não havendo diferenças estatísticas entre os tratamentos avaliados. O tratamento 3 proporcionou um desenvolvimento maior do sistema radicular que os demais, sendo os substratos T1 e T6, os que induziram um menor desenvolvimento. Houve um maior acúmulo de matéria seca na parte aérea das plantas aclimatizadas no T2, sendo seguidas pelas suas variações T3, T4 e T5, produzindo mudas mais vigorosas. O substrato a base de fibra de coco seco foi o que proporcionou o maior incremento de massa seca da parte aérea e raiz, sendo o mais indicado para aclimatização de *Heliconia chartacea* (Lane x Barreiros) var. Sexy Pink.

ABSTRACT

The ornamental tropical heliconia plants are of great interest in Brazilian floriculture, and among them stands out *Heliconia chartacea* (Barry x Lane) var. Sexy Pink, whose micropropagation allows to obtain large-scale plants, with genotype identical to the common ancestor and high health status. In order to determine the composition of the culture medium and the effect of cytokinin Benzylaminopurine (BAP) and Tidiazuron (TDZ) for multiplication *in vitro*, the effect of different concentrations of sucrose in the culture medium for rooting *in vitro* and the influence of different substrates on the acclimatization of plants of *H. chartacea* var. Sexy Pink., We tested different levels of nitrogen and calcium in the basic culture medium MS (Murashige and Skoog, 1962) in combination with BAP, TDZ and BAP, with or without coconut water. Treatment with MS medium plus 0.25 mg L⁻¹ TDZ, followed by MS treatments and 3 mg L⁻¹ BAP and MS with 220.00 mg L⁻¹ and 0.25 CaCl₂.2H₂O mg L⁻¹ TDZ presented the best answers to issue and size of the shoots, confirming Nannetti & Pinto (1995), who reported a need for different concentrations of cytokinins for different levels of nitrogen and calcium to the development of the sprouts *Heliconia* sp. It was also found that for variations of concentrations of BAP no statistical differences between treatments with 2 and 3 mg L⁻¹ with or without coconut water, however, concentration 2 mg L⁻¹ and 10% water Coconut comferiu best results proving to be the best medium for the multiplication of *H. chartacea* var. Sexy Pink. For rooting, plantlets with 3 to 5 cm high were inoculated in culture medium MS with half the salt concentration (MS/2) supplemented with different concentrations of sucrose (0, 15, 30, 45 and 60 g L⁻¹). The absence of an endogenous source of sugar did not inhibit root formation, but these were few and very thin. When the sucrose concentration used was 15 to 60 g L⁻¹, production of root biomass was increased giving the plant a greater chance of establishment for the acclimatization stage. Doses of 45 and 60 g L⁻¹ decreased the dry mass of roots thus enabled the formation of roots thickened and brittle due to greater accumulation of water in tissues. There were no significant differences in the average number of roots per explant in different concentrations of sucrose the exception of the control treatment, but comparing the dry weight of roots, one can ascertain that the addition of sucrose at a concentration of 30 g L⁻¹ in MS medium, showed the highest increase in mass, proving to be the best medium for rooting of *H. chartacea* var. Sexy Pink. For acclimatization, we used six types of substrate, T1: Bioplant[®] T2: Coconut fiber, T3: Coir + Bioplant[®], T4: Coir + Earthworm casting; T5: Coir + Bioplant[®] + Earthworm casting and T6: sand, vermiculite. The survival rate ranged from 83% to 92% with no statistical differences

between treatments. The T3 gave a further development of the root system than others, and the T1 and T6 substrates, those who had a less developed. There was a greater accumulation of dry matter in shoots of plants acclimatized in T2, followed by its variations T3, T4 and T5, favoring more vigorous seedlings. The substrate prepared with coconut fiber was what provided the greatest increase in dry mass of shoot and root, the most suitable for acclimatization of *Heliconia chartacea* (Barry Lane x) var. Sexy Pink.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
2. OBJETIVOS	03
2.1 Objetivo geral	03
2.2 Objetivos específicos	03
3. REVISÃO DE LITERATURA	04
3.1. O gênero <i>Heliconiacea</i>	05
3.1.1. Generalidades	05
3.1.2. Classificação taxonômica.....	06
3.1.3. Descrição botânica das Heliconiáceas:.....	06
3.1.4. Propagação das Helicônias.....	08
3.1.5 Aspectos bioclimáticos e ecofisiológicos.....	09
3.1.5.1. Luminosidade.....	09
3.1.5.2. Temperatura e umidade.....	09
3.1.5.3. Solos e adubação.....	10
3.1.5.4. Nutrição mineral de plantas.....	11
3.1.5.4.1. Nutrição e crescimento	11
3.1.5.4.2. Avaliação do estado nutricional	12
3.1.5.4.3. Deficiência nutricional de macronutrientes	14
3.1.5.5. Irrigação.....	21
3.1.6. <i>Heliconia chartacea</i> (Lane x Barreiros) var. Sexy Pink.....	21
3.1.6.1. Inflorescência	22
3.2. Micropropagação	22
3.2.1. Meios de cultura para o cultivo <i>in vitro</i> de helicônias	23
3.2.2. Reguladores de crescimento	24
3.3. Problemas na cultura <i>in vitro</i>	26
3.3.1. Declínio de vigor.....	26
3.3.2. Necroses.....	26
3.3.3. Oxidação.....	26
3.3.4. Hiperhidricidade.....	27
3.4. Enraizamento	27
3.5. Aclimatização das plantas	28
3.6. Substratos	30
3.6.1. Vermiculita	31

3.6.2. Fibra de coco	31
3.6.2. Húmus de minhoca	32
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
CAPÍTULO I. DETERMINÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA PARA	
A MULTIPLICAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE <i>Heliconia chartacea</i> (Lane x Barreiros) var. Sexy	
Pink	46
Resumo	47
Abstract	48
1. INTRODUÇÃO	49
2. MATERIAL E MÉTODOS	50
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
4. CONCLUSÕES	58
5. AGRADECIMENTOS	58
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
CAPÍTULO II. DETERMINÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA PARA	
O ENRAIZAMENTO <i>IN VITRO</i> DE <i>Heliconia chartacea</i> (Lane x Barreiros) var. Sexy	
Pink	61
Resumo	62
Abstract	63
1. INTRODUÇÃO	64
2. MATERIAL E MÉTODOS	65
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
4. CONCLUSÕES	71
5. AGRADECIMENTOS	71
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
CAPÍTULO III. ACLIMATIZAÇÃO DE MUDAS MICROPROPAGADAS DE	
<i>Heliconia chartacea</i> (Lane x Barreiros) var. Sexy Pink	
Resumo	75
Abstract	76
1. INTRODUÇÃO	77

2. MATERIAL E MÉTODOS	79
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	81
4. CONCLUSÕES	88
5. AGRADECIMENTOS	88
6. BIBLIOGRAFIA CITADA	88
ANEXOS	91
ANEXO 1. Normas para publicação de artigos e comunicações científicas da revista PLANT CELL CULTURE & MICROPROPAGATION	92
ANEXO 2. Normas para publicação de artigos e comunicações científicas da revista ACTA AMAZONICA	99

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I.

Tabela 01: Tratamentos com sais de MS e três modificações nas suas concentrações, em associação com duas citocininas (BAP e TDZ), para a multiplicação *in vitro* de *Heliconia chartacea* var. Sexy Pink. Manaus - AM.51

Tabela 02: Tratamentos com três modificações nas concentrações de citocinina (BAP) e duas de água de coco, em delineamento experimental 3x2, para a multiplicação *in vitro* de *Heliconia chartacea* var. Sexy Pink. Manaus - AM.52

Tabela 03: Avaliações do número de brotações emitidas de três subculturas de *Heliconia chartacea* var. Sexy Pink. Manaus - AM.56

CAPÍTULO II.

Tabela 01. Massa fresca e seca da raiz e parte aérea do experimento de enraizamento com diferentes concentrações de sacarose. Manaus – AM.70

CAPÍTULO III.

Tabela 01. Tratamentos e proporções volumétricas das misturas dos substratos utilizados na aclimação de *Heliconia chartacea* var. Sexy Pink. Manaus – AM.....80

Tabela 02. Médias referentes à altura da planta (AP), diâmetro do pseudocaule (DC), número de folhas (NF), número de raízes (NR), comprimento da maior raiz (CRP) e comprimento da raiz secundária (CRS) de plantas aclimatizadas de *Heliconia chartaceae* var. Sexy Pink, 45 dias após transplântio. Manaus – AM.....84

Tabela 03. Médias referentes ao peso fresco das raízes (PFR), peso fresco da parte aérea (PFPA), peso seco das raízes (PSR) e peso seco da parte aérea (PSPA) de plantas aclimatizadas de *Heliconia chartacea* var. Sexy Pink, 45 dias após transplântio. Manaus – AM.....85

Tabela 04. Análise de nutrientes dos tecidos da parte aérea de plantas aclimatizadas de *Heliconia chartacea* (Lane x Barreiros) var. Sexy Pink.....87

LISTA DE FIGURAS

Figura 01. *Heliconia chartacea* (Lane x Barreiros) var. Sexy Pink.21

CAPÍTULO I

Figura 01: Médias de brotações emitidas após 45 dias de subcultivo. Tratamento 1: 3 mg L⁻¹ BAP; Tratamento 2: 0,25 mg L⁻¹ TDZ; Tratamento 3: 3 mg L⁻¹ BAP + MS modificado 1; Tratamento 4: 0,25 mg L⁻¹ TDZ + MS modificado 1; Tratamento 5: 3 mg L⁻¹ BAP + MS modificado 2; Tratamento 6: 0,25 mg L⁻¹ TDZ + MS modificado 2; Tratamento 7: 3 mg L⁻¹ BAP + MS modificado 03 e Tratamento 8: 0,25 mg L⁻¹ TDZ.....53

Figura 02: Médias do tamanho das brotações emitidas após 45 dias de subcultivo. Tratamento 1: 3 mg L⁻¹ BAP; Tratamento 2: 0,25 mg L⁻¹ TDZ; Tratamento 3: 3 mg L⁻¹ BAP + MS modificado 1; Tratamento 4: 0,25 mg L⁻¹ TDZ + MS modificado 1; Tratamento 5: 3 mg L⁻¹ BAP + MS modificado 2; Tratamento 6: 0,25 mg L⁻¹ TDZ + MS modificado 2; Tratamento 7: 3 mg L⁻¹ BAP + MS modificado 03 e Tratamento 8: 0,25 mg L⁻¹ TDZ.54

Figura 03: **a:** tratamentos 01 - 3 mg L⁻¹ BAP e 02 - 0,25 mg L⁻¹ TDZ após 45 dias de inoculação; **b:** tratamentos 03 - 3 mg L⁻¹ BAP + MS modificado 1 e 04 - 0,25 mg L⁻¹ TDZ + MS modificado 1; **c:** tratamentos 05 - 3 mg L⁻¹ BAP + MS modificado 2 e 06 - 0,25 mg L⁻¹ TDZ + MS modificado 2; **d:** tratamentos 07 - 3 mg L⁻¹ BAP + MS modificado 03 e 08 - 0,25 mg L⁻¹ TDZ55

CAPÍTULO II.

Figura 01. a: Tratamento testemunha – sem sacarose, setas indicam a formação de raízes; **b:** Tratamento 2 – 15 g L⁻¹ de sacarose; **c:** tratamento 3 – 30 g L⁻¹ de sacarose; **d:** tratamento 4 – 40 g L⁻¹ de sacarose; **e:** tratamento 5 – 60 g L⁻¹ de sacarose; **f:** Aspecto geral dos tratamentos.....66

Figura 02: Número médio de raízes emitidas de *Heliconia chartacea* var. Sexy Pink após 45 de subcultivo em meio MS/2 com diferentes concentrações de sacarose.....68

Figura 03: Comprimento médio da raiz primária de *Heliconia chartacea* var. Sexy Pink após 45 de subcultivo em meio MS/2 com diferentes concentrações de sacarose.....69

Figura 04: Comprimento médio da raiz secundária de *Heliconia chartacea* var. Sexy Pink após 45 de subcultivo em meio MS/2 com diferentes concentrações de sacarose.....69

CAPÍTULO III.

Figura 01. Porcentagem de sobrevivência de *Heliconia chartacea* var. Sexy Pink após 45 dias em casa de vegetação, em diferentes substratos. T1: Bioplant[®]; T2: Fibra de coco; T3: Fibra de coco + Bioplant[®]; T4: Fibra de coco + Húmus de minhoca; T5: Fibra de coco + Bioplant[®] + Húmus de minhoca e T6: Areia + Vermiculita.....82

Figura 02. Aspecto geral das mudas aclimatadas de *Heliconia chartacea* var. Sexy Pink após 45 dias nos substratos: T1: Bioplant[®]; T2: Fibra de coco; T3: Fibra de coco + Bioplant[®]; T4: Fibra de coco + Húmus de minhoca; T5: Fibra de coco + Bioplant[®] + Húmus de minhoca e T6: Areia + Vermiculita. Barra = 1 cm.....8

1. INTRODUÇÃO

O mercado brasileiro de flores que em sentido amplo, abrange o cultivo de plantas ornamentais, desde flores e folhas de corte e plantas envasadas, floríferas ou não, a produção de sementes, bulbos e mudas de árvores de grande porte cresce mais a cada ano. Para se ter uma idéia o crescimento anual do setor se dá na ordem de 12% a 15% ao ano, acima da média da economia nacional, com uma estimativa que em 2010, o setor tenha movimentado R\$ 3,8 bilhões (SEBRAE, 2010). Este é um setor altamente competitivo, que exige a utilização de tecnologias avançadas além de profundo conhecimento técnico pelo produtor para que ele possa ter um sistema eficiente de produção, distribuição e comercialização (Zini, 2005).

As plantas ornamentais tropicais se diferenciam pela sua beleza, que encantam tanto através das suas formas exóticas, como pela variação de cores. Apresentam um efeito paisagístico podendo ser usadas em parques, jardins, ou comercializadas em vasos, como flores e folhagens de corte. Neste aspecto, as helicônias são plantas ornamentais que, promovem verdadeiras esculturas, lembrando em sua forma pirâmides, bicos de aves, cascatas de flores, pinhais ou cachos de banana. Tropicais e exóticas, as helicônias constituem uma das maiores riquezas da nossa flora. Exuberantes, coloridas, com formas inusitadas, elas são apreciadas no mercado internacional também por sua durabilidade e pela capacidade de mesmo sozinhas, gerar composições surpreendentes (Rocha, 2007).

A floricultura no Brasil apresenta uma área cultivada estimada em 8,4 mil hectares, crescendo a cada ano devido ao vigor do mercado interno e das exportações que giram em torno de US\$ 35 milhões em vendas anuais, ou o equivalente a 2,7% do valor da produção com crescentes embarques para Holanda, EUA, Japão, Espanha e França, e mais outros 30 diferentes destinos em todo mundo (Junqueira & Peetz, 2008). Neste contexto estão envolvidos 5.152 produtores, em toda a cadeia produtiva, são gerados 120 mil empregos, dos quais 58 mil estão localizados na produção. A produção é desenvolvida em pequenas propriedades, cuja média nacional de área cultivada é de 3,5 hectares (Junqueira & Peetz, 2008).

A demanda por flores de helicônia tem sido crescente e esta flor, a cada dia, mais e mais se fixa no mercado. Os principais mercados produtores estão localizados nos seguintes Países: Filipinas, Tailândia, Jamaica, Havaí, Costa Rica, Venezuela, Equador e Colômbia. Os

principais mercados importadores são: Estados Unidos, Canadá, Comunidade Européia e Japão. A oferta do produto se dá durante todo ano, mas o pico desta oferta ocorre entre os meses de outubro a abril, nas condições do nordeste brasileiro. Dentre as flores ornamentais tropicais destaca-se a *Heliconia chartacea* var. Sexy Pink, que apresenta as características de um mercado cada vez mais exigente com sua forma e coloração altamente atrativa e uma excelente durabilidade pós colheita.

Para a obtenção de mudas em quantidade suficiente para atender a um mercado cada vez mais exigente, faz-se necessário a utilização de novas tecnologias como a cultura de tecidos, cuja técnica de micropropagação permite a obtenção de mudas em larga escala, com alta qualidade fitossanitária, livre de fungos, bactérias, principalmente vírus e nematóides além de permitir a uniformidade do material vegetal e sem os riscos de disseminação de pragas e doenças que são transmitidas e intensificadas entre plantios sucessivos no solo, via rizomas contaminados (Torres *et al.*, 2005; Nathan *et al.*, 1992). Uma etapa fundamental na produção de mudas obtidas por cultura de tecidos é a aclimatização, uma vez que, as condições de cultura *in vitro* modificam características bioquímicas, anatômicas e morfológicas das plantas, alterando os processos fisiológicos normais (Lucas *et al.*, 2002). Neste contexto, a aclimatização das mudas micropropagadas torna-se uma fase crucial, pois propicia a regeneração efetiva de plantas de elevada qualidade genética e fitossanitária (Hoffmann, 2002). A maior dificuldade encontrada neste processo é a superação das dificuldades que as plântulas enfrentam ao mudarem de ambiente, porque estas plântulas passam de um ambiente de baixa transpiração para um ambiente onde elas terão de controlar as trocas gasosas o que pode causar estresse hídrico.

Considerando a importância das helicônias e as vantagens das técnicas aplicadas ao cultivo *in vitro*, torna-se necessária a realização de estudos mais detalhados e específicos para *Heliconia chartaceae* var. Sexy Pink, para viabilizar a micropropagação afim de que se consiga a produção massal, uma fase de enraizamento para dar suporte a planta para a fase de aclimatização e a aclimatização propriamente dita para esta variedade se desenvolva, nas condições ambientais de Manaus, Amazonas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Determinar a composição do meio de cultura para a multiplicação, enraizamento *in vitro* e as condições de aclimatização de plantas de *Heliconia chartacea* (Lane x Barreiros) var. Sexy Pink.

2.2. Objetivos específicos

Determinar a concentração ideal de auxinas e/ou citocininas na obtenção de brotações de *H. chartaceae* var. Sexy Pink em condições de cultura *in vitro*;

Verificar o efeito de diferentes concentrações de sacarose no enraizamento *in vitro* de brotações *H. chartaceae* var. Sexy Pink micropropagadas;

Avaliar a eficiência de diferentes substratos na aclimatização de mudas de *H. chartacea* var. Sexy Pink.

3. REVISÃO DE LITERATURA

O setor de floricultura vem crescendo e a partir de 1992, ocorrendo um crescimento nas exportações de 515% (Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior e do Instituto Brasileiro de Floricultura). Os dados do Instituto mostram que o principal tipo de produto exportado são as mudas de plantas ornamentais. O mundo está cada vez mais florido, cultivando plantas e flores ornamentais, com uma estimativa que em 2010, o setor tenha movimentado R\$ 3,8 bilhões (SEBRAE, 2010). No Brasil, o cultivo de flores tropicais é realizado, principalmente, nos estados de Pernambuco, Alagoas, Ceará, Bahia, Sergipe, Pará, Amazonas, Rio de Janeiro, São Paulo e no Distrito Federal. Na região Nordeste destacam-se os estados de Pernambuco, Alagoas e Ceará que atuam como principais exportadores de flores tropicais (Junqueira & Peetz, 2008). Esta peculiaridade pode ser explicada pelas condições climáticas favoráveis e pela facilidade de exportação aliada a proximidade em relação a posição geográfica dos centros consumidores como a Europa e os Estados Unidos (Bezerra, 1997). O estado de Pernambuco apresenta uma área de produção de flores tropicais em torno de 54,03 hectares, responsável por 28,67% do total da floricultura do estado e tem apresentado nos últimos anos uma ampliação em área plantada (SEBRAE, 2005).

Os principais municípios produtores de flores tropicais em Pernambuco são: Ribeirão, Primavera, Paulista, Água Preta, Camaragibe, Paudalho, São Lourenço da Mata, Jaboatão dos Guararapes, Barra de Guabiraba e Petrolina. No âmbito nacional, o estado comercializa 70% das flores tropicais. A produção é destinada para floriculturas, buffets, funerárias, decoradores e público em geral (Castro, 2007).

Hoje, o Brasil exporta para aproximadamente 30 países, sendo a Holanda o maior comprador. Os Estados Unidos vêm em segundo lugar no ranking dos importadores. Itália, Canadá, Espanha, Alemanha e México são alguns dos outros principais compradores. "Ainda há muitos mercados para se explorar, entre eles, os países árabes", diz Léa Lagares, coordenadora nacional de floricultura do Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas (SEBRAE, 2005). Em decorrência da expansão dos pólos de comercialização de flores, o mercado está cada vez mais motivado pela divulgação da beleza e da exotividade dos países tropicais. Segundo Oliveira (1995), o Brasil por sua vez, vem se destacando principalmente pela sua aptidão para flores tropicais em especial, as helicônias.

As plantas ornamentais se diferenciam pela sua beleza, que encantam tanto através das suas formas exóticas, como pela variação de cores. Apresentam um efeito paisagístico que podem ser usadas em parques, jardins, ou comercializadas em vasos, como flores, folhagens e minifrutos de corte. Neste aspecto, as helicônias são plantas ornamentais que, promovem verdadeiras esculturas, lembrando em sua forma pirâmides, bicos de aves, cascatas de flores, pinhais ou cachos de banana. Tropicais e exóticas, as helicônias constituem uma das maiores riquezas da nossa flora. Exuberantes, coloridas, com formas inusitadas, elas são apreciadas no mercado nacional e internacional também por sua durabilidade e pela capacidade de mesmo sozinha, gerar composições surpreendentes.

O cultivo de helicônia ainda é frequentemente realizado através de mudas propagadas vegetativamente. Essa forma de propagação, além de ser muito lenta, ainda pode disseminar patógenos capazes de provocar perdas significativas das mudas e cosequentemente inflorescências. Portanto, essa forma de obtenção das plantas muitas vezes inviabiliza a produção de mudas em quantidade e em qualidade suficientes para atender a um mercado consumidor crescente e cada vez mais exigente.

Nesse contexto, a micropropagação apresenta-se como uma alternativa viável para a produção de mudas de helicônia. Esta técnica consiste na aplicação de cultura de tecidos na reprodução assexuada de plantas visando à obtenção de indivíduos geneticamente idênticos.

Esta aplicação normalmente baseia-se na obtenção de plântulas, em tubos de ensaio ou frascos de vidro, a partir de órgãos, tecidos ou células, tais como: meristema apical, folhas, cambio, raiz, pólen, etc. (Torres *et al.*, 1998), permitindo a obtenção de plantas em escala comercial, com elevada qualidade genética e fitossanitária e em curto espaço de tempo.

3.1. O gênero *Heliconiaceae*

3.1.1 Generalidades

As helicônias são plantas ornamentais, cujo nome do gênero foi escolhido com referência ao Monte Helicon, na região da Beócia, Grécia, local onde, segundo a mitologia grega, residiam Apolo e suas musas.

As helicônias são plantas nativas dos trópicos do continente americano, na região compreendida entre o Trópico de Câncer no México Central e o Trópico de Capricórnio na América do Sul, incluindo o Caribe (Berry & Kress, 1991). Segundo Lamas (2003), o gênero *Helicônia* ocorre em altitudes que variam entre 0 e 2.900 metros, em locais sombreados, como

florestas e matas ciliares, ou a pleno sol, como bordas de florestas, clareiras e beira de estradas (Anderson, 1989 citado por Castro & Graziano, 1997) sendo sua preferência por locais úmidos, onde se desenvolvem bem (Lamas 2004).

As plantas têm tamanho variável, podendo alcançar até 12 m de altura, conforme a espécie. Crescem através de rizomas subterrâneos, que emitem brotações à superfície. Estes brotos podem ser solitários ou agregados, o que caracteriza a capacidade de disseminação de cada espécie. Cada planta é composta por um pseudocaule, as folhas e uma inflorescência. As folhas são compostas por um pecíolo e uma lâmina em um único plano, em disposição dística.

As plantas mostram diferentes hábitos de crescimento, o que facilita o reconhecimento das diferentes espécies (Lamas, 2004). São três os hábitos de crescimento das helicônias: (1) Musóide – as folhas têm pecíolos grandes, em posição vertical tomando a aparência das musas; (2) Zingiberoíde – as folhas têm pecíolo curto e se dispõem de forma mais horizontal, tomando aparência de gengibre; (3) Canóide – as folhas apresentam pecíolos curtos e médios e se dispõem em posição oblíqua, e tem a aparência dos gêneros *Canna* e *Alpínia*.

Suas principais qualidades ornamentais estão na beleza e na exotividade das flores e de seus componentes que as tornam muito vistosas, com um intenso e exuberante colorido que, na maioria das vezes, possui tonalidades contrastantes, além da rusticidade e da boa resistência, tendo grande durabilidade após a colheita e do corte de suas flores.

3.1.2 Classificação taxonômica

As Helicônias pertencem à família Heliconiaceae e gênero *Heliconia*. O nome do gênero foi estabelecido por Linnaeus, em 1771, numa alusão ao Monte Helicon na Beócia, local onde viviam Apolo e as Musas, segundo a mitologia Grega (Castro, 1995).

Embora existam controvérsias entre diferentes autores, são classificadas mais de 250 espécies de Helicônias, além de serem conhecidos alguns híbridos naturais e formas distintas de uma mesma espécie (Lamas, 2002).

3.1.3 Descrição botânica das Heliconiaceas:

De acordo com o fascículo da Flora Ilustrada Catarinense que trata da família das Heliconiáceas as Helicônias caracterizam-se por possuir:

- **INFLORESCÊNCIAS** pedunculadas ou sésseis; terminais ou, muito raramente laterais; eretas ou pêndulas; constituídas por cimeiras escorpióides ou helicóides; compostas de fascículos pauci ou multifloros; protegidas por brácteas variadamente coloridas, cimbiformes ou lanceolado-conduplicadas, de base amplexante ou não; geralmente perenes; muito raramente caducas; a mais inferior fértil ou estéril, com o ápice apenas aguçado ou foliáceo em vários graus.

- **RAQUE** escorpióide ou helicoidal, mais raramente quase reta, glabra ou pilosa, totalmente coberta pelas bases das brácteas ou com entrenós aparente em diversos graus;

- **BRACTÉOLAS** translúcidas ou opacas, brancas, amarelas, rosadas ou cor de palha, plana ou cimbiformes, glabras ou variadamente pilosas, raro reduzidas à nervura mediana.

- **FLORES** pediceladas ou subsésseis, hermafroditas, zigomorfas, brancas, esverdeadas ou amarelas até vermelhas, total ou parcialmente inclusas nas brácteas.

- **PERIANTO** reto, curvo ou geniculado, glabro ou variadamente piloso.

- **SÉPALOS** em geral carenados, livres apenas no ápice ou o dorsal livre em vários graus, ereto ou reflexo.

- **PÉTALOS** livres apenas no ápice, estames cinco com filetes de base alargada, aderentes à base dos pétalos, retos ou geniculados, glabros, anteras lineares, longitudinalmente deiscentes.

- **ESTAMINÓDIO** linear, lanceolado ou oblongo, de ápice obtuso até variadamente aguçado, de margem inteira micrópila delimitada por um opérculo por onde sai a radícula, raramente com apêndices;

- **ESTILETE** triquetro, estigma capitato com 6 a 8 fendas.

- **OVÁRIO** ínfero, 3-locular, 3-carpelar, 1-ovulado por lóculo, com o ápice truncado e marcado pela cicatriz deixada pela queda do perianto, glabro ou variadamente piloso.

- **FRUTO** drupa trispérmica, às vezes menos por aborto, trígona até um tanto globosa.

- **SEMENTES** de superfície geralmente mamelonada, com a germinação; embrião reto, basal e envolvido por endosperma farináceo.

- **PLANTAS** herbáceas, de aspecto musóide (pecíolos longos e afastados do pseudocaule), canóide (pecíolos curtos) ou pseudocanóide (pecíolos longos, porém aproximados do pseudocaule), rizomatosas, com pseudocaule formado pelas bainhas das folhas.

- **FOLHAS** geralmente dísticas, raro espiraladas, curtas ou longo pecioladas, lâminas oblongas a lanceoladas com inúmeras variações intermediárias, de base cuneada, truncada,

atenuada ou arredondada, geralmente inequilátera e ápice agudo, acuminado ou caudado, margens inteiras ou fendidas em vários graus, pruinosas ou não.

2.1.4. Propagação das helicônias

As helicônias são plantas que podem ser propagadas sexuadamente via semente ou assexuadamente. A propagação sexuada de helicônia é limitada, sendo que o tempo de desenvolvimento da planta pode demorar de um a dois anos (Lamas, 2004), pois o fruto apresenta um endocarpo duro que dificulta a germinação das sementes. Esta limitação pode ser contornada pela utilização da técnica de resgate de embriões zigóticos, que propicia uma propagação rápida, recuperação de plantas livres de doenças, conservação e intercâmbio de germoplasma, introdução de germoplasma como semente botânica e a superação da dormência de sementes (Torres *et al.*, 2005).

Na propagação assexuada ou por via vegetativa ocorre a divisão do rizoma e emissão de brotações à superfície, podendo ser solitárias ou agregadas (Mosca *et al.*, 2004). Esse método tem a desvantagem de poder conduzir à disseminação e ao acúmulo de agentes causais de doenças que são transmitidas e intensificadas entre plantios sucessivos, via rizomas contaminados (Torres *et al.*, 2005). Para minimizar esse risco, é necessária a utilização de ferramentas bem afiadas, salientando-se que o procedimento de desinfecção das ferramentas, entre o uso de uma touceira para outra, deve ser observado, e que antes de transplantar os rizomas devem ser desinfetados com inseticida, nematicida, fungicida e bactericida ou banhado em solução de hipoclorito de sódio. Esta prática contribui para se evitar possíveis danos com nematóides, insetos, fungos e bactérias.

No método comercial, segundo Criley, 1988, as plantas matrizes, que irão fornecer os rizomas, devem apresentar características tais como: produtividade, vigor e sanidade. Um rizoma ideal é aquele que tem pelo menos três gemas e, dependendo da época do ano, pode ser plantado diretamente no campo ou em sacos plásticos, sendo preferencialmente sob irrigação e sombreamento entre 30 e 60%, para facilitar o enraizamento (Lamas, 2004).

Atualmente, a propagação por culturas de meristemas é a forma mais adotada na multiplicação de plantas em larga escala, para fins comerciais. Neste tipo de multiplicação, também conhecida por micropropagação, clonagem ou cultura de tecidos, as novas plantas são obtidas a partir de um grupo de células (meristema). A principal vantagem desse tipo de propagação é a obtenção de mudas uniformes, com alta qualidade, em grande quantidade,

num tempo relativamente curto e total ou parcialmente livre de doenças. Portanto, a micropropagação possibilita a obtenção de plantas em quantidade e qualidade, de maneira a atender um mercado consumidor crescente e, cada vez mais exigente (Paula, 2000)

3.1.5 Aspectos bioclimáticos e ecofisiológicos

3.1.5.1. Luminosidade

As helicônias, dependendo da espécie, podem ser cultivadas em pleno sol ou em locais sombreados. Cada espécie tem diferentes necessidades de iluminação, porém, em geral, pode-se dizer que preferem a luz direta do sol ou sombra parcial. Os cultivos em sol pleno necessitam de mais água e fertilizantes (macro e microelementos).

Segundo Kress *et al.*(1999), a diminuição da luz solar pode baixar de forma considerável a produção de inflorescências. Por exemplo, quando se cultiva *H. psittacorum* a sol pleno e com boa fertilização, estas chegam a produzir 130 inflorescências/mês/ano; se for reduzida em 37% a insolação, em média, somente produzir-se-á 35 inflorescências/mês/ano.

Espécies como alguns cultivares de *H. bihai* e *H. stricta*, *H. psittacorum* e *caribea* podem ser cultivadas a sol pleno, outras como *H. orthotricha*, *H. xantovillosa*, *H. stricta*, *H. chartaceae* preferem sombreamento entre 30 e 50%.

Para o plantio de espécies que requerem sombreamento devem-se plantar de forma intercalada árvores para esta finalidade. As espécies mais recomendadas são: gliricidia (*Gliricidia sepium*), sombrero (*Clitoria racemosa*), samam (*Pithecolobium saman*); ingá (*Inga spp*); ou qualquer outro tipo de árvore que não venha competir por nutrientes e luminosidade com a helicônia.

3.1.3.2. Temperatura e umidade

A faixa de temperatura está relacionada com a altitude na qual cresce naturalmente cada espécie e situa-se entre 14 e 34 °C (Kress *et al.*, 1999). O ideal é temperatura média que oscile na faixa dos 21°C noturna e 26°C diurna. A umidade relativa do ar deve estar entre 60 e 80%.

3.1.3.3. Solos e adubação

As helicônias crescem em qualquer tipo de solo, quer seja argiloso ou arenoso, mas o solo ideal deve ser rico em matéria orgânica, profundo, poroso e bem drenado.

O pH ideal para cultivo deve estar na faixa de 5,0 a 6,5.

Quando do plantio, a adubação orgânica deve ser observada, pois se tratam de plantas oriundas de extratos de floresta úmida onde a compostagem orgânica natural se faz presente.

A fertilização, como em todas as plantas cultivadas, deve-se basear em análise de solo ou foliar.

As recomendações de adubação mineral das helicônias apresentam uma grande variação. Há registros de cultivos comerciais usando relações de NPK nas proporções 1:1:1, 1:2:2, 3:1:2, 3:1:5 e 2:1:1 (Ball, 1986; Criley, 1990; Criley & Broschat, 1992; Clemens & Morton, 1999).

Semelhante a outras culturas floríferas, as helicônias em cultivo, geralmente, requerem grandes quantidades de macroelementos, particularmente nitrogênio (Criley & Broschat, 1992). No Nordeste do Brasil, inicialmente era recomendado que, a cada quatro meses, fosse efetuada adubação com esterco de curral bem curtido (15 Kg por cova) e com NPK 10- 10-10 (400 g/m²), 4 a 5 vezes por ano, aplicada em superfície (Lamas, 1998).

Ultimamente, vem sendo recomendada a adubação com NPK 14:28:14, 150 g/cova, com replicações trimestrais de 15:5:15 + micronutrientes, 200 a 300 g/planta (Lamas, 2002).

Também a adubação foliar com fertilizantes formula completa 20-20-20 + micro ou 20-20-20 + 2 de Mg é recomendada. As formulações foliares podem ser na forma de quelatos, aminoácidos ou metalosatos, o importante é que sejam fertilizantes de alta solubilidade e qualidade comprovada.

Outro aspecto que afeta o crescimento e o florescimento é a taxa de intensidade luminosa. Sob um sombreamento de 63%, por exemplo, a luz torna-se um fator limitante para o cultivo comercial, mesmo que a fertilização seja aumentada, não ocorrerá aumento de produção de inflorescências (Donselman & Broschat, 1986).

3.1.5.4. Nutrição mineral de plantas

A absorção de nutrientes é realizada pela planta para suprir as necessidades de seu metabolismo, que compreende os processos pelos quais estes nutrientes serão utilizados para seu crescimento e manutenção (Epstein & Bloom, 2006).

De acordo com Mengel *et al.* (2001) um elemento é dito essencial se na sua ausência a planta tiver seu ciclo vital impedido, se for constituinte ou metabólito essencial para a planta ou se não puder ser substituído por outro elemento.

Os nutrientes podem ainda ser classificados como macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg e S), exigidos em maior quantidade ou micronutrientes (B, Cl, Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Se e Zn) se exigidos em quantidades menores. Os macros e micronutrientes exercem funções específicas na planta, embora em uma ou outra função possa haver algum tipo de substituição entre estes nutrientes. Com exceção do C, H e O, os vegetais adquirem seus nutrientes na forma de íons inorgânicos (Fanti & Peres, 2003), e normalmente são absorvidos diretamente da solução do solo.

3.1.5.4.1. Nutrição e crescimento

O crescimento das plantas depende de variáveis do ambiente como temperatura, intensidade de luz, disponibilidade de água e nutrientes essenciais. Um dos mecanismos de ajuste ao desbalanço nutricional, por exemplo, é a alocação de biomassa para órgãos que estão envolvidos na aquisição de nutrientes (Hermans *et al.*, 2006).

A nutrição mineral influencia as trocas gasosas por meio dos efeitos sobre a morfogênese, isto é, crescimento, tamanho e estrutura das folhas, dos ramos e, sobretudo, o tempo de duração da folha. Os elementos minerais são componentes integrantes de enzimas, pigmentos e ativadores diretos do processo fotossintético (Larcher, 2000).

O crescimento vegetal pode ser estudado através de medidas de diferentes tipos: lineares, superficiais, peso e número de unidades estruturais. As medidas superficiais estão relacionadas à determinação da superfície fotossinteticamente ativa. As folhas constituem os principais órgãos vegetais responsáveis pela fotossíntese, podendo a determinação da superfície das lâminas foliares serem estimada por meios diretos e indiretos (Benicasa, 1988).

A área foliar pode ser usada como medida de crescimento para avaliar a resposta da planta a fatores ambientais e a técnicas culturais (Pinto *et al.*, 2005). O número de perfilhos

emitidos por touceira pode ser usado para avaliar o desenvolvimento da planta, visto que está diretamente relacionado com a produção de hastes florais. A redução no número de perfis também está relacionado com a competição entre as plantas (Criley *et al.*, 2001).

3.1.5.4.2. Avaliação do estado nutricional

Os estresses abióticos e, dentre estes, os estresses nutricionais, estão relacionados com o desencadeamento de grande variedade de respostas nas plantas (Cabraia, 2005).

Em muitas plantas, a deficiência nutricional, além de reduzir o acúmulo de fotoassimilados, pela diminuição do número de folhas e da área foliar, afeta também o desenvolvimento e a durabilidade de flores e frutos. A caracterização do desenvolvimento das folhas e dos sintomas de deficiência pode auxiliar na diagnose de desordens nutricionais e na diferenciação de danos causados por patógenos, danos químicos ou outros tipos de estresse (Yeh *et al.*, 2000).

Diagnosticar o estado nutricional das plantas é conhecer e avaliar as suas condições sob o aspecto da nutrição mineral. O manejo preciso da adubação beneficia o meio ambiente, por diminuir os níveis de acidificação do solo, eutroficação das águas, poluição do lençol freático e salinização de áreas.

Os produtores e consumidores se beneficiam com maior produtividade e qualidade (Fontes, 2001). O estado nutricional da planta pode ser determinado utilizando-se procedimentos diretos e indiretos. Os procedimentos indiretos estimam a concentração de um nutriente por meio de uma característica cujos valores possam ser correlacionados com as concentrações do nutriente na planta. Os procedimentos diretos são aqueles em que a concentração aparente (análise visual) e/ ou real (análise da massa seca) é determinada. A análise da massa seca da folha através de procedimentos químicos é denominada análise foliar (Fontes, 2001).

A avaliação do estado nutricional, por meio de diagnose visual, consiste em comparar o aspecto da amostra em questão com uma amostra padrão (Miyavawa *et al.*, 1999). Se houver falta ou excesso de determinado elemento isto será refletido no aspecto anormal e visível da planta em relação a uma planta típica (Epstein & Bloom, 2006). É importante salientar que, mesmo antes de apresentar sintomas visíveis de deficiência, a planta pode estar com carência, que pode gerar comprometimento no desenvolvimento e na produção, denominada fome oculta (Malavolta, 2006).

O custo reduzido e a rapidez do diagnóstico são vantagens do método visual. Além disso, pode ser realizado no campo, não necessitando de equipamentos sofisticados. Entretanto, sintomas visuais de toxidez e deficiência observados no campo são difíceis de serem interpretados devido à interferências e interações diversas. Na maioria das vezes só é possível diagnosticar sintomas que ocorrem de forma aguda, quando já houve comprometimento do plantio (Fontes, 2001).

A análise foliar envolve secagem da amostra em estufa de ventilação forçada, seguida de mineralização com ácido forte e altas temperaturas para posterior dosagem do nutriente. É uma importante ferramenta no processo de avaliação do estado nutricional da planta e pode ser realizada com muitos objetivos: confirmar a diagnose visual de sintomas de deficiência ou toxidez; identificar “fome oculta”; verificar se o nutriente aplicado ao solo foi absorvido pela planta; caracterizar a concentração dos nutrientes nas plantas ao longo dos anos, entre outros (Malavolta *et al.*, 1997).

A observação de teores nas plantas muitas vezes é realizada em folhas totalmente expandidas e jovens, uma vez que nestas ocorre alta atividade metabólica, superior à de folhas mais velhas (Rodrigues, 2003), sendo, portanto, indicadora ideal do estado nutricional em várias culturas. Boaretto *et al.* (1999), Fontes (2001) e Malavolta, (2006) apresentam muitos exemplos de seleção das folhas, como tecido escolhido, para amostragem em trabalhos de nutrição. Malavolta (2006), entretanto, ressaltou que, se é a folha o tecido que melhor reflete o estado nutricional da planta, não é qualquer folha, que se presta para este propósito. Como regra, deve-se escolher para análise uma folha recém madura numa determinada época da vida da planta.

Embora, de um modo geral, as deficiências se expressem da mesma forma em várias plantas, o sintoma de carência de um determinado nutriente pode diferir muito de uma espécie para outra. Por isso torna-se necessário um estudo prévio a respeito da cultura (Borges *et al.*, 1997).

Antes do diagnóstico de deficiência ou de toxidez de nutrientes nas plantas, é necessário excluir possíveis manifestações de fatores bióticos e abióticos que estejam induzindo padrões de danos similares e ou, confundindo com sintomas típicos de deficiência ou toxidez. Dentre os principais fatores, podem ser citados: a falta ou excesso de água, temperatura baixa, vento, incidência de pragas e doenças, compactação do solo, danos mecânicos, solos mal preparados e toxidez de herbicidas (Borges *et al.*, 1997; Fontes, 2001).

A localização dos sintomas de carência nas folhas, novas ou velhas depende da mobilidade do nutriente na planta, que pode ser alta, intermediária ou baixa. Os sintomas de

deficiências aparecem primeiro nas folhas velhas se os elementos forem de alta mobilidade, e nas folhas novas, se os elementos forem de baixa mobilidade. Caso o elemento seja intermediário, a manifestação dos sintomas poderá ocorrer nas folhas novas ou velhas, dependendo de fatores como grau de deficiência, taxa de crescimento da planta e espécie (Fontes, 2001). São considerados elementos de alta mobilidade: nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), magnésio (Mg), cloro (Cl), sódio (Na) e enxofre (S); intermediária: zinco (Zn), cobre (Cu), molibdênio (Mo), ferro (Fe) e boro (B) baixa: cálcio (Ca) e manganês (Mn) (Marschner, 1995).

3.1.5.4.3. Deficiência nutricional de macronutrientes

Sintomas de deficiência nutricional em plantas é a expressão de distúrbios metabólicos resultantes do suprimento insuficiente de um elemento. Estas alterações estão relacionadas com as funções desempenhadas pelos elementos no metabolismo da planta (Taiz & Zeiger, 2004).

Nitrogênio (N)

O N é um elemento mineral requerido pelas plantas, em grandes quantidades, mais do que qualquer outro (Ewel, 2006). Tem função estrutural no vegetal, pois faz parte de muitos componentes da célula, como proteínas, bases nitrogenadas, ácidos nucléicos, enzimas, coenzimas, vitaminas e pigmentos e participa de processos como absorção iônica, fotossíntese, respiração, multiplicação e diferenciação celular. E, quanto a sua participação na formação e na qualidade da colheita, estimula a formação e o desenvolvimento de gemas floríferas (Malavolta, 2006).

O papel de N na produtividade das culturas está associado a fotossíntese, onde a energia física dos fótons é convertida em energia química da adenosina trifosfato (ATP) e reduzida a intermediários metabólicos como nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato-oxidado (NADPH), que é usado na síntese de carbono e assimilados nitrogenados, de diferentes tipos, particularmente carboidratos e aminoácidos. A rápida taxa de assimilação de CO² requer grandes quantidades de vários componentes dos cloroplastos, particularmente a luz coletada pelo complexo clorofila - proteína (LHCP), transporte de elétrons e componentes

redutores de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADH^+) dos tilacóides e a enzima ribulose bifosfato carboxilase oxigenase (Rubisco) além de outras enzimas requeridas para a assimilação de CO_2 , no estroma (Lawlor, 2002).

A deficiência de N inibe rapidamente o crescimento vegetal, provoca clorose nas folhas, sobretudo nas mais velhas, reduz a produção de folhas e dos perfilhos, diminui a área foliar (Lawlor, 2002) e conseqüentemente a superfície para absorção de luz para fotossíntese, diminui o teor de clorofila e atividade da Rubisco, que gera baixas taxas de fotossíntese (Taiz & Zeiger, 2004; Cechin & Fumis, 2004; Hermans *et al.*, 2006). Em algumas espécies a carência de N pode acarretar deformações nos frutos, como por exemplo, no abacaxi (Chitarra & Chitarra, 2005).

Teores adequados de N na nutrição da planta constituem um dos fatores que mais influenciam a produtividade em plantas ornamentais, e têm também um forte efeito na pós-colheita (Druege, 2001).

O N absorvido é facilmente distribuído na planta pelo floema, na forma de aminoácidos. Quando a reserva é insuficiente, o N das folhas velhas é disponibilizado para as folhas mais novas e outros órgãos, devido à sua mobilidade (Batista *et al.*, 2003). A clorose está associada à menor produção de clorofila (Malavolta *et al.*, 1997). Ocorre um grande impacto sobre o tamanho, a composição e a função dos cloroplastos que, quando comparado com os de uma planta bem suprida de N, são menores e achatados, com menos membranas tilacóides e maior proporção de estroma (Lawlor, 2002).

A deficiência de N pode resultar em acúmulo de açúcares e amido. Ainda não está elucidado o que causa este acúmulo de açúcares, no entanto, estudos apontam para mudanças transcricionais, que ocorrem quando as plantas são expostas a condições de estresse nutricional. A redução da fotossíntese, em plantas deficientes em N, é provavelmente uma conseqüência do acúmulo de açúcar, que afeta a expressão de proteínas que são reguladas por genes específicos (alta afinidade), associados ao metabolismo e requeridos na fotossíntese e exportação de fotoassimilados (Hermans *et al.*, 2006).

Fósforo (P)

O P é um componente integral de compostos como ésteres de carboidratos, fosfolipídios, coenzimas e ácidos nucléicos (Raghothama & Karthikeyan, 2005). Está

envolvido em processos de armazenamento e transferência de energia e fixação simbiótica do N. Este nutriente está relacionado com a formação rápida de raízes, maturação acelerada de frutos, aumento da frutificação e do teor de carboidratos, óleos, gorduras e proteínas. Em muitas espécies, este é um nutriente bastante exigido na floração. Sob sua deficiência, a planta retarda a sua emissão de flores (Malavolta, 2006).

A deficiência de P pode produzir folhas amareladas como resultado da proteólise. Ângulo agudo entre caules e folhas, dormência de gemas laterais, redução do perfilhamento, senescência precoce e folhas menores podem ocorrer devido ao menor número de células (Malavolta, 2006).

Primeiramente, a limitação deste nutriente reduz a assimilação de CO² na fotossíntese, só então, após um período variável, diminui a produção de biomassa, reduz a fotossíntese e a condutância estomática (Fujita *et al.*, 2003). De modo geral, os aspectos citológicos e metabólicos mais relevantes em plantas deficientes em P são a ocorrência de núcleos e cloroplastos pequenos, redução na síntese protéica, alto conteúdo de açúcares e alta pressão osmótica (Malavolta, 2006).

A combinação de uma eficiente absorção e translocação de P é essencial para manutenção dos níveis de P nas células, suficientes para garantir o metabolismo regular da planta. A absorção de P pelas plantas é influenciada pelo suprimento deste elemento pelas raízes através de fluxo de massa e difusão que pode variar em função da geometria e tamanho da raiz, da concentração de P na superfície da raiz e da competição entre raízes (Raghothama & Karthikeyan, 2005).

Evidências apontam a presença de transportadores, que operam, em alta ou baixa concentração de P no meio. O sistema de transporte de baixa afinidade se expressa normalmente nas plantas e o sistema de alta afinidade é fortemente expressado durante a deficiência de P, ou seja, a aquisição de P pelas plantas aumenta significativamente sob sua deficiência. Este aumento parece ser regulado, pelo menos em parte, quando se dá o acúmulo de proteínas (transportadoras de P), nas camadas epidérmicas de plantas deficientes, que aumentam a transcrição de genes, responsáveis pela absorção de P (Raghothama & Karthikeyan, 2005).

A limitação de P diminui a concentração de N e existem várias possibilidades que podem justificar esta diminuição (De Groot *et al.*, 2003). Entre as possibilidades destacam-se, a mudança da massa seca de órgãos com alta concentração de N para órgão com baixa concentração de N; inibição da absorção de N como resultado do acúmulo de N nas raízes;

decréscimo na disponibilidade de energia, devido a uma diminuição do crescimento radicular e/ou concentração de ATP (De Groot *et al.*, 2003).

Os níveis de citocininas também diminuem sob a omissão de P. E isso causa uma diminuição na atividade da enzima nitrato redutase e na rede de síntese protéica, sugerindo que as citocininas estejam envolvidas na regulação dos efeitos gerados pela limitação de P, absorção e concentração de N. Além disso, a expressão protéica de genes ligados a regulação de P pode ser reprimida pelo desbalanço dos níveis de citocinina (Gniazdowska & Rychter, 2000).

Potássio (K)

O crescimento da maioria das culturas é significativamente inibido pela deficiência de K, pois este elemento é vital para muitos processos fisiológicos, como osmorregulação (Zhao *et al.*, 2001; Pervez *et al.*, 2004), fotossíntese e transpiração (Ashraf *et al.*, 2001).

A extrema mobilidade do K dentro da planta inteira é uma consequência da permeabilidade da membrana. O transporte e redistribuição são, freqüentemente, em direção aos tecidos mais jovens, sendo esta característica importante em vários processos fisiológicos influenciados por K, como o crescimento meristemático e o transporte à longa distância (Mengel *et al.*, 2001).

O K é muito importante para o balanço hídrico da planta, pois a absorção de água nas células e tecidos é consequência da absorção ativa deste elemento. O adequado conteúdo de K em tecidos jovens é indispensável para a obtenção do turgor ótimo das células, que é requerido para expansão da célula. Além disso, a abertura e o fechamento dos estômatos dependem do fluxo de K (Mengel *et al.*, 2001).

A deficiência deste nutriente está associada com o baixo conteúdo de clorofila, restrita translocação de sacarídeos, bem como limitada condutância estomática. Em plantas com deficiência em K, pode ocorrer o acúmulo de compostos nitrogenados solúveis (Epstein & Bloom, 2006; Zhao *et al.*, 2001).

Em algumas espécies, o acúmulo de açúcares nas folhas está relacionado com a reduzida entrada de açúcar no transporte ou decréscimo de carregamento para o floema, ou seja, ocorre inibição da translocação de produtos da fonte para o dreno (Zhao *et al.*, 2001).

A deficiência de K nas plantas pode causar clorose, necrose das margens das folhas velhas; acamamento da planta; frutos e sementes enrugadas e pontuações brancas na margem

da folha (Fontes, 2001), frutos menos resistentes e senescência precoce (Malavolta, 2006). Segundo Mengel *et al.* (2001), a deficiência de K nem sempre resulta em sintomas visíveis rapidamente. Primeiramente ocorre uma redução no crescimento (fome oculta) e, posteriormente, clorose e necrose. Esses sintomas geralmente ocorrem em folhas mais velhas, devido ao fato dessas folhas suprirem as mais jovens com este cátion. Em muitas espécies, o decréscimo nos indicadores de crescimento nem sempre são observados (Yeh, *et al.*, 2000; Maffeis *et al.*, 2000).

Em helicônias e outras plantas ornamentais tropicais, os sintomas de deficiência de K aparecem inicialmente nas folhas mais velhas, como queima marginal ou necrose, eventualmente acompanhadas por clorose nas margens com eventuais pontuações necróticas ou alaranjadas (Broschat, 1992).

Cálcio (Ca)

O Ca é o constituinte estrutural dos pectatos de cálcio da lamela média das células (Borges *et al.*, 1997) e está envolvido no funcionamento das membranas e na absorção iônica (Malavolta *et al.*, 1997). Segundo Mengel *et al.* (2001), a deficiência de Ca é caracterizada pela redução de crescimento dos tecidos meristemáticos, pois este nutriente está envolvido na manutenção da integridade e da estabilidade da membrana e da expansão celular.

A necessidade de Ca para um ótimo crescimento é muito menor em monocotiledônea do que em dicotiledôneas. Diferenças genótípicas quanto à exigência de cálcio estão associadas com os sítios de ligação nas paredes celulares, ou seja, na capacidade de troca de cátions (Marschner, 1995; Amaral, 2003).

O Ca é um cátion bivalente, no apoplasto, uma parte está ligada estruturalmente, e outra parte é translocável na parede celular e na superfície exterior da membrana plasmática. Grande parte do Ca é armazenada no vacúolo, visto que sua concentração no citossol é extremamente baixa (Maschner, 1995).

As baixas concentrações de Ca no citossol ocorrem geralmente devido à baixa permeabilidade constitutiva das membranas para o Cálcio, e pela ação de transportadores da membrana removendo o cálcio do citossol e o excretando para o apoplasto ou o acumulando no retículo endoplasmático, cloroplastos, mitocôndrias ou no vacúolo. Estas baixas concentrações também são importantes para prevenir a precipitação de P e evitar competição com Mg por regiões de ligações específicas (Marschner, 1995).

As altas concentrações de Ca ficam na lamela média da parede celular, na superfície exterior da membrana plasmática, no retículo endoplasmático e no vacúolo (Amaral, 2003). A mobilidade deste cátion entre células e no floema é muito baixa (Marschner, 1995).

A deficiência de Ca pode causar murcha e morte de gemas terminais, limitação do crescimento, e escurecimento das extremidades das raízes (Malavolta *et al.*, 1997). Na maioria das plantas, essas desordens ocorrem primeiramente em tecidos meristemáticos, como extremidades de raízes, gemas de crescimento da parte superior da planta e órgãos de reserva (Mengel *et al.*, 2001). O suprimento adequado desse nutriente pode aumentar a qualidade e a longevidade de frutos, permitindo um período de armazenamento mais longo (Prado *et al.*, 2005; Chitarra & Chitara, 2005).

A baixa concentração de Ca em tecidos vegetais pode não refletir sintomas até que certa fase ou condição fisiológica ocorra, para, então, desencadear processos metabólicos que expressem a deficiência (Ferguson & Drobak, 1988).

Magnésio (Mg)

O Mg é um cátion bivalente e está envolvido em processos como síntese orgânica, balanço eletrolítico e estabilidade dos ribossomos. É ativador de muitas enzimas como a ATPases, RNA polimerases, fosfatases, carboxilases entre outros (Ding *et al.*, 2006). Quase todas as enzimas fosforilativas dependem da presença do Mg, que forma uma ponte entre a adenosina trifosfato (ATP) ou a adenosina difosfato (ADP) e a molécula da enzima (Malavolta *et al.*, 1997).

Participa também da organização das membranas dos tilacóides, atua como um cofator e ativador alostérico de enzimas envolvidas na fixação de CO² (Hermans & Verbruggen, 2005).

O Mg é essencial para os cloroplastos, sendo o átomo central da molécula de clorofila e uma ponte de ligação entre as subunidades ribossomais necessárias para síntese protéica, e enzimas do cloroplasto são fortemente influenciadas por variações nos níveis de Mg no citossol e no cloroplasto (Ding *et al.*, 2006).

Embora a maioria das ligações formadas envolvendo Mg sejam iônicas, ligações covalentes, como na molécula de clorofila, também ocorrem. O Mg forma complexos ternários com enzimas, nos quais as pontes de cátions são necessárias para estabelecer uma geometria precisa entre enzima e substrato, como por exemplo, a Rubisco (Amaral, 2003).

A competição entre cátions frequentemente leva a deficiência de Mg em plantas no campo. A taxa de absorção de Mg pode ser fortemente diminuída pela presença de outros cátions como K, NH₄, Ca, Mn, H (Ding *et al.*, 2006). A deficiência de Mg costuma causar clorose internerval das folhas, geralmente começando e sendo mais severa nas folhas mais velhas, e algumas espécies observa-se necrose nas folhas e surgimento de cor alaranjada, vermelha ou roxa (Malavolta, 2006). As bananeiras, por exemplo, produzem sintomas característicos, como clorose ao longo das margens das folhas mais velhas. Estes sintomas podem ser acompanhados de necrose nas extremidades foliares, em caso de extrema deficiência (Borges *et al.*, 1997).

Enxofre (S)

O S é um macronutriente requerido para síntese de aminoácidos. As plantas absorvem S na forma de iônica de sulfato. O S é um anion bivalente, componente de aminoácidos, proteínas, vitaminas e coenzimas (Malavolta *et al.*, 1997). Os sintomas visíveis de deficiência de S são clorose nas folhas mais jovens, folhas pequenas, enrolamento das margens das folhas, necrose e desfolhamento, internódios curtos e redução do florescimento. Na célula ocorre meiose anormal. Outros sintomas são: o aumento no teor de carboidratos, diminuição dos açúcares redutores e menor síntese de proteínas (Malavolta, 2006).

Os sintomas de deficiência desse nutriente são semelhantes aos de deficiência em N, visto que ambos são constituintes de proteínas. Os sintomas, entretanto, ocorrem em folhas jovens, pois o S não é transportado com facilidade das folhas mais velhas para as mais jovens, diferentemente das plantas com deficiência de N. Pode ocorrer também clorose em todas as folhas ou até mesmo a iniciação de sintomas a partir de folhas mais velhas, dependendo da espécie vegetal (Taiz & Zeiger, 2004). Este nutriente estimula o desenvolvimento vegetativo e a frutificação e favorecendo a fixação simbiótica de nitrogênio (Malavolta *et al.*, 1997).

Estudos moleculares têm revelado que a maioria dos vegetais superiores possui transportadores de alta afinidade que potencialmente facilitam a aquisição de sulfato pelas raízes (Maruyama-Nakashita *et al.*, 2004). Em geral os transportadores são controlados, a um nível de expressão de genes, por proteínas que se expressam modificando a absorção e assimilação de sulfato (Hirai & Saito, 2004).

3.1.5.5. Irrigação

Pode ser por aspersão, micro-aspersão ou infiltração. Deve-se manter o solo úmido, sem, contudo causar excessos. Os melhores resultados em cultivo de helicônia obtêm-se com a aspersão convencional (cobertura total), mas a opção ficará a cargo do floricultor e a disponibilidade de água e energia existentes na propriedade.

3.1.6. *Heliconia chartacea* var. *Sexy Pink* – segundo Mosca, *et al.*, 2004



Figura 01. *Heliconia chartacea* (Lane x Barreiros) var. *Sexy Pink*.

Florescimento: ano todo.

Altura: 1,98 a 5,28 m.

Habitat: 50% de sombra até completa exposição ao sol.

Distribuição: das Guianas à bacia Amazônica, Flórida, Havaí, Barbados e Costa Rica.

3.1.6.1. Inflorescência

Brácteas: em número de 4 a 28, nas quais a base e 2/3 da porção proximal “bochechas” e quilha são róseos. Uma linha fina verde marca o lábio e a ponta.

Haste: de laranja a amarelo.

Sépala: cor laranja na porção distal e em 2/3 da porção proximal amarelo-clara.

Ovário: cor laranja-claro.

Pedicelo: cor amarelo-claro.

Vegetação: musóide.

3.2. Micropropagação

A cultura de tecidos de plantas é uma técnica que utiliza pequenos fragmentos de tecido vivo (explante) isolados de uma planta, os quais são cultivados assepticamente em um meio nutritivo previamente definido. O fundamento básico da cultura de tecidos é a totipotência celular, segundo a qual, qualquer célula no organismo vegetal contém toda a informação genética necessária à regeneração de uma planta completa (Grattapaglia & Machado, 1998).

A micropropagação de plantas é uma das aplicações mais importantes da cultura de tecidos *in vitro*. Consiste na formação de novas plantas a partir de pequenas partes, inoculadas em meio nutritivo artificial sob condições assépticas. Potencialmente plantas de todas as espécies podem ser regeneradas através desta técnica, desde que as exigências nutricionais, hormonais e ambientais sejam satisfatórias (Lamas, 2004).

Através das técnicas de micropropagação pode-se induzir à proliferação de gemas apicais e axilares (multibrotação), formação de gemas adventícias por organogênese direta /indireta, e formação de embriões por embriogênese somática, permitindo a obtenção de um grande número de plantas em pouco tempo (Grattapaglia & Machado, 1998).

Para se ter bons resultados a partir da micropropagação de uma determinada espécie vários fatores devem ser estudados, como a presença de citocininas e suas respectivas concentrações e os tipos de explantes utilizados. Citocininas são reguladores de crescimento utilizados na quebra de dominância apical em gemas axilares e ápices caulinares, com conseqüente indução de brotações.

Das citocininas comercialmente disponíveis, a benzilaminopurina (BAP) é o regulador de crescimento que, em geral, apresenta melhores resultados *in vitro* para promover a multiplicação vegetativa, sendo utilizado em aproximadamente 60% dos meios de cultura (Santos & Rodrigues, 2004).

Os explantes a serem micropropagados podem ser retirados de uma planta-matriz, que pode ser tanto cultivada em campo, como em casa de vegetação, ou, ainda, cultivada *in vitro*. Explantes provenientes de plantas propagadas *in vitro* possuem a vantagem de apresentar índices mais baixos de contaminação por microorganismos, em relação àqueles que ainda

passarão pelo processo de desinfestação.

Ao se estabelecer uma determinada cultura *in vitro* é necessário estabelecer qual o tipo de explante é mais responsivo para a produção de brotos, aumentando as taxas de multiplicação a níveis significativos. Meristemas, segmentos nodais, ápices caulinares, gemas laterais e gemas adventícias (via organogênese) são tipos de explantes bastante utilizados na multiplicação de brotos.

3.2.1. Meios de cultura para o cultivo *in vitro* de helicônias

A obtenção de bons resultados no processo da micropropagação como a produção do maior número de plantas possível, no menor espaço de tempo, com o mínimo de variação entre os explantes e garantindo a boa qualidade durante o desenvolvimento que dependem da otimização de várias variáveis. Entre elas, a composição do meio de cultura (Grattapaglia & Machado, 1998).

No cultivo *in vitro* de plantas, diversos meios básicos têm sido utilizados na multiplicação de plantas, sendo que a maioria se baseia no meio MS. Modificações deste meio têm apresentado bons resultados para diversas espécies (Silveira *et al.*, 2001). As variações mais frequentes do meio básico estão relacionadas à composição de macronutrientes e reguladores vegetais, quanto ao efeito sobre o crescimento e o desenvolvimento dos explantes (Grattapaglia & Machado, 1998).

Diniz *et al.* (1999), relatam que a quantidade e o balanço de nutrientes proporcionados aos explantes são fatores determinantes para a sua utilização durante o cultivo *in vitro*. Os elementos essenciais são requeridos pelas plantas em quantidades variáveis conforme a espécie e o estágio de desenvolvimento. Os macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg e S) são elementos essenciais exigidos em maiores quantidades pelas plantas, envolvidos diretamente no metabolismo da planta, fazendo parte de um constituinte essencial (enzima) ou exigido para um passo metabólico específico (reação enzimática) (Malavolta, 1980). Diniz *et al.* (1999), acrescentam ainda que existem poucas informações disponíveis sobre o comportamento em relação à nutrição *in vitro*, acrescentando que a quantidade fornecida e o balanço de nutrientes são fatores determinantes na sua utilização pelas plantas. Concluíram que os explantes de bananeira cultivadas *in vitro* apresentaram a maior taxa de absorção de nutrientes durante os primeiros 20 dias de cultivo, sendo o fósforo o nutriente mais rapidamente absorvido e a quantidade de macronutrientes utilizada pelo explante seguindo a

ordem: $K > N > Ca \geq P > Mg > S$. A concentração e o acúmulo de nutrientes se diferenciam no rizoma, na folha e no pseudocaule, as maiores concentrações de N, P e K se encontram no pseudocaule e Ca, Mg e S é maior no rizoma. Entretanto, o maior acúmulo de N, K, Ca, Mg e S ocorrem no rizoma e as folhas apresentam o maior acúmulo de fósforo.

São diversos os fatores influentes na morfogênese, dos quais os reguladores de crescimento são considerados de extrema importância (Ponte, 1999). Os mesmos na concentração e combinação adequadas no meio de cultura são determinantes para o desenvolvimento vegetal. Os fitorreguladores suprem as deficiências dos teores endógenos de hormônios nos explantes, os quais se encontram isolados das regiões produtoras na planta matriz. Citocininas e auxinas são os principais responsáveis pela indução e multiplicação de gemas na maioria das espécies de vegetais, com variações nas concentrações exógenas necessárias (George & Sherrington, 1984).

3.2.2. Reguladores de crescimento

As auxinas são sintetizadas, principalmente, em tecidos meristemáticos de órgãos aéreos dos vegetais e são responsáveis pela expansão celular, incorporação de materiais na parede celular e aumento da elasticidade. Este último permite o influxo de água na célula, resultando em aumento de pressão sobre a parede celular, o que provoca a alongação. É também da auxina o fenômeno de fototropismo nos vegetais, movimento da planta em resposta a um gradiente de luz; a luminosidade unilateral provoca a migração da auxina para regiões sombreadas, induzindo assim maior alongação e conseqüente inclinação para o lado iluminado.

As auxinas estão presentes ainda nos fenômenos de geotropismo, dominância apical, iniciação e alongação caulinar, produção de etileno, crescimento de frutos abscisão, partenocarpia e partição de assimilados, e ainda tem ação herbicida em concentrações altas (Vieira & Monteiro, 2002). Uma das mais rápidas respostas hormonais observadas em plantas é a indução do crescimento provocada por auxinas, em especial em secções de coleótilo e de caules de plantas (Santos & Domingues, 2002). Existem diversas auxinas conhecidas, apenas duas naturais, o ácido indolacético (AIA), bastante utilizado na cultura de tecidos, e o indolacetonitrilo, pouco utilizado. As sintéticas são mais comuns, dentre elas temos o ácido indolbutírico (AIB), 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e ácido nafataleno acético (ANA) os mais aplicados em cultivos *in vitro*. Contudo as auxinas em solução aquosa apresentam severa

degradação devido a uma série de agentes, como ácidos, radiações ultravioletas e ionizantes, e inclusive pela luz visível quando na presença de pigmentos sensíveis. O AIA tem a maior sensibilidade à degradação, dentre as auxinas conhecidas, a qual deve-se a ação do oxigênio e peróxido em presença de um redutor (Vieira & Monteiro, 2002; Neto & Tavares, 2002).

Na fase de multiplicação a concentração da auxina normalmente é sempre menor do que a da citocinina, para não promover a formação de calo na base do explante. ANA e AIB normalmente são utilizados em concentrações abaixo de 0,5 mg L⁻¹ e o AIA, em virtude de sua baixa estabilidade, em concentrações maiores (Ponte, 1999; Grattapaglia & Machado, 1998).

As citocininas estão presentes, sobretudo em regiões meristemáticas e órgãos em crescimento como nas folhas jovens, sementes, frutos e principalmente no meristema apical da raiz, sítio de biossíntese desta substância. São essenciais para a quebra da dominância apical e indução de proliferação de gemas. São promotoras de crescimento e divisão celular, participando inclusive do alongamento e diferenciação celular (Vieira & Monteiro, 2002; Hu & Wang, 1983). Há, contudo efeitos adversos das citocininas quando em quantidades elevadas, toxidez, entufamento exagerado, formação de roseta (falta de alongamento), má formação foliar e vitrificação dos explantes (Ponte, 1999; Grattapaglia & Machado, 1998). Os efeitos das citocininas nos vegetais são bastante variáveis, em virtude à sua grande quantidade de metabólicos presentes diversa tipos de tecidos, variando inclusive entre as diferentes espécies da natureza (Brito & Castro, 2002). A primeira citocinina isolada foi a cinetina (6-furfurilaminopurina), com grande capacidade promotora de divisão celular ou citocinese. A zeatina (6-(4-hidroxi-3-trans-metil-2-amino-butenil) purina) foi a primeira citocinina natural identificada presente em sementes verdes de milho. As citocininas sintéticas são as mais conhecidas, como o BAP (6-benzilaminopurina), 2iP (6-dimetilamino purina) e PBA (6-(benzilamino)-9-(2-tetrahidronipiranyl)- 9H-purina), todas elas ligadas à promoção do crescimento, divisão, alongamento e diferenciação celular (Vieira & Monteiro, 2002).

O TDZ (Thidiazuron) foi originalmente desenvolvido para ser utilizado como desfolhante para o algodoeiro. Segundo Salgado *et al.* (2001) essa substância tem mostrado efeito semelhante aos das citocininas, quando aplicado em concentrações muito reduzidas. Na maioria dos casos, o TDZ tem apresentado resultados superiores em relação às outras citocininas na indução e multiplicação de brotos de várias espécies. O TDZ tem sido usado em várias espécies de plantas como *Psidium arguta* (araçá) (Kodja *et al.*, 1998), *Fragaria vesca* L. (morango) (Sutter *et al.*, 1997), com excelentes resultados.

3.3. Problemas na cultura *in vitro*

O cultivo *in vitro* como qualquer outro processo é sensível a alguns problemas de ordem ambiental ou biológico que afetam diretamente o desenvolvimento das culturas. Dentre estes problemas pode-se citar a oxidação, o declínio no vigor e a hiperhidricidade.

3.3.1. Declínio de vigor

A baixa taxa de desenvolvimento é chamada de declínio do vigor e está associado com a produção de substâncias fenólicas ou a outros fatores como vitescência, habituação ou maturidade dos explante.

3.3.2. Necroses

Necrose pode ser descrita como sendo a morte de uma parte de um organismo vivo. Isto ocorre com explantes colocados *in vitro*, podendo ter uma perda parcial ou a de toda a cultura (Santos & Rodrigues, 2004).

3.3.3. Oxidação

A oxidação é a reação do oxigênio com íons metálicos (+) dos outros compostos do meio de cultivo. Os explantes ao serem inoculados no meio de cultura podem liberar exudatos que tornam o meio de cultivo escuro. Este tipo de escurecimento é consequência da liberação de fenóis dos fermentos ocasionados no processo de extração dos explantes (Santos & Rodrigues, 2004).

3.3.4. Hiperhidricidade

A hiperhidricidade é definida como o estado fisiológico que a planta apresenta elevado teor de água no interior das células e tecidos com aspecto translúcido.

3.4. Enraizamento

O enraizamento é uma etapa que define o resultado final da micropropagação, é a etapa onde ocorre a formação de raízes adventícias nas partes aéreas. Pode ser dividido em indução, iniciação e alongamento das raízes (Torres, 1998).

Uma forma de enraizamento que pode ser utilizada é a *in vitro*. A vantagem deste tipo de enraizamento é o melhor controle das condições em que se trabalha e, com isso, a obtenção de um alto percentual de enraizamento. Por outro lado, a desvantagem do método é que as raízes formadas *in vitro* nem sempre são eficientes na absorção de água e de nutrientes, no momento da passagem das mudas para o substrato.

O processo de enraizamento em brotos propagados *in vitro* requer geralmente o transplante para um meio de cultura com menor concentração de sais. O meio MS diluído a 50% tem dado resultados positivos em diferentes espécies. Também é requerido um balanço hormonal, isto é diminuir as citocininas e aumentar auxinas endógenas, sendo que em determinadas culturas, a simples eliminação de citocininas tem sido um suficiente estímulo para a diferenciação do sistema radicular (Radmann *et al.*, 2002).

O tipo de raiz formada é altamente influenciada pelo meio de cultura, implicando no processo de aclimatação das mudas. Neste sentido, a utilização de diferentes concentrações de carbono exógeno no meio tem demonstrado exercer influência positiva na diferenciação de órgãos, como na formação das raízes.

Os níveis de sacarose, normalmente usados em cultura de tecidos, podem inibir a síntese de clorofila (George, 1996). De acordo com Kozai (1991), na presença de açúcar, as plântulas não desenvolvem capacidade fotoautótrofica, podendo causar crescimento reduzido e morte de mudas durante a fase de aclimatação.

Segundo Grattapaglia & Machado (1998), as culturas *in vitro* apresentam uma baixa taxa fotossintética e devido a isso devem dispor de uma fonte de energia, geralmente, sacarose. No entanto, elas continuam a depender de luz para realizar a morfogênese. Essa disponibilidade de luz varia de acordo com a espécie a ser propagada e com o órgão da planta utilizado.

3.5. Aclimatização das plantas

Conforme Terceiro Neto *et al.* (2004), a produção de flores e plantas ornamentais constitui uma atividade altamente promissora, no entanto é necessário o uso de tecnologias avançadas para atender à grande demanda do mercado.

Conforme Torres *et al.* (1998), a etapa da micropropagação consiste na transferência da planta da condição *in vitro* para a casa de vegetação e/ou telado (estufa), onde passa por aclimatização e endurecimento. Confundem-se os conceitos aclimatação e aclimatização. Aclimatação é um termo que se refere ao processo no qual as plantas ou outros organismos vivos tornam-se ajustados a um novo clima ou situação, como resultado de um processo essencialmente natural (Preece & Sutter, 1991; Tombolato *et al.*, 1998). Aclimatização é definida como a transferência de um organismo, especialmente uma planta, para um novo ambiente, sendo todo o processo realizado artificialmente (Tombolato *et al.*, 1998). Para George (1993), a aclimatação é um processo regulado pela natureza, enquanto que a aclimatização é um processo controlado pelo homem.

Na fase de aclimatização, as mudas são retiradas do meio de cultivo e transferidas para recipientes contendo substrato. Esse substrato pode influenciar as respostas das mudas, através de suas características químicas, físicas e biológicas (Gonçalves, 1995). A escolha e o manejo correto dos mesmos são de suma importância para a obtenção de mudas de qualidade.

Muitas espécies que crescem *in vitro* necessitam de um processo de aclimatização para assegurar a sua sobrevivência e o seu crescimento no ambiente externo. A aclimatização tem por objetivo reduzir o estresse causado pela enorme diferença entre as condições de cultivo *in vitro* e as condições externas de crescimento (Pasqual *et al.*, 2001).

Para Torres *et al.* (1998) e Pasqual *et al.* (2001) uma pré-adaptação à condição autotrófica pode ser estimulada ainda *in vitro*, para favorecer a sobrevivência das plantas enraizadas. Portanto, essa indução à realização da fotossíntese pode ser conseguida através da redução ou completa eliminação do açúcar (sacarose) no meio (Kozai, 1988) e com o aumento da luminosidade e da concentração de CO² (Debergh, 1991; Torres *et al.*, 1998). Alguns cuidados devem ser tomados durante o transplântio para assegurar a sobrevivência e o desenvolvimento satisfatório das plantas micropropagadas. Estes cuidados estão relacionados com as condições ambientais, fitossanitárias, recipientes, substratos, irrigação, entre outros fatores.

Maciel *et al.* (2000), afirmam que a manutenção da umidade relativa do ar alta e de temperaturas do ar amenas são imprescindíveis na fase de aclimatização. A umidade relativa alta no início da aclimatização faz com que a planta retome o crescimento e passe a realizar fotossíntese em níveis suficientes para estimular o desenvolvimento de um sistema radicular

mais funcional, na absorção de água e de nutrientes, isso porque, as raízes produzidas *in vitro* são fracas e pouco funcionais, razão pela qual devem ser substituídas o mais rapidamente possível, o que só ocorrerá mantendo a planta com baixa transpiração (Pierik, 1997). Apesar de a elevada umidade relativa ser fundamental, o seu excesso deve ser evitado, pois é extremamente favorável ao desenvolvimento de algas, fungos ou microrganismos patogênicos. Torres *et al.* (1998), mostram que é comum o uso de pequenos telados, túneis plásticos ou até mesmo casas de vegetação, para a manutenção de temperaturas mais amenas e redução da incidência direta de luz sobre as plantas.

Terceiro Neto *et al.* (2004) verificaram que o substrato influencia na resposta das plantas na fase de aclimatização através de suas características físicas, químicas e biológicas. Para Torres *et al.* (1998), o substrato deve apresentar uma capacidade de retenção de água e não compactar-se excessivamente, comprometendo à drenagem e, conseqüentemente, a aeração do sistema radicular. Tombolato *et al.* (1998) complementam, ressaltando que o substrato deve ter pH apropriado para cada espécie, ser asséptico (estéril) e suficientemente poroso para promover drenagem adequada e aeração. Quimicamente, ele deve ser inerte para permitir a manipulação dos conteúdos de nutrientes, de acordo com a necessidade da espécie.

Os substratos mais empregados na aclimatização são: pó de fibra de coco, húmus, vermiculita, moinha de carvão, serragem, turfa, palha de arroz carbonizada, areia, vermicomposto, entre outros. Quando o substrato é composto de vários materiais, as proporções de cada componente são bastante variáveis e dependem da espécie utilizada (Torres *et al.*, 1998).

As plantas se desenvolvem melhor e crescem mais rapidamente em recipientes mais espaçosos. Vários tipos de recipientes (área e volume) podem ser utilizados na aclimatização de plantas micropropagadas, como é o caso das bandejas plásticas ou de isopor, caixas de polietileno, sacos plásticos, copos plásticos, tubetes, vasos, etc.

Segundo Pasqual *et al.* (2001), o processo de aclimatização segue normalmente os seguintes procedimentos: retirada da muda enraizada *in vitro*; lavagem do sistema radicular para retirada do excesso do meio de cultura, que pode ser prejudicial ao desenvolvimento da muda; transferência da muda para substrato, preferencialmente estéril, umedecido e mantido em casa de vegetação com nebulização intermitente, temperatura amena e intenso sombreamento; manutenção no ambiente de aclimatização por tempo suficiente para as mudas sobreviverem; redução gradual da umidade relativa do ar, teor de água do substrato e sombreamento; transferência para o viveiro ou área de cultivo.

Existem poucos trabalhos que relatam detalhadamente os procedimentos de transplante e aclimatização de espécies micropropagadas, principalmente no que diz respeito ao manejo de mudas micropropagadas, no sentido de proporcionar o melhor aproveitamento das plântulas e a obtenção de melhor qualidade das mudas aclimatizadas.

3.6. Substratos

Os substratos para plantas ornamentais são misturas de materiais nos quais as raízes das plantas irão se desenvolver. Tais substratos devem apresentar as seguintes características: possuir alta capacidade de armazenamento de água, ser poroso com o intuito de facilitar a aeração, deve ser estável ao longo do tempo, ter alta capacidade de absorção, deve estar livre de patógenos, pragas, sementes de plantas infestantes e substâncias nocivas ao desenvolvimento das plantas. Os componentes básicos dos substratos são: turfa, vermiculita, argila, areia, argila expandida, ardósia expandida, polystyrol, espuma, fibra plástica, casca de arroz, fibra de madeira, chips de madeira, fibra de coco (Kämpf & Fermino, 2000).

Para que a planta possa demonstrar um bom desenvolvimento não é necessário somente um substrato de qualidade, mas sim a sanidade do ambiente que a planta se encontra, bem como do próprio substrato.

3.6.1. Vermiculita

Gonçalves (1995), estudando o efeito de diferentes substratos tais como: vermiculita, casa de arroz tostada, torta de filtro de Oliver, turfa e casca de pinheiro, no enraizamento de estacas, verificou que as misturas de vermiculita + torta de filtro de Oliver nas proporções de 1:1, 2:1 e 3:1 foram as que apresentaram os melhores desempenhos. Já as misturas vermiculita + turfa (1:1) e vermiculita + casca de pinheiro (1:1) tiveram os piores desempenhos.

3.6.2. Fibra de coco

As indústrias que fazem o processamento de coco maduro para a produção de óleo e outros produtos geram uma grande quantidade de resíduos formados, em grande parte, pelas

cascas ou mesocarpo grosso do fruto (Rosa *et al.*, 2001). Estas cascas são normalmente usadas como combustível de caldeiras ou, ainda, processadas para o beneficiamento de fibras empregadas na fabricação de cordoalhas, tapetes, esteiras e outros produtos (Cempre, 1998).

Segundo Rosa *et al.* (2001), os substratos obtidos a partir de frutos maduros do coco demonstram os melhores meios de cultivo para a produção de vegetais. O pó do coco maduro é um material vegetal 100 % natural, renovável, muito leve e bastante semelhante com as melhores turfas de *Sphagnum*, encontradas no norte da Europa e América do Norte. Atualmente, o pó do coco seco está sendo indicado como substrato agrícola, tanto por possuir uma estrutura física vantajosa, que proporciona alta porosidade e elevada retenção de umidade, como por ser um material biodegradável (Rosa *et al.*, 2001).

Com relação às propriedades químicas, o resíduo de coco maduro apresenta pH ótimo para o cultivo e salinidade de média à elevada e que esta salinidade não é um fator limitante para a sua utilização como substrato, uma vez que um programa adequado de rega é eficiente na remoção de sais solúveis em excesso.

Silva *et al.* (2004) avaliaram o efeito de alguns substratos na aclimatização de mudas micropropagadas de antúrio (*Anthurium andreaeanum*). Os substratos testados foram pó de coco seco, pó de coco seco mais bagana de carnaúba, pó de coco seco mais palha de arroz carbonizada, pó de coco seco mais palha de arroz carbonizada mais húmus, bagana decarnaúba, vermiculita e dois substratos comerciais. Aos 90 dias de cultivo, foram avaliadas as variáveis número médio de folhas por planta, altura das plantas e pesos fresco e seco das partes aérea e radicular das plantas. Os autores concluíram que o pó de coco seco se destacou entre os substratos testados, pois proporcionou as maiores médias de altura de planta, peso fresco e seco da parte aérea e, ainda, não diferiu estatisticamente dos outros substratos quanto à produção de matéria seca do sistema radicular.

Lacerda *et al.* (2006), também trabalhando com substratos avaliaram as características físicas e químicas de substratos provenientes de pó de coco e resíduo de sisal na produção de mudas de *Mimosa caesalpiniaefolia* e comparou com substrato proveniente de solo argissolo vermelho-amarelo distroférico. O pó de coco e o resíduo de sisal apresentaram menor densidade, maior retenção de água, maior aeração e maior porosidade quando comparado com o argissolo. Quanto ao pH a diferença entre o argissolo (5,7) e o pó de coco (6,3) não foi significativa, porém houve grande variação quando comparado com o pH do resíduo de sisal (9,3). No entanto os melhores resultados quanto ao desenvolvimento das mudas de *Mimosa caesalpiniaefolia* foram obtidos quando se misturou argissolo com pó de coco, e os piores na

mistura de argissolo com resíduo de sisal. Este resíduo não se mostrou como um bom substrato, pois sempre esteve associado aos piores resultados.

3.6.3. Húmus de minhoca

A utilização de húmus de minhoca permite o enriquecimento da matéria orgânica disponível, por meio do aumento na disponibilidade de nutrientes, de forma economicamente viável e ambientalmente sustentável (Bakker, 1994). A adição de húmus ao substrato, segundo Rossi & Shimoda (1995), promove um aumento na capacidade de troca de cátion, fornece macro e micronutrientes, diminui o efeito tóxico do alumínio, aumenta a atividade microbiana, diminui a compactação e melhora a aeração e o enraizamento. Em estudos de aclimatização de abacaxizeiro Souza-Júnior *et al.* (2001) observaram que o substrato com húmus de minhoca induziu melhor crescimento.

O húmus de minhoca é um complexo coloidal amorfo, de cor marrom a preta, de natureza variada e oriundo da decomposição de restos vegetais e animais depositados no solo (Aquino, 2004). O húmus de minhoca, também conhecido como vermicomposto, é um tipo de húmus gerado a partir de excrementos do aparelho digestivo da minhoca, que apresenta altos teores de matéria orgânica e sais minerais (Kiehl, 1985). O húmus de minhoca é, em média, 70 % mais rico em nutrientes do que os húmus convencionais. Além do mais, é rico em microrganismos benéficos às raízes, possui pH neutro, alta retenção de água e mineralização lenta da matéria orgânica. Kiehl (1985) acrescenta que o húmus de minhoca possui, em relação a uma camada de solo fértil, cinco vezes mais nitrogênio, duas vezes mais cálcio, o dobro de magnésio, sete vezes mais fósforo e onze vezes mais potássio.

Segundo Gonçalves & Poggiani (1996), o húmus de minhoca apresenta vantagens como uma boa consistência dentro de recipientes, média a alta porosidade e drenagem, alta capacidade de retenção de água e nutrientes, elevada fertilidade, boa formação do sistema radicular, pH equilibrado (neutro) e melhor controle biológico de patógenos e doenças. Quanto às propriedades físicas, o húmus melhora a agregação que, por sua vez, favorece o aumento da capacidade de armazenamento de água (3 a 4 vezes o seu peso), a redução dos riscos de compactação, erosão e lixiviação e a melhoria das condições de aeração, favorecendo a germinação de sementes e o crescimento e o funcionamento das raízes.

Com relação às propriedades químicas, o húmus, através da lenta mineralização, libera todos os nutrientes essenciais à planta, incluindo N, P, K, Ca, Mg, S e micronutrientes; aumenta a CTC do meio, o que proporciona a retenção de nutrientes e água para a planta;

funciona como agente quelante, retendo formas disponíveis de certo micronutrientes ou controlando a toxidez de outros (Fe, Al, Mn) e aumenta o poder tampão para pH, nutrientes, temperatura e umidade (Aquino, 2004).

Para as propriedades biológicas, Aquino *et al.* (1993) afirmam que o húmus aumenta a atividade biológica do meio, especialmente, dos organismos aeróbicos responsáveis pela oxidação do N, P, S, fixação do nitrogênio e solubilização do fósforo mineral.

Rodrigues *et al.* (2003), testou diferentes substratos para o desenvolvimento de mudas de bromélias imperiais (*Alcantarea imperialis*) sendo utilizado casca de arroz carbonizada, húmus, solo e areia. Os melhores resultados ficaram com a mistura de casca de arroz carbonizada e solo na proporção de 1:1. Já os piores resultados ficaram com as misturas que continham grande quantidade de solo ou de húmus.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amaral, A. F. C. *Comportamento in vitro de explantes de matrizes de cenoura (Daucus carota L.) tratadas com variáveis níveis de potássio*. 103p. Dissertação de Mestrado, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), Piracicaba. 2003.

Aquino, B. F. *Conceitos fundamentais em fertilidade do solo*. Apostila. 182 p. Fortaleza:UFC, 2004.

Aquino, A. B.; Aquino, B. F.; Hernandez, F. F. F.; Holanda, F. J. M.; Freire, J. M.; Crisostomo, L. A.; Costa, R. I. Da; Uchoa, S. C. P.; Ernandes, V. L. B. *Recomendações de adubação e calagem para o Estado do Ceará*. Fortaleza: UFC, 248p. 1993.

Ashraf, M.; Armad, A.; Mcnelly, T. G. Growth and photosynthetic characteristics in pearl millet under water stress and different potassium supply. *Photosynthetica*, Prague, v.39, n.2, p.389-394, 2001.

Bakker, A. P. *Efeito do húmus de minhoca e da inoculação do fungo micorrízico arbuscular Glomus macrocarpum Tul. & Tul. Sobre o desenvolvimento de mudas de cajueiro anão-precoce (Anacardium occidentale L.)*. Tese de Doutorado. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará. 60p. 1994.

Ball, D. Rhizome propagation of *Heliconia* 'Golden Torch' and *Heliconia psittacorum* 'Andromeda'. *Bulletin Heliconia Society International*, Ft. Lauderdale, v.1, p.6-7, 1986.

Batista, M. F.; Viegas, I. J. M.; Frazão, D. A. C.; Thomaz, M.A.; Silva, R. C. L. Efeito da omissão de macronutrientes no crescimento, nos sintomas de deficiências nutricionais e na composição mineral em gravioleiras (*Annona muricata*). *Revista Brasileira de Fruticultura*, Pelotas, v.25, n.2, p.315-318, 2003.

Benicasa, M. M. P. *Análise de crescimento de plantas*. Jaboticabal: FUNEP, 42p. 1988.

Berry, F.; Kress, W.J. *Heliconia: an identification guide*. 1. ed. Washington: Smithsonian Institution Press. 334 p.1991.

Bezerra, F. C. *Floricultura: aspectos gerais e técnicos de cultivo para flores tropicais*. Fortaleza: Embrapa-CNPAT, 39 p. Apostila. 1997.

Boaretto, A.; Chitolina, J. C.; Van Raij, B.; Silva, F. C.; Tedesco, M. J.; Carmo, C. A. S. *Amostragem, acondicionamento e preparo das amostras de plantas para análise química*. In: SILVA, F. C. (Ed.). *Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes*. Brasília: EMBRAPA, p.49-73. 1999.

Borges, A. L.; Oliveira, A. M. G.; Souza, L. S. *Solos, nutrição e adubação*. In: *A cultura da banana: aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais*. Alves, E. J. (Ed.). Brasília: EMBRAPA-SPI/ Cruz das Almas: EMBRAPA-CNPMPF, p. 197-254. 1997.

Brito, G. J. M.; Castro, P. R. C. Biossíntese de citocininas, ácido abscísico e etileno. In: Camargo E Castro, P. R.; Alves De Sena, J. O.; Kluge, R. A. *Introdução a fisiologia do desenvolvimento vegetal*, Maringá: Eduem, p. 63-78. 2002.

Broschat, T. K. Nutrition of heliconias and related plants. *Bulletin Heliconia Society International*, Ft. Lauderdale v.6, n.1/2, p.20-21, 1992.

Cambraia, J. *Aspectos bioquímicos, celulares e fisiológicos dos estresses nutricionais em plantas*. In: Nogueira, R. J. M. *et al.* (Eds.). *Estresses ambientais: Danos e benefícios em plantas*. Recife: UFRPE, Imprensa Universitária, p. 95-105. 2005.

Castro, N. R. *Murcha de Fusarium em Helicônia spp. ocorrência, variabilidade e resistência genética*. 2007, 98f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco - Recife, 2007.

Castro, C. E. F. de. *Heliconia para exportação: aspectos técnicos da produção*. FRUPEX. Publicações Técnicas, 16. Brasília. 1995.

Castro C. E. F.; Graziano T. T. Espécies do gênero *Heliconia* (Heliconiaceae) no Brasil. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental* v. 3, p.15-28, 1997.

Cechin, I.; Fumis, T. F. Effect of nitrogen supply on growth and photosynthesis of sunflower plants growth in greenhouse. *Plant Science*, Bundoora, v.166, p.1379-1385. 2004.

CEMPRE - Compromisso Empresarial para Reciclagem. *Perfil de recicladora de fibras de coco. Reciclagem e Negócios: fibras de coco*. São Paulo, 35p. 1998.

Chitarra, M. I. F.; Chitarra, A. B. *Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio*. Lavras: UFLA, 785 p. 2005.

Clemens, J.; Morton, R. H. Optimizing mineral nutrition for flowers production in *Heliconia* 'Golden Torch' using response surface methodology. *Journal of American Society of Horticultural Science*, Alexandria, v.124, n.6, p.713-718. 1999.

Criley, R. A., Maciel, N., Fu, Z. & Uchida, J. Productivity of three heliconia hybrids. *Bulletin Heliconia Society International*, Ft. Lauderdale, v.10, p.3, 2001.

Criley, R. A.; Broschat, T. K. *Heliconia: botany and horticulturae of new floral crop*. *Horticulturae Review*, Hawaii, v.14, p.1-55, 1992.

Criley, R. A. Production of heliconias as cut flowers and their potential as new potted plants. *Horticultural Digest*, Hawaii, v.92, p.1-7, 1990.

Criley R. A. Propagation methods for gingers and heliconias. *Bulletin Heliconia Society International*. USA, V. 2, p.6-7, 1988.

Debergh, P. C. Acclimatization techniques of plants from *in vitro*. *Acta Horticulturae*, v. 289, p. 291-300. 1991.

De Groot, C. C.; Marcelis, L. F. M.; Van Den Boogaard, R.; Kaiser, W. M.; Lambers, H. Interaction of nitrogen and phosphorus nutrition in determining growth. *Plant and Soil*, Amsterdam, v.248, p.257-268, 2003.

Ding, Y.; Luo, W.; Xu, G. Characterization of magnesium nutrition and interaction of magnesium and potassium in rice. *Annals of Applied Biology*, Warwick, v.149, p.111-123,

2006.

Druege, U. Postharvest responses of different ornamental products to preharvest nitrogen supply: role of carbohydrates photosynthesis and plants hormones. *Acta Horticulturae*, Leuven, v.543, p.97-105, 2001.

Donselman, H. M ; Broschat, T. K. Production of *Heliconia psittacorum* for cut flowers in South Florida. *Bulletin Heliconia Society International*, Ft. Lauderdale, v.1, n.4, p.4-6, 1986.

Epstein, E.; Bloom, A. J. *Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas*. 2ª ed. Londrina: Editora Paulista, 400p. 2006.

Ewel, J. J. Species and rotation frequency influence soil nitrogen in simplified tropical plant communities. *Ecological Applications*, Tempes, v.16, n.2, p.490-502, 2006.

Fanti, S. C.; Peres, S. C. J. G. A. *Influência do sombreamento artificial e da adubação química na produção de mudas de *Adenantha pavonina**. *Ciência Florestal*, Santa Maria, v.13, n.1, p.49-56, 2003.

Ferguson, I. B.; Drobak, B. K. Calcium and regulation of plant growth and senescence. *HortScience*, Alexandria, v.23, n.2, p.262-266, 1988.

Fontes, P. C. R. *Diagnóstico do estado nutricional das plantas*. Viçosa: UFV, 122p. 2001.

Fujita, K.; Okada, M; Lei, K.; Ito, J.; Ohkura, K.; Adu_Gyamfi, J. J.; Mohapatra, P. K. Effect of P-deficiency on photoassimilate partitioning and rhythmic changes in fruit and stem diameter of tomato (*Lycopersicon esculentum*) during fruit growth. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, v.54, n.392, p. 2519-2528, 2003.

George, E. F.; Sherrington, P. D. *Plant propagation by tissue culture*. Eversley: Eastern Press, 1984. 709p.

George, E. F. *Plant propagation by tissue culture, part 1: the technology*. 2nd ed. Edington: Exegetics, 1993. 786 p.

George, E.F. *Plant Propagation by Tissue Culture*. 2. Ed., Edington: Exegetics. 1361 p. Part 2: In Practice. 1996.

Gniazdowska , A.; Rychter, A. M. Nitrate uptake by bean (*Phaseolus vulgaris* L.) roots under phosphate deficiency. *Plant and Soil*, Wageningen, v.226, p.79-85, 2000.

Gonçalves, A. L. *Substratos para a produção de mudas de plantas ornamentais*. In: Minami, K. (Ed.) *Produção de mudas de alta qualidade em hortaliças*. São Paulo: T. A. Queiroz, cap. 14, p. 107-115, 1995a.

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

Gonçalves. J. L. De M.; Poggiani, F. *Substrato para produção de mudas*. In: SOLOSUELO-Congresso Americano de Ciencia Do Solo, 13., 1996. Águas de Lindóia-SP. Resumos expandidos. Águas de Lindóia. 1996.

Grattapaglia, D. & Machado, M. A. Micropropagação. In: Torres, A. C.; Caldas, L. S.; Buso, J. A. (Eds.). *Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas*. EMBRAPA-SPI/CNPH, Brasília, v.1, p. 183-260, 1998.

Hermans, C.; Verbruggen, N. Physiological characterization of Mg deficiency in *Arabidopsis thaliana*. *Photosynthetica*, Prague, v.42, n.2, p.251-255, 2004.

Hermans, C.; Hammond, J. P.; White, P. J.; Verbruggen, N. How plants respond to nutrient shortage by biomass allocation? *Trends in Plant science*, Amsterdam, v.11, n.12, 2006.

Hirai, M. Y.; Saito, K. Post-genomics approaches for the elucidation of plant adaptive mechanisms to sulphur deficiency. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, v.55, n.404, p. 1871-1879, 2004.

Hoffmann, A. Aclimação de mudas produzidas *in vitro* e *in vivo*. *Informe Agropecuário*, v.23, p.21-24, 2002.

Hu, C. Y.; Wang, P. J. Meristem, shoot tip, and bud culture. In: Evans, D. A.; Sharp, W. R.; Ammirato, P. V.; et al. *Handbook of plant cell culture*. New York: MacMillan Publishing Co. p. 177-227. 1983.

IBRAFLOR, *Instituto Brasileiro De Floricultura*. Disponível em: <<http://www.aprendendoexportar.gov.br/flores/onde/ibraflor.asp>>. Acesso em: 15 de jan. 2010.

Junqueira, A. H.; Peetz, M. da S. Estudo da competitividade e eficiência da cadeia produtiva de flores e plantas ornamentais da Amazônia – região norte. Manaus: SEBRAE/AM, 2008.

Kämpf, A. N; Fermino, M. H. 2000. Seleção de materiais para uso como substrato. Substratos para plantas: a base da produção vegetal em recipientes. In: Kämpf, A. N; Fermino, M. H. (Ed.). *Substratos para plantas: a base da produção vegetal em recipientes*. Porto Alegre: Gênese, p.139-145.

Kiehl, E. J. *Fertilizantes orgânicos*. Piracicaba: Ceres, 1985, 492p.

Kress, W.J.; Betancur, J; Echeverry, B. *Heliconias – Llamadas de la selva colombiana*. Cristina Uribe Editores, Colômbia, 1999.

Kodja, H.; Govinde, S. J.; Gurib, F. A.; Robene, S. I.; Humeau. L.; Figier, J. Micropropagation of *Psidia arguta* through cotyledonary axillary bud culture. *Plant Growth Regulation*, v. 25, n. 2, p. 75-80, 1998.

Kozai, T. *Autotropic (sugar-free) tissue culture for promoting the growth of plantlets in vitro and reducing biological contamination*. International Symposium on Application of Biotechnology for Small Industries in development countries. Bangkok, p. 39-51, 1988.

Kozai, T. Micropropagation under photoautotrophic conditions. In: Debergh, P.C.; Zimmerman, T.H. *Micropropagation technology and application*. Dordrecht: Kluwer. 484 p. 1991.

Lacerda, M. R. B.; Passos, M. A. A.; Rodrigues, J. J. V. Características físicas e químicas de substratos à base de pó de coco e resíduo de sisal para produção de mudas de sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth). *Revista Árvore*, vol.30, no.2, p.163-170, Mar./Apr. 2006.

Lamas, A. M. *Floricultura Tropical – Tecnologia de Produção*. Maceió/AL. 65 p. 2004.

Lamas A, M. *Floricultura Tropical – Avanços Tecnológicos*. Fortaleza: Instituto Frutal (CD-ROM). 2003.

Lamas, A. M. *Floricultura Tropical: Técnicas de cultivo*. Recife: SEBRAE/PE, 2002. 88p.

Lamas, A. M. *Curso Técnico de cultivo: Plantas Ornamentais Tropicais e Floricultura Tropical*. Alagoas, (Apostila). 1998. 169p.

Larcher, W. *Ecofisiologia Vegetal*, São Carlos: Rima, 2000. 531p.

Lawlor, D. W. Carbon and nitrogen assimilation in relation to yield: mechanisms are the key to understanding production systems. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, v.53, n.370, p.773-787, 2002.

Maciel, A. L. R.; Silva, A. B.; Pasqual, M. Aclimatização de plantas de violeta africana (*Staintpaulia ionantha* Wendl.) obtidas “in vitro”: efeitos do substrato. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 24, n.1, p. 9-12, jan/mar., 2000.

Maffeis, A.; Silveira, R. L. V. A.; Brito, J. O. Reflexos das deficiências de macronutrientes e boro no crescimento de plantas, produção e qualidade de óleo essencial em *Eucalyptus citriodora*. *Scientia Florestalis*, Piracicaba, v.57, p.87-98, 2000.

Malavolta, E. *Manual de nutrição mineral de plantas*. São Paulo: *Agronômica Ceres*, 638p. 2006.

Malavolta, E.; Vitti, G. C.; Oliveira, S. A. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. Piracicaba: *Potafos*, 319p. 1997.

Malavolta, Elementos de nutrição mineral de plantas. São Paulo: *Agronômica Ceres*, 1980. 251p

Marschner, H. Mineral Nutrition of Higher Plants. London: *Academic Press*, 889p. 1995.

Maruyama-Nakashita, A.; Nakamura, Y.; Yamaya, T.; Takahashi, H. Regulation of high-affinity sulphate transporters in plants: towards systematic analysis of sulphur signalling and regulation. *Journal of Experimental Botany*, v.55, n.404, p.1843-1849, 2004.

Mengel, K.; Kirkby, E. A.; Kosegarten, H.; Appel, T. *Principles of plant nutrition*. 5^o ed. Bern: International Potash Institute, 868p. 2001.

Miyavawa, M., Pavan, M. A., Muraoka, T.; Carmo, C. A. F.; Mello, W. J. *Análise química do tecido vegetal*. In: SILVA, F. C. (Ed.). Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes. Brasília: EMBRAPA. p. 170- 223. 1999.

Mosca, J. L.; Queiroz, M. B.; Almeida, A. S.; Cavalcante, R. A.; Alves, R. E. *Helicônia: Descrição, Colheita e Pós-Colheita*. EMBRAPA, Doc. 91. 33 p. 2004.

Nathan, M.J.; Goh, C.J.; Kumar, P.P. In vitro propagation of *Heliconia psittacorum* by bud culture. *HortScience*, v.27, p.450-452, 1992.

Neto, D. A., Tavares, S. Translocação de hormônios vegetais. In: Camargo E Castro, P. R.; Alves De Sena, J. O.; Kluge, R. A. *Introdução A Fisiologia Do Desenvolvimento Vegetal*, Maringá: Eduem, 2002. p.123-137.

Oliveira, M. R. V. O emprego de casas de vegetação no Brasil: vantagens e desvantagens. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 30, n. 8, p. 1099-1060, 1995.

Pasqual, M.; Chalfun, N. N. J.; Ramos, J. D. *Aplicações na propagação de plantas*. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 81 p.

Paula, C. C. *Cultivo de bromélia*. Viçosa: Aprenda fácil, 139 p., 2000.

Prado, R. D.; Natale, W.; Correa, M. C. D. Liming and postharvest quality of carambola fruits. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, Curitiba, v.48, n.5, p.689-696, 2005.

Pervez, H.; Ashraf, M.; Makhdum, M. I. Influence of potassium nutrition on gas exchange characteristics and water relations in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Photosynthetica*, Prague, v.42, n.2, p.251-255, 2004.

Pierik, R.L.M. *In vitro Culture of Higher Plants*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers. 348 p. 1997.

Pinto, A. C. R.; Graziano, T. T.; Barbosa, J. C.; Lasmar, F. B. Modelos para estimativa da área foliar de *Curcuma alismatifolia* e *Curcuma zedoaria*. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v.23, n.2, p.529, 2005.

Ponte, E. M.; *Micropropagação de Eucalyptus globulus ssp. Globulus Labill*. Dissertação de Mestrado em ciências – Universidade Federal de Pelotas. 46 p. 1999.

Preece, J. E.; Sutter, E. G. *Aclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field*. In: Debeegh. P. C.; Zimmerman, R. H. (Ed.) *Micropropagation: technology and application*. Amsterdam: Kluwer Academic, p. 7-93, 1991.

Radmann, E.B., Fachinello, J.C., Peters, J.A. Efeito de auxinas e condições de cultivo no enraizamento *in vitro* de porta-enxertos de macieira ‘M-9’. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal - SP, v. 24, n. 3, p. 624-628, 2002.

Raghothama, K. G.; Karthikeyan, A.S. *Phosphate acquisition. Plant and Soil*, Wageningen, v.274, p.37-49, 2005.

Rocha, E. L. J. *Aclimatização de mudas micropropagadas de helicônia sob diferentes lâminas de irrigação, tipos e volumes de substrato*. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Ceará. Fortaleza – CE. 74 p. 2007.

Rodrigues, J. D. *Fisiologia vegetal e sua importância na tecnologia de aplicação de defensivos*. *Biológico*, Campinas, v.65, n.1/2, p.59-61, 2003.

Rodrigues, T. M.; Paiva, P. D. De O.; Rodrigues, C. R. *Uso de diferentes substratos no desenvolvimento de mudas de bromélia imperial*. In: Congresso Brasileiro De Floricultura E Plantas Ornamentais, 14., 2003, Lavras. Resumo. Lavras:UFLA, p.409. 2003.

Rosa, M. F.; Santos, J. S. S.; Montenegro, A. A. T.; Abreu, F. A. P.; Araújo, F. B. S.; Norões, E. R. Caracterização do pó da casca de coco verde usado como substrato agrícola. *Comunicado Técnico*, 5. Fortaleza:Embrapa Agroindústria Tropical, 6p. 2001.

Rossi, F.; Shimoda, E. *Apostila de minhocultura*. Viçosa: UFLA, 1995, 10p.

Salgado, S. M. L.; Cunha, R. L.; Niella, G. R.; Teixeira, H.; Pasqual, M. Efeito da utilização de TDZ e Benomyl na micropropagação do crisântemo (*Dendranthema morifolium*). *Ciência Agrotecnica*, Lavras, v.25, n.2, p.274-280, mar/ abril. 2001.

Santos, C. H.; Domingues, M. C. S. *Mecanismos de ação de auxinas*. In: Camargo E Castro, P. R.; Alves De Sena, J. O.; Kluge, R. A. *Introdução a fisiologia do desenvolvimento vegetal*, Maringá: Eduem, p. 35-47. 2002.

Santos, C. C. C.; Rodrigues, P. H. V. Ocorrência de variação somaclonal em mudas de bananeira micropropagadas da cultivar Pacovan (*Musa* spp., grupo AAB). *Revista Bragantia*, Campinas, v. 63, p.201-205, 2004.

SEBRAE – Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. *Revista Sebrae Agronegócios, Jardins de oportunidades*. 64 p. 2005.

Silva, J. V.; Bezerra, F. C.; Hernandez, F. F. F.; Cordão Terceiro Neto, C.P.; Leal, F. R. R. *Efeito do substrato na aclimatização de mudas micropropagadas de antúrio*. In: IV Encontro Nacional Sobre Substrato Para Plantas, Viçosa:UFV, p.364. 2004.

Silveira, C. A. P.; Fachinello, J. C.; Fortes, G. R. L.; Citadin, I.; Rodrigues, A. C.; Quezada, A. C.; Silva, J. B. multiplicação *in vitro* de porta enxerto do gênero *Prunus* sob diferentes concentrações de BAP e dois meios de cultura. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v. 23, n. 3. p 488-492. 2001.

Souza-Júnior, E. E. De; Barboza, S. B. S. C.; Souza, L. A. C. *Efeito de substratos e recipientes na aclimação de plântulas de abacaxizeiro [Ananascomosus (L.) Merrill] cv. Pérola*. Pesquisa Agropecuária Tropical , v. 31, n. 2, p.147-151, 2001

Sutter, E.G.; Ahmadi, H.; Labavitch, J. .M. Direct regeneration of strawberry from leaf disks. *Acta Horticulturae*, v. 447, p. :243-246, 1997.

Taiz, L. Zeiger, E. Nutrição mineral. *Fisiologia vegetal*. Porto Alegre. p 95 – 112. 2004.

Terceiro Neto, C. P. C.; Hernandez, F. F. F.; Bezerra, F. C.; Souza, R. F. De; Cavalcanti, M. L. F. Efeito de diferentes substratos na aclimação “ex vitro” de mudas de Violeta Africana (*Saintpaulia ionantha* Wendl) *Revista Biologia e Ciência da Terra*, v. 4, n. 2, 2004.

Tombolato, A. C.; Rivas, E. B.; Coutinho, L. N.; Bergmann, E. C.; Imenes, S. L.; Furlani, P. R.; Castro, C. E. F.; Matthes, L. A. F.; Saes, L. A.; Costa, A. M. M.; Tagliacozzo, G. M. D.; Leme, J. M. *Ocultivo de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília:EMBRAPA/CNPH, v. 1, 864p.1998.

Torres, A. C.; Caldas, L. S.; Buso, J. A. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: EMBRAPA/CNPH, v. 1, 864p., 1998.

Torres, A. C. ; Duval, F. G. ; Ribeiro, D. G. ; Barros, A.F.F. ; Aragão, F. A. S. Efeito da sacarose, cinetina, isopentenil adenina no desenvolvimento de embriões de *Heliconia rostrata* in vitro. *Horticultura Brasileira*, Brasília, DF, v. 23, n. 5, p. 789-792, 2005.

Vieira, E. L.; Monteiro, C. A. Hormônios vegetais. In: Camargo E Castro, P. R.; Alves De Sena, J. O.; Kluge, R. A. *Introdução a fisiologia do desenvolvimento vegetal*, Maringá: Eduem. p. 79-104. 2002.

Yeh, M. D.; Lin, L.; Wright, C. J. Effects of mineral nutrient deficiencies on leaf development, visual symptoms and shoot-root ratio of *Spathiphyllum*. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v.86, p.223-233, 2000.

Zhao, D.; Oosterhuis, D. M. & Bednarz, C. W. Influence of potassium deficiency on photosynthesis, chlorophyll content, and chloroplast ultrastructure of cotton plants. *Photosynthetica*, Prague, v.39, n.1, p.103-109, 2001.

Zini, O. 2005. *Folhagens Tropicais, Cultivo e Manejo*. Apostila do curso de Folhagens Tropicais – SEBRAE/AM.

Capítulo 1

Raizer, M. D. M.; Quisen, R. C.; Iriarte-Mafrtel, J. H. 2011. Determinação da composição do meio de cultura para a multiplicação *in vitro* de *Heliconia Chartacea* (Lane X Barreiros) Var. Sexy Pink. Trabalho a ser enviado para publicação na revista Plant Cell Culture & Micropropagation. Lavras – MG. ISS: 0044-5967

DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA PARA A MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE *Heliconia chartacea* (Lane x Barreiros) var. *Sexy Pink*¹

Marcelo Domingues Martins RAIZER²; Regina Caetano QUISEN³; Jorge Hugo IRIARTE-MARTEL⁴.

RESUMO

As helicônias são plantas ornamentais tropicais de grande interesse na floricultura brasileira, cuja micropropagação permite a obtenção de mudas em larga escala, com genótipo idêntico ao do ancestral comum e alta qualidade fitossanitária. Com o objetivo de determinar a composição do meio de cultura para a multiplicação *in vitro* de *Heliconia chartacea* var. *Sexy Pink* e as concentrações ideais de citocininas na indução de brotações, foram testados diferentes níveis de nitrogênio e cálcio no meio básico de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) em combinações com Benzilaminopurina (BAP) e Tidiazuron (TDZ) e diferentes concentrações de BAP, associado ou não a água de coco. O tratamento com o meio de cultura MS acrescido de 0,25 mg L⁻¹ de TDZ, seguido do tratamentos MS e 3 mg L⁻¹ de BAP e MS com 220,00 mg L⁻¹ de CaCl₂.2H₂O e 0,25 mg L⁻¹ de TDZ foram os que apresentaram melhores respostas para emissão e tamanho das brotações, corroborando com Nannetti & Pinto (1995), que verificaram a necessidade de diferentes concentrações de citocininas para diferentes níveis de nitrogênio e cálcio para o desenvolvimento de brotações de *Heliconia sp.* Verificou-se também que para as variações das concentrações de BAP não houve diferenças estatísticas entre os tratamentos com 2 e 3 mg L⁻¹ associados ou não com água de coco, porém, a concentração com 2 mg L⁻¹ e 10% de água de coco conferiu melhores resultados demonstrando ser o melhor meio de cultura para a multiplicação da *Heliconia chartacea* var. *Sexy Pink*.

PALAVRAS-CHAVE: Cultura de Tecido, Multiplicação, Benzilaminopurina, Água de Coco.

¹Parte da dissertação apresentada ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, pelo primeiro autor.

²Engenheiro Agrônomo, Mestrando do Programa de Pós Graduação em Agricultura no Trópico Úmido do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Av. André Araújo, 2936, Aleixo, CEP 69060-001, Manaus, AM, Brasil. e-mail: marcelo_raizer@hotmail.com.

³Engenheira Floresal, Doutoranda em Agronomia – Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Embrapa Amazonia Ocidental. Rodovia AM-010, Km 29, Zona Rural - CEP: 69010-970. Caixa Postal 319 – Manaus, AM, Brasil. e-mail: regina.quisen@cpaa.embrapa.br.

⁴Engenheiro Agrônomo, Doutor em Genética e Melhoramento de Plantas, Pesquisador do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Av. André Araújo, 2936, Aleixo, CEP 69060-001, Manaus, AM, Brasil. e-mail: jhim@inpa.gov.br.

DETERMINAÇÃO DE COMPOSIÇÃO DE CULTURA MEDIUM FOR THE *IN VITRO* MULTIPLICATION *Heliconia chartacea* (Barry Lane x) var. Sexy Pink

ABSTRACT

The tropical plant heliconia are of great interest in Brazilian floriculture, whose micropropagation can obtain seedlings on a large scale, with a genotype identical to the common ancestor and high health status. Aiming to determine the composition of culture medium for in vitro propagation of *Heliconia chartacea* var. Sexy Pink and the optimal concentrations of cytokinins on shoot induction were tested at different levels of nitrogen and calcium in the basic culture medium MS (Murashige & Skoog, 1962) in combination with Benzylaminopurine (BAP) and Thidiazuron (TDZ) and different concentrations of BAP, with or without coconut water. Treatment with MS medium supplemented with 0.25 mg L⁻¹ TDZ treatments followed by MS and 3 mg L⁻¹ BAP and MS with 220.00 mg L⁻¹ and 0.25 CaCl₂.2H₂O mg L⁻¹ TDZ showed the best responses to the issue and size of the shoots, confirming Nannetti & Pinto (1995), who found a need for different concentrations of cytokinins for different levels of nitrogen and calcium to the developing shoots *Heliconia sp.* It was also found that for variations of concentrations of BAP no statistical differences between treatments with 2 and 3 mg L⁻¹ or not associated with coconut water, however, the concentration of 2 mg L⁻¹ and 10% water Coconut has measured better results proving to be the best culture medium for multiplication of *Heliconia chartacea* var. Sexy Pink

Index terms: Tissue Culture, Multiplication, Benzilaminopurine, Coconut Water.

1. INTRODUÇÃO

As plantas ornamentais tropicais se diferenciam pela sua beleza, que encantam tanto através das suas formas exóticas, como pela variação de cores o que tem proporcionado ao mercado de flores ornamentais um crescimento da ordem de 12% a 15% ao ano, acima da média da economia nacional (SEBRAE, 2010). Dentre as flores ornamentais tropicais destaca-se a *Heliconia chartacea* var. Sexy Pink que, por sua vez, tem através dos métodos tradicionais de propagação, seja via sexualmente, por semente, ou assexuadamente via rizoma, encontrado entraves como o tempo para o desenvolvimento da planta e a disseminação e acúmulo de agentes causais de doenças que são transmitidas e intensificadas entre plantios sucessivos, via rizomas contaminados (Torres *et al.*, 2005), tendo como alternativa para contornar essas dificuldades a cultura de tecidos.

Uma das técnicas da cultura de tecidos é a micropropagação que por sua vez, proporciona ao produtor mudas de elevada qualidade livre de fungos, bactérias e principalmente vírus e nematóides, padronizadas, em quantidade suficiente e necessária para suprir em curto espaço de tempo, a demanda crescente de um mercado cada vez mais exigente.

Considerando a importância das helicônias e as vantagens das técnicas aplicadas ao cultivo *in vitro*, torna-se necessária a realização de estudos mais detalhados e específicos, para viabilizar a micropropagação para esta variedade.

Esse trabalho teve como objetivo determinar a composição do meio de cultura para a multiplicação *in vitro* de *Heliconia chartacea* (Lane x Barreiros) var. Sexy Pink e as concentrações ideais de auxinas e/ou citocininas na obtenção de brotações em condições de cultura *in vitro*;

2. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais pertencente à Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária – EMBRAPA Amazônia Ocidental, em Manaus-AM.

Para a realização dos experimentos foram utilizados inicialmente materiais propagativos proveniente de ápices caulinares de *Heliconia chartacea* var. Sexy Pink, já estabelecidas *in vitro* cedidas pelo Centro de Biotecnologia do Amazonas - CBA.

Experimento 01: Como são poucos os dados existentes sobre as helicônias, para instalação inicial dos experimentos foi utilizado como controle o protocolo utilizado para banana pelo LCTV – EMBRAPA, e visando um suprimento de nutrientes mais adequada para a espécie, modificações das concentrações do meio de cultura MS – Soluções A (NH_4NO_3) e C ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), no esquema fatorial 2x4 (duas citocininas, BAP e TDZ x quatro meios de cultura, MS pleno, MS Modificado 1- $8.250,00 \text{ mg L}^{-1}$ de NH_4NO_3 , MS Modificado 2 - $220,00 \text{ mg L}^{-1}$ de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e MS modificado 3 – $880,00 \text{ mg L}^{-1}$ de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).

Os ápices caulinares propagados foram inoculados em câmara de fluxo laminar transversal, em tubos de ensaio com capacidade para 50 mL, contendo 10 mL de meio de cultura MS (Sais e minerais de Murashige & Skoog, 1962), suplementado com 30 g L^{-1} de sacarose e solidificado com $6,0 \text{ g L}^{-1}$ de ágar com a adição de AIA (ácido indolilacético) na concentração de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$, duas combinações dos reguladores de crescimento BAP (benzilaminopurina) e Tidiazuron – TDZ [1-fenil-3-(1,2,3-tiadiazol-5-il) uréia] nas concentrações de $3,0$ e $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ respectivamente, associados com sais de MS e três variações do meio, conforme mostra a Tabela 01, sendo o pH de todos os meios ajustado para 5,8 antes de ser autoclavado à 121°C por 15 minutos e 1,3 atm de pressão.

Tabela 01: Tratamentos com sais de MS e três modificações nas suas concentrações, em associação com duas citocininas (BAP e TDZ), para a multiplicação *in vitro* de *Heliconia chartacea* var. Sexy Pink. Manaus - AM.

Tratamentos	0,1 mg L ⁻¹ AIA	3 mg L ⁻¹ BAP	0,25 mg L ⁻¹ TDZ	MS (10%)	MS (Mod. 1)	MS (Mod. 2)	MS (Mod. 3)
1	X	X		X			
2	X		X	X			
3	X	X			X		
4	X		X		X		
5	X	X				X	
6	X		X			X	
7	X	X					X
8	X		X				X

MS (Mod.1, 2 e 3) = MS modificado 1, 2 e 3; MS modificado 1 – 8.250,00 mg L⁻¹ de NH₄NO₃; MS modificado 2 – 220,00 mg L⁻¹ de CaCL₂.2H₂O; MS modificado 3 – 880,00 mg L⁻¹ de CaCL₂.2H₂O.

O delineamento experimental foi o DIC em esquema fatorial 4 x 2 (quatro combinações do meio de cultura MS e duas citocininas – BAP e TDZ) sendo os tratamentos dispostos da seguinte forma: **Tratamento 1:** 3 mg L⁻¹ BAP; **Tratamento 2:** 0,25 mg L⁻¹ TDZ; **Tratamento 3:** 3 mg L⁻¹ BAP + MS modificado 1; **Tratamento 4:** 0,25 mg L⁻¹ TDZ + MS modificado 1; **Tratamento 5:** 3 mg L⁻¹ BAP + MS modificado 2; **Tratamento 6:** 0,25 mg L⁻¹ TDZ + MS modificado 2; **Tratamento 7:** 3 mg L⁻¹ BAP + MS modificado 03; **Tratamento 8:** 0,25 mg L⁻¹ TDZ

Experimento 2: Em câmara de fluxo laminar transversal os ápices foram inoculados em frascos com capacidade para 250 ml, contendo 40 mL meio de cultura MS (Sais e minerais de Murashige & Skoog, 1962), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e solidificado com 6,0 g L⁻¹ de ágar com a adição dos reguladores de crescimento BAP (benzilaminopurina) nas concentrações de 2, 3 e 4 mg L⁻¹, e AIA (ácido indolilacético) na concentração de 0,1 mg L⁻¹

associados ou não a água de coco conforme mostra a Tabela 02, sendo o pH ajustado a 5.8 com 0,1 M KOH antes de ser autoclavado à 121°C por 15 minutos e 1,3 atm de pressão.

Tabela 02: Tratamentos com três modificações nas concentrações de citocinina (BAP) e duas de água de coco, para a multiplicação *in vitro* de *Heliconia chartacea* var. *Sexy Pink*. Manaus - AM.

Tratamentos	0,1 mg L ⁻¹ AIA	2 mg L ⁻¹ BAP	3 mg L ⁻¹ BAP	4 mg L ⁻¹ BAP	10% Água de coco
1	X	X			
2	X		X		
3	X			X	
4	X	X			X
5	X		X		X
6	X			X	X

Foram realizadas três subculturas de 45 dias cada, sendo que ao final de cada período foi avaliado o número de brotações adventícias formadas por cada explante.

O delineamento estatístico empregado foi inteiramente casualizado. Para cada um dos seis tratamentos foram feitas 15 repetições perfazendo um total de 90 unidades experimentais por subcultura, cada uma com três explantes por parcela.

O experimento foi mantido em sala de crescimento à temperatura de 26 ± 1 °C, e radiação luminosa de $38 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fornecidas por lâmpadas fluorescentes brancas de 20 W com fotoperíodo de 16 horas.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey e Duncam, a 5% de significância para a comparação das médias dos tratamentos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento 01: Durante o cultivo *in vitro* de *Heliconia chartacea* var. Sexy Pink, obteve-se uma taxa de multiplicação diferenciada para cada tratamento. O tratamento com o meio de cultura MS acrescido de 0,25 mg L⁻¹ de TDZ, seguido do tratamentos MS + 3 mg L⁻¹ de BAP e MS com 220,00 mg L⁻¹ de CaCL₂.2H₂O + de 0,25 mg L⁻¹ de TDZ foram os que apresentaram melhores respostas para emissão de brotações conforme mostra a Figura 01.

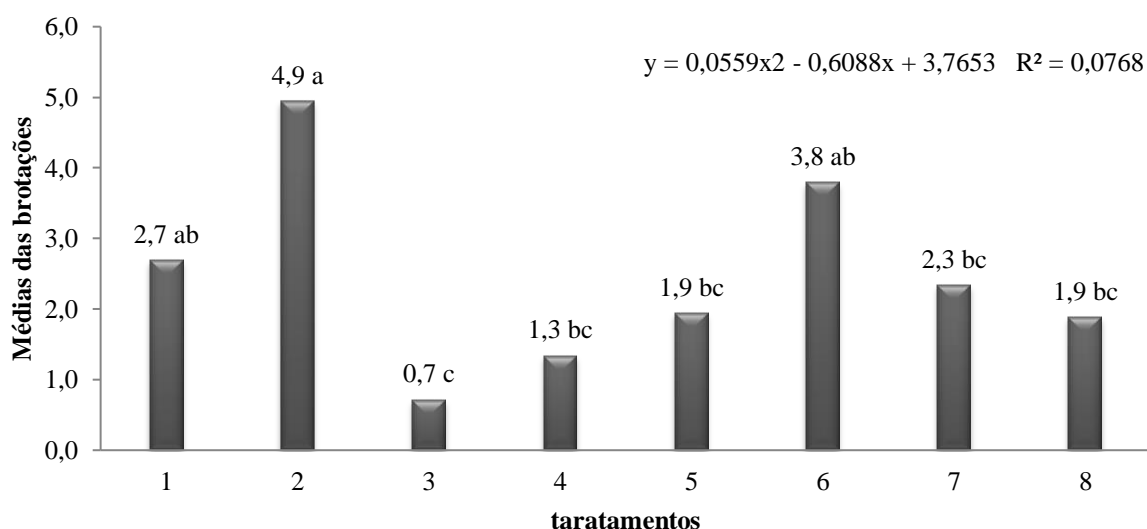


Figura 01: Médias de brotações emitidas após 45 dias de subcultivo. Tratamento 1: 3 mg L⁻¹ BAP; Tratamento 2: 0,25 mg L⁻¹ TDZ; Tratamento 3: 3 mg L⁻¹ BAP + MS modificado 1; Tratamento 4: 0,25 mg L⁻¹ TDZ + MS modificado 1; Tratamento 5: 3 mg L⁻¹ BAP + MS modificado 2; Tratamento 6: 0,25 mg L⁻¹ TDZ + MS modificado 2; Tratamento 7: 3 mg L⁻¹ BAP + MS modificado 03 e Tratamento 8: 0,25 mg L⁻¹ TDZ. Médias seguidas da mesma letra nas colunas não diferem entre si ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste Tukey

Resultados semelhantes foram obtidos por Nannetti (1994) que determinou uma metodologia básica para a micropropagação de *Heliconia sp.* e observando um maior número de brotos nos explantes estabelecidos em meio contendo 2,5 mg L⁻¹ de BAP e entre os tratamentos com TDZ a maior porcentagem de brotações ocorreu com adição de 0,25 mg L⁻¹.

Dentre os tratamentos analisados para variável tamanho das brotações, não houve diferenças estatísticas, ou seja, sendo elas em maior ou menor quantidade de acordo com cada tratamento as médias entre elas estatisticamente mantiveram-se iguais conforme pode ser

observado na Figura 02.

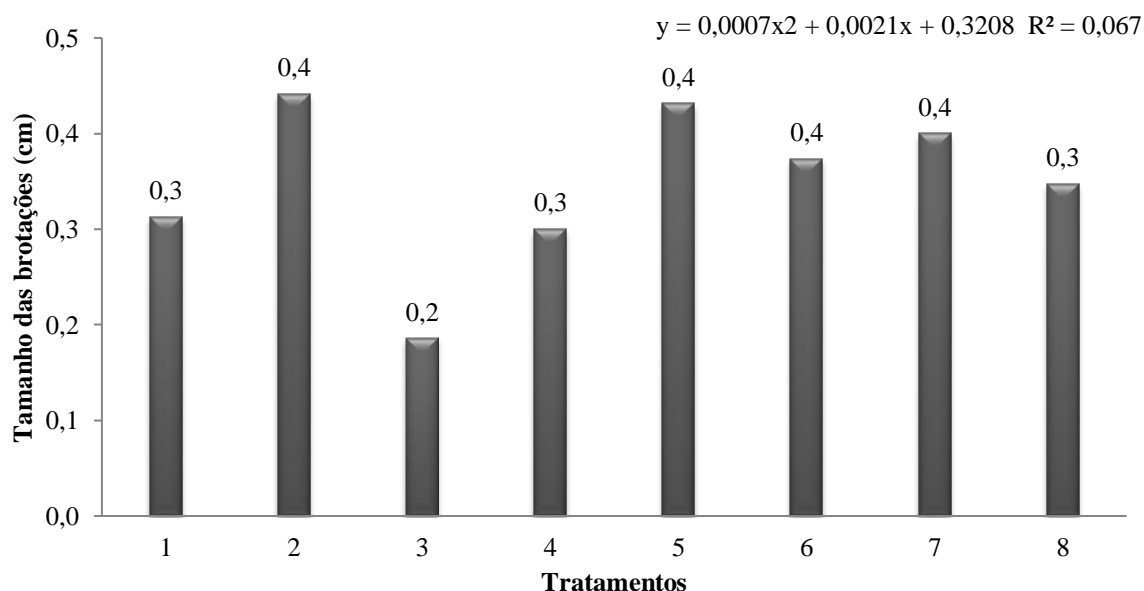


Figura 02: Médias do tamanho das brotações emitidas após 45 dias de subcultivo. Tratamento 1: 3 mg L⁻¹ BAP; Tratamento 2: 0,25 mg L⁻¹ TDZ; Tratamento 3: 3 mg L⁻¹ BAP + MS modificado 1; Tratamento 4: 0,25 mg L⁻¹ TDZ + MS modificado 1; Tratamento 5: 3 mg L⁻¹ BAP + MS modificado 2; Tratamento 6: 0,25 mg L⁻¹ TDZ + MS modificado 2; Tratamento 7: 3 mg L⁻¹ BAP + MS modificado 03 e Tratamento 8: 0,25 mg L⁻¹ TDZ.

Embora o BAP seja utilizado na maioria dos sistemas experimentais *in vitro*, verifica-se às vezes, que as culturas apresentam diferentes sensibilidades a esta citocinina dependendo do meio de cultura utilizado. Nannetti & Pinto (1995), verificaram a necessidade de diferentes concentrações de citocininas para diferentes níveis de nitrogênio e cálcio para o desenvolvimento de brotações de *Heliconia sp.* Outros autores, como Preece (1995) e Murashige & Skoog (1962), chamam a atenção também para concentração da solução salina do meio, uma vez que esta apresenta uma interrelação entre os sais inorgânicos e os reguladores de crescimento no meio de cultura, esta interação entre nutrientes e reguladores de crescimento, influencia na quantidade de reguladores utilizados, uma vez que concentrações mais diluídas do meio requerem menores quantidades de reguladores, como observou Preece (1995) para o TDZ.

O acréscimo de 880,00 mg L⁻¹ de CaCl₂.2H₂O acarretou uma clorose dos explantes e

uma baixa porcentagem de brotações tanto no tratamento com BAP, como no TDZ contrastando com os resultados obtidos por Nannetti (1994). Entretanto o tamanho das brotações foi superior nas concentrações de 220,00 mg L⁻¹ e 880,00 mg L⁻¹, nos meios com TDZ e BAP respectivamente.

A alta concentração de NH₄NO₃ (8.250,00 mg L⁻¹, cinco vezes mais do que a normal utilizada) acabou causando uma oxidação dos explantes de 65% no tratamento 03 e 55% no tratamento 04 (Figura 3 b).

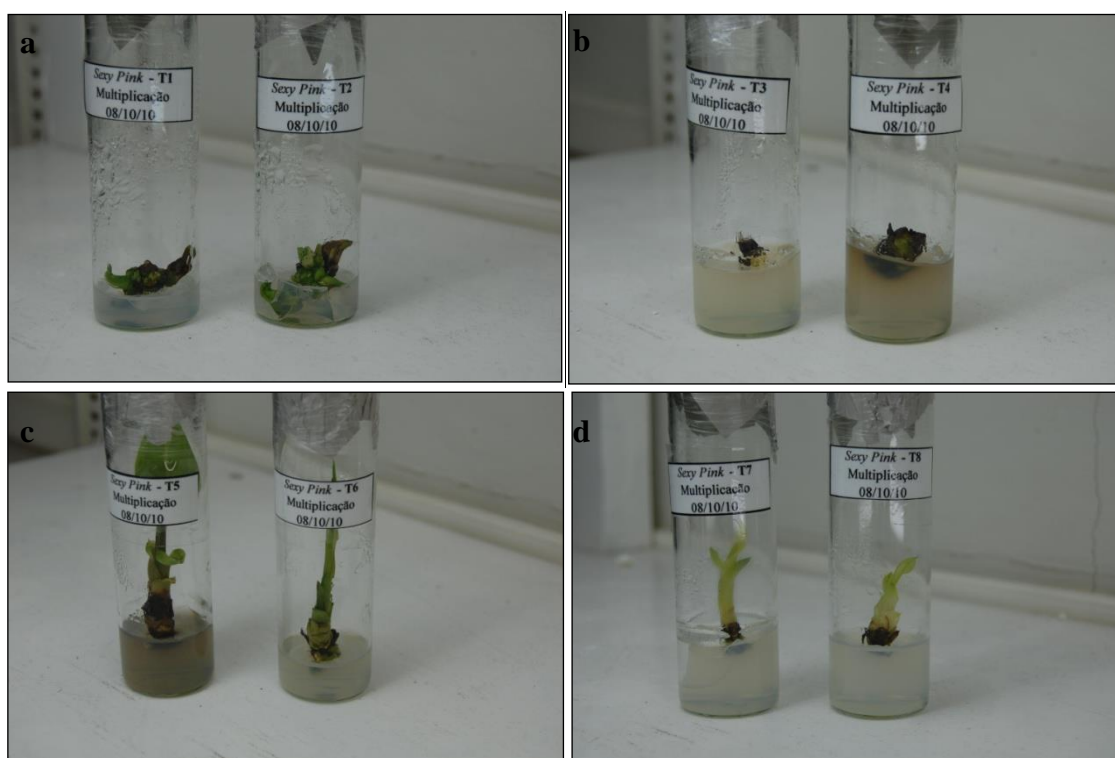


Figura 03: a: tratamentos 01 - 3 mg L⁻¹ BAP e 02 - 0,25 mg L⁻¹ TDZ após 45 dias de inoculação; b: tratamentos 03 - 3 mg L⁻¹ BAP + MS modificado 1 e 04 - 0,25 mg L⁻¹ TDZ + MS modificado 1; c: tratamentos 05 - 3 mg L⁻¹ BAP + MS modificado 2 e 06 - 0,25 mg L⁻¹ TDZ + MS modificado 2; d: tratamentos 07 - 3 mg L⁻¹ BAP + MS modificado 03 e 08 - 0,25 mg L⁻¹ TDZ

A partir de determinados níveis de nitrogênio, o número de brotações diminuiu, mostrando que a concentração de N no meio de MS é tóxica, inibindo a indução de brotações. De acordo com Bessalho *et al.* (1993), o nitrogênio também foi tóxico para formação de brotos em explantes de *Stevia rebaudiana*. Segundo os autores, foi importante a diminuição de NH₄NO₃ do MS para 5,15 g L⁻¹ para otimizar a indução de brotações. Observou-se que o

necessário seria a redução da concentração de nitrogênio para uma melhor análise da interação com o meio de cultura, ao invés de aumentar sua concentração. Outros trabalhos mostraram um aumento da indução em brotos com a redução na concentração de nitrogênio (Welander, 1979; Gertsson, 1988; Bessalok *et al.*, 1993), sobretudo quando se aumentou a relação nitrato/amônia (Zens & Zimmer, 1986).

Experimento 02: Durante o cultivo *in vitro* de *Heliconia chartaceae* var. Sexy Pink, obteve-se uma taxa de multiplicação diferenciada para cada tratamento, verificando-se também a produção do primeiro broto aos 15 dias após cada subcultura.

Diniz *et al.* (1999), afirmam que teores de nutrientes necessários para plantas de bananeira variam entre as cultivares, assim como entre os diferentes estádios de desenvolvimento. Desta forma, como foi observado neste trabalho, os diferentes meios de cultura proporcionaram diferentes respostas durante a multiplicação (Tabela 03), sugerindo a necessidade de um estudo aprofundado na determinação da composição orgânica e mineral do meio de cultura, focalizando a quantidade nutricional imprescindível para manter o desenvolvimento e a diferenciação *in vitro*.

Tabela 03: Avaliações do número de brotações emitidas de três subculturas de *Heliconia chartacea* var. Sexy Pink. Manaus - AM.

Tratamentos	1ª Avaliação	2ª Avaliação	3ª Avaliação
1	1,13 ab	1,09 ab	0,58 ab
2	1,88 a	0,76 ab	0,36 ab
3	0,66 b	0,31 b	0,11 b
4	1,46 ab	1,23 a	1,13 a
5	1,18 ab	0,93 ab	0,69 ab
6	0,99 ab	0,66 ab	0,53 ab
CV%	40,01	52,92	78,46

Tratamento 1: MS + 0,1 mg L⁻¹ AIA + 2 mg L⁻¹ BAP; Tratamento 2: MS + 0,1 mg L⁻¹ AIA + 3 mg L⁻¹ BAP; Tratamento 3: MS + 0,1 mg L⁻¹ AIA + 4 mg L⁻¹ BAP; Tratamento 4: MS + 0,1 mg L⁻¹ AIA + 2 mg L⁻¹ BAP + 10% água de coco; Tratamento 5: MS + 0,1 mg L⁻¹ AIA + 3 mg L⁻¹ BAP + 10% água de coco; Tratamento 6: MS + 0,1 mg L⁻¹ AIA + 4 mg L⁻¹ BAP + 10% água de coco. Médias seguidas da mesma letra nas colunas não diferem entre si ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste Tukey

Verificou-se que na multiplicação de plântulas de *Heliconia chartacea* var. Sexy Pink não houve diferenças estatísticas entre o T1 com 2 mg L⁻¹ BAP e o T2, com 3 mg L⁻¹ BAP, porém, na primeira subcultura o T2 se mostrou mais favorável com uma taxa de multiplicação maior. Nachtigal *et al.* (1995) trabalhando com doses crescentes de BAP para a multiplicação do Kiwi, observaram que o mesmo possui efeito crescente até a concentração de aproximadamente 2,0 mg L⁻¹, a partir da qual ocorre uma diminuição da taxa de multiplicação. Isto demonstra a necessidade de uma fonte de citocinina exógena para promover a multiplicação celular. Já Fortes *et al.* (1992), em experimento realizado nas mesmas condições, encontraram um incremento linear do número de brotações de kiwi, cv. *Hayward*, até próximo à concentração de 2,5 mg L⁻¹ de BAP. Resultados similares foram observados por Nathan *et al.* (1992), com *Heliconia psittacorum* e por Nannetti (1994), com *Heliconia sp.*, cuja concentração de 2,5 mg L⁻¹ de BAP apresentou maior eficiência na emissão de gemas. Porém, os primeiros autores obtiveram maior número médio de brotos (5,0) por explante. Estas diferenças podem ser resultantes da interação entre o genótipo utilizado, as condições fisiológicas dos explantes na época da coleta das gemas, bem como da manipulação de cada grupo de trabalho.

A adição de água de coco favoreceu os tratamentos analisados devido à suplementação de sais minerais. De acordo com Nunes *et al.* (2008), o efeito estimulatório da água de coco pode ser explicado pelos elevados teores de glicose, frutose e sais minerais, além de hormônios vegetais, necessários ao processo de formação e desenvolvimento de plântulas. Vieira *et al.* (2009), avaliando a propagação e aclimatação de orquídea *Cattleya* Lindl., observaram que a adição de água de coco e polpa de banana favoreceu a produção de mudas de melhor qualidade e com um maior incremento de massa fresca em relação à testemunha. Resultados semelhantes foram observados por Huang *et al.* (2001), que utilizaram a formulação completa do meio MS para clonagem *in vitro* de orquídea *Paphiopedilum*, e

concluíram que a suplementação do meio com água de coco até a concentração de 22,5% aumentou o número de brotos, a concentração de até 15% a quantidade de raízes formadas.

O tratamento com a adição de 4 mg L⁻¹ BAP foi o que apresentou a menor taxa de multiplicação comparado com os demais provavelmente pelos efeitos adversos das citocininas quando em quantidades elevadas causando efeito fitotóxico, inibindo a morfogênese.

4. CONCLUSÕES

O meio de cultura MS acrescido de 0,25 mg L⁻¹ de TDZ, e o meio MS + 3 mg L⁻¹ de BAP foram os que apresentaram melhores respostas para emissão de brotações.

Com a redução da concentração do BAP de 3 mg L⁻¹ para 2 mg L⁻¹, não houve diferenças estatísticas para emissão de brotações.

A concentração de 2 mg L⁻¹ de BAP, associado a 10% de água de coco é o mais adequado para o cultivo de *Heliconia chartacea* var. *Sexy Pink*.

5. AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo e apoio à pesquisa – FAPEAM, pela bolsa concedida.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA Amazônia Ocidental, pelo apoio institucional e técnico.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BESPALHOK, J. C. B. F.; VIEIRA, L. G. E.; HASHIMOTO, J. M. Fatores influenciando a micropropagação *in vitro* de gemas axilares de *Stevia rebaudiana* (Bert) Bertonil. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v. 4, n. 1, p. 59-61, jul. 1993.

DINIZ, J.D.N.; GONÇALVES, A.N.; HERNANDEZ, F.F.F.; TORRES, A.C. Absorção de micronutrientes por explantes de bananeira *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**,

Brasília, v.34,n.8,p.1385-1391,1999.

FORTES, G.R.L., SANTOS FILHO, B.G., ZECCA, A.G.D., et al. Multiplicação *in vitro* de kiwi, cv. Hayward. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 14, n. 1, p. 71-75, 1992.

GERTSSON, O. E. Influence of macronutrient composition, TIBA, and dark treatment on shoot formation and nitrogen content in petiole explants of senecio x hybrid. **Journal of Horticultural Science**, London, v. 63, n. 1, p. 497-502, May 1988.

HOFFMANN, A. Aclimação de mudas produzidas *in vitro* e *in vivo*. **Informe Agropecuário**, v.23, p.21-24, 2002.

HUANG, L. C.; LIN, C. J.; KUO, C. I. Paphiopedilum cloning in vitro. **Scientia Horticulturae**, Ireland, v.91, p.111-121, 2001.

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

NACHTIGAL, J. C.; ZECCA, A. G. D.; FIGUEIREDO, S. L. B.; FORTES, G. R. L. Influência da benzilaminopurina (bap) na multiplicação *in vitro* de kiwi (*Atinidia deliciosa*). **Ciência Rural**. vol.25 no.1 Santa Maria – RS. 1995.

NANNETTI, D. C., PINTO, J. E. B. P. Efeito de diferentes níveis de nitrogênio e cálcio combinados com BAP e TDZ no desenvolvimento de *Heliconia* sp. *in vitro*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 5., 1995, Lavras. **Anais...** Lavras, p. 144. 1995.

NANNETTI, D. C. **Utilização da cultura de tecidos vegetais na micropropagação e manutenção de *Heliconia* spp.** 1994. 106 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, 1994.

NATHAN, M.J.; GOH, C.J.; KUMAR, P.P. In vitro propagation of *Heliconia psittacorum* by bud culture. **HortScience**, v.27, p.450-452, 1992.

NUNES, C. F.; DALILHIA, M. P.; SANTOS, N.; CUSTÓDIO, T. N.; ARAÚJO, A. G. Diferentes suplementos no cultivo in vitro de embriões de pinhão-manso. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.43, n.1, p.9-14, 2008.

PREECE, J. E. Can nutrient salts partially substitute for plant growth regulator? **Plant tissue culture and biotechnology**, n. 1, v.1, p.26-37, 1995.

ROCHA, E. L. J. **Aclimatização de mudas micropropagadas de helicônia sob diferentes lâminas de irrigação, tipos e volumes de substrato**. Dissertação - Universidade Federal do Ceará. Fortaleza – CE. 74 p. 2007.

SEBRAE, Mercado de flores e plantas movimentada R\$ 3,8 bilhões no País. Disponível em: <http://www.agenciasebrae.com.br/noticia.kmf?canal=199&cod=10808941>. Acessado em: 27/04/2011. Rio Grande do Norte. 2010.

TORRES, A. C. ; DUVAL, F. G. ; RIBEIRO, D. G. ; Barros, A.F.F. ; ARAGÃO, F. A. S. Efeito da sacarose, cinetina, isopentenil adenina no desenvolvimento de embriões de *Heliconia rostrata* in vitro. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 23, n. 5, p. 789-792, 2005.

VIEIRA, J. G. Z.; UNEMOTO, L. K.; YAMAKAMI, J. K.; NAGASHIMA, G. T.; FARIA, R. T.; AGUIAR, R. S. Propagação in vitro e aclimatização de um híbrido de *Cattleya* Lindl. (Orchidaceae) utilizando polpa de banana e água de coco. **Revista Científica**, Jaboticabal, v.37, n.1, p.48 - 52, 2009.

WELANDER, T. Influence of medium compositions on organ formation in explants of *Begoniaxhimalis* in vitro. **Physiology Plantarum**, Copenhagen, v. 43, n. 1, p. 136- 141, Jan. 1979.

ZENS, A.; ZIMMER, K. In vitro vermehrung ven *Anthurium Scherzerianum*. **Gartenbauwissenschaft Weihenstephan**, Berlin, v. 51, n. 1, p. 26-31, Dez. 1986.

Capítulo 2

Raizer, M. D. M.; Quisen, R. C.; Iriarte-Mafritel, J. H. 2011. Determinação da composição do meio de cultura para o enraizamento *in vitro* de *Heliconia chartacea* (Lane x Barreiros) var. Sexy Pink. Trabalho a ser enviado para publicação na revista Plant Cell Culture e Micropropagation. Lavras – MG. ISS: 0044-5967

DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA PARA O ENRAIZAMENTO IN VITRO DE *Heliconia chartacea* (Lane x Barreiros) var. Sexy Pink¹

Marcelo Domingues Martins RAIZER²; Regina Caetano QUISEN³; Jorge Hugo IRIARTE-MARTEL⁴.

RESUMO

Heliconia chartacea var. Sexy Pink é uma planta ornamental tropical de grande interesse na floricultura brasileira, cuja micropropagação permite a obtenção de mudas em larga escala em espaço e tempo reduzidos. Com o objetivo de determinar a composição do meio de cultura para o enraizamento *in vitro* da *H. chartacea* var. Sexy Pink, mudas micropropagadas com 3 – 5 cm de altura foram inoculadas em meio de cultura Murashige & Skoog, 1962 com metade da concentração salina (MS/2) suplementado com diferentes concentrações de sacarose (0; 15; 30; 45 e 60 g L⁻¹). A ausência de uma fonte endógena de açúcar não inibiu a formação de raízes, porém estas foram poucas e muito finas. Quando a concentração de sacarose utilizada foi de 15 a 60 g L⁻¹, a produção da biomassa da raiz foi aumentada dando a planta uma possibilidade maior de estabelecimento para a fase de aclimatização. As doses de 45 e 60 g L⁻¹ apresentaram redução na massa seca das raízes, pois propiciaram a formação de raízes mais grossas e quebradiças devido ao maior acúmulo de água nos tecidos. Não foram observadas diferenças significativas no número médio de raízes emitidas por explante nas diferentes concentrações de sacarose a exceção do tratamento controle, porém comparando-se o peso seco das raízes, pode-se averiguar que a adição de sacarose na concentração de 30 g L⁻¹ no meio MS, foi a que apresentou maior incremento de massa, demonstrando ser o melhor meio de cultura para o enraizamento da *Heliconia chartacea* var. Sexy Pink.

PALAVRAS-CHAVE: Biomassa, Sacarose, Massa Seca, Cultura de tecidos, Biotecnologia

¹Parte da dissertação apresentada ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, pelo primeiro autor.

²Engenheiro Agrônomo, Mestrando do Programa de Pós Graduação em Agricultura no Trópico Úmido do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Av. André Araújo, 2936, Aleixo, CEP 69060-001, Manaus, AM, Brasil. e-mail: marcelo_raizer@hotmail.com.

³Engenheira Floresal, Doutoranda em Agronomia – Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Embrapa Amazonia Ocidental. Rodovia AM-010, Km 29, Zona Rural - CEP: 69010-970. Caixa Postal 319 – Manaus, AM, Brasil. e-mail: regina.quisen@cpaa.embrapa.br.

⁴Engenheiro Agrônomo, Doutor em Genética e Melhoramento de Plantas, Pesquisador do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Av. André Araújo, 2936, Aleixo, CEP 69060-001, Manaus, AM, Brasil. e-mail: jhim@inpa.gov.br.

**DETERMINATION OF COMPOSITION OF CULTURE MEDIA FOR *IN VITRO*
ROTTING OF *Heliconia chartacea* (Lane x Barreiros) var. Sexy Pink**

ABSTRACT

Heliconia chartacea var. Sexy Pink is a tropical ornamental plant of great interest in Brazilian floriculture, whose micropropagation can obtain seedlings on a large scale in space and time reduced. This research aimed to determine the composition of the culture medium for *in vitro* rooting *H. chartacea* var. Sexy Pink plantlets with 3 - 5 cm height were inoculated Murashige and Skoog medium (1962) with half the salt concentration (MS/2) supplemented with different concentrations of sucrose (0, 15, 30, 45 and 60 g L⁻¹). The absence of an endogenous source of sugar did not inhibit root formation, but these were few and very thin. When the sucrose concentration used was 15 to 60 g L⁻¹, production of root biomass was increased giving the plant a greater chance of establishment for the acclimatization phase. Doses from 45 to 60 g L⁻¹ showed reduction in root dry mass thus promoted the formation of roots thickened and brittle due to high accumulation of water in tissues. There were no significant differences in the average number of roots per explant at different concentrations of sucrose the exception of the control treatment, but comparing the dry weight of roots, the addition of sucrose at a concentration of 30 g L⁻¹ in MS medium, showed the largest increase in mass, proving to be the best medium for rooting of *Heliconia chartacea* var. Sexy Pink.

Index terms: Biomass, Sucrose, Dry mass.

1. INTRODUÇÃO

O mercado de flores ornamentais tropicais tem ganhado espaço no Brasil e se consolidando com um crescimento de 12% a 15% ao ano, acima da média da economia nacional (SEBRAE, 2010). Esse crescimento se deve a beleza e exotividade dessas flores que mesmo sozinhas, apresentam um impacto visual deslumbrante. Dentre essas flores destaca-se a *Heliconia chartacea* var. *Sexy Pink* que, por sua vez, tem através da micropropagação uma alternativa para uma rápida obtenção de material propagativo, livre de vírus e nematóides, problemas estes encontrados no método de propagação tradicional por meio de rizomas.

Uma etapa crítica na cultura de tecidos é a aclimatização e, visando proporcionar melhores condições para o estabelecimento *ex vitro* de explantes micropropagados visou-se uma fase de enraizamento. Para tanto conforme observado por Grattapaglia e Machado (1998) uma simples diluição do meio de cultura pode aumentar a eficiência do processo de enraizamento, já que altas concentrações de sais tendem a inibir o enraizamento e favorecer a formação da parte aérea. A iniciação das raízes é um processo que demanda bastante energia e o requerimento por carboidratos no meio faz-se necessário (Mohammed e Vivalder, 1988), e de acordo com George e Sherington (1984), a presença de carboidratos no meio de cultura tem mostrado ser essencial para a formação de raízes *in vitro* de muitas espécies.

A sacarose é a fonte de carboidrato mais utilizada na cultura de tecidos, concentrações de sacarose abaixo de 2%, podem acarretar em clorose dos tecidos e, acima de 4%, pode-se incorrer em excessivo potencial osmótico do meio, possibilitando deterioração das culturas segundo Grattapaglia e Machado (1998).

Este trabalho teve como objetivo determinar a composição do meio de cultura para o enraizamento *in vitro* de *Heliconia chartacea* (Lane x Barreiros) var. *Sexy Pink* e quantificar o efeito de diferentes concentrações de sacarose no enraizamento *in vitro* das brotações.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas pertencente à Embrapa Amazônia Ocidental, em Manaus, Amazonas. Para a realização dos experimentos foram utilizados ápices caulinares de *Heliconia chartacea* var. Sexy Pink estabelecidos *in vitro* com aproximadamente 3-5 cm de altura.

Em câmara de fluxo laminar as brotações foram transferidas para frascos com 250 mL de capacidade, contendo 40 mL meio de cultura Murashige e Skoog (1962) com metade da concentração salina original (MS/2) suplementado com o complexo vitamínico MS, solidificado com 6,0 g L⁻¹ de ágar e adição de sacarose em diferentes concentrações Tratamento 1: 0 (zero – controle); Tratamento 2: 15 g L⁻¹; Tratamento 3: 30 g L⁻¹; Tratamento 4: 45 g L⁻¹ e Tratamento 5: 60 g L⁻¹ de sacarose. O pH do meio foi ajustado em 5,8 e o meio de cultura autoclavado a 121 °C por 15 minutos.

O experimento foi mantido em sala de crescimento à temperatura de 26 ± 1 °C, e radiação luminosa de 38 µmol m⁻² s⁻¹ fornecidas por lâmpadas fluorescentes brancas de 20 W com fotoperíodo de 16 horas.

Aos 45 dias de cultivo foram avaliados o comprimento e número de raízes adventícias formadas, massa fresca das raízes e parte aérea, e massa seca das raízes e parte aérea. Para avaliação da biomassa, raízes e parte aérea foram individualizadas em sacos de papel previamente pesados em balança analítica e colocados pra secar em estufa por 60 °C até atingirem peso constante.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com 15 repetições, perfazendo um total de 75 unidades amostrais, sendo considerado como unidade amostral o frasco contendo três explantes cada. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e comparação de médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme pode ser observado na Figura 1, houve crescimento e desenvolvimento da parte aérea e formação de raízes adventícias em todos os tratamentos testados.

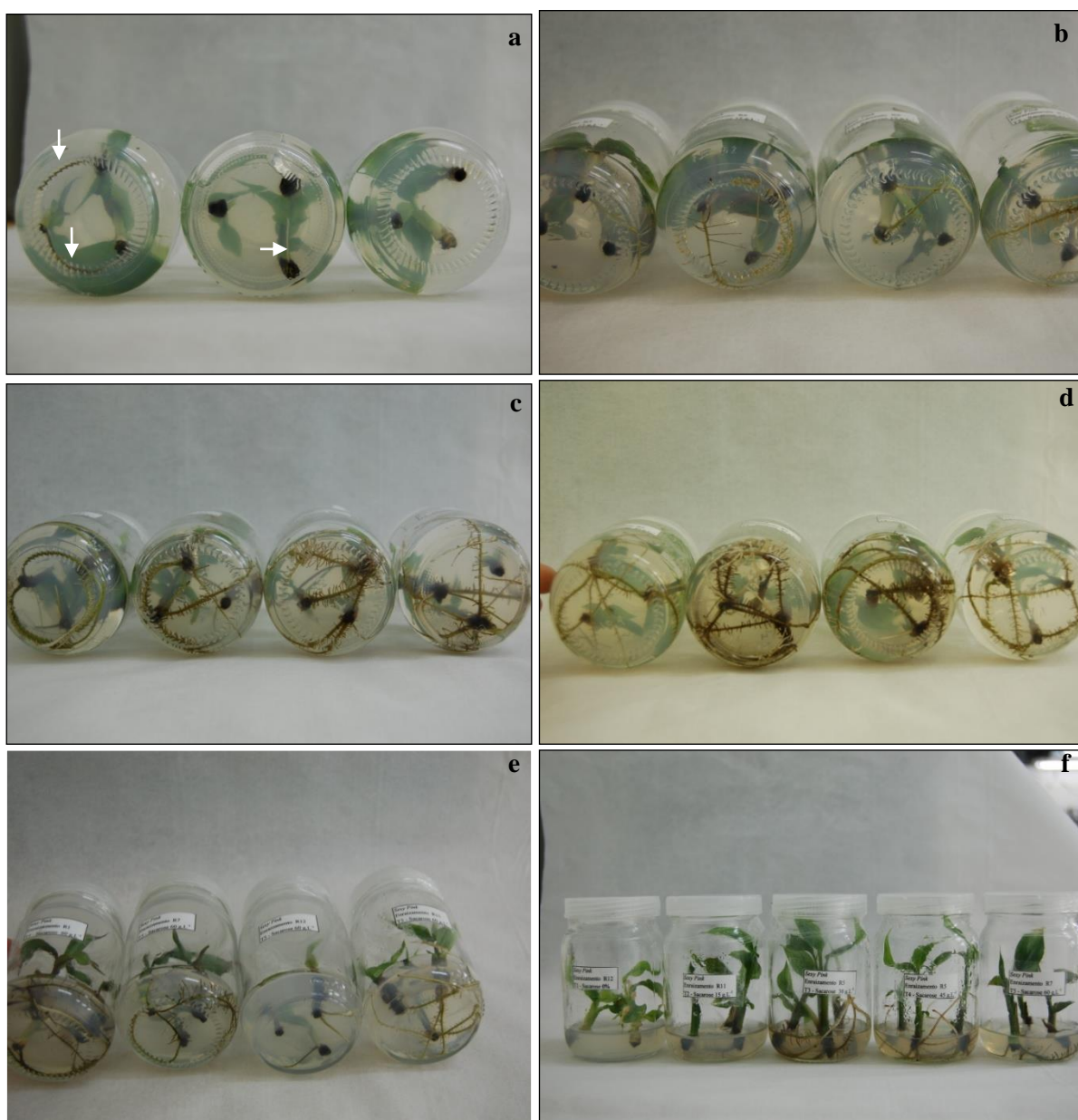


Figura 01. **a:** Tratamento testemunha – sem sacarose, setas indicam a formação de raízes; **b:** Tratamento 2 – 15 g L⁻¹ de sacarose; **c:** tratamento 3 – 30 g L⁻¹ de sacarose; **d:** tratamento 4 – 40 g L⁻¹ de sacarose; **e:** tratamento 5 – 60 g L⁻¹ de sacarose; **f:** Aspecto geral dos tratamentos.

Conforme observado por diversos autores, a resposta da concentração de sacarose ao meio de enraizamento de mudas micropropagadas tem sido bastante variada (Nicoloso *et al.*,

2003; Grattapaglia e Machado, 1998; Wainwright e Scrace, 1989), sugerindo desta maneira que exista uma concentração ótima do carboidrato para cada espécie, sendo que acima ou abaixo da qual a formação de raízes adventícias é inibida. Uma vez que nas células, os carboidratos são necessários como fonte de energia e de carbono nos processos biossintéticos (Gösslová *et al.*, 2001) e servindo também, como agentes osmóticos (Tremblay e Tremblay, 1991).

A formação de um sistema radicular bem definido é de extrema importância para a sobrevivência e o crescimento de plântulas nas novas condições ambientais. O número de raízes por explante e a qualidade destas raízes, que resultam em um sistema radicular bem desenvolvido, são características que certamente irão facilitar o desenvolvimento das plantas durante o processo de aclimatização.

Neste trabalho, para a *H. chartacea* var. Sexy Pink a ausência de uma fonte de energia não inibiu totalmente a formação de raízes (Figura 2), sendo estas no entanto muito finas e em menor quantidade (0,6 raízes/planta). Outras espécies também não são influenciadas pela ausência de sacarose, como demonstrado por Wainwright e Scrace (1989) que observaram que níveis crescentes de sacarose não afetaram o enraizamento *in vitro*, nem o estabelecimento *in vivo* de cinco folhas (*Potentilla fruticosa* L.) e fícus-lira (*Ficus lyrata* Warburg). Do mesmo modo, Srikandarajah e Mullins (1981) obtiveram melhores resultados no enraizamento *in vitro* de macieira ‘Granny Smith’ com a utilização de apenas 10 g L⁻¹ de sacarose. Já outros autores não observaram bons resultados na propagação *in vitro*, em presença de sacarose, para samambaia-espada (*Nephrolepis exaltata* L. Schott) (Guimarães *et al.*, 1999).

Para as demais concentrações, conforme demonstrado na Figura 2, houve aumento significativo no número médio de raízes, ocorrendo maior média a 45 g L⁻¹ (4 raízes/planta), e nova redução a 60 g L⁻¹ (3,5 raízes/planta)

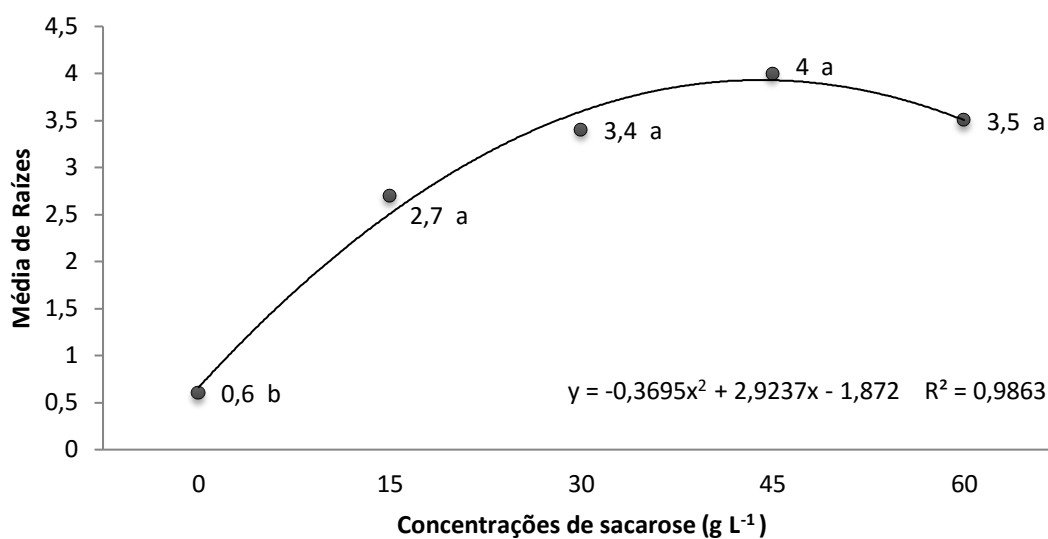


Figura 02: Número médio de raízes emitidas de *Heliconia chartacea* var. Sexy Pink após 45 de subcultivo em meio MS/2 com diferentes concentrações de sacarose. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

Este mesmo comportamento foi observado para o comprimento médio da raiz primária por explante, com diferença significativa na presença de sacarose (Figura 3). Nota-se neste parâmetro, o aumento no comprimento das raízes até 30 g L⁻¹, (91 mm) concordando com as observações de Lane (1978) que demonstrou a importância da alteração da sacarose na indução de raízes de macieira. A partir desta concentração, no entanto, houve a redução no comprimento, apresentando média de 82 mm a 45 g L⁻¹ e 72 mm a 60 g L⁻¹ próxima a obtida a 15 g L⁻¹ (67 mm).

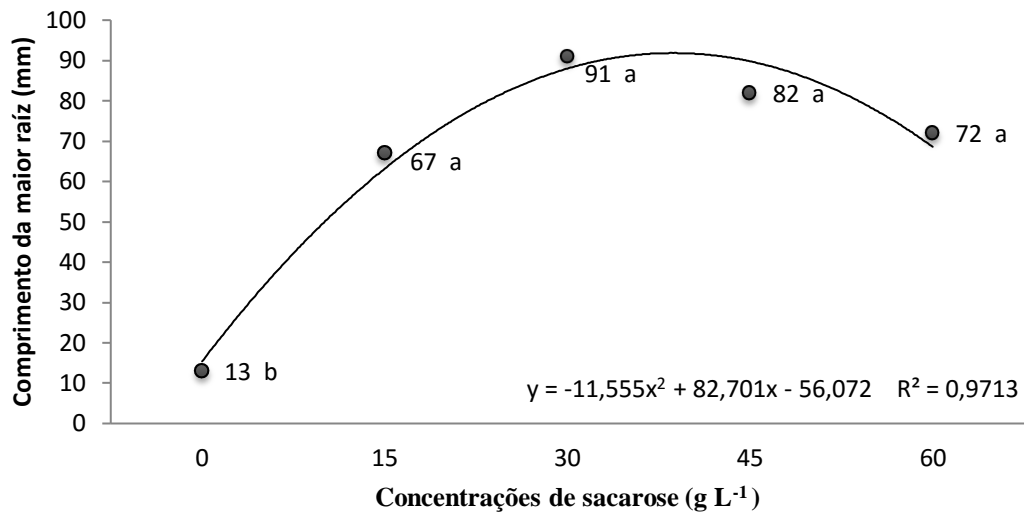


Figura 03: Comprimento médio da maior raiz de *Heliconia chartacea* var. Sexy Pink após 45 de subcultivo em meio MS/2 com diferentes concentrações de sacarose. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

A presença de sacarose também proporcionou um aumento significativo no número médio de raízes secundárias, ocorrendo maior média a 45 g L⁻¹ (9,7 mm), conforme mostra a Figura 4.

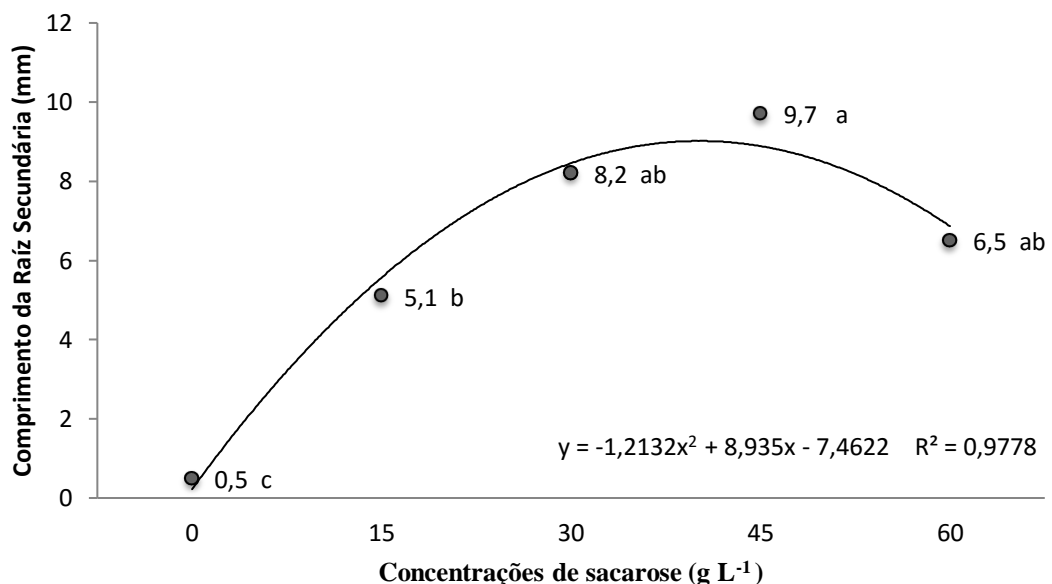


Figura 04: Comprimento médio da raiz secundária de *Heliconia chartacea* var. Sexy Pink após 45 de subcultivo em meio MS/2 com diferentes concentrações de sacarose. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

O aumento da produção da biomassa da raiz foi crescente entre as dosagens usadas até 60 g.L⁻¹, entretanto, quando a dose foi elevada para 60 g L⁻¹ houve redução na massa seca, conforme pode ser observado Tabela 1. Concentrações maiores de sacarose no meio (45 e 60 mg L⁻¹) propiciaram a formação de raízes mais grossas e quebradiças, devido ao maior acúmulo de água nos tecidos, como pode ser observado no peso fresco e seco das raízes. Já Nicoloso *et al.* (2003) observaram que a elevação da concentração de sacarose de 30 até 60 g L⁻¹ promoveu maior produção de biomassa dos órgãos de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata*) cultivadas *in vitro*. O aumento da produção de biomassa da raiz para a cultura do morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch) foi crescente até 45 g L⁻¹ de sacarose (Calvete, 1998).

Tabela 01. Massa fresca e seca da raiz e parte aérea do experimento de enraizamento com diferentes concentrações de sacarose. Manaus – AM.

Concentrações de sacarose (mg L ⁻¹)	Massa Fresca da Raiz	Massa Seca da Raiz	Massa Fresca da Parte Aérea	Massa Seca da Parte Aérea
0	0,136 c	0,038 c	1,309 b	0,338 b
15	0,565 b	0,155 b	1,577 a	0,447 a
30	0,718 ab	0,234 a	1,535 a	0,499 a
45	0,761 ab	0,209 ab	1,487 ab	0,467 a
60	0,830 a	0,217 ab	1,488 ab	0,493 a
CV%	39,49	39,52	13,04	13,03

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey. Os dados foram transformados $x = \sqrt{x}$.

Não foram observadas diferenças significativas no número médio de raízes emitidas por explante nas diferentes concentrações de sacarose a exceção do tratamento controle, porém comparando-se o peso seco das raízes, pode-se afirmar que a adição de sacarose na concentração de 30 g L⁻¹ no meio MS/2, foi a que apresentou maior incremento de massa. Outros autores também obtiveram bom resultados com enraizamento utilizando metade da concentração salina como Dzazio *et al.* (2002) trabalhando com porta enxerto de videira que obtiveram 80% de enraizamento nesta concentração de sais e Bertolucci *et al.* (2000)

trabalhando com segmentos nodais de marmelinho (*Tournefortia cf paniculata* Cham).

4. CONCLUSÕES

A presença de sacarose mostrou-se fundamental para o desenvolvimento das raízes *in vitro*, tendo em vista que na sua ausência sua emissão foi mínima.

A concentração de 30 de sacarose foi a que propiciou um melhor enraizamento, demonstrando ser o melhor meio de cultura para o enraizamento da *Heliconia chartacea* var. Sexy Pink.

5. AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo e apoio à pesquisa – FAPEAM, pela bolsa concedida.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA Amazônia Ocidental, pelo apoio institucional e técnico.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERTOLUCCI, S. K. V.; PINTO, J. E. B. P.; CARDOSO, M. das G.; GAVILANES, M. L.; SANTIAGO, E. J. A.; LAMEIRA, O. A. Micropropagação de *Tournefortia cf. paniculata* Cham. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.3, n.1, p.43-49, 2000.

CALVETE, E. O. **Concentrações de sacarose in vitro e seleção de substratos para aclimatização ex vitro de morangueiro cv Campinas (Fragaria ananassa Duch.)**. 1998. 108f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1998.

DZAZIO, P. M.; BIASI, L. A.; ZANETTE, F. Micropropagação do porta-enxerto de videira ‘420-A’. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.24, n.3, p.759-764, 2002.

GEORGE, E. F.; SHERINGTON, P. D. Factors affecting growth and morphogenesis. **Plant**

propagation by tissue culture. England: Exegeics, p.125-171. 1984.

GUIMARÃES, P. T. C.; PASQUAL, M.; MIRANDA, A. M. P. Efeito de diferentes concentrações de nitrogênio e de sacarose sobre a propagação *in vitro* de samambaia-espada [*Nephrolepis exaltata* (L.) Schott]. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 23, n. 2, p. 309-316, 1999.

GÖSSLOVÁ, M.; SVOBODOVÁ, H.; LIPAVSKÁ, H.; ALBRECHTOVÁ, J.; VREUGDENHIL, D. Comparing carbohydrate status during norway spruce seed development and somatic embryo formation. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v.37, p.24-28, 2001.

GRATTAPAGLIA, D. & MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Embrapa-SPI/CNPH, Brasília, v.1, p. 183-260, 1998.

LANE, W. D. Regeneration of wolfe plants from shoot meristem tips. **Plant Science Letters**. Amsterdam, v.13, p.281-285, 1978.

MOHAMMED, D. G.; VIVALDER, W. E. Root production and plantlet development in tissue cultured conifers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands. v.14, p.137-60, 1988.

NATHAN, M.J.; GOH, C.J.; KUMAR, P.P. In vitro propagation of *Heliconia psittacorum* by bud culture. **HortScience**, v.27, p.450-452, 1992.

NICOLOSO, F. T. ; ERIG, A. C. ; RUSSOWSKI, D. ; MARTINS, C. F. Efeito de concentrações e fontes de carboidratos no crescimento de plantas de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen) cultivadas *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 1, p. 84-90, 2003.

SEBRAE, Mercado de flores e plantas movimentada R\$ 3,8 bilhões no País. Disponível em: <http://www.agenciasebrae.com.br/noticia.kmf?canal=199&cod=10808941>. Acessado em: 27/04/2011. Rio Grande do Norte. 2010.

SRIKANDARAJAH, S.; MULLINS, M. G. Micropropagation of Granny Smith apple: factors

affecting root formation “*in vitro*”. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v. 56, n. 1, p. 71-76, 1981.

TREMBLAY, L.; TREMBLAY, F.M. Carbohydrate requirements for the development of black spruce (*Picea mariana* (Mill.) B.S.P.) and red spruce (*P. rubens* Sarg) somatic embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.27, p.95-103, 1991.

WAINWRIGHT, H.; SCRACE, J. Influence of “*in vitro*” preconditioning with carbohydrates during the rooting of microcuttings on “*in vitro*” establishment. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 38, n. 3/4, p. 261-267, 1989.

Capítulo 3

Raizer, M. D. M.; Quisen, R. C.; Iriarte-Mafrtel, J. H. 2011. Aclimatização de mudas micropropagadas de *Heliconia chartacea* (Lane x Barreiros) var. Sexy Pink. Trabalho a ser enviado para publicação na revista Acta Amazônica. Manaus-AM. ISSN 0044-5997

ACLIMATIZAÇÃO DE MUDAS MICROPROPAGADAS DE *Heliconia chartacea* (Lane x Barreiros) var. Sexy Pink.

Marcelo Domingues Martins RAIZER¹; Regina Caetano QUISEN²; Jorge Hugo IRIARTE-MARTEL³.

^{1,3}Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Av. André Araújo, 2936, Aleixo, CEP 69060-001, Manaus - AM, Fone: (92) 3642-1845 Ramal: 1878 Fax: (92) 3642-1845. email: marcelo_raizer@hotmail.com, jhim@inpa.gov.br. ²Embrapa Amazônia Ocidental Rodovia AM-010, Km 29, Zona Rural - CEP: 69010-970. Caixa Postal 319 - Manaus/AM. Fone: (92) 3303-7800. Fax: (92) 3303-7820 / 3303-7817. email: regina.quisen@cpaa.embrapa.br.

RESUMO

As plantas ornamentais se diferenciam pela sua beleza, que encantam tanto através das suas formas exóticas, como pela variação de cores, e dentre elas destaca-se a *Heliconia chartacea* var. Sexy Pink. A disponibilidade de mudas sadias destas espécies de importante valor no mercado de plantas ornamentais é bastante reduzida quando em escala comercial. . As técnicas utilizadas para propagação massal desta espécie *in vitro* proporcionam um maior número de explantes com tempo reduzido, porém, apresentam lacunas em diferentes fases de sua aplicação, como no enraizamento e aclimatização que definem o sucesso da micropropagação com a transferência para ambiente *ex vitro*. Este trabalho teve como objetivo estudar a influência de diferentes substratos sobre a aclimatização de mudas de *H. chartacea* var *Sexy Pink*. As mudas foram plantadas em tubetes contendo seis diferentes substratos, T1: Bioplant[®]; T2: Fibra de coco; T3: Fibra de coco + Bioplant[®]; T4: Fibra de coco + Húmus de minhoca; T5: Fibra de coco + Bioplant[®] + Húmus de minhoca e T6: Areia + Vermiculita. A taxa de sobrevivência variou de 83 % a 92 % não havendo diferenças estatísticas entre os tratamentos avaliados. A combinação Fibra de coco + Bioplant[®] proporcionou um desenvolvimento maior do sistema radicular que os demais, sendo os substratos dos tratamentos 1 e 6, os que apresentaram um menor desenvolvimento. Houve um maior acúmulo de matéria seca na parte aérea das plantas aclimatizadas no substrato composto por fibra de coco, sendo seguidos pelas suas variações com Bioplant[®], húmus de minhoca, propiciando mudas mais vigorosas. O substrato a base de fibra de coco seco foi o que proporcionou o maior incremento de massa seca da parte aérea e raiz, sendo o mais indicado para aclimatização de *Heliconia chartacea* (Lane x Barreiros) var. Sexy Pink.

PALAVRAS-CHAVE: Plantas ornamentais tropicais, substratos, fibra de coco.

ACCLIMATIZATION OF PLANTLETS OF *Heliconia chartacea* (Barry x Lane) var. Sexy Pink.

ABSTRACT

Ornamental plants are distinguished by their beauty, which delight both through its exotic forms, such as by varying colors, and among them stands out *Heliconia chartacea* var. Sexy Pink. The availability of healthy seedlings of these species is valuable for the ornamental plant market is greatly reduced when a commercial scale. The technique of in vitro mass production that provides a greater number of explants with reduced time, however, has problems in various stages of development, as in the root that defines the final stage of micropropagation before transfer to ex vitro conditions. This work aimed to study the influence of different substrates on the acclimatization of seedlings *H. chartacea* var. Sexy Pink. Seedlings were planted in tubes containing six different substrates: T1: Bioplant[®] T2: Coconut fiber, T3: Coconut fiber + Bioplant[®], T4: Coconut fiber + Humus; T5: Coconut fiber + Bioplant[®] + Humus and T6: sand + vermiculite. The survival rate ranged from 83 % to 92 % with no statistical differences between treatments. The T3 gave a further development of the root system than others, and the T1 and T6 substrates, those who had a less developed. There was a greater accumulation of dry matter in shoots of plants acclimatized in T2, followed by its variations T3, T4 and T5, favoring more vigorous seedlings. The substrate prepared with coconut fiber was what provided the greatest increase in dry mass of shoot and root, the most suitable for acclimatization of *Heliconia chartacea* (Barry x Lane) var. Sexy Pink.

KEYWORDS: Tropical ornamental plants, substrates, coconut fiber.

1. INTRODUÇÃO

A produção de flores e plantas ornamentais constitui uma atividade altamente promissora. A demanda atual por plantas ornamentais e flores de corte dos países do primeiro mundo alcança US\$ 90 bilhões por ano, com uma taxa de crescimento estimada da ordem de 12 % a 15 % ao ano, acima da média da economia nacional (SEBRAE, 2010). Segundo dados do Instituto Brasileiro de Floricultura (IBRAFLOR, 2005), o Brasil movimenta, anualmente, cerca de US\$ 1 bilhão no negócio de flores, em uma área cultivada de aproximadamente 5.250 hectares, gerando cerca de 200.000 postos de trabalho.

O mercado mundial de flores ornamentais tradicionais segundo Castro & Graziano (1997), encontra-se saturado o que acarreta em um crescente interesse por parte dos consumidores estrangeiros pelas espécies tropicais. Neste contexto, destaca-se a *Heliconia chartacea* var. Sexy Pink, que assim como as espécies do gênero *Heliconia*, apresenta inflorescência com uma aparência exótica, alta durabilidade após o corte e boa aceitação no mercado nacional e internacional.

Porém, os métodos tradicionais de multiplicação das helicônias, geralmente vegetativa através dos rizomas, conduz à disseminação e ao acúmulo de agentes causais de importantes doenças que são transmitidas entre plantios sucessivos, via rizomas contaminados, que dificultam ou impedem a manifestação do verdadeiro potencial produtivo, já a propagação através de sementes, apresenta várias desvantagens em relação à propagação via rizomas, uma vez que estas apresentam dormência e as mudas propagadas por sementes apresenta um período para florescimento muito longo, de 3 a 4 anos. Além disso, nem todas as espécies frutificam e a maioria dos cruzamentos interespecíficos são incompatíveis (Nannetti, 1994).

Buscando alternativas para que o produtor tenha benefícios satisfatórios no plantio de flores tropicais, faz-se necessário o uso de tecnologias avançadas. Neste contexto, a produção de mudas através da micropropagação surge como uma alternativa viável para obtenção de

mudas em escala comercial livre da presença de fungos, bactérias e, principalmente, vírus e nematóides, com um material genético de elevada qualidade, uma vez que se utilizam clones de plantas selecionadas, cultivadas em meio asséptico e com um curto espaço de tempo.

Uma etapa fundamental na produção de mudas obtidas por cultura de tecidos é a aclimatização, uma vez que, as condições de cultura *in vitro* modificam características bioquímicas, anatômicas e morfológicas das plantas, alterando os processos fisiológicos normais (Lucas *et al.*, 2002). A aclimatização consiste em retirar a planta da condição *in vitro* e transferi-la para o ambiente *ex vitro*. A maior dificuldade encontrada neste processo é a superação das dificuldades que as plântulas enfrentam ao mudarem de ambiente, porque estas plântulas passam de um ambiente de baixa transpiração para um ambiente onde elas terão de controlar as trocas gasosas o que pode causar estresse hídrico. Outros fatores a serem considerados são a passagem de um estado heterotrófico para o estado autotrófico, a mudança de um meio com disponibilidade de sais minerais provenientes do meio de cultura para outro onde a planta precisa absorver sais de um substrato agrícola, ou seja, de um estado asséptico para ficar sujeito ao ataque de microorganismos saprófitos e eventualmente patogênicos (Grattapaglia & Machado, 1990).

No processo de aclimatização as mudas são retiradas do meio de cultura e transferidas para recipientes contendo substratos, que devem apresentar boa porosidade para facilitar à aeração do sistema radicular, boa capacidade de retenção de água e não compactar-se excessivamente o que compromete à drenagem e pode levar a morte dos tecidos. A escolha e o manejo correto dos mesmos são de suma importância para a obtenção de uma boa taxa de sobrevivência e mudas de alta qualidade (Gonçalves, 1995).

Considerando a escassez de estudos na literatura científica referentes à aclimatização de plântulas das espécies pertencentes ao gênero *Heliconia*, este trabalho teve como objetivo

estudar a influência de diferentes substratos sobre a aclimatização de mudas de *Heliconia chartacea* (Lane x Barreiros) var. Sexy Pink.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado em casa de vegetação do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas pertencente a Embrapa Amazônia Ocidental, em Manaus, Amazonas.

As mudas de helicônias utilizadas neste experimento foram obtidas através do processo de micropropagação, quando as plântulas apresentavam-se completamente enraizadas e com alturas variando de 2,5 a 5,0 cm.

Os frascos com as mudas micropropagadas foram destampados e mantidos abertos na sala de crescimento por 16 horas. Após este período, as plântulas foram lavadas em água corrente, colocadas em bandejas contendo água destilada para evitar a desidratação, e suas raízes podadas com o auxílio de uma tesoura deixando-se um comprimento aproximado de 3 cm, com o objetivo de uniformizar o material, facilitar o plantio e estimular o desenvolvimento de um sistema radicular mais funcional. Após a toailete das raízes, as plântulas foram levadas para casa de vegetação para aclimatização, onde foram transferidas para os recipientes contendo seis diferentes misturas de substratos orgânicos conforme apresentado na Tabela 01.

Tabela 01. Tratamentos e proporções volumétricas das misturas dos substratos utilizados na aclimatização de *Heliconia chartacea* var. Sexy Pink. Manaus – AM.

Tratamentos	Substrato	Proporção
1	Bioplant [®]	100%
2	Fibra de coco	100%
3	Fibra de coco + Bioplant [®]	1:1
4	Fibra de coco + Húmus de minhoca	3:1
5	Fibra de coco + Bioplant [®] + Húmus de minhoca	3:1:1
6	Areia + Vermiculita	1:1

O delineamento estatístico experimental empregado foi o inteiramente casualizado, com seis tratamentos com quatro blocos cada, e cada bloco com seis repetições (planta), perfazendo um total de 144 unidades experimentais. As médias foram comparadas pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Na casa de vegetação, os tubetes com capacidade volumétrica de 250 cm³ com os substratos testados foram acomodados sobre uma bancada distanciada a 80 cm da superfície do solo em suportes rígidos de polipropileno, dentro de uma miniestufa semicircular de 0,8 m de altura, revestida por uma camada de plástico transparente, para manter a umidade e proteger as plantas contra a influência de intempéries climáticas, principalmente, a perda excessiva de água por transpiração. No interior da estrutura foi instalado um termômetro para medir a máxima e a mínima temperatura diária (°C) e a umidade relativa.

Após 15 dias de transplântio foi realizada uma aplicação de fungicida composta por 0,05% de Cercobin[®], Agrimicina[®] e 0,03 % de espalhante adesivo, repetida semanalmente até término da avaliação.

Foram avaliados os parâmetros: número de folhas (NF), altura da planta (AP), diâmetro do caule (DC), número de raízes (NR), comprimento da maior raiz (CMR) e comprimento da

raiz secundária (CRS), peso fresco das raízes (PFR), peso fresco da parte aérea (PFPA), peso seco das raízes (PSR) e peso seco da parte aérea (PSPA).

O número de folhas foi contado visualmente em toda a extensão da planta. Todas as folhas foram consideradas na contagem, exceto as secas. A altura da planta foi medida, por meio de uma régua em milímetros a partir da base até a abertura das últimas folhas. O diâmetro do caule foi mensurado com um paquímetro digital, graduado em milímetros e decímetros de milímetros, considerando a base como local de medida. O número de raízes foi obtido mediante contagem após a retirada das plantas dos seus respectivos substratos e lavagem em água corrente para retirada do excesso de resíduos. Os comprimentos da maior raiz e raízes secundárias foram obtidos por meio de uma régua em milímetros a partir da base do pseudocaule. A análise da massa fresca e massa seca das raízes e parte aérea foram feitas em balança de precisão. Para avaliação da biomassa, raízes e parte aérea foram individualizadas em sacos de papel previamente pesados em balança analítica e colocados pra secar em estufa por 65 °C até atingirem peso constante (Malavolta *et al.*, 1997). As amostras secas foram encaminhadas ao Laboratório de Fertilidade do Solo e Nutrição Vegetal da Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, Amazonas, para determinação dos teores de N, P, K, Ca, Mg, S, B, Zn, Fe, Mn e Cu.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey a 5% de significância para a comparação das médias dos tratamentos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao final de 45 dias foi avaliada a taxa sobrevivência em virtude dos substratos empregados e obteve-se um resultado considerado satisfatório para este parâmetro, que variou de 83% a 92%, conforme apresentado na Figura 01. Resultados semelhantes foram observados por Rodrigues *et al.* (2005), e Santos *et al.*, 2006, que obtiveram 93% e 100% respectivamente, de sobrevivência na aclimatização de *Heliconia bihai*. Durante a execução desta avaliação não foi verificada presença de pragas ou doenças que prejudicassem o processo de aclimatização das mudas micropropagadas, fato este que pode ter sido favorecido pelo controle fitossanitário realizado e o uso do próprio túnel de cultivo.

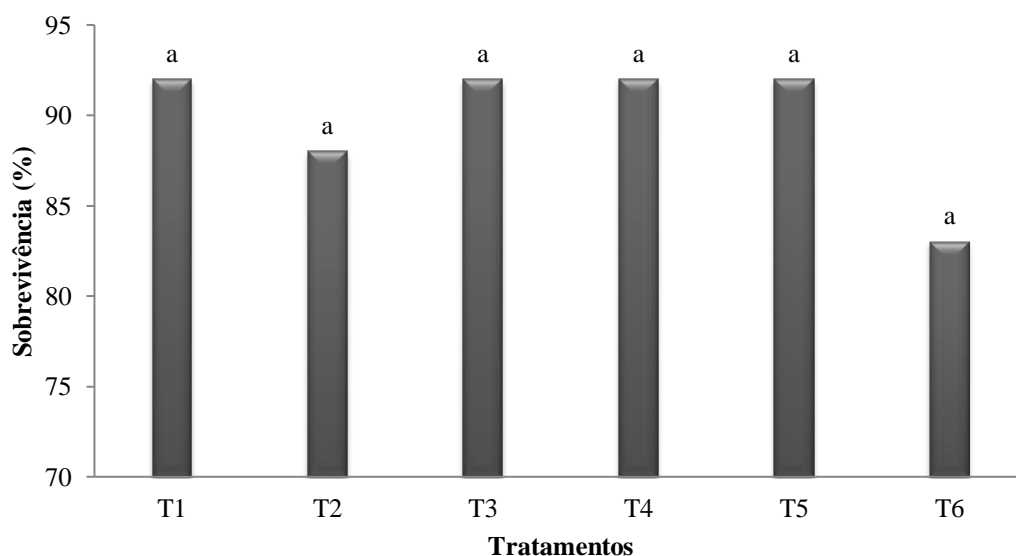


Figura 01. Porcentagem de sobrevivência de *Heliconia chartacea* var. Sexy Pink após 45 dias em casa de vegetação, em diferentes substratos. T1: Bioplant[®]; T2: Fibra de coco; T3: Fibra de coco + Bioplant[®]; T4: Fibra de coco + Húmus de minhoca; T5: Fibra de coco + Bioplant[®] + Húmus de minhoca e T6: Areia + Vermiculita.

Com exceção do comprimento da maior raiz, os valores médios dos demais parâmetros avaliados não diferiram estatisticamente entre si (Tabela 2). Conforme pode ser observado na Figura 2, o substrato com Fibra de coco + Bioplant[®] + Húmus de minhoca favoreceu a formação de mudas visualmente mais vigorosas para o período avaliado.

Quanto à altura, diâmetro do pseudocaule e número de folhas, não houve diferenças significativas entre os tratamentos avaliados (Tabela 2), possivelmente pelo curto período de aclimação (45 dias) e ao tamanho reduzido dos tubetes que não supria a necessidade da planta para um bom desenvolvimento do sistema radicular por um período maior do que o avaliado. Resultados estes semelhantes aos observados por Rocha *et al.* (2009) em *Heliconia lingulata* Ruiz e Pav., onde aos 30 dias após o transplante demonstraram que não houve diferença significativa entre estas variáveis, sendo estas observadas somente após 60 dias.



Figura 02. Aspecto geral das mudas aclimatadas de *Heliconia chartacea* var. Sexy Pink após 45 dias nos substratos: T1: Bioplant[®]; T2: Fibra de coco; T3: Fibra de coco + Bioplant[®]; T4: Fibra de coco + Húmus de minhoca; T5: Fibra de coco + Bioplant[®] + Húmus de minhoca e T6: Areia + Vermiculita. Barra = 1 cm.

Quanto ao desenvolvimento do sistema radicular (Tabela 2), o substrato Bioplant[®]+ fibra de coco proporcionou desenvolvimento superior aos tratamento com Bioplant[®] e areia + vermiculita, provavelmente por estes últimos apresentarem uma densidade maior, o que pode ter dificultado o desenvolvimento do sistema radicular no período avaliado. As maiores médias foram observadas nos substratos que proporcionaram maior aeração e porosidade, permitindo pelo menos o dobro de crescimento da maior raiz quando comparados a maior média (8,68 mm) com as menores (4,26 e 3,89 mm). Resultados semelhantes foram obtidos

por Souza-Júnior *et al.* (2001) que observaram valores médios inferiores para variáveis de crescimento de plantas de abacaxizeiro aclimatizadas em substrato composto por areia.

Tabela 02. Médias referentes à altura da planta (AP), diâmetro do pseudocaule (DC), número de folhas (NF), número de raízes (NR), comprimento da maior raiz (CRP) e comprimento da raiz secundária (CRS) de plantas aclimatizadas de *Heliconia chartaceae* var. Sexy Pink, 45 dias após transplântio. Manaus – AM.

Tratamentos	AP (cm)	DC (mm)	NF	NR	CMR (mm)	CRS (mm)
1	4,64 a	0.62 a	5 a	3.91 a	4.26 b	0.2 a
2	4.09 a	0.45 a	4.36 a	4.5 a	7.68 ab	0.4 a
3	5.35 a	0.6 a	6.2 a	5.17 a	8.68 a	0.99 a
4	4.96 a	0.66 a	5.27 a	4.09 a	6.12 ab	0.6 a
5	5.64 a	0.74 a	6.27 a	3.36 a	7.74 ab	0.46 a
6	5.56 a	0.62 a	5.33 a	2.82 a	3.89 b	0.63 a
CV%	37.01	36.05	30.11	66.74	53.53	124.67

T1: Bioplant[®]; T2: Fibra de coco; T3: Fibra de coco + Bioplant[®]; T4: Fibra de coco + Húmus de minhoca; T5: Fibra de coco + Bioplant[®] + Húmus de minhoca e T6: Areia + Vermiculita. Médias seguidas da mesma letra nas colunas não diferem entre si ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste Tukey.

A proliferação das raízes depende da disponibilidade de água e nutrientes no microambiente que as circundam. Se a rizonfera é pobre em nutrientes ou muito seca, o crescimento radicular é lento, sendo que à medida que as condições melhoram, o crescimento radicular aumenta (Taiz & Zeiger, 2006). Provavelmente a presença da fibra de coco nos tratamentos 2 a 5, proporcionou aos substratos uma maior capacidade de retenção de água e, conseqüentemente, uma maior porcentagem de sobrevivência e vigor das plantas. Resultados semelhantes foram obtidos por Lacerda *et al.* (2006), que recomendaram substratos à base de pó de coco ou sob mistura com argisolo, na aclimatização de mudas de sabiá. Bezerra *et al.* (2001) e Silveira *et al.* (2002) também constataram que a fibra de coco constituiu um excelente substrato para o cultivo de tomateiro e na aclimatização do crisântemo, respectivamente.

Quanto às variáveis de produção de biomassa, o peso fresco da parte aérea (PFPA) e o

peso fresco das raízes (PFR) apresentaram valores médios que diferiram estatisticamente entre si (Tabela 3).

Tabela 03. Médias referentes ao peso fresco das raízes (PFR), peso fresco da parte aérea (PFPA), peso seco das raízes (PSR) e peso seco da parte aérea (PSPA) de plantas aclimatizadas de *Heliconia chartacea* var. Sexy Pink, 45 dias após transplântio. Manaus – AM.

Tratamentos	PFR (g)	PFPA (g)	PSR (g)	PSPA (g)
1	1,40 b	15,1 a	0,08 a	0,929 b
2	2,87 a	18,1 a	0,10 a	1,600 a
3	3,12 a	24,8 a	0,11 a	1,416 ab
4	2,18 ab	23,8 a	0,07 a	1,401 ab
5	2,70 a	24,2 a	0,11 a	1,437 ab
6	2,38 ab	19,0 a	0,09 a	1,235 ab
CV%	28,45	26,14	49,7	26,16

T1: Bioplant[®]; T2: Fibra de coco; T3: Fibra de coco + Bioplant[®]; T4: Fibra de coco + Húmus de minhoca; T5: Fibra de coco + Bioplant[®] + Húmus de minhoca e T6: Areia + Vermiculita. Médias seguidas da mesma letra nas colunas não diferem entre si ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste Duncan.

Houve um maior acúmulo de matéria seca na parte aérea das plantas aclimatizadas no substrato a base de casca de coco (T2), sendo seguidas pelas suas variações (T3, T4 e T5), corroborando com efeitos positivos no vigor das mudas, como pode ser observado na Figura 2. Silva (2004) avaliando o efeito de alguns substratos na aclimatização de mudas micropropagadas de antúrio verificou que aos 90 dias de cultivo, o pó-de-coco seco proporcionou as maiores médias de altura de planta, peso fresco e seco da parte aérea. Visivelmente o tratamento com Fibra de coco + Bioplant[®] + Húmus de minhoca apresentou mudas mais vigorosas, porém, para o período avaliado, não houve diferenças estatísticas como pode ser observado na Tabela 3.

Em estudos conduzidos por Silva *et al.* (2007) com plantas de *Dyckia marítima* (Bromeliaceae) oriundas da cultura de tecidos observaram que a adição de pó de casca de coco à solução hidropônica, favoreceu a maior porcentagem de sobrevivência e redução no

tempo de aclimatização para 1/3 do período necessário com os substratos a base de húmus de minhoca e fibra de coco + húmus de minhoca. Terceiro Neto *et al.* (2004) trabalhando com aclimatização de violeta africana, observaram que os melhores resultados obtidos foram os de mudas aclimatizadas no substrato comercial e Bioplant[®] seguidos pelo pó de casca de coco seco e vermiculita, resultados semelhantes aos obtidos neste trabalho na aclimatização da helicônia. Tal desempenho pode estar associado às características desses substratos, que proporcionaram condições favoráveis para o melhor desenvolvimento das mudas.

A matéria fresca das raízes de plantas aclimatizadas nos substratos fibra de coco e fibra de coco + Bioplant[®] foram os que apresentaram maior peso comparado aos demais (Tabela 03).

Outros fatores como temperatura e umidade do ambiente em que as plantas foram cultivadas, poderão também ter afetado o desenvolvimento das mudas, uma vez que a temperatura média e umidade do ambiente foram respectivamente, 30,3 °C e 74,5%. Maciel (2000) destaca a importância desses fatores na fase de aclimatização.

Na Tabela 4 são apresentados os resultados dos valores médios dos macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg, S) e micronutrientes (B, Zn, Fe, Mn e Cu) encontrados nos tecidos das plântulas micropropagadas ao final da avaliação. Observou-se que para o N, apenas os tratamentos T3 e T5, estão fora da faixa dos níveis de nutrientes definidos para *Heliconia* spp, que segundo Atehortua apud Lamas (2003), são: N = 31-38 g kg⁻¹; P = 20-40 g kg⁻¹; K = 35-45 g kg⁻¹; Ca = 12,6-17,5 g kg⁻¹; Mg = 2,5-8 g kg⁻¹; S = 2,5-8 g kg⁻¹; B = 10-75 mg kg⁻¹; Cu = 6-25 mg kg⁻¹; Fe = 76-300 mg kg⁻¹; Mn = 100-1000 mg kg⁻¹; Zn = 26-250 mg kg⁻¹.

Tabela 04. Análise de nutrientes dos tecidos da parte aérea de plantas aclimatadas de *Heliconia chartacea* (Lane x Barreiros) var. Sexy Pink.

Tratamentos	N	P	K	Ca	Mg	S	B	Cu	Fe	Mn	Zn
T1	34,57	5,29	60,94	8,29	5,47	5,50	40,22	8,20	958,0	143,88	87,76
T2	33,56	8,37	42,26	5,00	2,75	3,43	49,08	12,36	570,0	346,80	144,18
T3	27,55	7,40	72,72	5,27	3,29	3,47	45,86	9,43	404,0	273,76	100,51
T4	34,71	8,44	62,82	5,53	2,60	2,76	41,18	8,92	318,0	231,90	93,05
T5	28,68	7,56	64,50	5,14	2,88	2,84	38,82	9,12	639,0	216,43	87,09
T6	36,50	3,17	37,38	3,71	7,17	2,44	34,21	10,55	1724,0	211,70	81,59

T1: Bioplant[®]; T2: Fibra de coco; T3: Fibra de coco + Bioplant[®]; T4: Fibra de coco + Húmus de minhoca; T5: Fibra de coco + Bioplant[®] + Húmus de minhoca e T6: Areia + Vermiculita.

Conforme os valores mencionados, verificou-se ainda que os níveis de Ca estão abaixo do exigido pela planta, deficiência esta caracterizada pela redução de crescimento dos tecidos meristemáticos. Em situação mais crítica o P, que dependendo do tratamento apresentou apenas 15,8% do mínimo (20 g kg⁻¹) (Atehortua apud Lamas, 2003) requerido pela cultura determinando, assim, um déficit acentuado, este nutriente está relacionado com a formação rápida de raízes, razão esta que pode ter influenciado nos resultados, já que estatisticamente não houve diferença na massa seca das raízes nos tratamentos analisados.

A Tabela 4 também apresenta os teores médios dos micronutrientes B, Zn, Fe, Mn e Cu, encontrados nos tecidos das plântulas, e constatou-se que os valores de B, Mn e Cu estão dentro do limite de exigência, definidos por Atehortua apud Lamas (2003). Embora os níveis de Fe sejam numericamente superiores nas plantas, este não atinge um nível de fitotoxidez que é de 1880 mg kg⁻¹ (Kirkby & Römheld, 2007), os tratamentos não mostraram diferença significativa entre si em relação aos microelementos analisados.

4. CONCLUSÕES

Nas condições avaliadas, o substrato a base de fibra de coco seco foi o que proporcionou o maior incremento de massa seca da parte aérea e raiz, sendo o mais indicado para aclimatização de *Heliconia chartacea* (Lane x Barreiros) var. *Sexy Pink*.

Para maior aprimoramento da aclimatização, recomenda-se estudos complementares com recipientes de diferentes volumes associado ao substrato a base de fibra de coco seco para esta espécie, uma vez que o tamanho reduzido do tubete utilizado não foi adequado para aclimatação desta espécie por um período maior do que o avaliado.

5. AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo e apoio à pesquisa – FAPEAM, pela bolsa concedida.

À Embrapa Amazônia Ocidental, pelo apoio técnico e institucional.

6. BIBLIOGRAFIA CITADA

Bezerra, F. C.; Rosa, M. F.; Brígido A. K. L.; Norões E. R. V. Utilização de pó de coco como substrato de enraizamento para estacas de crisântemo. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental* 7: 129-134. 2001.

Castro C. E. F.; Graziano T. T. Espécies do gênero *Heliconia* (Heliconiaceae) no Brasil. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental* v. 3, p.15-28, 1997.

Grattapaglia, D. & Machado, M. A. Micropropagação. In: Torres, A. C.; Caldas, L. S.; Buso, J. A. (Eds.). *Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas*. Embrapa-SPI/CNPH, Brasília, v.1, p. 183-260, 1998.

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

IBRAFLOR, Instituto Brasileiro De Floricultura.
(<http://www.aprendendoaexportar.gov.br/flores/onde/ibraflor.asp>) Acesso em:
15/01/2010.

Lacerda, M. R. B.; Passos, M. A. A.; Rodrigues, J. J. V. Características físicas e químicas de substratos à base de pó de coco e resíduo de sisal para produção de mudas de sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth). *Revista Árvore*, vol.30, no.2, p.163-170. 2006.

Lamas, A. M. – *Floricultura Tropical – Tecnologia de Produção*. Maceió/AL. 65 p. 2004.

Lamas, A. da M. *Floricultura tropical: avanços tecnológicos*. In: *Semana Internacional da Fruticultura, Floricultura e Agroindústria*, 10, 2003, Fortaleza. Anais... Fortaleza. CE. 2003.

Lucas, M.A.K.; Sampaio, N.V.; Kohn, E.T.; Soares, P.F.; Sampaio, T.G. Avaliação de diferentes composições de substratos para a aclimação de mudas de morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch). *Revista Científica Rural*, v.8, n.1, p. 16-23, 2002.

Maciel, A. L. R.; Silva, A. B.; PasquaL, M. Aclimação de plantas de violeta africana (*Staintpaulia ionantha* Wendl.) obtidas “in vitro”: efeitos do substrato. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 24, n.1, p. 9-12, jan/mar., 2000.

Malavolta, E.; Vitti, G. C.; Oliveira, S. A. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. 2. ed. Piracicaba: *Potafos*, 319 p. 1997.

Nannetti, D. C. *Utilização da cultura de tecidos vegetais na micropropagação e manutenção de Heliconia spp.* 1994. 106 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, 1994.

Rocha, E. L. J. *Aclimação de mudas micropropagadas de helicônia sob diferentes lâminas de irrigação, tipos e volumes de substrato*. Dissertação - Universidade Federal do Ceará. Fortaleza – CE. 74 p. 2007.

Rodrigues, P. H. V.; Lima, A. M. L. P.; Ambrosano, G. M. B.; Dutra, M. F. B.

Acclimatization of micropropagated *Heliconia bihai* (Heliconiaceae) plants. *Scientia Agricola*. vol.62 no.3 Piracicaba. 2005.

Santos M. R. A.; Timbó A. L. O; Carvalho A. C. P. P.; Jmorais J. P. S. Estudo de adubos e substratos orgânicos no desenvolvimento de mudas micropropagadas de helicônia. *Horticultura Brasileira*. 24: 273-278. 2006.

SEBRAE, Mercado de flores e plantas movimentada R\$ 3,8 bilhões no País. (<http://www.agenciasebrae.com.br/noticia.kmf?canal=199&cod=10808941>). Acessado em: 27/04/2011.

Silva, A. L. L.; Franco, E. T. H.; Horbach, M. A.; Bisognin, D. A.; Quoirin, M. *Caderno de Pesquisa, Série Biologia*, Santa Cruz do Sul, v. 19, n. 3, p. 16-23, 2007.

Silva, J. V.; Bezerra, F. C.; Hernandez, F. F. F.; Cordão Terceiro Neto, C.P.; Leal, F. R. R. Efeito do substrato na aclimatização de mudas micropropagadas de antúrio. In: *IV Encontro Nacional Sobre Substrato Para Plantas*, Viçosa:UFV, p.364. 2004.

Silveira, E.B.; Rodrigues, V.J.L.B.; Gomes, A.M.A. Pó de coco como substrato para produção de mudas de tomateiro. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v.20, n.2, p.211-216, 2002.

Souza Júnior, V.S.; Ribeiro, M.R. & Oliveira, L.B. Propriedades químicas e manejo de solos tiomórficos da várzea do Rio Coruripe, Estado de Alagoas. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 25:811-822, 2001.

Taiz, L. Zeiger, E. Nutrição mineral. *Fisiologia vegetal*. Porto Alegre. p 95 – 112. 2004.

Terceiro Neto, C. P. C.; Hernandez, F. F. F.; Bezerra, F. C.; Souza, R. F. De; Cavalcanti, M. L. F. Efeito de diferentes substratos na aclimatação “ex vitro” de mudas de Violeta Africana (*Saintpaulia ionantha Wendl*) *Revista Biologia e Ciência da Terra*, v. 4, n. 2, 2004.

ANEXOS

ANEXO 1. Normas para publicação de artigos e comunicações científicas da revista PLANT CELL CULTURE & MICROPROPAGATION

Os conceitos e afirmações contidos nos artigos e comunicações serão de inteira responsabilidade do(s) autor(es).

1. SUBMISSÃO:

Cada trabalho deverá ter no **máximo 14 páginas** e junto do mesmo deverá ser encaminhado ofício dirigido ao Editor Chefe da revista, solicitando a publicação do artigo.

Processador de texto: Word for Windows (version 98, 2000, XP ou 2003)

Redigido em português, inglês ou espanhol

Espaçamento do texto: Duplo. Margens: esquerda (3cm), direita (2cm), inferior e superiores (2,5cm). Cabeçalho e Rodapé (2,5cm).

Papel: formato A4

Fonte: Times New Roman, tamanho 12

Número de páginas: até 14 páginas, numeradas consecutivamente, incluindo as ilustrações

Tabelas: devem fazer parte do corpo do artigo e ser apresentadas no módulo tabela do Word. O título deve ficar acima.

Gráficos, Figuras e Fotografias: devem ser apresentados em preto e branco, nítidos e com contraste, escaneados, inseridos no texto após a citação dos mesmos e também em um arquivo à parte, salvos em extensão “tif” ou “jpg”, com resolução de 300 dpi. Os gráficos devem vir também em excel, com letra **Times New Roman, tamanho 10, sem negrito; sem caixa de textos e agrupadas.** em arquivo à parte.

Símbolos e Fórmulas Químicas: deverão ser feitos em processador que possibilite a formatação para o programa Page Maker, sem perda de suas formas originais.

2. ESTRUTURA E ORGANIZAÇÃO

2.1. O artigo científico deve ser apresentado na seguinte seqüência:

TÍTULO

Suficientemente claro, conciso e completo, evitando-se palavras supérfluas, em letras maiúsculas, centralizado, em negrito, em português e inglês.

AUTORES

Máximo de 6 autores

Nomes completos sem abreviação, com chamada para nota de rodapé da primeira página em apenas 1 das 4 vias do manuscrito

Rodapé deve conter: titulação – instituição a que o autor está filiado – endereço da instituição – CEP – cidade, estado – endereço de e-mail, do respectivo autor.

RESUMO

Deve condensar, em um único parágrafo, o conteúdo, expondo objetivos, materiais e métodos, os principais resultados e conclusões em não mais do que 250 palavras. De acordo com as normas da NBR6028

Termos para indexação : no mínimo de três e máximo de cinco. Não devem repetir os termos que se acham no título, podem ser constituídas de expressões curtas e não só de palavras e devem ser separadas por vírgula. Se possível, extraídas do vocabulário: Thesagro – Thesaurus Agrícola Nacional, desenvolvido pela CENAGRI (indicação da revista “**Plant Cell Culture & Micropropagation**” para evitar o uso de vários sinônimos como termos de indexação)

ABSTRACT

Além de seguir as recomendações do resumo, não ultrapassando 250 palavras, deve ser uma tradução próxima do resumo.

Index terms: representam a tradução das palavras-chave para a língua inglesa.

INTRODUÇÃO

Deve apresentar uma visão concisa do estado atual do conhecimento sobre o assunto, que o manuscrito aborda e enfatizar a relevância do estudo, sem constituir-se em extensa revisão e, na parte final, os objetivos da pesquisa. Deve incluir a revisão de literatura.

MATERIAL E MÉTODOS

Esta seção pode ser dividida em subtítulos, indicados em negrito.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Podem ser divididas em subseções, com subtítulos concisos e descritivos, e conter tabelas e figuras.

CONCLUSÕES

Finalizar com os resultados de acordo com os objetivos do trabalho

AGRADECIMENTOS

Se for o caso ao fim do texto, e antes das Referências Bibliográficas, a pessoas ou instituições. O estilo, também aqui, deve ser sóbrio e claro, indicando as razões pelas quais se fazem os agradecimentos

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Devem seguir as normas para citação no texto e na seção própria.

3. CASO O ARTIGO CONTENHA FOTOGRAFIAS, GRÁFICOS, FIGURAS, SÍMBOLOS E FÓRMULAS, ESSAS DEVERÃO OBEDECER ÀS SEGUINTE NORMAS:

3.1 Fotografias deverão ser apresentadas em **preto e branco**, nítidas e com contraste, inseridas no texto após a citação das mesmas e também em um arquivo à parte, **salvas em extensão “TIFF” ou “JPEG” com resolução de 300 dpi.**

3.2 Figuras deverão ser apresentadas em **preto e branco**, nítidas e com contraste, inseridas no texto após a citação das mesmas e também em um arquivo à parte, **salvas em extensão “TIFF” ou “JPEG” com resolução de 300 dpi.** As figuras deverão ser elaboradas com letra **Times New Roman, tamanho 10, sem negrito; sem caixa de textos e agrupadas.**

3.3 Gráficos deverão ser inseridos após citação dos mesmos, dentro do próprio texto, elaborado preferencialmente em Excel, com letra **Times New Roman, tamanho 10, sem negrito; sem caixa de textos e agrupadas.**

3.4 **Símbolos e Fórmulas Químicas** deverão ser feitas em processador que possibilite a formatação para o programa **Page Maker** (ex: MathType, Equation), sem perda de suas formas originais.

OBS: A formatação correta é parte imprescindível para que o trabalho seja devidamente protocolado. Caso este não esteja nas normas, o mesmo será recusado.

4. **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:** as referências bibliográficas devem ser citadas conforme a NBR6023/2002 da ABNT.

A exatidão das referências constantes da listagem e a correta citação no texto são de responsabilidade do(s) autor(es) do artigo.

4.1. Orientações gerais:

- Deve-se apresentar todos os autores do documento científico (fonte);
- O nome do periódico deve ser descrito por extenso, não deve ser abreviado;
- Em todas as referências deve-se apresentar o local de publicação (cidade), a ser descrito no lugar adequado para cada tipo de documento;
- As referências devem ser ordenadas alfabeticamente.

4.2. Exemplificação (tipos mais comuns):

ARTIGO DE PERIÓDICO:

VIEIRA, R. F.; RESENDE, M. A. V. de. Épocas de plantio de ervilha em Patos de Minas, Uberaba e Janaúba, Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n. 1, p. 74-80, jan./mar. 2000.

LIVRO:

a) livro no todo:

STEEL, R. G. D.; TORRIE, J. H. **Principles and procedures of statistics**. New York: McGraw-Hill Book, 1960. 481 p.

b) Parte de livro com autoria específica:

FLEURY, J. A. Análise ao nível de empresa dos impactos da automação sobre a organização da produção de trabalho. In: SOARES, R. M. S. M. **Gestão da empresa**. Brasília: IPEA/IPLAN, 1980. p. 149-159.

c) Parte de livro sem autoria específica:

MARTIM, L. C. T. Nutrição de bovino de corte em confinamento. In: _____. **Confinamento de bovino de corte**. 2. ed. São Paulo: Nobel, 1986. cap. 3, p. 29-89.

DISSERTAÇÃO E TESE:

GONÇALVES, R. A. **Preservação da qualidade tecnológica de trigo (*Triticum aestivum* L.) e controle de *Rhizopertha dominica* (F.) durante o armazenamento em atmosfera controlada com Co₂ e N₂**. 1997. 52 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1997.

MATIOLI, G. P. **Influência do leite proveniente de vacas mastíticas no rendimento de queijo frescal**. 2000. 55 p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.

Nota: “A folha é composta de duas páginas: anverso e verso. Alguns trabalhos, como teses e dissertações são impressos apenas no anverso e, neste caso, indica-se f.” (ABNT, NBR6023/2002, p. 18).

TRABALHOS DE CONGRESSO E OUTROS EVENTOS:

SILVA, J. N. M. Possibilidades de produção sustentada de madeira em floresta densa de terra firme da Amazônia brasileira. In: CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, 6., 1990, Campos do Jordão. **Anais...** Campos do Jordão: SBS/SBEF, 1990. p. 39-45.

DOCUMENTOS ELETRÔNICOS:

As obras consultadas *online* são referenciadas conforme normas específicas para cada tipo de documento (monografia no todo e em parte, trabalho apresentado em evento, artigo de periódico, artigo de jornal, etc.), **acrescidas de informações sobre o endereço eletrônico apresentado entre braquetes (< >), precedido da expressão “Disponível em:” e da data de acesso ao documento, precedida da expressão “Acesso em:”**.

Nota: “Não se recomenda referenciar material eletrônico de curta duração nas redes” (ABNT, NBR6023/2000, p. 4). Segundo padrões internacionais, a divisão de endereço eletrônico, no fim da linha, deve ocorrer sempre após barra (/).

Monografia (acesso online):

a) livro no todo

TAKAHASHI, T. (Coord.). **Tecnologia em foco**. Brasília: Socinfo/MCT, 2000. 90 p. Disponível em: <<http://www.socinfo.org.br>>. Acesso em: 22 ago. 2000.

b) parte de livro

TAKAHASHI, T. Mercado, trabalho e oportunidades. In: _____. **Sociedade da informação no Brasil**: livro verde. Brasília: Socinfo/MCT, 2000. cap. 2, p. 13-24. Disponível em: <<http://www.socinfo.gov.br>>. Acesso em: 22 ago. 2000.

c) Parte de congresso, seminário, etc.

GIESBRECHT, H. O. Avaliação de desempenho de institutos de pesquisa tecnológica: a experiência de projeto excelência na pesquisa tecnológica. In: CONGRESSO ABIPTI, 2000, Fortaleza. **Gestão de institutos de pesquisa tecnológica**. Fortaleza: Nutec, 2000. Disponível em: <<http://www.abipti.org.br>>. Acesso em: 01 dez. 2000.

d) Tese

SILVA, E. M. **Arbitrariedade do signo**: a língua brasileira de sinais (LIBRAS). 1997. 144 p. Dissertação (Mestrado em Linguística Aplicada e Estudo de Língua) - Pontifícia Universidade Católica de São Paulo, São Paulo, 1997. Disponível em: <<http://www.terra.com.br/virtualbooks/freebook/port/did/teses.htm>>. Acesso em: 28 nov. 2000.

Artigo de periódico (acesso online):

RESENDE, A. M. G. Hipertexto: tramas e trilhas de um conceito contemporâneo. **Informação e Sociedade**, Recife, v. 10, n. 1, 2000. Seção Educação. Disponível em: <<http://www.informacoesociedade.ufpb.br/>>. Acesso em: 30 nov. 2000.

CITAÇÃO: PELO SISTEMA ALFABÉTICO (AUTOR-DATA) (conforme ABNT, NBR10520/2002)

Dois autores - Steel & Torrie (1960) ou (STEEL & TORRIE, 1960).

Três ou mais autores - Valle et al. (1945) ou (VALLE et al., 1945).

Obs.: Quando forem citados dois autores de uma mesma obra deve-se separá-los pelo sinal & (comercial).

ANEXO 2. Normas para publicação de artigos e comunicações científicas da revista ACTA AMAZONICA

Como parte do processo de submissão, os autores são obrigados a verificar a conformidade da submissão em relação a todos os itens listados a seguir. As submissões que não estiverem de acordo com as normas serão devolvidas aos autores.

1. O tamanho máximo do arquivo deve ser 3 MB.
2. O manuscrito deve ser acompanhado de uma carta de submissão indicando que:
 - a) Os dados contidos no trabalho são originais e precisos;
 - b) que todos os autores participaram do trabalho de forma substancial e estão preparados para assumir responsabilidade pública pelo seu conteúdo;
 - c) a contribuição apresentada a Revista não está sendo publicada, no todo ou em parte em outro veículo de divulgação. A carta de submissão deve ser carregada no sistema da Acta Amazonica como "documento suplementar".
3. Os manuscritos são aceitos em português, espanhol e inglês, mas encorajam-se contribuições em inglês. A veracidade das informações contidas numa submissão é de responsabilidade exclusiva dos autores.
4. A extensão máxima do trabalho é de 30 páginas para artigos e revisões, dez para comunicações e notas científicas e cinco para outros tipos de contribuições, incluindo bibliografia, tabelas, figuras e legendas. Tabelas e figuras devem ser inseridas ao final do texto, nesta ordem. Uma cópia das figuras deve ser submetida em formato eletrônico na pagina do Periódico (ver itens referente a figuras).
5. Os manuscritos formatados conforme as Normas da Revista (Instruções para os autores) são enviados aos editores associados para pré-avaliação. Neste primeiro julgamento são levados em consideração a relevância científica, a inteligibilidade do manuscrito e seu escopo dentro do contexto Amazônico. Nesta fase, contribuições fora do escopo ou de pouca relevância científica serão rejeitadas. Manuscritos aprovados na pré-avaliação são enviados

para revisores (pelo menos dois), especialistas de outras instituições diferentes daquelas dos autores, para uma análise mais detalhada.

6. Uma contribuição pode ser considerada para publicação, se tiver recebido pelo menos dois pareceres favoráveis no processo de avaliação. A aprovação dos manuscritos está fundamentada no conteúdo científico e na sua apresentação conforme as Normas da Revista.

7. Os manuscritos que necessitem correções são encaminhados aos autores para revisão. A versão corrigida deve ser encaminhada ao Editor no prazo de DUAS semanas. Uma resposta deve ser carregada no sistema da Revista, detalhando as correções efetuadas. Nesta resposta, recomendações não incorporadas ao manuscrito, devem ser justificadas. Todo o processo de avaliação pode ser acompanhado no endereço, <http://submission.scielo.br/index.php/aa/login>.

8. A organização do manuscrito deve seguir esta ordem: Título, Nome do(s) autor(es), Endereço institucional e eletrônico, Resumo, Palavras Chave, Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão, Conclusões, Agradecimentos (incluído apoio financeiro) e Bibliografia Citada.

Importante: Toda submissão deve incluir antes da Introdução: título, abstract e palavras-chave (keywords) em inglês.

9. As comunicações e notas científicas são redigidas em seqüência única, sem separação em tópicos; porém, devem conter: Título, Nome do(s) autor(es), Endereço institucional e eletrônico, Resumo, Palavras Chave; Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão, Conclusões, Agradecimentos e Bibliografia Citada. São permitidas até três figuras e duas tabelas. Também devem ser incluídos título, abstract e palavras-chave (keywords) em inglês.

10. O(s) nome(s) completo(s) do(s) autor(es) deve(m) ser escrito(s) com o último nome em letras maiúsculas. Nomes e instituição(ões) com o endereço completo, incluindo telefone, fax, e-mail devem ser cadastrados no sistema da Revista no ato da submissão.

11. **IMPORTANTE:** Os manuscritos não formatados conforme as Normas da Revista NÃO são aceitos para publicação.

12. Os manuscritos devem ser preparados usando editor de texto (e salvos em formato doc, docx ou Rtf), utilizando fonte "Times New Roman", tamanho 12 pt, espaçamento duplo, com margens de 3 cm. As páginas e as linhas devem ser numeradas. Referências, tabelas e figuras (se houver) devem ser incluídas ao final do manuscrito, nessa sequência.

13. O título deve ser justificado à esquerda; com a primeira letra maiúscula.

14. O resumo, com até 250 palavras ou até 150 palavras no caso de notas e comunicações, deve conter de forma sucinta, o objetivo, a metodologia; os resultados e as conclusões. Os nomes científicos das espécies e demais termos em latim devem ser escritos em itálico.

15. As palavras-chave devem ser em número de três a cinco. Cada palavra-chave pode conter dois ou mais termos.

16. Introdução. Esta seção deve enfatizar o propósito do trabalho e fornecer de forma sucinta o estado do conhecimento sobre o tema em estudo. Nesta seção devem-se especificar claramente os objetivos ou hipóteses a serem testados. Não incluir resultados ou conclusões na Introdução.

17. Material e Métodos. Esta seção deve ser organizada cronologicamente e explicar os procedimentos realizados, de tal modo que outros pesquisadores possam repetir o estudo. O procedimento estatístico utilizado deve ser descrito nesta seção. Procedimentos-padrão devem ser apenas referenciados. As unidades de medidas e as suas abreviações devem seguir o Sistema Internacional e, quando necessário, deve constar uma lista com as abreviaturas utilizadas. Equipamento específico utilizado no estudo deve ser descrito (modelo, fabricante, cidade e país de fabricação). Material testemunho (amostra para referência futura) deve ser depositado em uma ou mais coleções científicas e informado no manuscrito.

18. Aspectos éticos e legais. Para estudos que exigem autorizações especiais (p.ex. Comitê de Ética/Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, IBAMA, CNTBio, INCRA/FUNAI, EIA/RIMA, outros) deve-se informar o número do protocolo de aprovação.

19. Resultados e discussão. Os resultados devem apresentar os dados obtidos com o mínimo julgamento pessoal. Não repetir no texto toda a informação contida em tabelas e figuras. Algarismos devem estar separados de unidades. Por ex., 60 °C e NÃO 60° C, exceto para percentagem (p. ex., 5% e NÃO 5 %). Utilizar unidades e símbolos do sistema internacional

e simbologia exponencial. Por exe., cmol kg^{-1} em vez de meq/100g. A discussão deve ter como alvo os resultados obtidos. Evitar mera especulação. Entretanto, hipóteses bem fundamentadas podem ser incorporadas. Apenas referências relevantes devem ser incluídas.

20. Conclusões. Este item contém a interpretação dos resultados obtidos no trabalho. Podem ser apresentadas como um tópico separado ou incluídas na seção de resultados e discussão.

21. Agradecimentos (incluindo apoio financeiro). Devem ser breves e concisos.

22. Bibliografia citada. Pelo menos 70% das referências devem ser artigos de periódicos científicos. As referências devem ser preferencialmente dos últimos 10 anos. Os nomes dos autores devem ser citados em ordem alfabética. As referências devem se restringir a citações que aparecem no texto. Nesta seção, o título do periódico NÃO deve ser abreviado.

a) Artigos de periódicos: Walker, I. 2009. Omnivory and resource – sharing in nutrient – deficient Rio Negro Waters: Stabilization of biodiversity? *Acta Amazonica*, 39: 617-626.

Alvarenga, L.D.P.; Lisboa, R.C.L. 2009. Contribuição para o conhecimento da taxonomia, ecologia e fitogeografia de briófitas da Amazônia Oriental. *Acta Amazonica*, 39: 495-504.

b) Dissertações e teses: Ribeiro, M.C.L.B. 1983. *As migrações dos jaraquis (Pisces: Prochilodontidae) no rio Negro, Amazonas, Brasil*. Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Fundação Universidade do Amazonas, Manaus, Amazonas. 192 pp.

c) Livros: Goulding, M. 1980. *The fishes and the forest. Explorations in Amazonian natural history*. University of California Press, Berkeley, CA, USA. 280 pp.

d) Capítulos de livros: Absy, M.L. 1993. Mudanças da vegetação e clima da Amazônia durante o Quaternário, p. 3-10. In: Ferreira, E.J.G.; Santos, G.M.; Leão, E.L.M.; Oliveira, L.A. (Eds.). *Bases científicas para estratégias de preservação e desenvolvimento da Amazônia*. v.2. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas.

e) Citação de fonte eletrônica: CPTEC, 1999. Climanalise, 14: 1-2 (www.cptec.inpe.br/products/climanalise). Acesso em 19/05/1999.

23. No texto, citações de referências seguem a ordem cronológica. Para duas ou mais referências do mesmo ano citar conforme a ordem alfabética. Exemplos:

a) Um autor: Pereira (1995) ou (Pereira 1995).

b) Dois autores: Oliveira e Souza (2003) ou (Oliveira e Souza 2003).

c) Três ou mais autores: Rezende *et al.* (2002) ou (Rezende *et al.* 2002).

d) Citações de anos diferentes (ordem cronológica): Silva (1991), Castro (1998) e Alves (2010) ou (Silva 1991; Castro 1998; Alves 2010).

e) Citações no mesmo ano (ordem alfabética): Ferreira *et al.* (2001) e Fonseca *et al.* (2001); ou (Ferreira *et al.* 2001; Fonseca *et al.* 2001).

FIGURAS

24. Fotografias, desenhos e gráficos devem ser de alta resolução, em preto e branco com alto contraste, numerados sequencialmente em algarismos arábicos. A legenda da figura deve estar em posição inferior a esta. NÃO usar tonalidades de cinza em gráfico dispersão (linhas ou símbolos) ou gráficos de barra. Em gráfico de dispersão, pode-se usar símbolos abertos ou sólidos (círculos, quadrados, triângulos, ou losangos) e linhas em preto (contínuas, pontilhadas ou tracejadas). Para gráfico de barra, pode-se usar barras pretas, bordas pretas, barras listradas ou pontilhadas. Na borda da área de plotagem utilizar uma linha contínua e fina, porém NÃO usar uma linha de borda na área do gráfico. Evitar legendas desnecessárias na área de plotagem. Nas figuras, NÃO usar letras muito pequenas (< tamanho 10 pt), nos título dos eixos ou na área de plotagem. Nos eixos (verticais, horizontais) usar marcas de escala internas. NÃO usar linhas de grade horizontais ou verticais, exceto em mapas ou ilustrações similares. O significado das siglas utilizadas deve ser descrito na legenda da figura.

25. No manuscrito, as figuras devem limitar-se a sete em artigos, e a três em comunicações e notas científicas e devem ser de alta qualidade.

26. As figuras devem estar dimensionadas de forma compatível com as dimensões da Revista, ou seja, largura de uma coluna (8 cm) ou de uma página 17 cm e permitir espaço para a legenda. As ilustrações podem ser redimensionadas durante a processo de produção para

otimizar o espaço da Revista. Na figura, quando for o caso, a escala deve ser indicada por uma linha ou barra (horizontal) e, se necessário, referenciadas na legenda da figura, por exemplo, barra = 1 mm.

27. No texto, a citação das figuras deve ser com letra inicial maiúscula, na forma direta ou indireta (entre parêntesis). Por exe.: Figura 1 ou (Figura 1). Na legenda, a figura deve ser numerada seguida de ponto antes do título. Por exe.: "Figura 1. Análise..."

28. Para figuras não originais ou publicadas anteriormente, os autores devem informar explicitamente no manuscrito que a permissão para reproduzi-las foi concedida.

29. As fotografias e ilustrações (Bitmap) devem estar no formato Tiff ou Jpeg, em alta resolução (mínimo de 300 dpi). Em gráficos de dispersão ou de barras utilizar o formato Xls, Eps, Cdr, Ai ou Wmf. Cada uma das figuras inseridas no texto deve também ser carregada no sistema da *Acta Amazonica* em arquivo separado, como um "documento suplementar".

30. Fotografias devem estar, preferencialmente, em preto e branco. Fotografias coloridas podem ser aceitas, mas com os custos de impressão por conta dos autores. Como alternativa, pode ser usada a figura em preto e branco na versão impressa e colorida (se for necessário) na versão eletrônica, sem custo para os autores.

31. Os autores podem ser convidados a enviar uma fotografia colorida, para ilustrar a capa da Revista. Nesse caso, não há custos para os autores.

TABELAS

32. As tabelas devem ser organizadas e numeradas sequencialmente em algarismos arábicos. O número máximo de tabelas é de cinco para os artigos e de duas tabelas para as comunicações e notas científicas. A numeração e o título (breve e descritivo) devem estar em posição superior à tabela. A tabela pode ter notas de rodapé. O significado das siglas utilizadas na tabela (cabeçalhos, etc) deve ser descrito no título ou no rodapé.

33. As tabelas devem ser elaboradas em editor de texto (Rtf, Doc ou Docx) e não podem ser inseridas no texto como figura (p. ex. um gráfico no formato Jpeg).

34. A citação no texto pode ser na forma direta ou indireta (entre parêntesis), por extenso, com a letra inicial maiúscula. Por exe. Tabela 1 ou (Tabela 1). Na legenda, a tabela deve ser numerada seguida de ponto antes do título. Por exe. "Tabela 1. Análise..."

INFORMAÇÕES ADICIONAIS

1. A Acta Amazonica pode efetuar alterações de formatação e correções gramaticais no manuscrito para ajustá-lo ao padrão editorial e linguístico. As provas finais são enviadas aos autores para a verificação. Nesta fase, apenas os erros tipográficos e ortográficos podem ser corrigidos. Nessa etapa, **NENHUMA** alteração de conteúdo pode ser feita no manuscrito, se isso acontecer, o manuscrito pode retornar ao processo de avaliação.

2. A Acta Amazonica não cobra taxas para publicação. Informações adicionais podem ser obtidas por e-mail acta@inpa.gov.br. Para informações sobre um determinado manuscrito, deve-se fornecer o número de submissão.