

DULCIMARA CARVALHO NANNETTI

**UTILIZAÇÃO DA CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS NA
MICROPROPAGAÇÃO E MANUTENÇÃO DE *Heliconia* sp.**

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura de Lavras, como parte das exigências do
Curso de Mestrado em Agronomia, área de
concentração em Fitotecnia, para obtenção do título de
"Mestre".

Orientador

PROF. JOSÉ EDUARDO BRASIL PEREIRA PINTO

**LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
1994**

FICHA CATALOGRÁFICA PREPARADA PELA SEÇÃO DE CATALOGAÇÃO E
CLASSIFICAÇÃO DA BIBLIOTECA CENTRAL DA ESAL

Nannetti, Dulcimara Carvalho
Utilização da cultura de tecidos vegetais na
micropropagação e manutenção de *Heliconia* sp. /
Dulcimara Carvalho Nannetti.--Lavras : ESAL, 1994.
106 p. : il.

Orientador: José Eduardo Brasil Pereira Pinto.
Dissertação (Mestrado) - ESAL.
Bibliografia.

1.Helicônia - Cultura de tecidos. 2.Helicônia -
Micropropagação. 3.Helicônia - Reguladores de
crescimento. 4.Helicônia - Micorrizas. I. Escola
Superior de Agricultura de Lavras. II. Título.

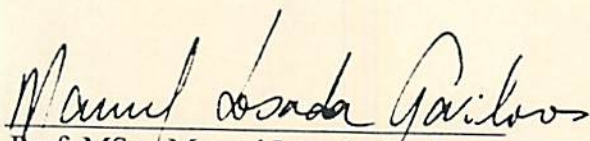
CDD-635.93421

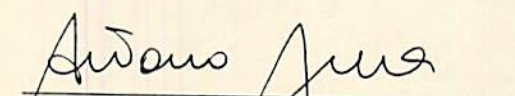
DULCIMARA CARVALHO NANNETTI

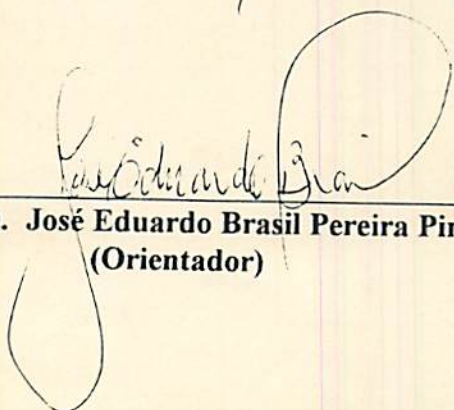
**UTILIZAÇÃO DA CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS NA
MICROPROPAGAÇÃO E MANUTENÇÃO DE *Heliconia* sp.**

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura de Lavras, como parte das exigências do
Curso de Mestrado em Agronomia, área de
concentração em Fitotecnia, para obtenção do título de
"Mestre".

APROVADA em 16 de dezembro de 1994


Prof. MSc. Manuel Losada Gavilanes


Pesq. PhD. António V. O. Figueira


Prof. PhD. José Eduardo Brasil Pereira Pinto
(Orientador)

Aos meus irmãos:

Darlene Gonçalves Carvalho

Delaine Carvalho Aramuni

Dalmo Gonçalves Carvalho

OFEREÇO

Aos meus pais:

Dalmo Carvalho e

Dalci Gonçalves Carvalho

Ao meu marido:

Alex Nogueira Nannetti

DEDICO

AGRADECIMENTOS

-A Deus por tudo.

-À Escola Superior de Agricultura de Lavras, através de seus departamentos, professores e funcionários, pela oportunidade e auxílio para a realização do curso de mestrado.

-Ao orientador Prof. José Eduardo Brasil Pereira Pinto pela orientação segura, apoio constante durante à realização dos créditos e realização do trabalho científico. Minha constante admiração pelo seu amor ao trabalho, à pesquisa, e grande amizade aos orientados.

-Aos laboratoristas e amigos Evaldo S. Arantes e Vantuil A. Rodrigues pelo estímulo e grande colaboração durante à realização dos experimentos.

-Ao Prof. Maurício de Souza (Departamento de Agricultura), Prof. José Oswaldo Siqueira (Departamento de Ciências do Solo), Prof^ª Eliany Carvalho Faria e Cicarelli e Prof^ª Kendra C. Dwelley (Instituto Cultural Brasil -Estados Unidos).

-Ao Prof. Manuel Losada Gavilanes pela importante participação na banca examinadora e também pela grande amizade como professor e como colega de trabalho.

-Ao pesquisador Antônio V. O. Figueira pelas valiosas sugestões na dissertação e importante participação na banca examinadora.

-Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudos.

-Ao meu irmão Dalmo Gonçalves Carvalho, importante conselheiro em todas as ocasiões, pelo auxílio prestado durante à realização de todos os experimentos, pelo registro dos mesmos através de fotografias que constam nesta dissertação, pelo apoio moral e técnico na confecção desta dissertação.

-À médica patologista Darlene Gonçalves Carvalho pela identificação da bactéria *Bacillus subtilis* durante a execução do trabalho de pesquisa.

-À grande amiga e “orientadora” Prof^a Jane Soares pelas sempre corretas dicas e alertas, pelo grande incentivo à realização deste curso e constante estímulo ao estudo e trabalho.

-À amiga Denise Garcia Santana pela orientação estatística.

-Ao amigo Geraldo A. Melo, Arie e Fátima Blank e Osmar Lameira pelo grande auxílio na confecção desta dissertação.

-Aos sempre amigos Daniela A. Silveira, Alessandra R. Carvalho, Patrícia D. Oliveira, Rossana C. Almeida, Tânia M^a Barbosa, Valéria E. G. Rodrigues, Patrícia M. Caixeta, Sinara Carvalho, João e Elza de Freitas, Leandro e Matilde Nannetti, Maria Inês Alvarenga, José Sérgio Araújo, pela convivência e amizade.

-Ao amigo Renato Innecco e amiga Aurora Y. Sato pelo grande auxílio no decorrer do trabalho científico e pela sincera amizade.

-Aos colegas do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da ESAL e colegas de curso.

-Ao grande companheiro Alex Nogueira Nannetti pelo carinho, paciência, dedicação, apoio e estímulo constante, não só durante o curso, mas durante a nossa vida.

-Àqueles que participaram direta e indiretamente do trabalho de pesquisa e contribuíram para a realização do mesmo.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMO	xiii
SUMMARY	xv
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 INTRODUÇÃO GERAL	1
1.2 ASPECTOS BOTÂNICOS DA HELICÔNIA	6
1.3 OBJETIVO GERAL	10
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	10
2 ESTABELECIMENTO, MULTIPLICAÇÃO, ALONGAMENTO E INDUÇÃO DE ENRAIZAMENTO "IN VITRO" DE <i>Heliconia</i> sp	13
RESUMO	13
2.1 REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.2 OBJETIVO	22
2.3 MATERIAL E MÉTODOS	22
2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
2.4.1 Tratamento de rizomas de <i>Heliconia</i> , obtenção e inoculação de gemas "in vitro" ...	26
2.4.2 Multiplicação de <i>Heliconia</i> sp. "in vitro" através do uso de TDZ e BAP	31
2.4.2.1 Utilização de diferentes níveis de TDZ e BAP em meio MS	31
2.4.2.2 Diferentes períodos de exposição de explantes secundários ao TDZ	38
2.4.2.3 Efeito da imersão de explantes secundários em solução de TDZ	45
2.4.3 Alongamento de tufos de brotos de <i>Heliconia</i> sp. em meio MS	50
2.4.4 Utilização de AIB para promoção de enraizamento em <i>Heliconia</i> sp.	53
2.5 CONCLUSÕES	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

3 EFEITO DE DIFERENTES NÍVEIS DE NITROGÊNIO E CÁLCIO, COMBINADOS COM BAP E TDZ, NO DESENVOLVIMENTO DE <i>Heliconia</i> sp. "IN VITRO"	64
RESUMO	64
3.1 REFERENCIAL TEÓRICO	65
3.2 OBJETIVO	69
3.3 MATERIAL E MÉTODOS	70
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
3.4.1 Variação dos níveis de nitrogênio e relação $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$	72
3.4.2 Variação dos níveis de cálcio	79
3.5 CONCLUSÕES	85
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
4 UTILIZAÇÃO DE MICORRIZAS VESICULAR-ARBUSCULARES (MVA) EM MUDAS MICROPROPAGADAS DE <i>Heliconia</i> sp. DURANTE O PERÍODO DE ACLIMATAÇÃO	88
RESUMO	88
4.1 REFERENCIAL TEÓRICO	89
4.2 OBJETIVO	93
4.3 MATERIAL E MÉTODOS	94
4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	97
4.5 CONCLUSÕES	104
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Quantidade de plantas ornamentais do total de plantas micropropagadas por ano em diversas regiões. ESAL, Lavras-M.G., 1994	5
2	Contaminação fúngica e formação de gemas em rizomas de <i>Heliconia</i> sp. tratados e não tratados com fungicida e armazenados em sacos de polietileno por 14 dias. ESAL, Lavras-M.G., 1994	27
3	Contaminação bacteriana em gemas de <i>Heliconia</i> sp. inoculadas em meio MS com e sem adição de antibiótico. ESAL, Lavras-M.G., 1994	29
4	Efeito de várias concentrações de BAP e TDZ sobre o número,tamanho de brotos e enraizamento de <i>Heliconia</i> sp. "in vitro". ESAL, Lavras-M.G., 1994	31
5	Efeito do período de exposição (dias) do explante secundário de <i>Heliconia</i> sp. ao TDZ (0,25 mg/L) e transferência para meio MS sem regulador de crescimento, após 60 dias de cultivo, sobre o número e tamanho de brotos, tamanho de explantes secundários e número de raízes. ESAL, Lavras-M.G., 1994	38
6	Efeito de vários períodos de imersão (minutos),de explantes secundários de <i>Heliconia</i> sp. em solução de TDZ 0,25 mg/L e cultivo em meio MS sem regulador de crescimento, sobre o número e tamanho de brotos, tamanho do explante secundário e número de raízes. ESAL, Lavras-M.G., 1994	48
7	Número e comprimento de raízes para vários tamanhos de explantes secundários de <i>Heliconia</i> sp., provenientes de meio com TDZ (A) e com BAP (B), e cultivados em 1/2 MS com diferentes níveis de AIB. ESAL, Lavras-M.G., 1994	53
8	Variação dos níveis de nitrogênio e relação $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ do meio MS. ESAL, Lavras-M.G., 1994	71
9	Variação dos níveis de cálcio do meio MS. ESAL, Lavras-M.G., 1994	71

Tabela	Página
10 Características avaliadas em <i>Heliconia</i> sp. através da variação de níveis de nitrogênio fornecido em meio MS suplementado com 2,5 mg/L de BAP. ESAL, Lavras-M.G., 1994	77
11 Características avaliadas em <i>Heliconia</i> sp. através da variação de níveis de nitrogênio fornecidos em meio MS suplementado com 0,25 mg/L de TDZ. ESAL, Lavras-M.G., 1994	78
12 Efeito do cálcio associado com BAP e TDZ no crescimento de explantes secundários, número e crescimento de brotos e número de raízes de <i>Heliconia</i> sp. ESAL, Lavras-M.G., 1994	84
13 Espécies micorrízicas utilizadas para inoculação de <i>Heliconia</i> sp., quantidade de inóculo e de esporos por litro de substrato. ESAL, Lavras-M.G., 1994	94
14 Resultados obtidos na avaliação de plântulas de <i>Heliconia</i> sp. inoculadas com várias espécies de MVA. ESAL, Lavras-M.G., 1994	98
15 Determinação de macro (%) e micronutrientes (ppm) através de análise mineral da parte aérea de <i>Heliconia</i> sp. oriunda de inoculação com diferentes espécies de MVA. ESAL, Lavras-M.G., 1994	101

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Diversas espécies de helicônia com inflorescências eretas (2, 4, 5 e 6) e pendentes (1 e 3) e porte arbustivo (4). ESAL, Lavras-M.G., 1994	7
2	Desenvolvimento de gemas em rizomas de <i>Heliconia</i> sp. após 14 dias de armazenamento em sacos de polietileno. ESAL, Lavras-MG, 1994	28
3	Desenvolvimento de <i>Heliconia</i> sp. após o estabelecimento de gemas. ESAL, Lavras-MG, 1994	30
4	Produção (A) e crescimento de brotos (B) de <i>Heliconia</i> sp. com níveis crescentes de BAP em meio MS. ESAL, Lavras-M.G., 1994	32
5	Produção (A) e crescimento de brotos (B) de <i>Heliconia</i> sp. com níveis crescentes de TDZ em meio MS. ESAL, Lavras-M.G., 1994	33
6	Desenvolvimento de brotos de <i>Heliconia</i> sp. com a utilização de BAP e TDZ em diferentes níveis (Fig.6.1 e 6.2). Diferentes períodos de exposição do explante secundário ao TDZ (Fig. 6.3). Efeito da imersão do explante secundário em solução de TDZ (Fig.6.4). ESAL, Lavras-MG, 1994	34
7	Quantidade de raízes formadas em explantes secundários de <i>Heliconia</i> sp., com 40 dias de cultivo em meio MS com níveis crescentes de BAP. ESAL, Lavras-M.G., 1994	35
8	Produção de brotos em <i>Heliconia</i> sp. com diferentes períodos (dias) de exposição em meio MS suplementado com 0,25 mg/L de TDZ, após 60 dias de cultivo. ESAL, Lavras-M.G., 1994	39
9	Produção de brotos em plântulas de <i>Heliconia</i> sp., transferidas para meio MS sem regulador de crescimento, após a exposição a 0,25 mg/L de TDZ por 2, 4, 8, 16 e 32 dias. As avaliações foram realizadas com 39, 46, 53 e 60 dias. ESAL, Lavras-M.G., 1994	39

Figura		Página
10	Tamanhos de brotos (mm) com período crescente de exposição de <i>Heliconia</i> sp. em meio MS suplementado com 0,25 mg/L de TDZ, após 60 dias de cultivo. ESAL, Lavras-M.G., 1994	40
11	Tamanho dos brotos (mm) de <i>Heliconia</i> sp. transferidos para meio MS, sem regulador de crescimento. ESAL, Lavras-M.G., 1994	40
12	Tamanho de explantes secundários (mm) com períodos de exposição crescente de <i>Heliconia</i> sp. ao meio MS suplementado com 0,25 mg/L de TDZ, após 60 dias de cultivo. ESAL, Lavras-M.G., 1994	42
13	Tamanho dos explantes secundários (mm) de <i>Heliconia</i> sp. transferidos para meio MS sem regulador de crescimento. ESAL, Lavras-M.G., 1994	42
14	Quantidade de raízes formadas com período crescente de imersão de <i>Heliconia</i> sp. em meio MS suplementado com 0,25 mg/L de TDZ, após 60 dias de cultivo. ESAL, Lavras-M.G., 1994	43
15	Quantidade de raízes formadas em <i>Heliconia</i> sp. transferida para meio MS sem regulador de crescimento. ESAL, Lavras-M.G., 1994	43
16	Produção (A) e crescimento de brotos (B) de <i>Heliconia</i> sp. com período crescente (em minutos) de imersão dos explantes secundários em solução 0,25 mg/L de TDZ e posterior transferência para meio MS sem regulador de crescimento. ESAL, Lavras-M.G., 1994	46
17	Tamanho do explante secundário (A) e número de raízes (B), obtidos com diferentes períodos de imersão (minutos) dos explantes secundários de <i>Heliconia</i> sp. em solução 0,25 mg/L de TDZ, e posterior transferência para meio MS sem regulador de crescimento. ESAL, Lavras-M.G., 1994	47
18	Crescimento de tufo de brotos de <i>Heliconia</i> sp. inteiros, divididos ao meio, em quatro partes e individualizados, cultivados por 60 dias em meio MS sem regulador de crescimento. ESAL, Lavras-M.G., 1994	51
19	Alongamento de tufo de brotos de <i>Heliconia</i> sp. inteiros, divididos ao meio, em quatro partes, individualizados (1). Quantidade de brotos retirados de um tufo inteiro (2). ESAL, Lavras-MG, 1994	52

Figura	Página	
20	Número de raízes formadas em três diferentes tamanhos de explante secundário de <i>Heliconia</i> sp., provenientes de meio com TDZ (A) - (tamanho 1: 10 a 15 mm; tamanho 2: 15 a 20 mm e tamanho 3: 25 a 40 mm) e BAP (B)- (tamanho 1: 15 a 20 mm; tamanho 2: 30 a 35 mm e tamanho 3: 45 a 50 mm), cultivados em 1/2 MS com diferentes níveis de AIB. ESAL, Lavras-M.G., 1994	54
21	Comprimento de raízes em tamanhos diferentes de explantes secundários de <i>Heliconia</i> sp., provenientes de meio com TDZ (A) e com BAP (B), cultivados em 1/2 MS com diferentes níveis de AIB. ESAL, Lavras-M.G., 1994	56
22	Enraizamento de <i>Heliconia</i> sp., em três tamanhos diferentes de explantes secundários (T ₁ , T ₂ , T ₃), provenientes de meio com BAP e TDZ, através do uso de níveis crescentes de ácido indolbutírico (AIB). ESAL, Lavras-MG, 1994	58
23	Produção de brotos em <i>Heliconia</i> sp. com diferentes níveis de nitrogênio no meio de cultura MS e adição de 2,5 mg/L de BAP, após 40 dias de cultivo. ESAL, Lavras-M.G., 1994	72
24	Produção (A) e crescimento de brotos (B) de <i>Heliconia</i> sp. com vários níveis de nitrogênio no meio de cultura MS e adição de 0,25 mg/L de TDZ. ESAL, Lavras-M.G., 1994	74
25	Quantidade de raízes produzidas com 0,25 mg/L de TDZ (A) e peso da matéria fresca (PMF) de raízes com 2,5 mg/L de BAP (B), através da variação de níveis de nitrogênio no meio MS para <i>Heliconia</i> sp. ESAL, Lavras-M.G., 1994	76
26	Desenvolvimento de <i>Heliconia</i> sp. com a utilização de diferentes níveis de nitrogênio (1) e cálcio (2) combinados com BAP e TDZ, após 40 dias de cultivo. ESAL, Lavras-MG, 1994	80
27	Crescimento de explantes secundários de <i>Heliconia</i> sp. com diferentes níveis de cálcio em meio MS suplementado com 2,5 mg/L de BAP (A) e 0,25 mg/L de TDZ (B). ESAL, Lavras-M.G., 1994	81
28	Crescimento de brotos de <i>Heliconia</i> sp. com diferentes níveis de cálcio em meio MS suplementado com 2,5 mg/L de BAP (A) e 0,25mg/L de TDZ (B). ESAL, Lavras-M.G., 1994	82

Figura		Página
29	Número de brotos obtidos com níveis crescentes de cálcio em meio MS suplementado com 0,25 mg/L de TDZ. ESAL, Lavras-M.G., 1994	83
30	Colonização (%) - (A) e comprimento (mm) - (B) do sistema radicular em plântulas de <i>Heliconia</i> sp. inoculadas com diferentes espécies de MVA além da testemunha. ESAL, Lavras-M.G., 1994	99
31	Peso da matéria seca (mg) de sistema radicular em plântulas de <i>Heliconia</i> sp. inoculadas com diferentes espécies de MVA além da testemunha. ESAL, Lavras-M.G., 1994	100
32	Resultado da utilização de várias espécies de micorrizas isoladamente (3, 4 e 5), mistura de inóculo (2) e ausência de inoculação (1) em mudas micropropagadas de <i>Heliconia</i> sp. ESAL, Lavras -MG, 1994	103

RESUMO

NANNETTI, Dulcimara Carvalho. **Utilização da cultura de tecidos vegetais na micropropagação e manutenção de *Heliconia* sp.** Lavras: ESAL, 1994. 106p. (Dissertação - Mestrado em Fitotecnia).*

Para viabilizar a micropropagação de *Heliconia* sp. foi necessário inicialmente a utilização de fungicida (Benomyl) para o tratamento dos rizomas e obtenção de gemas. Posteriormente foi necessária a utilização de antibiótico (Claforan) no meio de cultura MS para o estabelecimento dos explantes iniciais. Na multiplicação da espécie, BAP se mostrou mais eficiente na dosagem de 2,5 mg/L e TDZ na dosagem de 0,25 mg/L. A redução do período de exposição de explantes secundários ao regulador de crescimento TDZ de 40 para 8 dias ocasionou o aumento da produção de brotos. Para o alongamento de tufos de brotos a transferência para o meio MS sem regulador de crescimento causou um bom desenvolvimento dos brotos. *Heliconia* sp. enraizou com facilidade mesmo na ausência de auxinas no meio de cultura. Contudo a utilização de AIB (0,5 a 1,5 mg/L) incrementou a formação de raízes principalmente em explantes secundários de tamanhos menores (10 a 30 mm). Variando-se a concentração de nutrientes do meio MS observou-se um maior número de brotos com a utilização de 840,00 e 335,44 mg/L de

* Orientador: José Eduardo Brasil Pereira Pinto. Membros da Banca: Manuel Losada Gavilanes e Antônio V. O. Figueira.

nitrogênio para 2,5 mg/L de BAP e 0,25 mg/L de TDZ, respectivamente. Variando-se a concentração de cálcio observou-se uma maior produção de brotos com 880 e 440 mg/L de cálcio com a utilização de 2,5 mg/L de BAP e 0,25 mg/L de TDZ, respectivamente. Durante a fase de aclimatação a inoculação com a MVA *Gigaspora margarita* resultou em um maior crescimento e maior peso da matéria seca do sistema radicular das plântulas, resultado de uma maior porcentagem de colonização. Os fungos micorrízicos testados não mostraram um efeito positivo no desenvolvimento da parte aérea da planta.

SUMMARY

UTILIZATION OF PLANT TISSUE CULTURE IN MICROPROPAGATION AND MAINTENANCE OF *Heliconia* sp.

The fungicide (Benomyl) was necessary to initiate the *Heliconia* sp. micropropagation, as rhizomes treatment to induce buds. The antibiotic (Claforan) must be used in the MS medium to establish initial explants. In this specie's multiplication, BAP was more efficient with a concentration of 2,5 mg/L, and TDZ was more efficient with a concentration of 0,25 mg/L. Shoot production was increased by the reduction of the exposition period of secondary explants in thidiazuron (TDZ) from 40 to 8 days. In order to be elongated, shoot clusters were transferred to MS medium without growth regulators and that resulted in a good development of the shoots. *Heliconia* sp. rooted easily without auxins in the culture medium, although the use of IBA (0,5 a 1,5 mg/L) increased the rooting, mainly in smaller secondary explants (from 10 to 30 mm). When the MS medium nutrient concentration was changed, the highest number of shoots was observed with 840,00 and 335,44 mg/L of nitrogen to 2,5 mg/L of BAP and 0,25 mg/L of TDZ, respectively. When the calcium concentration was changed, the highest number of shoots was observed with 880 and 440 mg/L of calcium to 2,5 mg/L of BAP and 0,25 mg/L of TDZ, respectively. During the acclimatization phase, the inoculation with the VAM *Gigaspora margarita* caused more growth and more dry material weight of the root system. Increased growth and dry material weight were a result of an optimum colonization. The mycorrhizic fungi tested didn't show a positive effect on the aerial part of the plants' growth.

1 INTRODUÇÃO

1.1 INTRODUÇÃO GERAL

No Brasil, o interesse pela floricultura e plantas ornamentais começou a ter destaque no início dos anos 70, apresentando possibilidades de crescimento, principalmente como cultura comercial.

Em alguns países como Holanda, Alemanha, França, Estados Unidos, Japão, Israel, além da Itália, Bélgica e Inglaterra a floricultura está bem desenvolvida destacando-se pelas exposições e feiras realizadas (Criscuolo, 1978 e Miranda e Criscuolo, 1980). A indústria de floricultura tem uma contribuição significativa na agricultura de Israel, oferecendo uma opção para o pequeno agricultor que busca aumentar seus lucros com a agricultura intensiva porque se vê limitado por possuir pouca terra, recursos financeiros escassos e também pela escassez de mão-de-obra. As exportações de flores para a Europa são favorecidas porque em Israel durante o inverno existem boas condições climáticas, constituindo uma vantagem econômica, pois, na Europa as condições climáticas são extremas, os dias nublados, intensidade luminosa escassa e temperaturas baixas dificultando a manutenção da produção em níveis altos para garantir uma comercialização mais expressiva (Seligman, 1983).

A floricultura apresenta-se como a forma mais adiantada da evolução agrícola, pois exige alta tecnologia, um sistema eficiente e rápido de distribuição e comercialização. Apresenta

alta rentabilidade por área, exige grande quantidade de mão-de-obra e portanto gera empregos. Apresenta-se, então, como uma opção de fixação de mão-de-obra no meio rural e de aproveitamento dos minifúndios, considerados impróprios para outras atividades agropecuárias (Saturnino, 1979).

O Brasil é um dos países que possui maior contingente de espécies nativas de plantas e flores ornamentais; a sua distribuição atinge a maioria dos estados, numa extensa gama de espécies e variedades de orquídeas, cactos, bromélias (Criscuolo, 1978). Por sua extensão geográfica tem uma amplitude muito grande de climas e solos tornando possível uma floricultura muito diversificada em função de sua série de microclimas.

De acordo com Saturnino (1979), inicialmente no Brasil a floricultura era bastante amadora e desenvolvia-se como uma atividade paralela a outros setores agrícolas, de comércio restrito, abrangia apenas as cidades mais desenvolvidas. A floricultura comercial começou a desenvolver-se nos arredores das grandes cidades e excepcionalmente no interior quando as condições de clima se apresentavam adequadas, e, aos poucos foi adquirindo caráter empresarial.

Em quase todos os estados brasileiros o cultivo de flores e plantas ornamentais vêm apresentando um sensível aumento. Há uma intensa comercialização de flores cortadas ou em vasos e principalmente de plantas ornamentais. Este fenômeno é registrado também em outros países, segundo cita Saturnino (1979).

Estima-se que a área plantada esteja em torno de 10.000 ha, apresentando um consumo de fertilizantes somente superado pelas culturas do alho, batata, milho, tomate, fumo e olerícolas (Haag, Minami e Lima, 1989).

Os principais centros de comercialização de plantas ornamentais são: São Paulo, Rio de Janeiro, Belo Horizonte, Brasília, Porto Alegre, Curitiba, Salvador, Recife, Vitória e Manaus (Castro e Minami, 1988).

A exportação de flores tem crescido a cada ano, o que melhora as perspectivas de retorno por parte dos produtores e amplia o processo de geração de divisas para o país (Santos, 1979).

Atualmente, a produção nacional está em torno de US\$ 200 milhões, sendo exportadas 5% desse valor para países da Europa, América do Norte, Àsia (CPA-SAA, 1991). Segundo fontes do Ministério de Relações Exteriores, a Suíça importa um montante superior a 2,5 milhões de dólares anuais de flores frescas. A França, Alemanha, a própria Holanda, importam somas fabulosas em flores. Segundo Saturnino (1979), as oportunidades de aumento das exportações brasileiras são amplas porque:

- 1- Os países que dispendem grandes somas de divisas com importações de flores o fazem porque seus hábitos de consumo não podem prescindir desse produto.
- 2- A produção interna é pequena ou o custo interno de produção é muito alto.
- 3- No período de inverno no Hemisfério Norte, na maioria dos países, há necessidade de aquecimento das casas de vegetação (estufas) para a produção de flores e um gasto muito grande de energia quando grande parte destes países precisam economizá-la. No Brasil, pode-se produzir flores sem consumo adicional de energia e na época de maior consumo dos países do Hemisfério Norte.
- 4- A mão-de-obra nesses países é muito cara em relação à brasileira. Contudo, ainda são escassas as informações referentes ao setor da floricultura geradas pelas pesquisas científicas, embora o

setor possibilite lucros rápidos, ocupação de áreas impróprias para outros cultivos, denotando uma alternativa para pequenos e médios agricultores.

A preservação dos recursos genéticos de plantas ornamentais no Brasil evidencia que praticamente não existem instituições oficiais voltadas para o setor. A conservação dos recursos genéticos existentes é feita “ex situ” e, geralmente, em precárias condições.

As diversas tecnologias desenvolvidas para a conservação do patrimônio genético, como conservação “in vitro”, criopreservação, armazenamento de sementes, não são utilizadas, para as plantas ornamentais, segundo Mathes (1990).

A cultura de tecidos tem sido utilizada como um meio rápido de propagação vegetativa na indústria de horticultura ornamental possibilitando a produção de propágulos livres de doenças que podem ser facilmente disseminadas (Chu, 1985).

A cultura de tecidos foi responsável pela transformação da cultura de orquídeas de um trabalho artesanal para industrial, ao permitir a multiplicação rápida de material uniforme, de qualidade superior e com período de floração mais amplo, o que facilita a comercialização.

Pierik (1991), cita que em 1988, na Europa Ocidental, 212,5 milhões de plantas foram micropropagadas, dentre as quais 92,2 milhões eram plantas de vaso e 37,8 milhões de flores de corte.

Com o aumento do consumo de flores de corte na Europa e exportação mundial de flores de corte via Holanda, em particular, há um aumento na demanda do mercado para produtos de cultura de tecidos. Uma recente análise de mercado estimou que na Europa houve 25% de aumento entre 1987 e 1993 no consumo de flores de corte que sustentará um aumento de produção em cultura de tecidos e vendas de produtos de floricultura em particular. Nos Estados

Unidos este aumento foi estimado em 50% para o mesmo período de tempo (van Doesburg, 1989 citado por Barnhill Jones e SLuis, 1991).

Na Tabela 1 pode-se observar, segundo Debergh e Zimmerman (1991), a quantidade total de plantas e a quantidade de plantas ornamentais produzidas em laboratórios de cultura de tecidos em diversas regiões.

TABELA 1. Quantidade de plantas ornamentais do total de plantas micropropagadas por ano em diversas regiões. ESAL, Lavras-M.G., 1994.

Regiões	Nº de Laboratórios	Milhares de plantas/ano	Milhares de ornamentais/ano
Europa Ocidental	248	212.500	150.400
Israel	5	4.900	3.900
Polônia	120	15.000	—
Alemanha	19	4.000	—
Hungria	22	60	—
Bulgária	—	—	250
América do Norte	—	150.000	572.000
Ásia	145	86.700	64.000
Austrália e Nova Zelândia	88	—	—
África	42	—	1.200
Brasil	22	—	—

OBS.: As lacunas vazias significam a inexistência de dados numéricos precisos. Todos os países entretanto, segundo os autores, apresentam participação expressiva de ornamentais no total de plantas micropropagadas.

A micropropagação de helicônia teve início em Laboratórios de Cingapura, Ásia. A quantidade é ainda pequena mas é esperado seu aumento. De acordo com Gavinlertvatana e Prutpongse (1991) a cultura, recentemente introduzida na região, está se tornando popular entre os agricultores, devido ao grande potencial para exportação.

Atualmente o custo do rizoma de *Heliconia* sp. no mercado de São Paulo é por volta de US\$ 2,30 (dois dólares e trinta centavos), sendo que a cultura de tecidos pode ser uma

alternativa para a propagação dessa espécie, fornecendo um material mais barato devido a produção uniforme e em grande escala, além deste apresentar um excelente aspecto fitossanitário.

1.2 ASPECTOS BOTÂNICOS DA HELICÔNIA

A helicônia é uma planta tropical da família Heliconiaceae (Keng, 1978 e Donselman e Broschat, 1986). A origem da helicônia é na América Central e do Sul, entretanto, ela é encontrada na Ásia e nas Índias Ocidentais. São denominadas popularmente por bananeira-de-jardim, bananeirinha-de-jardim, pacová, bananeira-do-brejo, bananeira-do-mato, bananeira-brava, caeté, pacavira, falsa ave-do-paraíso (Medina, 1959 e Correa, 1984).

As helicônias são plantas fibrosas e cultivadas como plantas ornamentais em todo o país e também são utilizadas na indústria de papel. Por serem fornecedoras de fibras grosseiras com espessuras variáveis, são empregadas na manufatura de capachos de porta e fins similares. As folhas prestam-se para cobertura de casas rústicas enquanto a raiz é diurética e adstringente de efeito suave e as sementes são consumidas pelos aborígenes como alimento (Medina, 1959 e Correa, 1984).

As helicônias preferem lugares levemente sombreados, são sensíveis a ventos e a geadas. Algumas espécies suportam solos levemente encharcados, porém a maioria, prefere solos úmidos a ligeiramente úmidos, profundos, ricos e porosos.

A helicônia é uma planta herbácea, perene, com folhas similares às plantas pertencentes a família Musaceae, pseudocaule de tamanho variável, rizoma bastante difuso, as inflorescências são terminais e formam longos escapos, podem ser eretas ou pendentes dependendo da espécie (Figura 1), inseridas por duas ou mais brácteas grandes dispostas



FIGURA 1. Diversas espécies de helicônia com inflorescências eretas (2, 4, 5 e 6) e pendentes (1 e 3) e porte arbustivo (4). ESAL, Lavras-M.G., 1994.

alternadamente ou opostas formando um eixo central (Broschat e Donselman, 1983a). As brácteas possuem coloridos vistosos, dentre eles: vermelhas, alaranjadas e amarelas.

O cultivo da helicônia geralmente é por propagação vegetativa, usando rizomas (Broschat e Donselman, 1983 b). Este tipo de propagação é mais rápida, as mudas são menores, de fácil manuseio por serem leves e suportam até uma semana fora da terra. A propagação via semente é muito demorada e o tempo para florescimento é de 3 a 4 anos.

Por serem plantas muito rústicas são resistentes a doenças, no entanto, a propagação vegetativa e o intercâmbio de germoplasma podem ser afetados pela bactéria *Pseudomonas solanacearum* Smith, Akiew et al., 1990 citados por Nathan, Goh e Kumar (1992).

A detecção desta mesma bactéria em plantas cultivadas através de rizomas importados do Havá, implica que se faça uma quarentena rigorosa, antes da qual não é permitida a importação, segundo Akiew, citado por Nathan, Goh e Kumar (1992). Assim sendo, fazem-se necessárias limpezas periódicas nas touceiras, removendo as folhas mortas ou velhas para evitar manutenção e disseminação de fitopatógenos.

O florescimento pode ocorrer o ano todo em condições ideais de cultivo. Podem ser plantadas em qualquer época do ano no Brasil, entretanto, há preferência para o plantio no final do inverno ou no início da primavera. Na Europa e América do Norte as helicônias são cultivadas em estufas, que propiciam a condição necessária de calor e umidade para a produção florífera.

A maioria das espécies de helicônia florescem durante estações chuvosas (Stiles, 1978 e 1979). Algumas espécies caracteristicamente produzem inflorescências durante outras estações mas a maioria apresenta períodos sincrônicos de florescimento (Stiles, 1978 e Kress, 1981).

Segundo Geertsen (1990) a maioria das inflorescências são estacionais e produzem poucas flores. Vale ressaltar que as flores são geralmente brancas e não têm destaque ornamental porque são encobertas pelas próprias brácteas.

A época de colheita depende do estágio da inflorescência. Em algumas espécies faz-se a colheita no início da abertura das duas brácteas inferiores, em outras a colheita ocorre somente quando as brácteas atingem total expansão. Vale ressaltar que as inflorescências devem ser cortadas ao nível do solo para maior indução na formação de novas inflorescências.

Para a comercialização há uma preferência para as espécies que possuem inflorescências menores, leves e no mesmo plano, estas possuem grande durabilidade, mesmo quando cortadas e conservadas em água, principalmente como utilização ornamental.

Existem 150 espécies vegetais pertencentes ao gênero *Heliconia*, sendo 30 delas nativas no Brasil. Por serem muito abundantes não são muito cultivadas podendo ser colhidas nas matas úmidas. Nas matas da Colômbia destacam-se as espécies com folhas longipecioladas e limbo amplo que compartilham seu habitat com plantas de pequeno porte, o que favorece um alto nível de depredação com fins ornamentais devido às inflorescências vistosas (Fraume, Alvarez e Gallego, 1990).

No Brasil, recentemente, foram introduzidas 60 espécies provenientes da Venezuela com o objetivo de diversificar as espécies já existentes no Instituto Agrônomo de Campinas (Castro e Tavares, 1991).

Espécies de helicônia com interesse comercial e com fortes períodos sazonais de florescimento são relatadas por Criley e Lekawatana (1992): *H. angusta*, *H. bihai*, *H. caribaea*, *H. collinsiana*, *H. farinosa*, *H. lingulata*, *H. rostrata*, *H. sampaioana*, *H. stricta*, *H. subulata*, *H. wagneriana*.

A taxonomia do gênero *Heliconia* ainda tem provocado divergências devido a homogeneidade de algumas características morfológicas das espécies de helicônias existentes.

1.3 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo principal determinar uma metodologia básica de micropropagação de *Heliconia* sp., desde o estabelecimento até a aclimação, visando a propagação clonal em larga escala.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARNHILL JONES, J.; SLUIS, C.J. Marketing of micropropagated plants. In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H. **Micropropagation: technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1991. p.141-154.
- BROSCHAT, T.K.; DONSELMAN, H.M. Heliconias: a promising new cut flower crop. **HortScience**, Mont Vernon, v.18, p.2, 1983 a.
- BROSCHAT, T.K.; DONSELMAN, H.M. Production and postharvest culture of *Heliconia psittacorum* flowers in South Florida. **State Horticultural Society, USA**, v.96, p.272-273, 1983 b.
- CASTRO, C.E.F.; MINAMI, K. Floricultura no Brasil: situação atual e perspectiva. **Revista ADELQ**, Piracicaba, n.9, p.30-33, 1988.
- CASTRO, C.E.F.; TAVARES, A.R. Introdução de desenvolvimento de *Heliconia* spp. no IAC. Campinas, CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 8, Joinville, Santa Catarina, 1991. **Anais...** Joinville: Fundação Cargill, 1991. p.13.
- CHU, I.Y.E. The application of tissue culture to plant improvement and propagation in the ornamental horticulture industry. In: ZIMMERMAN, R.H.; GRIESBACH, R.J.; HAMMERSCHLAG, F.A; LAWSON, R.H. **Tissue culture as a plant production system for horticultural crops**. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 1985. p.15-135.

- COORDENADORIA DA PESQUISA AGROPECUÁRIA E SECRETARIA DA AGRICULTURA E ABASTECIMENTO (CPA-SAA). Programa: flores e plantas ornamentais. v.9, n.2, maio/agosto, p.88-90, 1991.
- CORREA, P.M. **Dicionário das plantas úteis e exóticas do Brasil**. Rio de Janeiro: Ministério / Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal / Imprensa Nacional, 1984. v.1, p.253-256.
- CRILEY, R.A.; LEKAWATANA, S. Determination of seasonal flowering patterns for *Heliconia* in Hawaii through grower sales records. **HortScience**, Mont Vernon, v.27, n.6, p.576, 1992.
- CRISCUOLO, P.D. **Floricultura na economia agrícola do estado de São Paulo**; Parte I. São Paulo: Instituto de Economia Agrícola/Secretaria da Agricultura, 1978. n.7, 27 p.
- DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H. **Micropropagation: technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher, 1991. 484 p.
- DONSELMAN, H.; BROCHAT, T.K. Production of *Heliconia psittacorum* for cut flowers in South Florida. Fort Landerdale Res. Educ. Ctr. Ornamental Ornamentals Res. Rpt., EUA, p.86-91, 1986.
- FRAUME, M.R.; ALVAREZ, M.L.M.; GALLEGO, A.J.H. Monteleon relicto de selva andina tropical de Manizales, Colombia. **Agronomia**, Caldas, v.4, n.1, p.24-36, set. 1990.
- GAVINLERTVATANA, P.; PRUTPONGSE, P. Commercial micropropagation in Asia. In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H. **Micropropagation: technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1991. p.181-189.
- GEERTSEN, V. Effect of photoperiod and temperature on the growth and flower production of *Heliconia psittacorum* "Tay". **Acta horticultural**, v.252, p.117-122, 1989. In: HORTICULTURAL ABSTRACTS, Wallingford, v.60, n.8, p.731, Aug. 1990. (Abstr. 8326).
- HAAG, H.P.; MINAMI, K.; LIMA, A.M.L.P. **Nutrição mineral de algumas espécies ornamentais**. Campinas: Fundação Cargill, 1989.309 p.
- KENG, H. **Orders and families of Malayan seed plants**. Singapore: Singapore University Press, 1978. 97 p.
- KRESS, W.J. **Reproductive biology and systematics of Central America Heliconia (Heliconiaceae)**. Durham: EUA, 1981. (Tese).
- MATHES, L.A.F. Situação do banco de germoplasma de plantas ornamentais no Brasil. In: SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO SOBRE RECURSOS GENÉTICOS DE ESPÉCIES HORTÍCOLAS, 1, Campinas, 1990. **Anais...** Campinas: Fundação Cargill, 1990. p.27-31.

- MEDINA, J.C. **Plantas fibrosas da flora mundial**. Campinas: Instituto Agronômico de Campinas, 1959. p.356-359.
- MIRANDA, L.C.; CRISCUOLO, P.D. Contribuição ao estudo econômico da floricultura no estado de São Paulo: In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 1, **Anais...** Campinas: Fundação Cargill, 1980. p.146-147.
- NATHAN, M.J.; GOH, C.J.; KUMAR, P.P. In vitro propagation of *Heliconia psittacorum* by bud culture. **HortScience**, Mont Vernon, v.27, n.5, p.450-452, may 1992.
- PIERIK, R.L.M. Commercial micropropagation in Western Europe and Israel. In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H. **Micropropagation: technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1991. p.155-165.
- SANTOS, H.L. dos. Floricultura em Minas Gerais. In: ENCONTRO DE PESQUISADORES EM FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 1, Viçosa, 1979. **Primeiro...**Viçosa: UFV,1979. p.1-10.
- ↳ SATURNINO, H.M. A floricultura no Brasil. In: ENCONTRO DE PESQUISADORES EM FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 1, Viçosa, 1979. **Primeiro...**Viçosa: UFV,1979. p.11-18.
- SELIGMAN, R. La floricultura en Israel: exportacion multicolor. In: **Cultivo y reverdecimento**. Jerusalém, Israel, 1983. n.2, p.29-33.
- STILES, F.G. Ecology, flowering phenology, and hummingbird food plants of a tropical wet forest. **Biotropica**, USA, v.10, p.194-210, 1978.
- STILES, F.G. Notes on the natural history of *Heliconia* (Musaceae) in Costa Rica. **Brenesia**, v.15, p.151-180, 1979.(supl.).

2 ESTABELECIMENTO, MULTIPLICAÇÃO, ALONGAMENTO E INDUÇÃO DE ENRAIZAMENTO "IN VITRO" DE *Heliconia* sp.

RESUMO

Rizomas de *Heliconia* sp. foram imersos em solução de Benomyl, 5 g/L do produto comercial (500 g de Benomyl/Kg), durante 24 horas e armazenados em sacos de polietileno. Após 14 dias as gemas foram retiradas, desinfestadas, e inoculadas em meio MS (Murashige e Skoog, 1962), acrescido de (mg/L): BAP (2,0), AIA (0,5), sulfato de adenina (80). Explantes secundários foram transferidos do meio de estabelecimento para o meio de multiplicação.

Com o objetivo de se observar o efeito de BAP e TDZ para a formação de brotos em *Heliconia* sp. foram realizados três experimentos utilizando explantes secundários com 10 a 15 mm de comprimento em meio MS. O primeiro experimento foi constituído dos seguintes tratamentos: meio suplementado com BAP (0,0; 2,5; 5,0 e 10,0 mg/L) e meio suplementado com TDZ (0,025; 0,250; 0,500 e 1,000 mg/L). Constatou-se um maior número de brotos com o nível de 2,5 mg/L de BAP. Para TDZ o maior número de brotos foi observado com o nível de 0,25 mg/L. No segundo experimento os explantes secundários foram inicialmente cultivados em meio MS suplementado com 0,25 mg/L de TDZ. Após 2, 4, 8, 16 e 32 dias os explantes foram transferidos para meio MS sem regulador de crescimento. Após 60 dias verificou-se um máximo de produção de brotos com 8 dias de exposição ao TDZ. No terceiro experimento os explantes

secundários foram imersos em solução 0,25 mg/L de TDZ por 5, 10, 20, 40 e 80 minutos e então cultivados em meio MS. Observou-se um maior número e tamanho de brotos com 80 minutos de imersão.

Originados a partir do meio de multiplicação, tufos de brotos foram cultivados inteiros, divididos pela metade, em 1/4 e individualmente em meio MS, com o intuito de se determinar a prática que causaria o maior crescimento dos brotos. Todos mostraram um crescimento similar, demonstrando a ausência de necessidade de repicagem para o alongamento dos brotos em *Heliconia* sp.

Com o objetivo de se otimizar a formação de raízes, explantes secundários de 3 tamanhos distintos foram transferidos de meio suplementado com BAP e meio suplementado com TDZ e cultivados em meio MS, com metade da concentração de sais, no qual foi acrescentado vários níveis de AIB (0,0; 0,5; 1,0; 1,5 mg/L). Para plântulas oriundas de meio com BAP obteve-se um maior número de raízes com 1,0 e 1,5 mg/L de AIB. Para explantes secundários oriundos de meio com TDZ obteve-se um maior número de raízes com 0,5 mg/L de AIB. O crescimento de raízes foi inversamente proporcional ao aumento da concentração de AIB para todos os tamanhos de explantes originários de BAP e TDZ.

2.1 REFERENCIAL TEÓRICO

-Tratamento de rizomas de *Heliconia*, obtenção e inoculação de gemas “in vitro”

Para a propagação assexuada de *Heliconia* spp., tanto pelos métodos comerciais tradicionais, como pela cultura de tecidos vegetais, deve-se fazer coletas de rizomas no campo, os quais originarão gemas vegetativas.

Um método prático foi desenvolvido para a obtenção de gemas de *Heliconia psittacorum* L.f. por Nathan, Goh e Kumar (1992). Segundo os autores, rizomas devem ser armazenados em sacos de polietileno durante 7 dias para a indução de gemas, quando então se obtém um número máximo de brotos por cultura. Estes não observaram quaisquer infecções com fungos ou bactérias durante o armazenamento dos rizomas.

De acordo com Kunneman e Albers, citados por Hol e van der Linde (1992), altas taxas de contaminação são observadas em materiais oriundos do solo, tais como bulbos, rizomas e estolões. A contaminação pode ser causada por bactérias (Cassells, 1987), fungos (Seabrook, 1990), outros microrganismos (Leggatt e Waites, 1987), ácaros e tripses (Blake, 1987). Se a esterilização superficial inicial é ineficiente, fungos, leveduras e bactérias podem ser introduzidos em culturas "in vitro" com o explante, principalmente aqueles explantes que são retirados do solo ou próximo deste. Plantas desenvolvidas no campo, em climas tropicais, ou aquelas plantas irrigadas por aspersão são muito difíceis de esterelizar (De Fossard, citado por Leifert, Ritchie e Waites, 1991).

A maioria dos laboratórios usam hipoclorito de cálcio ou de sódio ou várias águas sanitárias comerciais como rotina para esterilização superficial, ou seja, desinfestação do explante. Nathan, Goh e Kumar (1992) utilizaram solução de NaClO, 0,8%, durante 15 minutos, com agitação contínua, para esterilização inicial de gemas axilares de *H. psittacorum*. Após enxagüe com água destilada e esterilizada os tecidos externos foram cortados e novamente imersos em solução de NaClO, 0,4%, por 10 minutos.

Segundo relata Lameira (1993), para se obter maior capacidade de esterilização do hipoclorito de sódio deve-se baixar o pH de 11 a 12, normal entre os produtos comerciais, para 5,0 a 6,5. Quando o pH é alto, ou quando ClO^- é aumentado e HClO é reduzido, a capacidade de

esterilização torna-se reduzida. Por exemplo, se o nível do pH é 10, é necessário usar 150 vezes mais cloro do que se o pH fosse 5, para se obter o mesmo efeito na esterilização. Quando o nível do pH é menor que 6,5 a eficiência do cloro pode chegar até 100%.

NaClO é um poderoso agente oxidante, e quimicamente é ligado com lipídios, proteínas, amidos em muitos tipos de organismos, portanto o efeito de esterilização pode também ser minimizado dependendo do grau de contaminação.

Embora condições assépticas estão normalmente implícitas muitas plantas não estão assépticas “in vitro”. Contaminação com microrganismos é considerada ser a mais importante razão para perdas durante a cultura de plantas “in vitro” (Cassells, 1986; Boxus e Terzi, 1987 e Leifert e Waites, 1990).

A contaminação com bactérias é considerada a mais séria e tem sido descrita extensivamente na literatura (Knauss e Miller; Horsch e King; Trick e Lings e Leifert et al., citados por Leifert, Ritchie e Waites, 1991).

Depois de identificar 293 bactérias provenientes de dois laboratórios comerciais de micropropagação Leifert, Ritchie e Waites (1991) encontraram, dentre estas, 13% de *Bacillus*. Segundo os mesmos autores, *Bacillus subtilis* é uma espécie de bactéria gram-positiva e já foi isolada como contaminante em cultura de tecidos e células nos seguintes gêneros de plantas: *Astilbe*, *Cotinus*, *Delphinium*, *Hemerocallis*, *Malus*, *Thalictrum*, *Viola*.

As bactérias do gênero *Bacillus* formam endósporos resistentes ao álcool e calor segundo Claus, Berkeley e Sneath, citados por Leifert, Ritchie e Waites (1991). São também resistentes a flambagem de instrumentos. *Bacillus macerans* somente foi eliminada com chama produzida por bico de Bunsen, depois de 12 segundos (Singha, Bissonnette e Double, 1987). *Bacillus* spp. podem inclusive ser disseminada pelo álcool usado para esterilizar instrumentos

(Boxus e Terzi, 1987). As espécies resistentes ao calor sobrevivem a autoclavagem do meio (20 minutos a 110°C).

Bacillus spp. são sensíveis à vários antibióticos e podem, por isso, serem suprimidas por incorporação de antibióticos no meio (Leifert, Ritchie e Waites, 1991). Entretanto devido a habilidade de formar esporos dormentes, os quais os antibióticos não afetam, é improvável que *Bacillus* possa ser totalmente eliminada das culturas por antibióticos.

Segundo o trabalho realizado por Kneifel e Leonhardt (1992) diferentes bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, dentre essas *Bacillus* spp., foram isoladas. Usando 28 diferentes tipos de antibióticos e 7 misturas foram selecionadas duas misturas: Imipenem/Ampicilina e Imipenem/Penicilina G, com concentração de 5 mg/L cada, as quais foram mais efetivas para inibição do crescimento das bactérias em cultura de tecidos vegetais.

- Multiplicação de *Heliconia* sp. “in vitro” através do uso de TDZ e BAP

Thidiazuron (TDZ) foi desenvolvido originalmente por Schering AG (Berlim, Alemanha) para ser utilizado como desfolhante de *Gossypium hirsutum* L. (algodão) (Arndt, Rusch e Stalfried, 1976). TDZ foi relatado por possuir atividades de citocinina pela primeira vez em 1982. Desde então tem sido utilizado com sucesso para indução de brotos axilares e adventícios “in vitro” (Chin-Yi Lu, 1993).

TDZ é derivado de uréia e não contém o anel purina comum a citocininas tipo adenina tal como benzilaminopurina, cinetina ou zeatina. Segundo Mok, Mok e Shudo (1982), thidiazuron pode ser a mais potente das difenil uréias que já foram avaliadas para uso em cultura de tecidos vegetais.

O mecanismo pelo qual TDZ induz respostas como as outras citocininas não é completamente entendido. De acordo com Thomas e Katterman (1986), TDZ estimula a síntese de citocininas purinas endógenas, ou inibe a degradação destas.

As concentrações de TDZ utilizadas para micropropagação são geralmente mais baixas que outras citocininas, de 0,0022 a 0,0088 mg/L, apesar de algumas espécies requererem níveis mais elevados como 0,022 a 2,2 mg/L (van Nieuwkerk, Zimmerman e Fordham, 1986). TDZ é mais estável no meio de cultura durante um período maior de tempo por não ser degradado por oxidases (Mok, Mok e Turner, 1987).

TDZ é biologicamente mais ativo que BAP apesar de estar associado a efeitos como hiperhidricidade, morfologia anormal de folhas, formação de calos e de brotos curtos e compactos (Chin-Yi Lu, 1993).

Nathan, Goh e Kumar (1992) testaram o efeito da concentração de benzilaminopurina (BAP) na indução de multiplicação de brotos em *Heliconia psittacorum*. O maior número de brotos por explante e maior comprimento de brotos foram obtidos mantendo-se as brotações em meio MS, acrescido de 2,5 mg/L de BAP. Também para a proliferação de brotos em banana (*Musa spp.*), BAP tem sido utilizado na concentração de 2,5 a 5,0 mg/L. Vale ressaltar que os gêneros *Heliconia* e *Musa* pertenciam a mesma família (Musaceae) e de acordo com Donselman e Broschat (1986) as helicônias estão incluídas na família Heliconiaceae.

O efeito de BAP e TDZ foi avaliado para regeneração de brotos a partir de receptáculo de rosa. TDZ foi a mais efetiva citocinina produzindo 2,3 brotos, em média, por explante, sendo que nenhum broto foi produzido com BAP (Chin-Yi Lu, 1993). Também relatado por Chin-Yi Lu (1993) TDZ foi mais efetivo para formação de brotos oriundos de pétalas de cravo, produzindo 17,0 brotos em média enquanto BAP produziu 4,77 e cinetina 0,33.

Em alguns casos, entretanto, TDZ não superou BAP. Por exemplo, em *Prunus* sp. TDZ produziu calos, excessivamente, e ocorreu proliferação mínima de brotos, enquanto que BAP produziu um maior número de brotos (Zimmerman e Scorza, 1992).

Em uma comparação de BAP e TDZ para formação de brotos adventícios em *Picea glauca* (Moench) Voss, realizada por Ellis et al. (1991), o máximo de indução de brotos a partir de embriões, ocorreu com 0,225 mg/L BAP e 0,0022 mg/L de TDZ. O trabalho também mostra que mais altas concentrações de BAP inibiram a indução de brotos, mas que 22,53 mg/L de BAP ou zeatina quando combinadas com 0,022 ou 0,0022 mg/L de TDZ causaram alongamento de brotos adventícios. Citocininas comumente estimulam proliferação de brotos e inibem o seu alongamento. Entretanto inibição de alongamento de brotos por TDZ é mais consistente devido sua alta atividade de citocinina (Huetteman e Preece, 1993).

Enraizamentos podem ser dificultados ou inibidos pelo efeito das citocininas em meio de proliferação de brotos. Brotos de “muscadine grape”, (*Vitis rotundifolia* Michx.), em 0,11 mg/L de TDZ enraizaram 8% comparando com 34% de enraizamento em 1,13 mg/L de BAP (Gray e Benton, 1991). A redução de capacidade de enraizamento pode ser atribuída a alta atividade de citocinina e persistência do thidiazuron quando comparado com citocininas aminopurinas.

- Alongamento de tufos de brotos de *Heliconia* sp. em meio MS

Para a maioria das plantas o período de alongamento, combinado com enraizamento ou não, é obtido pela transferência da cultura do meio de propagação para um apropriado meio de alongamento. Brotos podem ser transplantados isoladamente para um meio desprovido de citocinina, entretanto, sob o ponto de vista econômico, segundo Debergh e Maene

(1981), é aconselhável transplantar um agrupamento de brotos para um meio que permita um bom alongamento de todos eles. Pode-se também adicionar um meio líquido de alongamento sobre o meio no qual as plântulas já estão estabelecidas, em vez de transplantá-las para um novo meio (Maene e Debergh, 1985).

Ultimamente a competição entre laboratórios de micropropagação é tão grande que a eficiência é a chave para a sobrevivência econômica. A produção de mudas em um menor tempo com menor custo é o principal objetivo. O maior custo em propagação de plantas por cultura de tecidos é o trabalho manual e este é pronunciado especialmente nos estádios de alongamento e enraizamento quando brotos individuais são manipulados. Por esta razão Maene e Debergh (1985) recomendam manter as culturas em forma de agrupamento de brotos tanto tempo quanto for possível, economizando assim trabalhos manuais, meio de cultura, tubos ou frascos, além de espaço físico em salas de crescimento.

- Utilização de AIB para promoção de enraizamento em *Heliconia* sp.

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 dados resultados positivos em diferentes espécies. Também é requerido um balanço hormonal, isto é, diminuir as citocininas e aumentar as auxinas exógenas. Em algumas espécies a simples eliminação das citocininas exógenas tem sido um suficiente estímulo para a diferenciação do sistema radicular (Thorpe, 1980).

Segundo Went e Thimann (1937) há duas fases de formação de raízes adventícias: iniciação radicular, quando a exposição à auxina é essencial, e, emergência e desenvolvimento radicular, quando a auxina não é requerida ou é até mesmo inibitória. De acordo com Drew,

(1991), por causa da dificuldade e custo de transferência dos brotos para meio sem auxina, em cultura de tecidos comercial os brotos são usualmente deixados em meio contendo auxina por 3 a 4 semanas, com conseqüente prejuízo para morfologia e alongamento de raízes.

De acordo com Németh (1986) a habilidade dos tecidos das plantas formarem raízes adventícias depende de interações de diferentes fatores endógenos e exógenos. Jarvis (1986) cita que folhas jovens e brotos ativos são fontes de auxina e intensificam o enraizamento em algumas estacas. Este efeito estimulatório natural pode ser completamente ou parcialmente substituído por auxinas exógenas.

O tratamento de espécies de difícil enraizamento através da aplicação de auxinas apresenta vantagens como o aumento da porcentagem de enraizamento, antecipação da indução radicular e aumento do número, qualidade e uniformidade de raízes.

As diferenças genéticas da capacidade de enraizamento, segundo Haissig (1986), podem estar relacionadas com a atividade de enzimas específicas. Plantas não lenhosas são usualmente altamente sensíveis à suplementação de auxina.

O ácido indol acético (AIA) é a auxina natural mais encontrada nas plantas, tanto na forma livre como conjugada. A partir de sua descoberta, testes com os análogos tais como o ácido indolbutírico (AIB) e ácido naftalenacético (ANA) comprovaram o grande efeito na promoção do enraizamento, sendo denominadas auxinas sintéticas. Mais tarde compostos como o 2,4-D e 2,4,5-T também foram incluídos neste grupo.

AIA é mais facilmente degradado pela luz, além da própria planta possuir mecanismos metabólicos para reduzir ou anular os seus efeitos através de conjugação e destruição (Leopold e Kriedemann, 1975).

O ácido indolbutírico (AIB) é citado com frequência em trabalhos de micropropagação devido principalmente à sua estabilidade, maior espectro de ação em diferentes espécies e menor fitotoxidez em plantas (Proebsting, 1984).

A auxina AIB (2,032 mg/L) em experimento realizado com *Carica papaya* L. “in vitro” por Drew, McComb e Considine (1993), foi a mais eficiente entre AIB, ANA e PCPA, para aumentar a porcentagem de enraizamento e número de raízes por broto. Riboflavina (10 μ M) foi acrescentada no meio causando 90% de foto-oxidação do AIB no período de 12 horas, após 2 dias no escuro.

2.2 OBJETIVO

A realização destes trabalhos teve por objetivo o estabelecimento da *Heliconia* sp. “in vitro”, determinar o melhor regulador de crescimento e melhor nível deste regulador para a multiplicação da espécie, obter o alongamento dos tufos de brotos além de definir o melhor nível de AIB para a formação do sistema radicular da *Heliconia* sp. e tamanho adequado de explante secundário para enraizamento.

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização dos seguintes experimentos foi utilizado o meio MS (Murashige e Skoog, 1962), com 6,5 g/L de ágar e pH 5,8 antes de autoclavagem. O meio foi distribuído em tubos de ensaio 25 x 150 mm, aproximadamente 15 ml por tubo, vedados com tampa plástica e autoclavado a 120°C por 20 minutos.

Após a inoculação os explantes foram mantidos em sala de crescimento com a temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e 2000 lux de luminosidade.

- Tratamentos de rizomas de *Heliconia*, obtenção e inoculação de gemas “in vitro”

Rizomas de *Heliconia* sp. foram coletados no viveiro do Departamento de Agricultura da ESAL. Estes foram lavados em água corrente com o auxílio de bucha e detergente. Bases das folhas e raízes foram retiradas. Os rizomas, (80 unidades), foram divididos em fragmentos de 100 mm cada e 40 deles foram imersos em solução de Benomyl, 5 g/L do produto comercial (500g de Benomyl/Kg), durante 24 horas. Após este tratamento os rizomas foram secos com papel absorvente e inseridos, individualmente, em sacos de polietileno. Os outros 40 rizomas não sofreram tratamento com Benomyl mas foram também armazenados em sacos de polietileno.

Após armazenamento de 14 dias, no escuro, foram retiradas as gemas, de 5 a 10 mm, para inoculação “in vitro”. Com um estilete foram cortadas a película de tecido exterior e tecido escurecido da base da gema. As gemas foram imersas em solução de 200 mg de ácido cítrico/L, durante a operação. Posteriormente foram mergulhadas em etanol 95% por 2 minutos e hipoclorito de sódio (0,8%), pH 6, por 15 minutos em agitação contínua.

Em câmara de fluxo laminar as gemas foram enxaguadas por três vezes, em água destilada e autoclavada. Com o auxílio de uma lupa retiraram-se os tecidos oxidados de cada gema, reduzindo-as ao tamanho de 2 a 3 mm.

O meio de cultura MS foi acrescido de (mg/L): BAP (2,0), AIA (0,5), e sulfato de adenina (80), meio inicial utilizado para o cultivo de *Gerbera jamesonii* (Sato, 1994). O meio foi então autoclavado em Erlenmeyer, tampado com papel alumínio. Retirado do autoclave, ainda quente e em fase líquida, o meio foi levado para a câmara de fluxo laminar e suplementado com

200 mg/L do antibiótico Claforan (cefotaxima sódica). Após a diluição do antibiótico o meio foi distribuído em tubos de ensaio, as gemas foram então inoculadas (uma por tubo), e permaneceram no escuro durante 48 horas. Finalmente foram transferidas para a sala de crescimento.

- Multiplicação de *Heliconia* sp. “in vitro” através do uso de TDZ e BAP

Explantos secundários (plântulas repicadas, utilizadas para originar os brotos), medindo de 10 a 15 mm, foram utilizados para os seguintes experimentos de multiplicação, nos quais o modelo estatístico adotado foi o Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) com 5 repetições por tratamento e 4 tubos por repetição.

1º experimento: Explantes secundários foram cultivados em meio MS suplementado com BAP (0,0; 2,5; 5,0 e 10,0 mg/L) e meio suplementado com TDZ (0,025; 0,250; 0,500 e 1,000 mg/L). Foram realizadas avaliações de 10 em 10 dias, até 40 dias. Foram avaliadas as seguintes características por tratamento: número e tamanho de brotações, porcentagem de enraizamento, número de raízes e formação de calos.

2º experimento: Explantes secundários foram cultivados em meio MS suplementado com 0,25 mg/L de TDZ, dosagem ótima para formação de brotos no experimento anterior. Variou-se dias de manutenção em meio suplementado com TDZ: 2, 4, 8, 16 e 32 dias. Após cada período 20 explantes foram transferidos para meio MS sem regulador de crescimento. A partir de 32 dias, de 7 em 7 dias até 60 dias (39, 46, 53, 60 dias), foram avaliados o desenvolvimento do explante secundário, o número e tamanho de brotos e número de raízes em cada tratamento.

3º experimento: Explantes secundários foram imersos em solução de 0,25 mg/L de TDZ em água bidestilada (previamente autoclavada) em câmara de fluxo laminar. A solução foi

colocada em placas de petri, onde os explantes, permaneceram por 5, 10, 20, 40 e 80 minutos imersos. Após este tratamento os explantes secundários foram transferidos para os tubos de ensaio com meio MS sem regulador de crescimento. Após 40 dias os explantes foram avaliados quanto ao crescimento, formação e tamanho de brotos e formação de raízes.

- Alongamento de tufo de brotos de *Heliconia* sp. em meio MS

Alguns tufo de brotos, com aproximadamente 20 mm de comprimento, formados após exposição do explante secundário em meio MS com níveis de 5,0 e 10 mg/L de BAP, 0,5 e 1,0 mg/L de TDZ por 40 dias, e então transferidos para meio MS com 2,5 mg/L de BAP por aproximadamente 90 dias foram utilizados para a realização deste experimento.

Na câmara de fluxo laminar, com o auxílio de placas de petri e estilete, os tufo de brotos receberam 4 tratamentos : foram divididos ao meio, divididos em quatro partes, separados individualmente e mantidos inteiros. Os tufo de brotos foram então cultivados em meio MS, isento de regulador de crescimento e mantidos em sala de crescimento. Após 60 dias foi avaliado o comprimento dos brotos.

- Utilização de AIB para promoção de enraizamento em *Heliconia* sp.

Explantes secundários com tamanhos distintos denominados explante 1 (com 10 a 15 mm), explante 2 (com 15 a 20 mm) e explante 3 (com 25 a 40 mm) foram retirados de meio suplementado com TDZ. De meio suplementado com BAP também foram retirados explantes secundários de tamanhos distintos e determinados explante 1 (com 15 a 20 mm), explante 2 (com 30 a 35 mm) e explante 3 (com 45 a 50 mm). Estes explantes retirados do meio de multiplicação foram então cultivados em meio MS, com metade da concentração de sais, para enraizamento. O

meio de cultura foi suplementado com ácido indolbutírico (AIB) em quatro diferentes níveis (mg/L): 0,0; 0,5; 1,0; 1,5.

O experimento foi montado segundo Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC), constituindo-se 24 tratamentos com 3 repetições por tratamento.

Após 40 dias as características número e comprimento de raízes foram avaliadas.

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.4.1 Tratamento de rizomas de *Heliconia*, obtenção e inoculação de gemas “in vitro”

A imersão em solução de Benomyl, tornou viável o armazenamento de rizomas em sacos de polietileno com ausência total de contaminação fúngica. Sem o prévio tratamento 30% dos rizomas apresentavam-se cobertos por massa fúngica cinzenta, com apenas dois dias de armazenamento. Com 8 dias de armazenamento 100% dos rizomas não tratados se mostraram contaminados (Tabela 2). Essa rápida proliferação fúngica se deve porque o acondicionamento em sacos plásticos aumenta o calor e umidade facilitando o desenvolvimento dos fungos sobre os rizomas, inviabilizando-os para a produção de gemas.

Após cerca de 14 dias obteve-se 80% de rizomas tratados com gemas. Alguns apresentaram gemas antes deste período e outros só as desenvolveram aos 20 dias de armazenamento. Nathan, Goh e Kumar (1992), obtiveram brotos com armazenamento dos rizomas por 7 dias, sem contaminação fúngica apesar de não terem utilizado nenhum tratamento químico. Isto pode ter ocorrido devido às diferentes condições ambientais nas quais os rizomas foram coletados, além da diferença entre as espécies utilizadas nos dois experimentos. Rizomas,

TABELA 2. Contaminação fúngica e formação de gemas em rizomas de *Heliconia* sp. tratados e não tratados com fungicida e armazenados em sacos de polietileno por 14 dias. ESAL, Lavras-M.G., 1994.

Período de armazenamento (dias)	Tratamentos			
	Sem Benomyl		Com Benomyl	
	Contaminação %	Formação gemas (%)	Contaminação %	Formação gemas (%)
2	30	0	0	0
4	55	0	0	0
6	73	0	0	0
8	100	0	0	32
10	100	0	0	45
12	100	0	0	66
14	100	0	0	80

com aproximadamente 100 mm de comprimento, produziram normalmente 1 gema, mais raramente 2, e um deles chegou a produzir 4 gemas (Figura 2). Prolongando o armazenamento os rizomas mostraram sinais de senescência, tornando-se murchos e escuros. O mesmo relata Nathan, Goh e Kumar (1992) que notaram o dessecamento de rizomas de *Heliconia psittacorum* com armazenamento excessivo.

Para o estabelecimento de *Heliconia* sp. "in vitro", foi necessária a utilização de antibiótico, Claforan, no meio de cultura. Resultados preliminares mostraram 100% de contaminação bacteriana (Tabela 3) e nenhum desenvolvimento do explante primário. A contaminação "in vitro" com bactérias é considerada a mais séria. Kunneman e Albers, citados por Hol e van der Linde (1992) confirmam que as taxas de contaminação culminam com materiais que são oriundos do solo como rizomas. Alguns outros antibióticos como Penicilina, Agrimicina, dentre outros, foram utilizados em nossos experimentos, sem sucesso. Segundo Leifert, Ritchie e

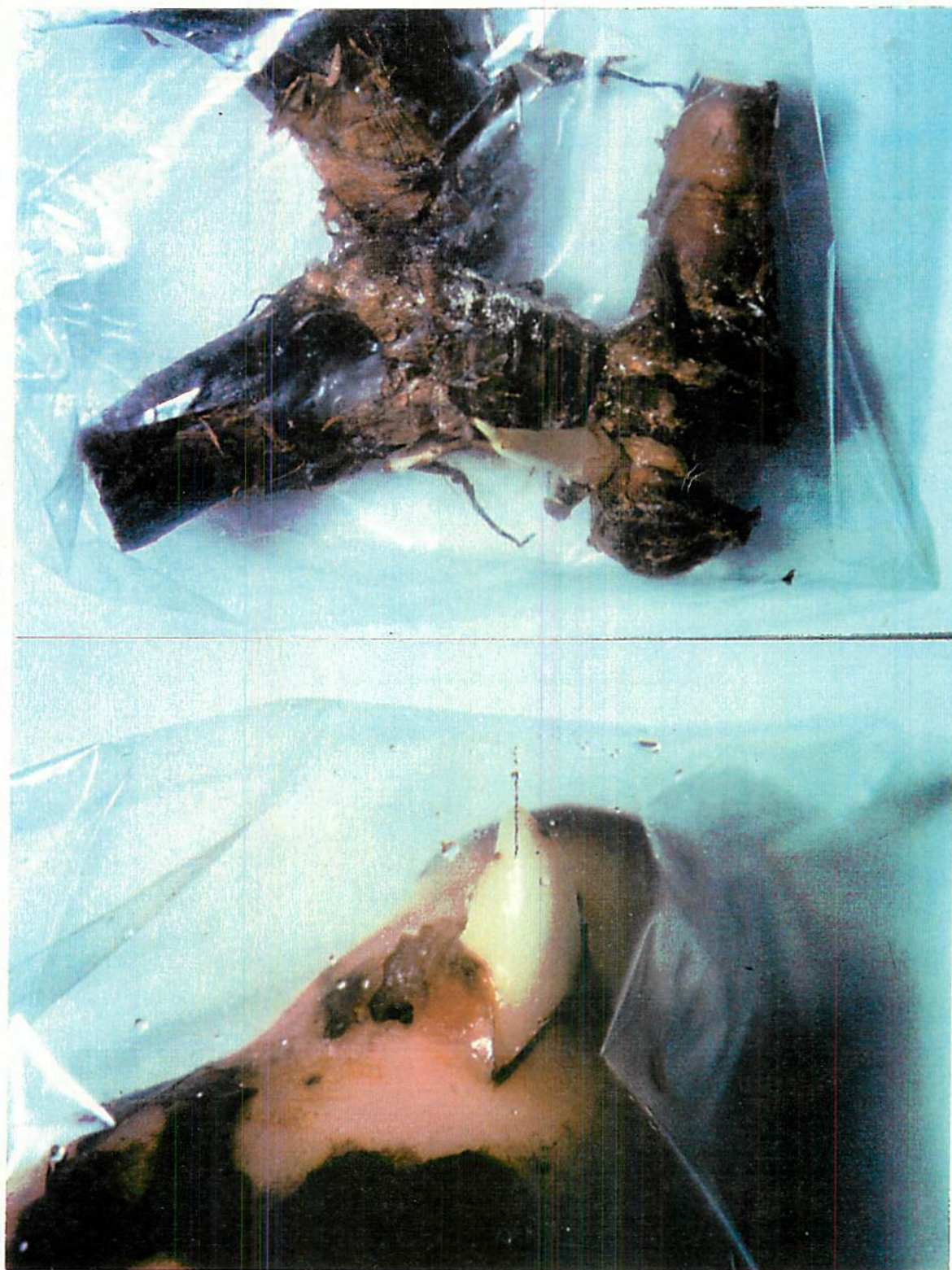


FIGURA 2. Desenvolvimento de gemas em rizomas de *Heliconia* sp. após 14 dias de armazenamento em sacos de polietileno. ESAL, Lavras-M.G., 1994.

TABELA 3. Contaminação bacteriana em gemas de *Heliconia* sp. inoculadas em meio MS com e sem adição de antibiótico. ESAL, Lavras-M.G., 1994.

Período de cultivo (dias)	Tratamentos	
	Sem claforan-Contaminação (%)	Com claforan-Contaminação (%)
5	38,5	0
10	100,0	0

Waites (1991) *Bacillus* spp. são sensíveis a vários antibióticos. Entretanto, devido a habilidade de formar esporos dormentes, os quais os antibióticos não afetam, é difícil sua eliminação da cultura. Nathan, Goh e Kumar (1992), citam em seu trabalho 33% de contaminação. Vale dizer que a desinfestação de gemas realizada pela equipe de Nathan foi a mesma que utilizamos, exceção ao tempo de imersão em etanol que foi aumentado de 30 segundos para 2 minutos além do abaixamento do pH 12 do hipoclorito de sódio para 6, aumentando sua eficiência. De acordo com Claus, Berkeley e Sneath, citados por Leifert, Ritchie e Waites (1991) *Bacillus* spp. formam endósporos resistentes ao álcool e calor, inclusive à flambagem de instrumentos, facilitando assim sua disseminação nos laboratórios de cultura de tecidos. A utilização de antibiótico no meio de cultura impediu o desenvolvimento da bactéria *Bacillus subtilis* no presente experimento. Kneifel e Leonhardt (1992) também conseguiram inibir o crescimento de bactérias Gram-positivas em cultura de tecidos vegetais, dentre essas *Bacillus* spp., com a utilização de antibióticos combinados: Imipenem/Ampicilina e Imipenem/Penicilina G. O desenvolvimento das gemas de *Heliconia* sp. foi lento, com escurecimento dos tecidos externos mostrando alta oxidação e necrose. Somente 10 % das gemas tornaram-se verdes, originando posteriormente plântulas para a multiplicação (Figura 3).

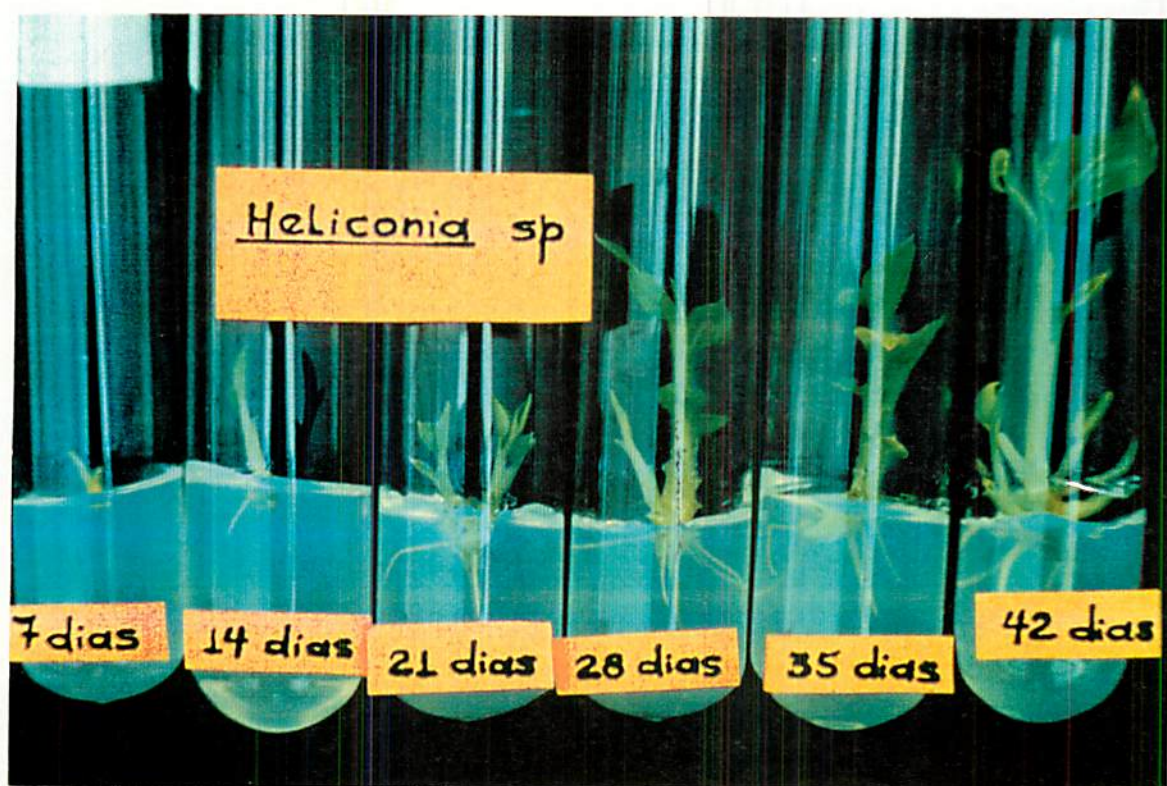


FIGURA 3. Desenvolvimento de *Heliconia* sp. após o estabelecimento de gemas. ESAL, Lavras-M.G., 1994.

2.4.2 Multiplicação de *Heliconia* sp. "in vitro" através do uso de TDZ e BAP

2.4.2.1 Utilização de diferentes níveis de TDZ e BAP em meio MS

Pode-se observar a partir da Tabela 4 e Figuras 4A e 4B, respectivamente, um maior número de brotos com o nível de 2,5 mg/L de BAP, e maior comprimento de brotos com 5 mg/L de BAP.

TABELA 4. Efeito de várias concentrações de BAP e TDZ sobre o número, tamanho de brotos e enraizamento de *Heliconia* sp. "in vitro". ESAL, Lavras-M.G., 1994.

Citocinina	Concentração (mg/L)	Nº médio de brotos	Tamanho médio de brotos (mm)	% de enraizamento	Nº médio de raízes	Formação de calos
BAP	0,0	0,97	4,7	95	3,71	0
	2,5	2,21	5,9	55	1,15	0
	5,0	1,40	6,4	75	1,36	0
	10,0	1,45	4,5	55	0,83	0
TDZ	0,025	1,65	8,3	60	0,80	0
	0,250	2,05	5,2	50	1,08	0
	0,500	1,75	5,8	50	1,24	0
	1,000	1,04	3,9	40	0,59	0

Para TDZ o maior número de brotos foi observado com o nível de 0,25 mg/L, sendo que para comprimento de brotos a menor dosagem 0,025 mg/L, foi mais efetiva, o que pode ser constatado através das Figuras 5A e 5B.

Nas dosagens de 0,5 e 1,0 mg/L de TDZ constatou-se a tendência de enrijecimento de brotos, formação de folhas menores e produção de brotos curtos e compactos, além de fitotoxidez demonstrada por necrose em algumas folhas (Figura 6.2).

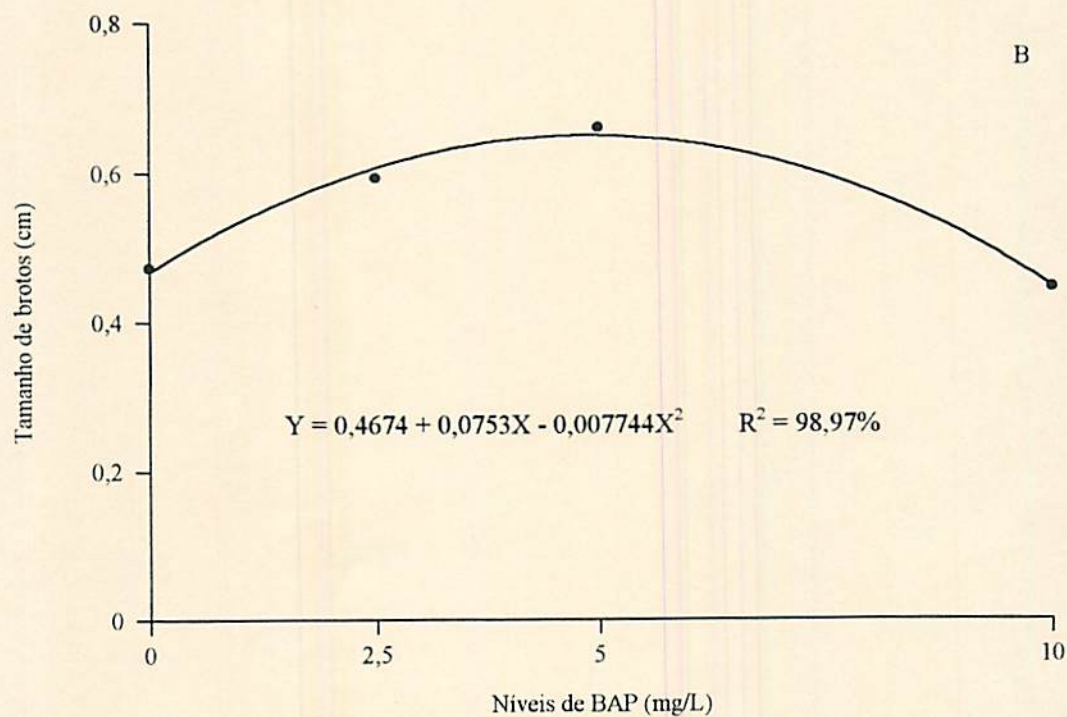
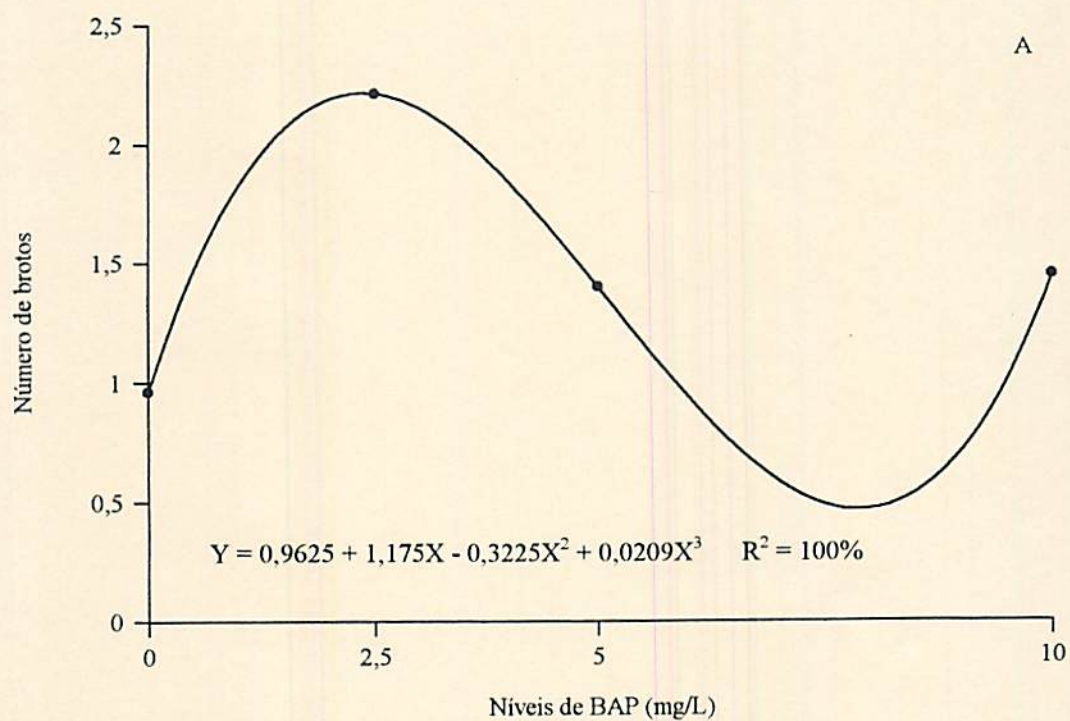


FIGURA 4. Produção (A) e crescimento de brotos (B) de *Heliconia* sp. com níveis crescentes de BAP em meio MS. ESAL, Lavras-M.G., 1994.

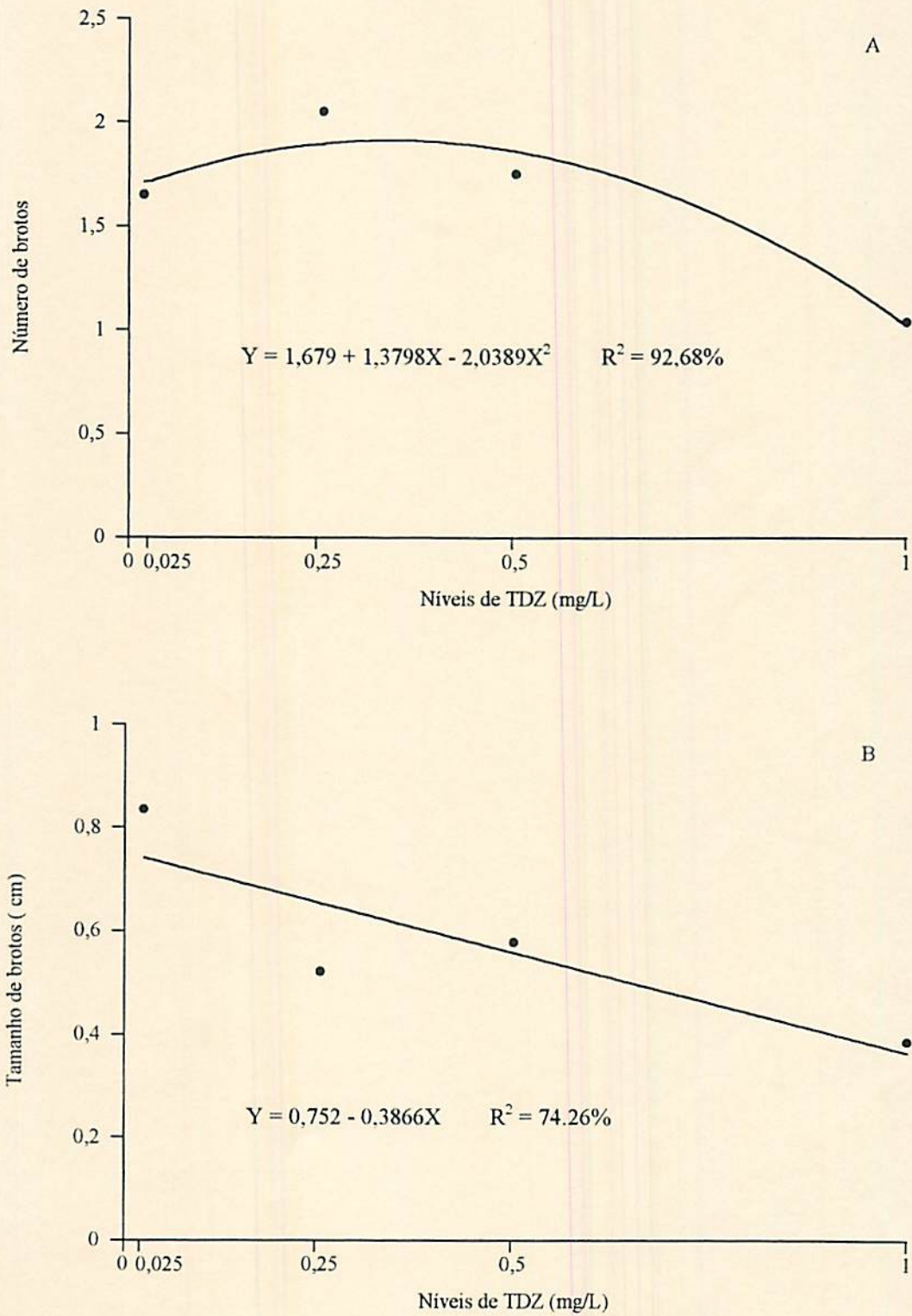


FIGURA 5. Produção (A) e crescimento de brotos (B) de *Heliconia* sp. com níveis crescentes de TDZ em meio MS. ESAL, Lavras-M.G., 1994.

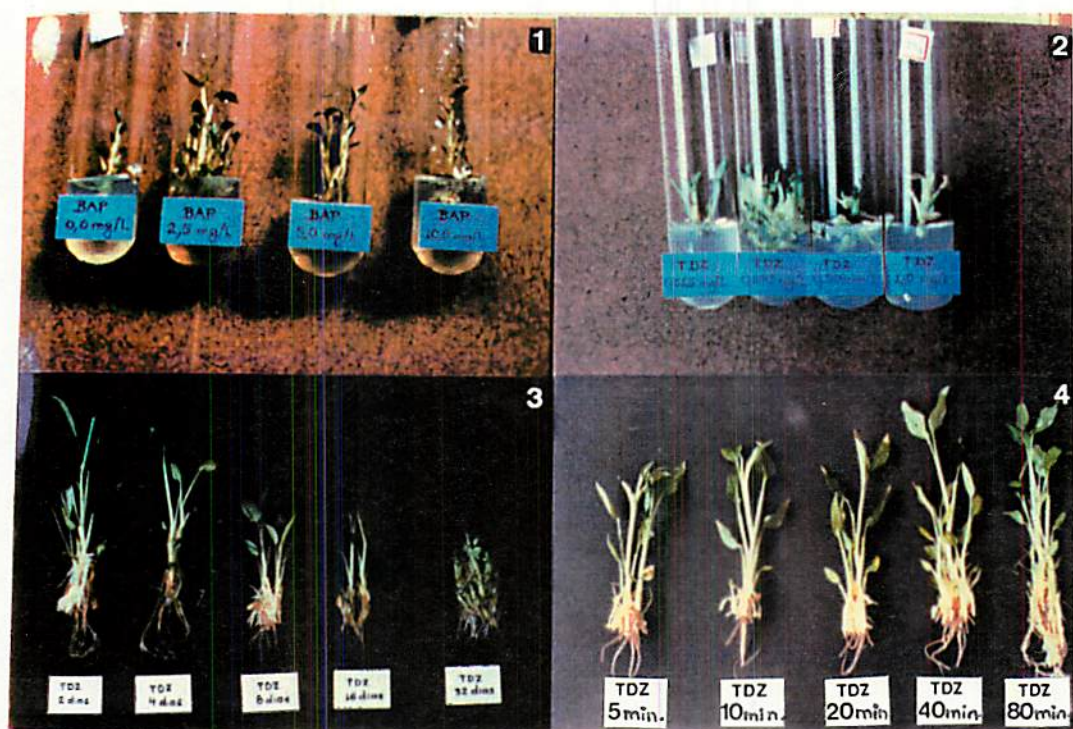


FIGURA 6. Desenvolvimento de brotos de *Heliconia* sp. com a utilização de BAP e TDZ em diferentes níveis (Fig.6.1 e 6.2). Diferentes períodos de exposição do explante secundário ao TDZ (Fig. 6.3). Efeito da imersão do explante secundário em solução de TDZ (Fig.6.4). ESAL, Lavras-M.G., 1994.

Com relação à formação de raízes, na ausência de BAP ou nível inferior de TDZ (0,025 mg/L), estes tratamentos apresentaram 95 e 60% de enraizamento respectivamente (Tabela 4). Como mostra a Figura 7, houve uma diferença marcante para enraizamento dos explantes secundários inseridos em meio sem regulador de crescimento, que apresentaram um maior enraizamento, e os que possuíam BAP acrescido ao meio apresentaram menor enraizamento. Explantes em meio com 0,025 mg/L de TDZ, mostraram maior porcentagem de enraizamento do que os explantes cultivados em meio com níveis maiores do regulador de crescimento (Tabela 4).

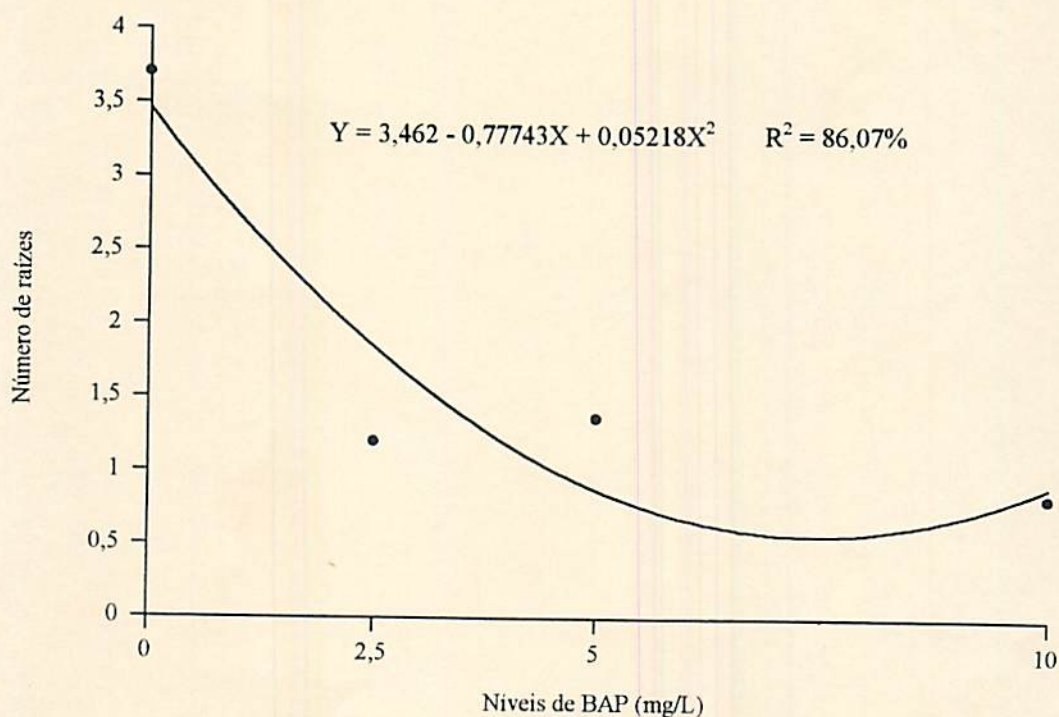


FIGURA 7. Quantidade de raízes formadas em explantes secundários de *Heliconia* sp., com 40 dias de cultivo em meio MS com níveis crescentes de BAP. ESAL, Lavras-M.G., 1994.

O melhor nível de BAP (2,5 mg/L), observado pelos resultados experimentais (Figura 6.1), concordam com resultados obtidos anteriormente por Nathan, Goh e Kumar (1992), apesar do maior número de brotos obtidos nesse experimento estar abaixo do que Nathan, Goh e Kumar (1992) obtiveram (5,0), isto talvez seja devido ao genótipo da planta ou às condições de cada laboratório.

Também em banana (*Musa* spp.), BAP tem sido utilizado com sucesso na proliferação de brotos na concentração de 2,5 a 5,0 mg/L (Balakrishnamurthy e Sree, 1988). Resultados do experimento de micropropagação com *Heliconia* sp. são comparáveis a trabalhos para obtenção de brotos de banana realizados por Swamy e Sahijram (1989) onde BAP foi utilizado na concentração de 2,25 mg/L.

O nível ótimo para número de brotações coincide com o ótimo para comprimento dos brotos, segundo Nathan, Goh e Kumar (1992).

Quanto a TDZ não existem trabalhos prévios realizados com *Heliconia* sp., mas em comparações com experimentos em outras espécies comprovou-se que são necessárias concentrações menores em relação às outras citocininas para se obter resultados similares ou mesmo superiores na multiplicação das espécies.

De acordo com Chin-Yi Lu (1993) TDZ é biologicamente mais ativo que BAP. Isto se deve, segundo Thomas e Katterman (1986), à síntese de citocininas purinas endógenas estimulada pelo TDZ, além da inibição da degradação destas. Mok, Mok e Turner (1987) atribuem a maior atividade de TDZ à sua estabilidade no meio de cultura por não ser degradado por oxidases.

O nível ótimo (0,25 mg/L) de TDZ, encontrado neste trabalho, está entre as dosagens citadas por van Nieuwkerk, Zimmerman e Fordham (1986). Segundo esses autores

Heliconia sp. estaria então entre as espécies que requerem níveis mais elevados de TDZ (0,022 a 2,2 mg/L) pois as concentrações geralmente utilizadas para micropropagação estão entre 0,0022 a 0,0088 mg/L.

De acordo com Huetteman e Preece (1993) citocininas inibem o crescimento de brotos o que pode-se verificar com a menor dosagem de 0,025 mg/L de TDZ produzindo brotos mais alongados que as demais. Comparando comprimentos de brotos produzidos por TDZ e BAP, segundo os mesmos autores, TDZ possui atividade de citocinina mais acentuada, comprovada pelas dosagens menores e efetivas, causando assim produção de brotos mais curtos. Apesar deste problema poder ser revertido pela transferência desses brotos para um meio sem TDZ ou com um diferente balanço entre reguladores de crescimento (Fasolo, Zimmerman e Fordham, 1989; Briggs, McCulloch e Edick, 1988).

As desvantagens do uso de TDZ já citadas por Chin-Yi Lu (1993) foram comprovadas, como tendência a hiperhidricidade (vitricificação), morfologia anormal de folhas e produção de brotos curtos e compactos. Em relação à formação de calos houve exceção, provavelmente devido à maior concentração utilizada (1,0 mg/L) não ter sido muito elevada.

Para enraizamento, como já era previsto, a ausência de citocinina foi o melhor tratamento, concordando com resultados obtidos por Nathan, Goh e Kumar (1992) quando obtiveram 92% de enraizamento de brotos em *Heliconia psittacorum* com a omissão de BAP do meio. De acordo com Huetteman e Preece (1993) a persistência de TDZ no meio de cultura pode reduzir a capacidade de enraizamento em relação à BAP. Resultados estes já demonstrados em experimentos por Gray e Benton (1991).

2.4.2.2 Diferentes períodos de exposição de explantes secundários ao TDZ

Verificou-se um maior número de brotos formados (5,08), quando o explante secundário permaneceu por 8 dias no meio suplementado com 0,25 mg/L de TDZ (Tabela 5 e Figura 8).

TABELA 5. Efeito do período de exposição (dias) do explante secundário de *Heliconia* sp. ao TDZ (0,25 mg/L) e transferência para meio MS sem regulador de crescimento, após 60 dias de cultivo, sobre o número e tamanho de brotos, tamanho de explantes secundários e número de raízes. ESAL, Lavras- M.G., 1994.

Período de exposição ao TDZ (0,25 mg/L) (dias)	Nº médio de brotos	Tamanho médio de brotos (mm)	Tamanho médio de explantes secundários (mm)	Número médio raízes
2	1,86	11,6	48,8	6,99
4	2,52	9,2	31,7	4,56
8	5,08	7,9	24,9	3,28
16	3,11	7,3	22,4	1,91
32	2,73	4,9	22,7	0,95

Prolongando-se os dias de exposição ao regulador de crescimento diminuiu-se a quantidade de brotos formados. Observou-se também uma tendência de aumento linear no número de brotos durante as avaliações (Figura 9), devido ao efeito temporal.

Quando observou-se o tamanho dos brotos verificou-se que a medida que permaneciam mais tempo em contato com o TDZ, mais curtos os brotos ficavam, o que pode-se constatar ao observar-se a Figura 10. O tamanho dos brotos aumentou com o incremento de dias em meio MS sem regulador de crescimento (Figura 11), devido ao efeito temporal.

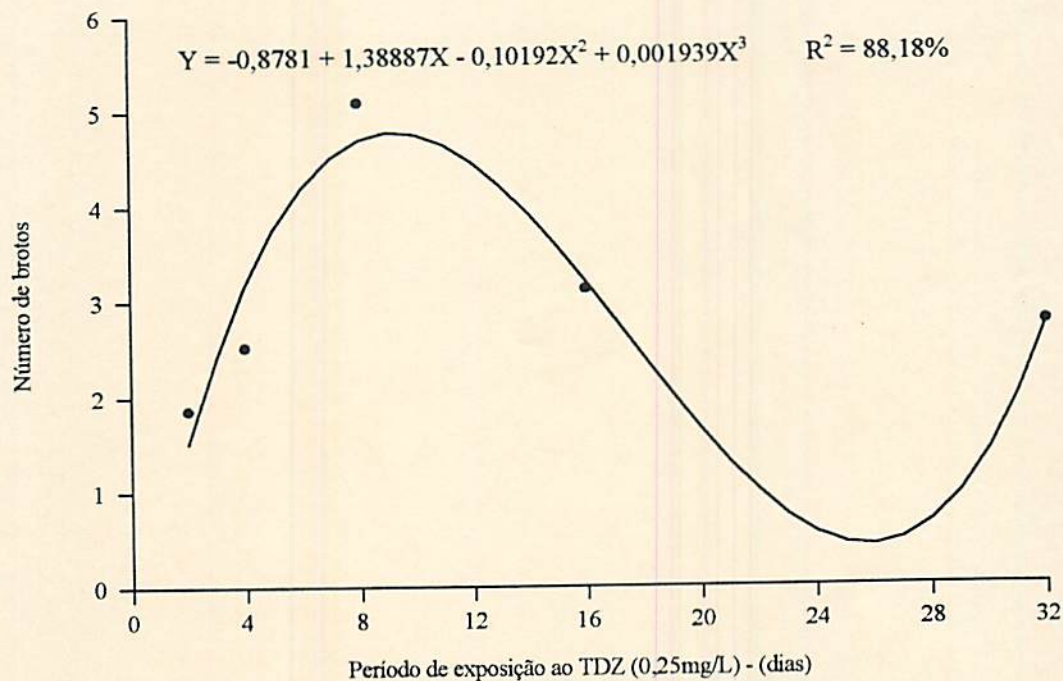


FIGURA 8. Produção de brotos em *Heliconia* sp. após diferentes períodos (dias) de exposição em meio MS suplementado com 0,25 mg/L de TDZ, após 60 dias de cultivo. ESAL, Lavras-M.G., 1994.

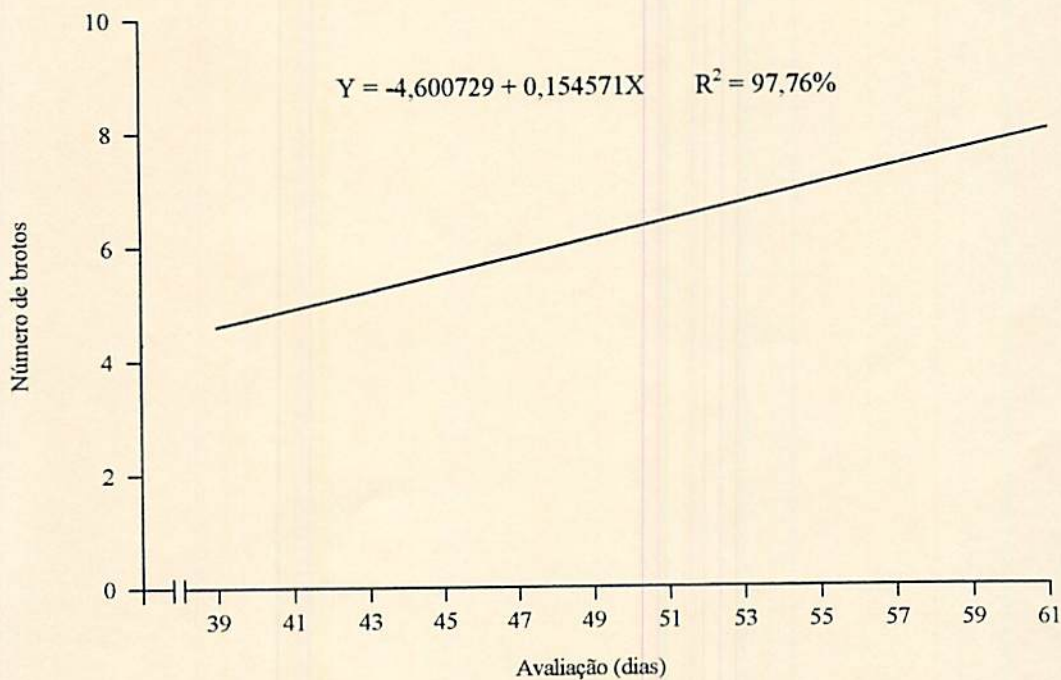


FIGURA 9. Produção de brotos em plântulas de *Heliconia* sp. transferidas para meio MS sem regulador de crescimento após a exposição a 0,25 mg/L de TDZ por 2, 4, 8, 16 e 32 dias. As avaliações foram realizadas com 39, 46, 53 e 60 dias. ESAL, Lavras-M.G., 1994.

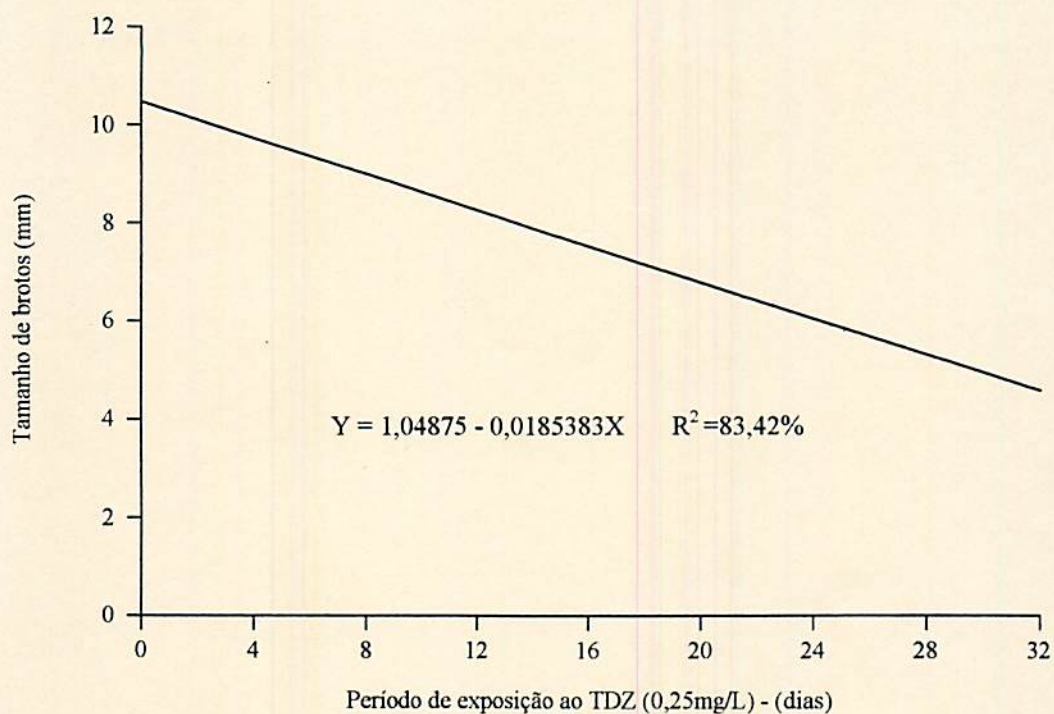


FIGURA 10. Tamanho dos brotos (mm) com período crescente de exposição de *Heliconia* sp. em meio MS suplementado com 0,25 mg/L de TDZ, após 60 dias de cultivo. ESAL, Lavras-M.G., 1994.

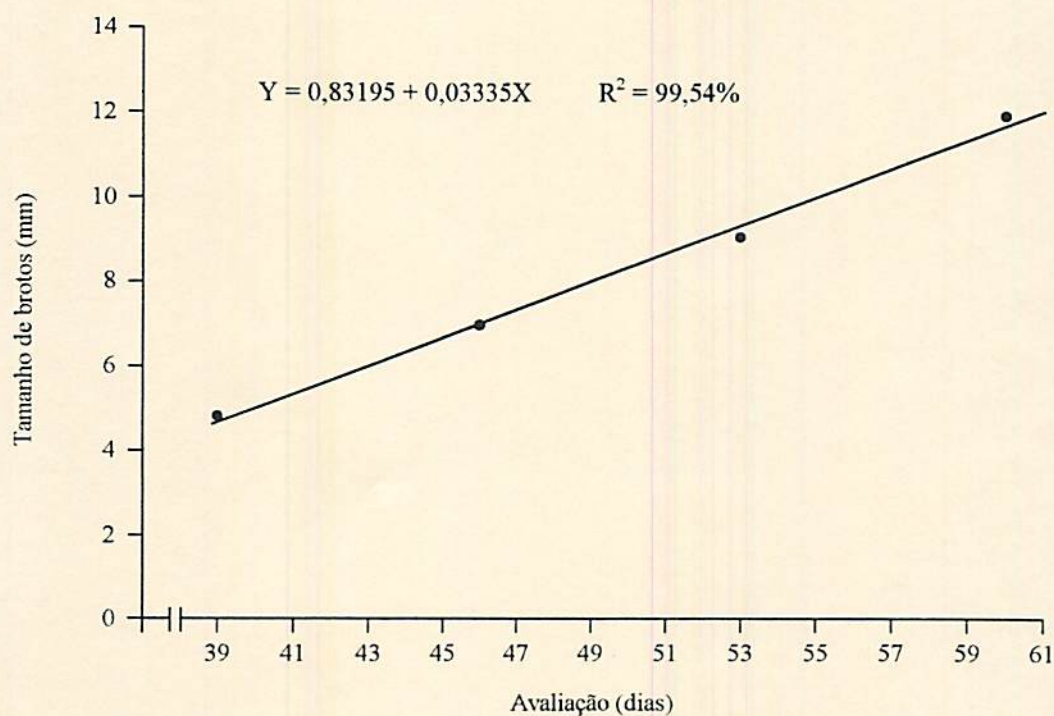


FIGURA 11. Tamanho dos brotos (mm) de *Heliconia* sp. transferidos para meio MS, sem regulador de crescimento. ESAL, Lavras-M.G., 1994.

O desenvolvimento do explante secundário também foi mais reduzido com a maior exposição ao regulador de crescimento. Obteve-se um tamanho maior do explante com o período mínimo de contato com TDZ, 48,7 mm para 2 dias de exposição, e um tamanho menor de 22,7 mm para o explante com 32 dias de exposição ao regulador de crescimento (Figura 12). Da primeira para a quarta avaliação (39 a 60 dias) ocorreu aumento linear para tamanho do explante (Figura 13).

Para a formação de raízes o menor período de exposição ao TDZ suplementado no meio (2 dias), foi mais eficiente (6,98 raízes, em média). O maior período de exposição (32 dias), produziu em média 0,95 raízes. O decréscimo de número de raízes com o aumento de dias de exposição ao TDZ pode ser observado na Figura 14. Maior número de raízes foi formado com maior tempo de avaliação (Figura 15), devido ao efeito temporal.

A redução do tamanho do broto e tamanho do explante secundário com uma maior exposição ao regulador de crescimento TDZ (Figura 6.3), já era esperada, uma vez que thidiazuron induz um menor crescimento e desenvolvimento da plântula. Conforme cita Fellman, Read e Hosier (1987). TDZ causou grande proliferação de brotos em petúnia mas suprimiu o alongamento desses brotos, segundo os autores isso foi devido a alta estabilidade do regulador de crescimento no meio de cultura. Gray e Klein (1989), Meyer e van Staden (1988) e van Nieuwkerk, Zimmerman e Fordham (1986) também relatam que o meio contendo TDZ causa produção de brotos menores, principalmente quando compara-se estes com brotos produzidos em meio suplementado com BAP. Por outro lado Nielsen, Brandt e Hansen (1993) não observaram nenhuma diferença de tamanhos de brotos de *Miscanthus sinensis* (Thunb.) cultivados em meio com BAP ou TDZ, isto provavelmente se deve aos diferentes genótipos de cada espécie utilizada.

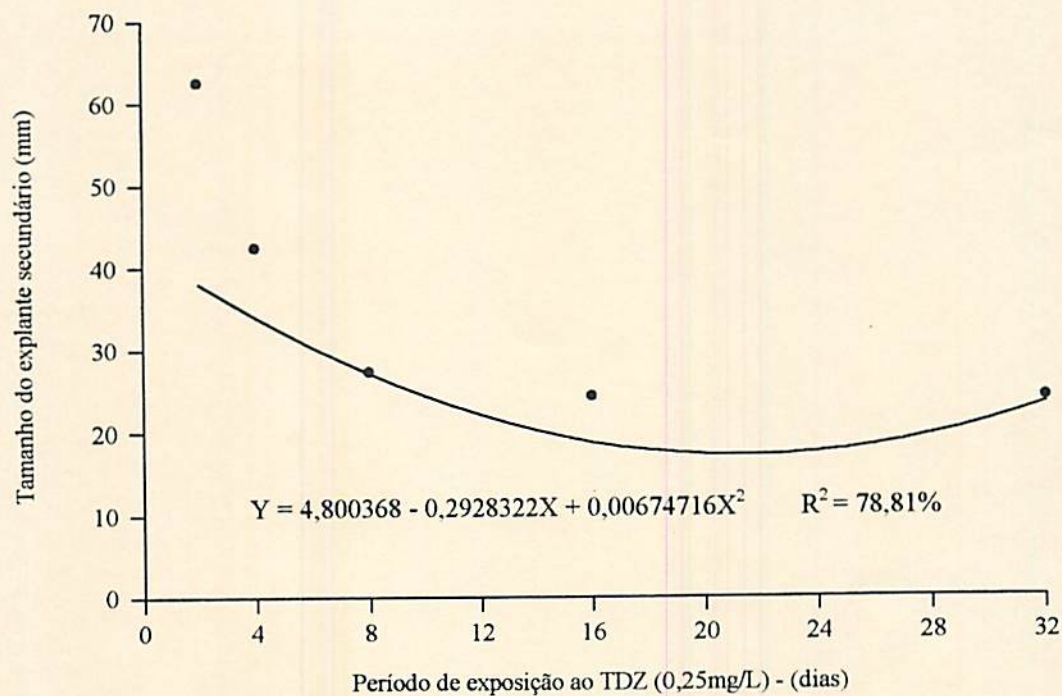


FIGURA 12. Tamanho dos explantes secundários (mm), com períodos de exposição crescente de *Heliconia* sp. no meio MS suplementado com 0,25 mg/L de TDZ, após 60 dias de cultivo. ESAL, Lavras-M.G., 1994.

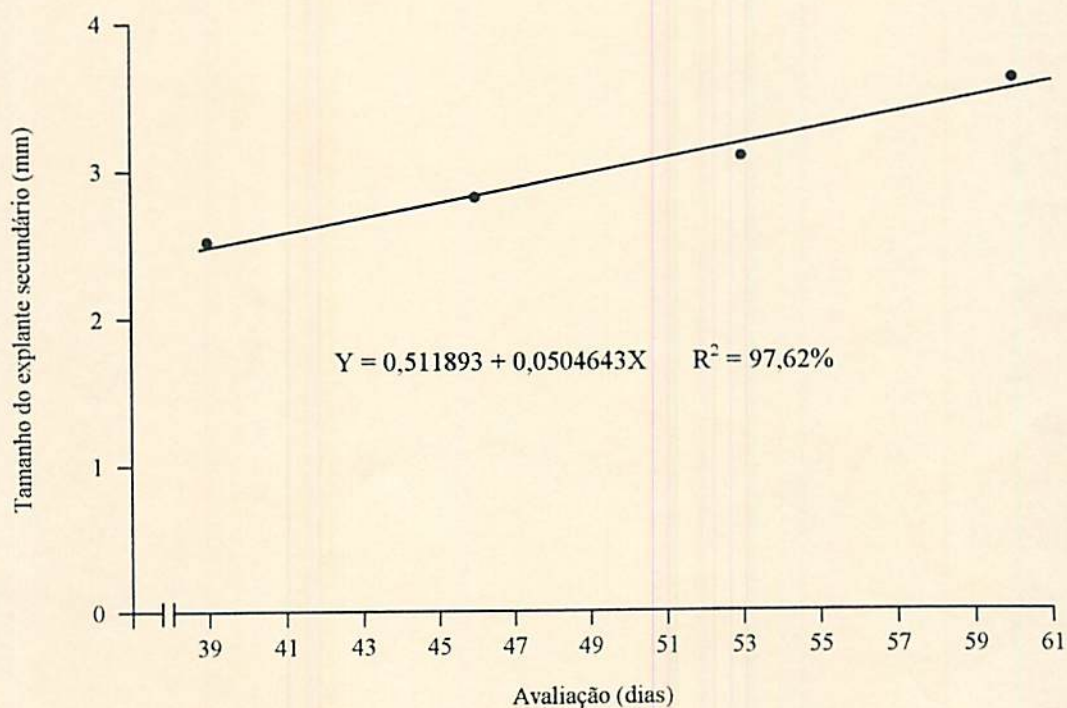


FIGURA 13. Tamanho dos explantes secundários (mm) de *Heliconia* sp. transferidos para meio MS, sem regulador de crescimento. ESAL, Lavras-M.G., 1994.

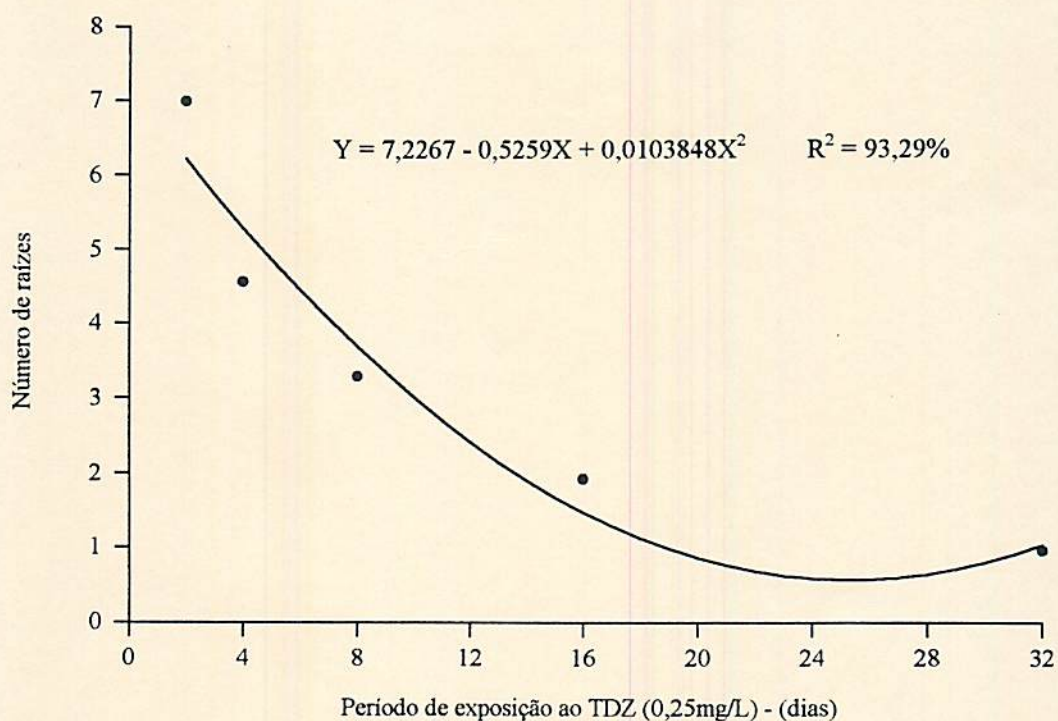


FIGURA 14. Quantidade de raízes formadas com período crescente de imersão de *Heliconia* sp. em meio MS suplementado com 0,25 mg/L de TDZ, após 60 dias de cultivo. ESAL, Lavras-M.G., 1994.

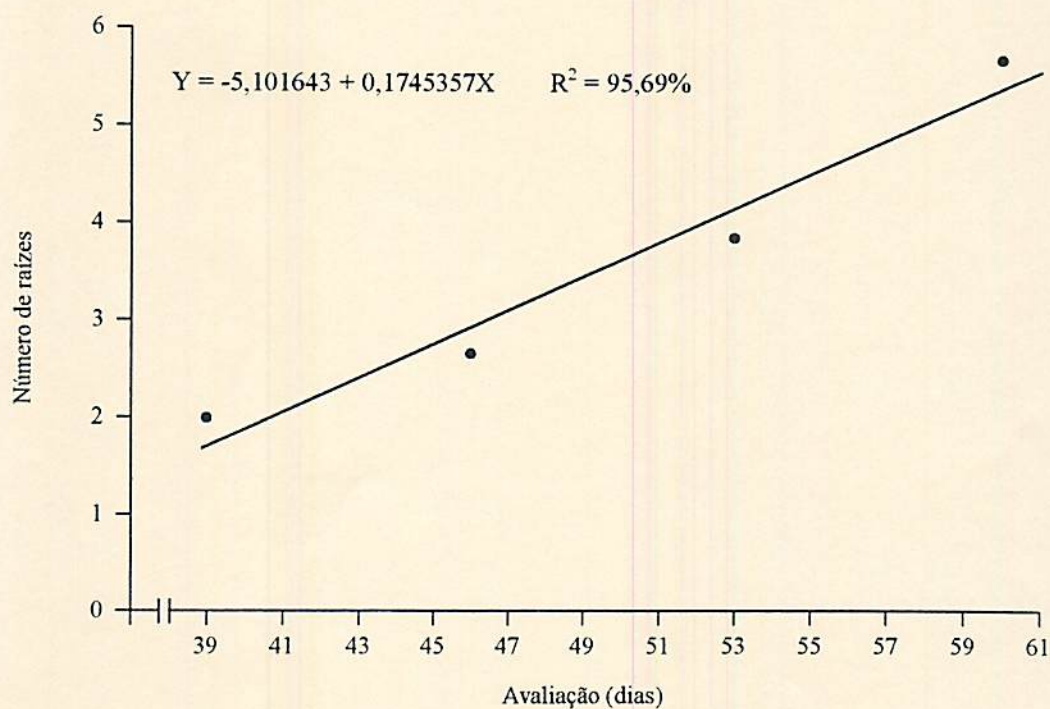


FIGURA 15. Quantidade de raízes formadas em *Heliconia* sp. transferida para meio MS sem regulador de crescimento. ESAL, Lavras-M.G., 1994.

A redução de crescimento causada por TDZ é devido a atuação deste como um regulador de crescimento na divisão celular, afetando o tamanho das células (Pinto, 1994)*.

O aumento do número de raízes com menor período de exposição ao TDZ comprova o efeito citocinina de inibição de enraizamento (Kaminek, 1992; Medford et al., 1989). A redução da capacidade de enraizamento pode ser atribuída a alta atividade de citocinina e estabilidade do thidiazuron quando comparado com citocininas aminopurinas. Gray e Benton (1991) trabalhando com brotos de "muscadine grape" obtiveram um enraizamento de 8% com 0,11 mg/L de TDZ comparado com 34% de enraizamento com uma dosagem dez vezes maior de BAP (1,12 mg/L).

O resultado de maior número de brotos com 8 dias de exposição ao TDZ, sugere que deve-se reduzir o tempo de exposição ao TDZ, sendo que com o aumento deste para 32 dias obteve-se menor número de brotos. A dosagem 0,25 mg/L de TDZ já tinha sido constatada, em experimento previamente realizado, como a melhor para formação de brotos. Faltava então a indicação do período que o explante deveria permanecer neste meio para a maior indução de brotos, visto que neste experimento prévio não havia a transferência para meio isento de TDZ, ficando os explantes secundários expostos a este até a última avaliação (40 dias), e no qual pôde-se obter 2,05 brotos em média, em contraste com 5,08, com somente 8 dias de exposição.

A alta atividade de citocinina do TDZ demonstrada por Mok, Mok e Shudo (1982) em *Phaseolus vulgaris* L., a capacidade de estimular a síntese de citocininas purinas endógenas (Thomas e Katterman, 1986), aliados a sua estabilidade no meio de cultura devido a não degradação por oxidases (Mok, Mok e Turner, 1987), vêm explicar a necessidade de um menor período de exposição dos explantes secundários de *Heliconia* sp. (8 dias) a este regulador de

* Comunicação pessoal (José Eduardo Brasil P. Pinto, Prof. Titular, Depto. Agricultura-ESAL).

crescimento para a produção de brotos, além de minimizar as desvantagens causadas pelo maior período de exposição de explantes ao TDZ, como a redução do tamanho de brotos.

Comparando-se as avaliações realizadas após transferência das plântulas para meio sem regulador de crescimento: 1ª (39 dias), 2ª (46 dias), 3ª (53 dias) e 4ª avaliação (60 dias), observa-se que com maior tempo de exposição do explante secundário no meio sem TDZ houve um aumento do número e tamanho de brotos, aumento de tamanho do explante secundário e aumento do número de raízes, provavelmente devido ao efeito de inibição que o regulador de crescimento poderia estar afetando no desenvolvimento do explante secundário.

2.4.2.3 Efeito da imersão de explantes secundários em solução de TDZ

Constatou-se um maior número de brotos (0,78) para 80 minutos de imersão dos explantes secundários, como pode-se observar na Figura 16.A. O maior tempo de imersão também conferiu um maior comprimento de brotos, Figura 16.B.

O tamanho do explante secundário não variou significativamente entre os diferentes tratamentos (Figura 17.A).

Para a variável número de raízes pode-se observar um decréscimo a medida que se aumentou o tempo de imersão em solução de TDZ, como mostra a Figura 17.B.

Resultados numéricos da avaliação do experimento podem ser observados na Tabela 6.

Apesar de ter havido uma tendência de progressão para número de brotos com um maior tempo de imersão pode-se constatar a pequena diferença que houve entre os tratamentos. O número de brotos obtidos com a imersão dos explantes secundários na solução de TDZ por 80

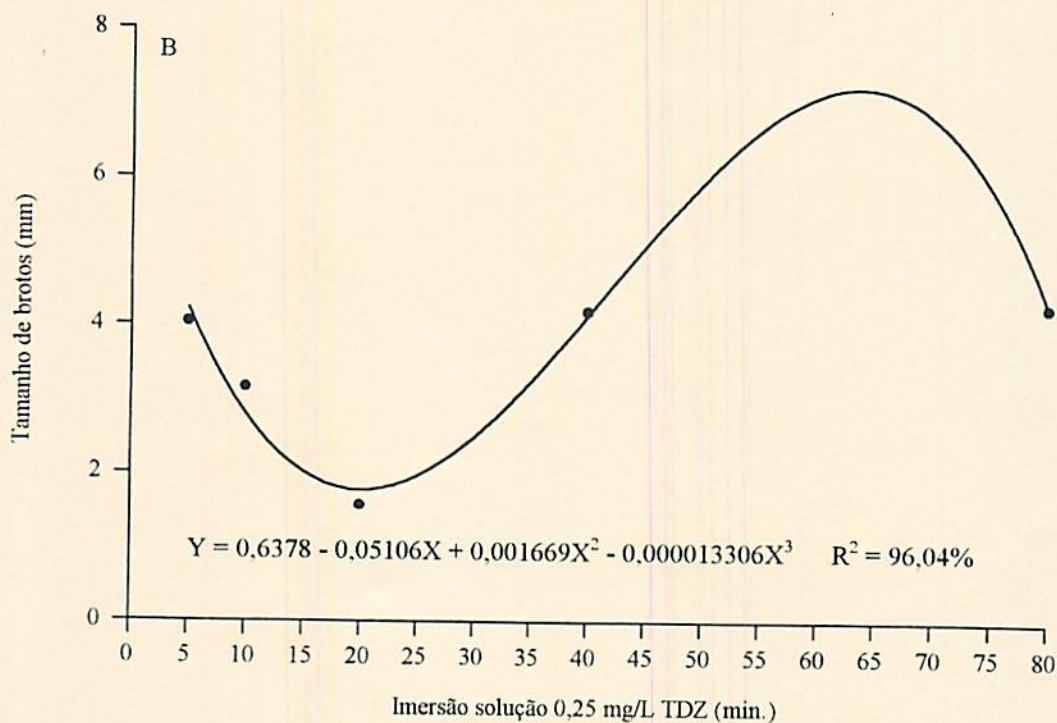
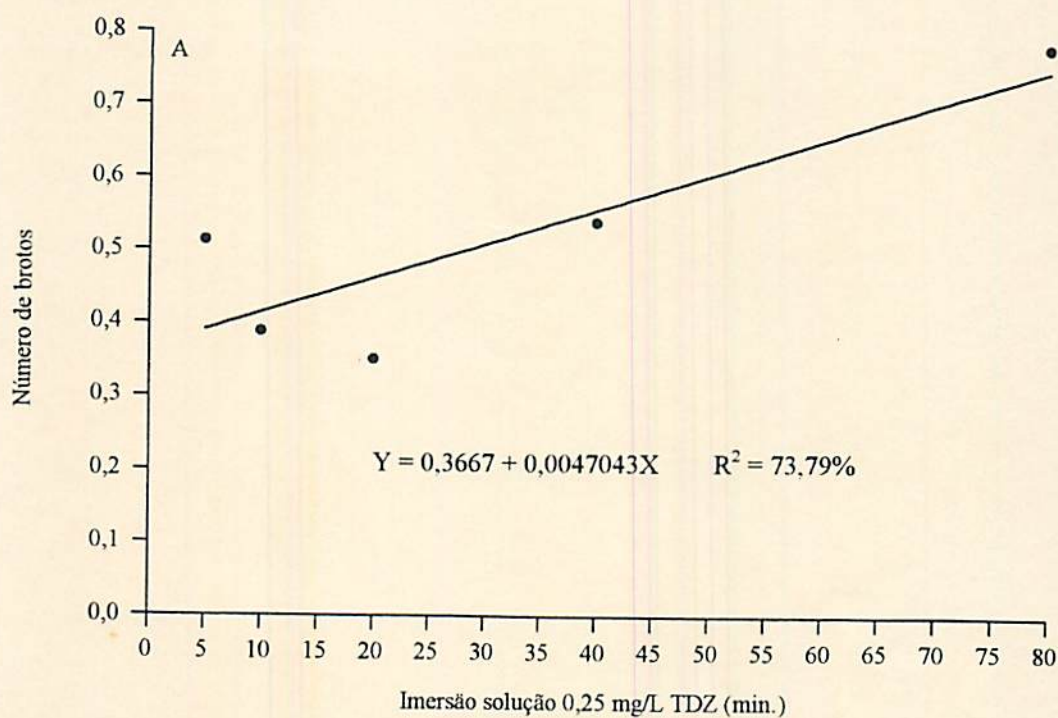


FIGURA 16. Produção (A) e crescimento de brotos (B) de *Heliconia* sp. com período crescente (minutos) de imersão dos explantes secundários em solução 0,25 mg/L de TDZ e posterior transferência para meio MS sem regulador de crescimento. ESAL, Lavras-M.G., 1994.

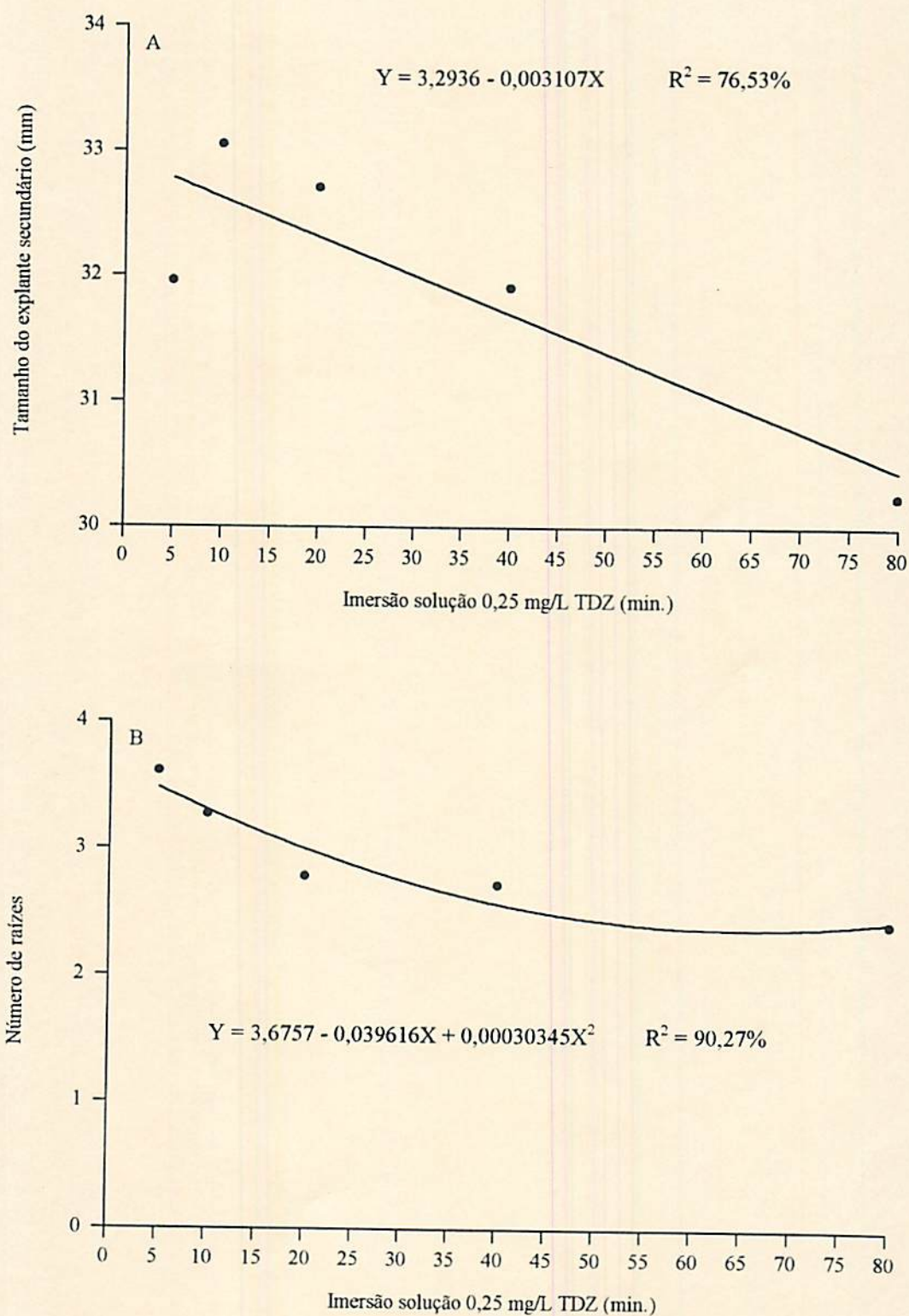


FIGURA 17. Tamanho do explante secundário (A) e número de raízes (B) obtidos com diferentes períodos de imersão (minutos) dos explantes secundários de *Heliconia* sp. em solução 0,25 mg/L de TDZ e posterior transferência para meio MS sem regulador de crescimento. ESAL, Lavras-M.G., 1994.

TABELA 6. Efeito de períodos diferentes de imersão (minutos) de explantes secundários de *Heliconia* sp. em solução de TDZ 0,25 mg/L e cultivo em meio MS sem regulador de crescimento, sobre o número e tamanho de brotos, tamanho do explante secundário e número de raízes. ESAL, Lavras-M.G., 1994.

Imersão em 0,25 mg/L TDZ (minutos)	N ^o médio de brotos	Tamanho mé- dio de bro- tos (mm)	Tamanho médio de explantes secundários (mm)	Número médio de raízes
5	0,51	4,0	32,0	3,61
10	0,39	3,2	33,1	3,28
20	0,35	1,6	32,7	2,79
40	0,54	4,2	31,9	2,73
80	0,78	4,3	30,2	2,43

minutos (0,78) foi reduzido quando comparado a outras respostas com TDZ adicionado ao meio de cultura (Figura 6).

Em experimentos anteriores quando acrescentou-se 0,25 mg/L de TDZ ao meio obteve-se 2,05 brotos produzidos por explante secundário, em média. Quando reduziu-se o tempo de exposição de 40 para 8 dias, com esta mesma concentração de TDZ (0,25 mg/L), mantendo-se o TDZ no meio, constatou-se um aumento da produção de brotos para 5,08. Observa-se então a necessidade da adição do regulador de crescimento ao meio de cultura para que este demonstre sua potencialidade para produção de brotos. A imersão possibilitou um período curto de contato do explante secundário com o TDZ (no máximo por 80 minutos), período este insuficiente para a absorção e assimilação do regulador de crescimento quando comparado com 8 ou 40 dias de exposição à citocinina nos experimentos realizados anteriormente.

Alguns autores têm obtido um grande número de brotos em média com a adição de TDZ no meio de cultura. A alta atividade biológica do TDZ foi ressaltada por Chin-Yi Lu (1993)

quando obteve formação de 17 brotos em média em pétalas de cravo e regeneração de brotos a partir de receptáculo de rosa. Thidiazuron tem produzido grande número de brotos em maçã (*Malus domestica* Borkh) (van Nieuwkerk, Zimmerman e Fordham, 1986), proliferação de brotos de “hackberry” (*Celtis occidentalis* L.) e possibilitou a propagação de “Acer” (Kerns e Meyer, 1985).

Podemos constatar também a pequena diferença entre tratamentos para enraizamento, contudo tenha havido tendência à formação de menor número de raízes com maior tempo de imersão. A redução da capacidade de enraizamento é devido a inibição das citocininas na formação de raízes. A inibição de formação de raízes também é citada por Kaminek (1992) e Medford et al. (1989) e comprovada por Nielsen, Brandt e Hansen (1993) quando trabalharam com *Miscanthus sinensis*. Comprovou-se a redução de formação de raízes em *Heliconia* sp. em experimentos realizados anteriormente quando aumentou-se a concentração de TDZ de 0,025 para 1,00 mg/L e o número médio de raízes reduziu de 1,55 para 0,60. O número médio de raízes também foi reduzido de 6,99 para 0,95 quando prolongou-se o tempo de exposição de *Heliconia* sp. de 2 para 32 dias em meio com 0,25 mg/L de TDZ.

Quando em experimentos anteriores observou-se o decréscimo de crescimento de brotos e explantes secundários com o aumento de dosagens de thidiazuron ou com prolongado período de exposição a este regulador de crescimento, constatou-se a influência deste na redução de crescimento. Como exemplo pode-se citar o aumento da concentração de TDZ de 0,025 para 1,00 mg/L no meio de cultura acarretando a redução do tamanho médio de brotos de 8,3 para 3,9 mm. Com a concentração de TDZ fixada em 0,25 mg/L e variando-se o período de exposição ao regulador de crescimento de 2 a 32 dias obteve-se uma redução do tamanho médio de brotos de 11,6 para 4,9 mm e redução do tamanho médio de explante secundário de 48,8 para 22,7 mm.

A redução de crescimento de plântulas causado por TDZ tem sido constantemente citada em trabalhos como os de Kaminek (1992), Medford et al. (1989). Huetteman e Preece (1993) afirmam que citocininas normalmente estimulam proliferação de brotos e inibem o seu alongamento, mas a inibição de alongamento de brotos por TDZ é mais consistente devido sua alta atividade de citocinina. Entretanto no presente experimento não houve diferença significativa entre os diferentes tratamentos para o tamanho médio dos explantes secundários que variou de 32,0 a 31,2 mm com os variados períodos de imersão em solução de TDZ de 5 a 80 minutos.

2.4.3 Alongamento de tufos de brotos de *Heliconia* sp. em meio MS

Brotos cultivados isoladamente tiveram um maior desenvolvimento (42,5 mm), seguidos por tufos de brotos divididos ao meio (40,4 mm), inteiros (35,1 mm) e divididos em 1/4 (35,0 mm), como pode-se observar nas Figuras 18 e 19.

Apesar dos tratamentos se mostrarem diferentes estatisticamente, ao nível de significância de 5%, os tratamentos com os tufos inteiros ou divididos pela metade foram iguais ao melhor tratamento com a plântula individual. E o tratamento dividido em 4 partes que mostrou menor desenvolvimento foi também equiparado aos dois primeiros citados acima, como podemos observar na Figura 22. Ao nível de significância de 1%, os tratamentos não mostraram diferença estatística.

A diferença observada entre o maior e o menor crescimento é de apenas 7,5 mm, o que não justifica a repicagem dos brotos individualizando-os para se obter um maior crescimento. Sob o ponto de vista econômico, segundo Debergh e Maene (1981), é aconselhável transplantar um agrupamento de brotos para um meio que permita bom alongamento de todos eles em vez de

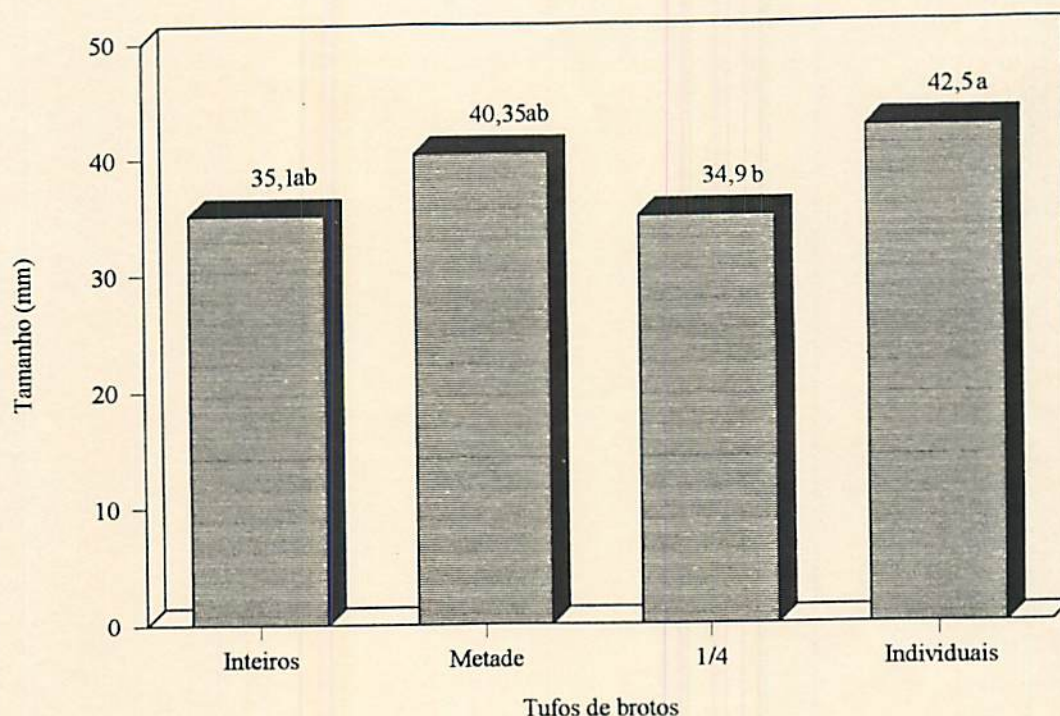


FIGURA 18. Crescimento de tufos de brotos de *Heliconia* sp. inteiros, divididos ao meio, em quatro partes e individualizados, cultivados por 60 dias em meio MS sem regulador de crescimento. ESAL, Lavras-M.G., 1994.

transplantá-los isoladamente. A individualização de brotações é uma prática trabalhosa e demorada além de onerar a produção de mudas. De acordo com Debergh e Maene (1981) o maior custo em propagação de plantas por cultura de tecidos é o trabalho manual e este é pronunciado principalmente nos estádios de alongamento e enraizamento quando brotos individuais são manipulados. Desta forma os autores recomendam manter as culturas em forma de agrupamento de brotos, quanto tempo for possível.

Considerando que uma média de 20 ou 30 brotos, obtidos por período prolongado de cultivo em nossos experimentos, possam crescer em um único tubo de ensaio, se os individualizarmos, passaremos a utilizar 20 a 30 tubos de ensaio, com um maior gasto de meio de cultura e necessidade de um maior espaço físico na sala de crescimento.

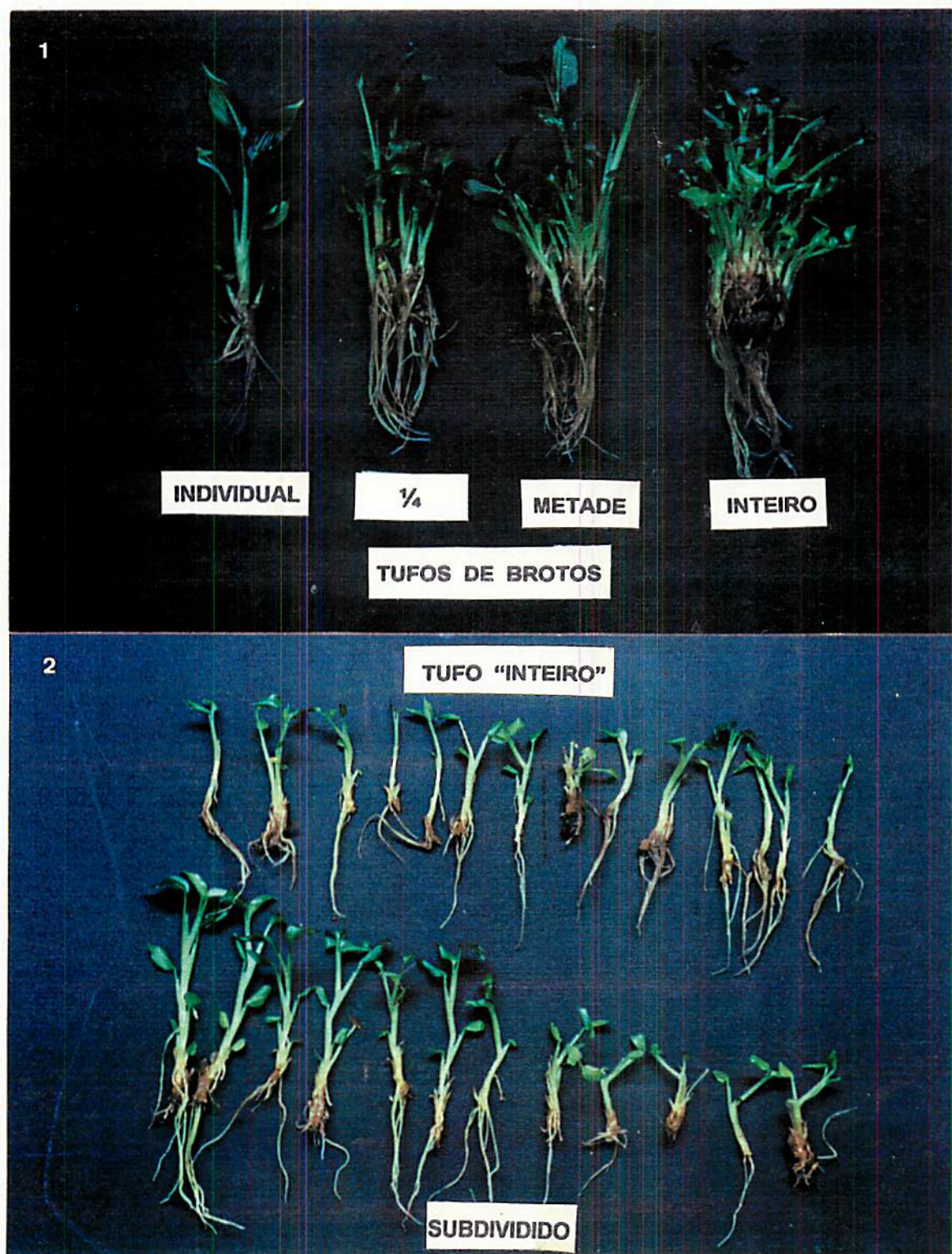


FIGURA 19. Alongamento de tufos de brotos de *Heliconia* sp. inteiro, dividido ao meio, em quatro partes, individualizado (1). Quantidade de brotos retirados de um tufo inteiro (2). ESAL, Lavras-M.G., 1994.

2.4.4 Utilização de AIB para promoção de enraizamento em *Heliconia* sp.

O maior número e maior comprimento de raízes obtidos foi com o tamanho de explante 3 tanto para explantes secundários oriundos do meio com TDZ (25 a 40 mm) quanto para explantes oriundos do meio com BAP (45 a 50 mm), além de demonstrarem uma maior capacidade de enraizamento mesmo quando o meio estava isento de ácido indolbutírico (AIB). Para estes mesmos tamanhos de explantes a melhor concentração de AIB, produzindo um maior número de raízes por explante, foi a de 1,0 mg/L (Tabela 7).

TABELA 7. Número e comprimento de raízes para vários tamanhos de explantes secundários de *Heliconia* sp, provenientes de meio com TDZ (A) e com BAP (B), e cultivados em 1/2 MS com diferentes níveis de AIB. ESAL, Lavras-M.G., 1994.

AIB mg/L	Número médio de raízes						Comprimento médio de raízes (mm)					
	Explante 1		Explante 2		Explante 3		Explante 1		Explante 2		Explante 3	
	(A)	(B)	(A)	(B)	(A)	(B)	(A)	(B)	(A)	(B)	(A)	(B)
0	2,55	4,72	2,95	3,83	7,03	5,75	8,0	15,4	8,3	23,7	15,4	28,8
0,5	7,08	6,08	7,23	6,44	8,97	7,00	3,8	6,7	5,5	7,3	6,5	13,9
1,0	4,81	4,39	6,45	9,33	9,36	9,89	1,9	3,4	2,8	5,2	6,1	8,6
1,5	6,81	8,21	6,33	6,44	9,03	9,08	2,4	2,4	1,9	2,8	5,0	6,5

Quando se utilizou explantes oriundos de TDZ nos tamanhos 1 (10 a 15 mm) e 2 (15 a 20 mm) a melhor concentração foi 0,5 mg/L de AIB. Para explantes provenientes de meio com BAP no tamanho 1 (15 a 20 mm) a melhor concentração foi 1,5 mg/L de AIB. O tamanho 2 (30 a 35 mm), semelhante ao tamanho 3, produziu maior número de raízes com 1,0 mg/L de AIB. Pode-se observar o comportamento dos explantes secundários em relação ao crescente nível de AIB nas Figuras 20.A e 20.B.

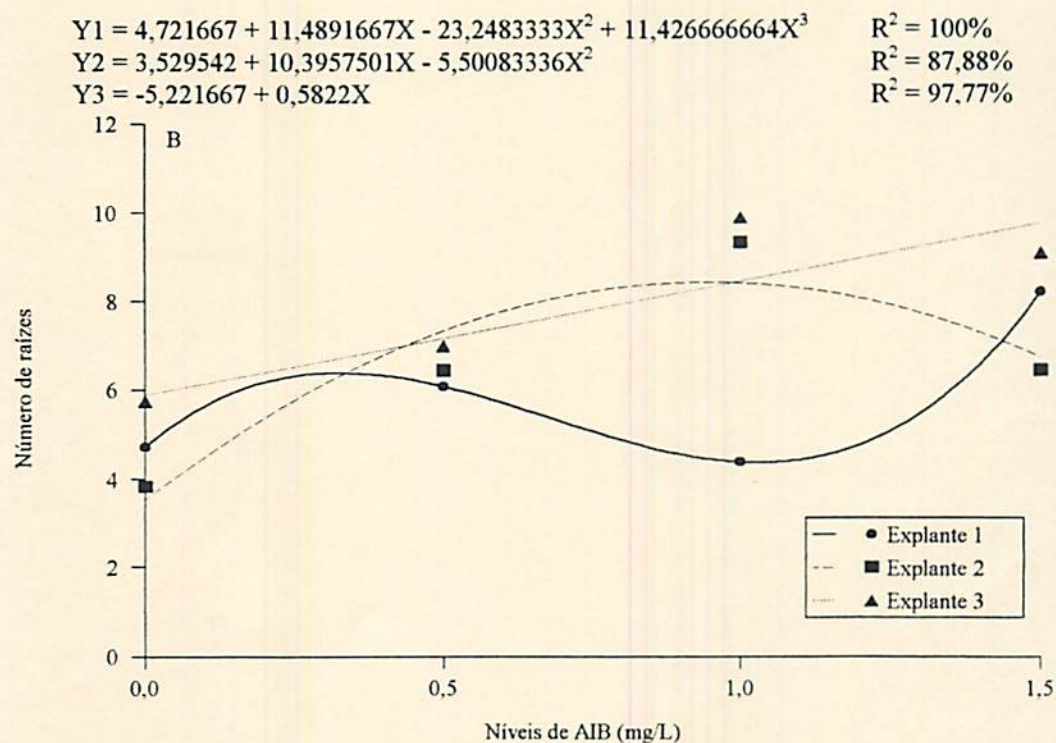
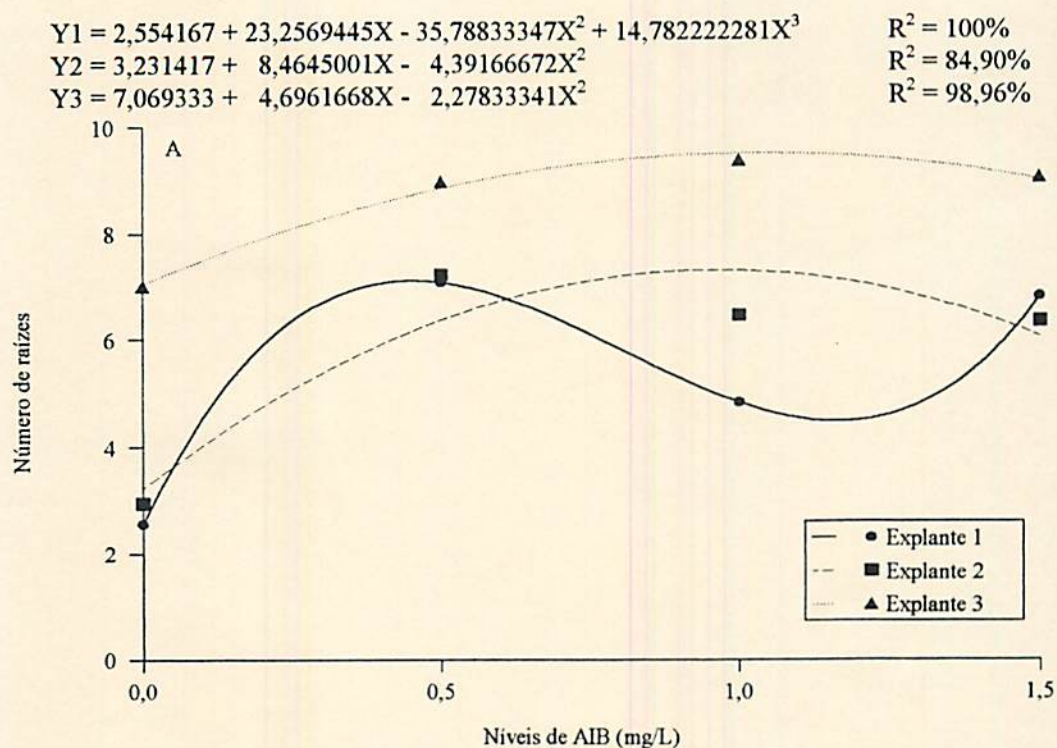


FIGURA 20. Número de raízes formadas em três diferentes tamanhos de explante secundário de *Heliconia* sp., provenientes de meio com TDZ (A) - (tamanho 1: 10 a 15 mm; tamanho 2: 15 a 20 mm e tamanho 3: 25 a 40 mm) e BAP (B) - (tamanho 1: 15 a 20 mm; tamanho 2: 30 a 35 mm e tamanho 3: 45 a 50 mm), cultivados em 1/2 MS com diferentes níveis de AIB. ESAL, Lavras-M.G., 1994.

Quando avaliou-se o comprimento das raízes observou-se um decréscimo de crescimento para todos os tamanhos de explantes, provenientes de meio com TDZ ou BAP a medida que se aumentava os níveis de AIB, o que pode ser verificado através das Figuras 21.A e 21.B. Isto se deve, segundo Went e Thimann (1937), a existência de duas fases de formação de raízes adventícias, a primeira é a fase de iniciação radicular, quando a exposição à auxina é essencial; na segunda fase, de emergência e desenvolvimento radicular, a auxina não é requerida ou é até mesmo inibitória. Foi exatamente o que observou-se com *Heliconia* sp., a adição de maiores concentrações de AIB no meio (1,0 e 1,5 mg/L) acarretou a formação de um maior número de raízes, principalmente para os explantes secundários de menor tamanho (explante 1 e explante 2) tanto para explantes originários de meio com BAP quanto para os originários de meio com TDZ. Esta então é a fase de iniciação citada pelos autores onde há a necessidade de exposição dos explantes à auxina. A segunda fase, de emergência e desenvolvimento radicular, quando a auxina não é requerida ou é inibitória, foi demonstrada pelo bom desenvolvimento das raízes de *Heliconia* sp. no meio sem auxina, para todos os tamanhos de explantes originários de BAP ou TDZ, além do menor crescimento de raízes à medida que se aumentou a concentração de AIB no meio de cultura. Este resultado demonstra a importância da exposição dos explantes à auxina na fase inicial de enraizamento e a necessidade de transferência destes explantes para meio livre de auxina na fase de desenvolvimento radicular. De acordo com Drew (1991), por causa da dificuldade e custo de transferência dos brotos para meio sem auxina, em cultura de tecidos comercial os brotos são usualmente deixados em meio contendo auxina por 3 a 4 semanas, com conseqüente prejuízo para a morfologia e alongamento de raízes.

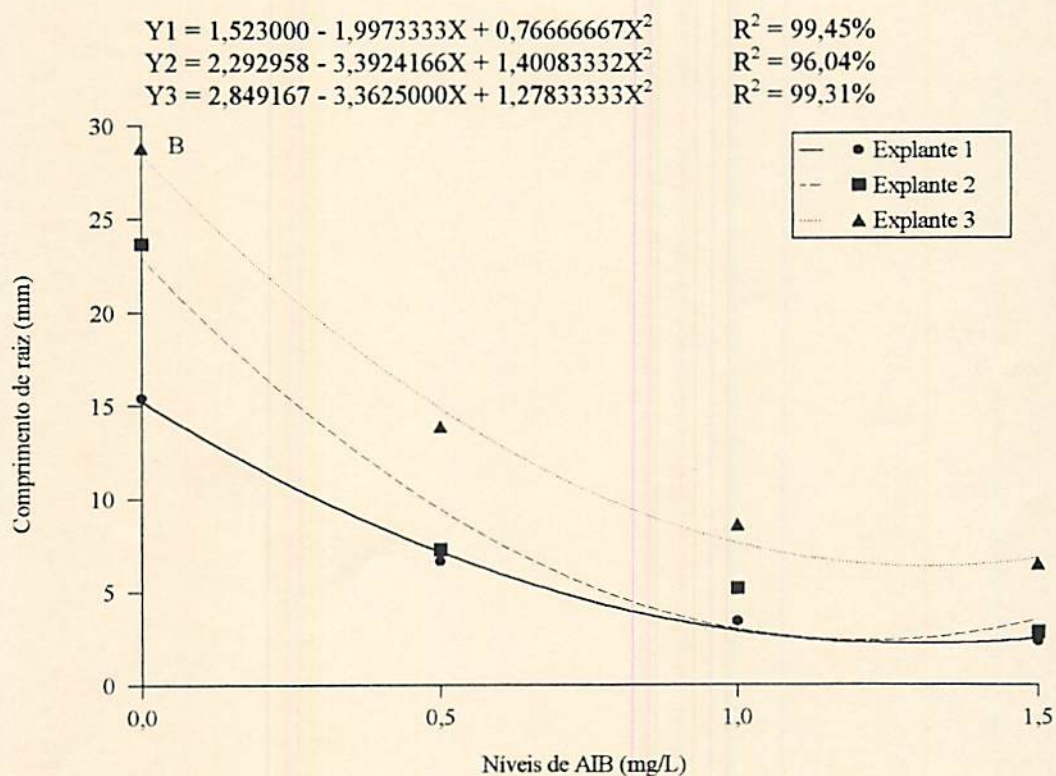
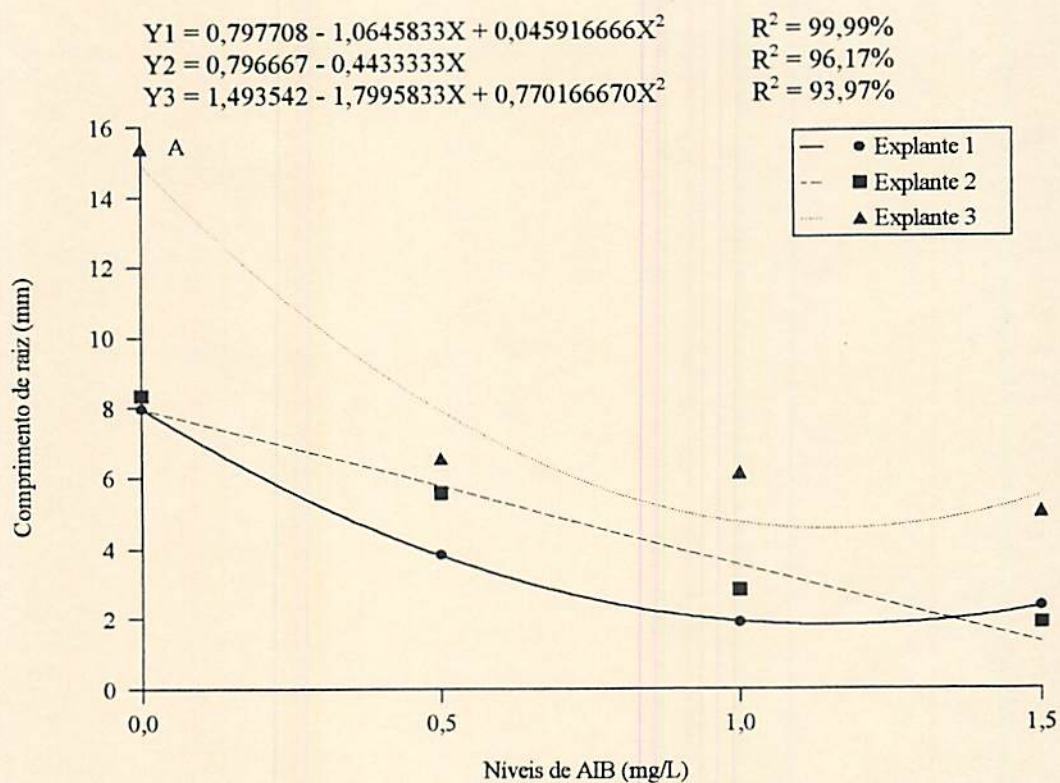


FIGURA 21. Comprimento de raízes em tamanhos diferentes de explantes secundários de *Heliconia* sp, provenientes de meio com TDZ (A) e com BAP (B), cultivados em 1/2 MS com diferentes níveis de AIB. ESAL, Lavras-M.G., 1994.

O efeito prejudicial da auxina na fase de crescimento de raízes pode ser acentuado pelo uso de AIB, pois, segundo Proebsting (1984) o ácido indolbutírico apresenta grande estabilidade no meio de cultura.

Apesar da ausência de ácido indolbutírico no meio de cultura favorecer o crescimento de raízes, o AIB induziu a formação de raízes mais espessas (Figura 22). Pode-se observar também o maior número e maior tamanho de raízes para explantes provenientes do meio com BAP em relação às que se originaram em meio com TDZ. Isto se deve certamente ao maior tamanho dos explantes que se desenvolveram em meio suplementado com BAP e também a uma maior atividade do TDZ em relação ao BAP, ou seja, o TDZ é mais estável e tem uma maior atividade, podendo atuar de maneira tóxica no enraizamento (Tabela 7).

Heliconia sp. enraizou com facilidade em meio sem a adição de auxina. Segundo Thorpe (1980) para algumas espécies a simples eliminação das citocininas exógenas é um suficiente estímulo para a diferenciação do sistema radicular. As diferenças genéticas da capacidade de enraizamento, de acordo com Haissig (1986), podem estar relacionadas com a atividade de enzimas específicas. Apesar da possibilidade de enraizamento sem AIB o tratamento com a auxina apresentou vantagens como a antecipação da indução radicular, aumento do número de raízes e uniformidade na formação de raízes.



FIGURA 22. Enraizamento de *Heliconia* sp., em três tamanhos diferentes de explantes secundários (T₁, T₂, T₃), provenientes de meio com BAP e TDZ, através do uso de níveis crescentes de ácido indolbutírico (AIB). ESAL, Lavras-M.G., 1994.

2.5 CONCLUSÕES

- É necessário a utilização de fungicida, (Benomyl), como tratamento inicial de rizomas de *Heliconia* sp., para a obtenção de gemas, quando estes são acondicionados em sacos de polietileno.
- A adição de antibiótico (Claforan), viabilizou a obtenção de explantes sem contaminação bacteriana.
- Dentre os níveis testados de BAP, a dosagem de 2,5 mg/L foi mais eficiente para a formação de brotos apresentando 2,21 brotos em média.
- Dentre os níveis testados de TDZ, a dosagem de 0,25 mg/L foi a que apresentou maior número de brotações: 2,05 brotos em média.
- O uso de BAP causou maior crescimento de brotos do que o TDZ.
- A exposição do explante secundário ao TDZ (0,25 mg/L) por dois dias resultou no seu maior crescimento e produziu brotos maiores com maior enraizamento.
- A exposição do explante secundário ao TDZ (0,25 mg/L) por oito dias resultou na maior produção de brotos (5,08).
- O tempo de imersão de 80 minutos produziu maior número de brotos e menor número de raízes.
- Não houve diferença marcante no crescimento e desenvolvimento dos brotos separados ou não dos tufos.
- *Heliconia* sp. enraiza com facilidade mesmo na ausência de auxinas no meio de cultura, sendo que a ausência de AIB também possibilitou um maior crescimento de raízes.

- Explantes secundários de menor tamanho apresentam um bom enraizamento, apesar dos explantes secundários maiores se mostrarem mais eficientes para produção e crescimento de raízes.

- A utilização do ácido indolbutírico (AIB) incrementa a formação de raízes, principalmente para explantes de menor tamanho, além de causar o aparecimento de raízes mais espessas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARNDT, F.; RUSCH, R.; STILFRIED, H.V. A new cotton defoliant. **Plant Physiology**, Washington, v.57, p.99, 1976.
- BALAKRISHNAMURTHY, G.; SREE, S.R. Regeneration of banana plantlets from "in vitro" culture of floral apices. **Current Science**, India, v.5, n.57, p.270-272, 1988.
- BLAKE, J. Mites and thrips as bacterial and fungal vectors between plant tissue cultures. **Acta Horticultural**, Wageningen, v.225, p.163-6, 1987.
- BOXUS, P.H.; TERZI, J.M. Big losses due to bacterial contamination can be avoided in mass propagation scheme. **Acta Horticultural**, Wageningen, v.212, p.91-3, 1987.
- BRIGGS, B.A.; McCULLOCH, S.M.; EDICK, L.A. Micropropagation of azaleas using thidiazuron. **Acta Horticultural**, Wageningen, v.226, p.205-8, 1988.
- CASSELS, A.C. Bacterial and bacteria-like contaminants of plant tissue cultures. **Acta Horticultural**, Wageningen, p.225, 1987.
- CASSELS, A.C. Production of healthy plants. In: ALDERSON, P.G.; DULLFORCE, W.M. Proceedings of the Institute of Horticulture Symposium: **Micropropagation in Horticulture**. Nottingham: University of Nottingham Trent Print, 1986. p. 53-71.
- CHIN-YI, LU. The use of thidiazuron in tissue culture. **In vitro cell**, Columbia, p.92-6, 1993.
- DEBERGH, P.C.; MAENE, L.J. A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. **Scientia horticultural**, Amsterdam, v.14, p.335-45, 1981.

- DONSELMAN, H.; BROSCAT, T.K. Production of *Heliconia psittacorum* for cut flowers in South Florida. **Fort Landerdale Res. Educ. Ctr. Ornamental Ornamentals Res. Rpt.**, EUA, p.86-91, 1986.
- DREW, R.A.; McCOMB, J.A.; CONSIDINE, J.A. Rhizogenesis and root growth of *Carica papaya* L. "in vitro" in relation to auxine sensitive phases and use of riboflavin. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v.33, n.1, p.1-7, 1993.
- DREW, R.A. Optimizing root initiation by controlling exposure to auxin. **International Plant Propagator's Society, Combined Proceedings**, 41, 1991.
- ELLIS, D.D.; BARCZYNSKA, H.; McCOWN, B.H.; NELSON, N. A comparison of BA, zeatin and thidiazuron for adventitious bud formation from *Picea glauca* embryos and epicotyl explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v.27, p.281-287, 1991.
- FASOLO, F.; ZIMMERMAN, R.H.; FORDHAM, I. Adventitious shoot formation on excised leaves of "in vitro" grown shoots of apple cultivars. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v.16, p.75-87, 1989.
- FELLMAN, C.D.; READ, P.E.; HOSIER, M.A. Effects of thidiazuron and CPPU on meristem formation and shoot proliferation. **HortScience**, Mont Vernon, v.22, n.6, p.1197-1200, 1987.
- GRAY, D.J.; BENTON, C.M. In vitro micropropagation and plant establishment of muscadine grape cultivars (*Vitis rotundifolia*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v.27, p.7-14, 1991.
- GRAY, D.J.; KLEIN, C.M. In vitro micropropagation and plant establishment of 'Blanc du Bois' grape. **HortScience**, The Hague, v.102, p.221-223, 1989.
- HAISSIG, B.E. Metabolic processes in adventitious rooting of cuttings. In: JACKSON, M.B. **New root formation in plants and cuttings**. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 1986. p.141-189.
- HOL, G.M.G.M.; van der LINDE, P.C.G. Reduction of contamination in bulb-explant cultures of *Narcissus* by a hot-water treatment of parent bulbs. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v.31, p.75-79, 1992.
- HUETTEMAN, C.A.; PREECE, J.E. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v.33, p.105-119, 1993.
- JARVIS, B.C. Endogenous control of adventitious rooting in non-woody cuttings. In: JACKSON, M.B. **New root formation in plants and cuttings**. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 1986. p.191-216.
- KAMINEK, M. Progress in cytokinin research. **Tibtech**, v.10, p.159-164, 1992.

- KERNS, H.R.; MEYER, M.M. In vitro propagation of redsilver hybrid maples. **HortScience**, Mont Vernon, v.20, p.593, 1985.
- KNEIFEL, W.; LEONHARDT, W. Testing of different antibiotics against Gram-positive and Gram-negative bacteria isolated from plant tissue culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v.29, p.139-144, 1992.
- LAMEIRA, O.A. Características do hipoclorito de sódio. Boletim Informativo. EMBRAPA-CPATU, C.P., Belém, , p.1-9, 1993.
- LEGGATT, I.V.; WAITES, W.M. Characterization of microorganism isolated from plants during micropropagation. **Acta Horticultural**, Wageningen, v.225, p.93-102, 1987.
- LEIFERT, C.; RITCHIE, J.Y.; WAITES, W.M. Contaminants of plant-tissue and cell cultures. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v.7, p.452-469, 1991.
- LEIFERT, C.; WAITES, W.M. Bacteria and yeasts; important contaminants in micropropagated plant cultures. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON PLANT TISSUE AND CELL CULTURE, 7, Dordrecht, 1990. **Abstracts...** Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1990. p.112.
- LEOPOLD, A.C.; KRIEDEMANN, P.E. **Plant growth and development**. 2.ed. New York: McGraw-Hill, 1975. p.109-35.
- MAENE, L.J.; DEBERGH, P. Liquid medium additions to established tissue cultures to improve elongation and rooting "in vivo". **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v.5, p.23-33, 1985.
- MEDFORD, J.I.; HORGAN, R.; EL-SAWI, Z.; KLEE, H.J. Alterations of endogenous cytokinins in transgenic plants using a chimeric isopentenyl transferase gene. **Plant Cell**, v.1, p.403-413, 1989.
- MEYER, H.J.; van STADEN, J. In vitro multiplication of *Ixia flexuosa*. **HortScience**, Mont Vernon, v.23, n.6, p.1070-1071, 1988.
- MOK, M.C.; MOK, D.W.S.; SHUDO, K. Cytokinin activity of N-phenyl-N'-1,2,3-thiadiazol-5-ylurea (thiadiazuron). **Phytochemistry**, Emsford, v.21, p.1509-1511, 1982.
- MOK, M.C.; MOK, D.W.S.; TURNER, J.E. Biological and biochemical effects of cytokinin-active phenylurea derivatives in tissue culture systems. **HortScience**, Mont Vernon, v.22, p.1194-1197, 1987.
- 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.

- NATHAN, M.J.; GOH, C.J.; KUMAR, P.P. In vitro propagation of *Heliconia psittacorum* by bud culture. **HortScience**, Mont Vernon, v.27, n.5, p.450-452, 1992.
- NÉMETH, G. Induction of rooting. **Biotechnology in Agriculture and Forestry**. Berlin: Springer Verlag, 1986. v.1, cap.4, p.49-50.
- NIELSEN, J.M.; BRANDT, K.; HANSEN, J. Long-term effects of thidiazuron are intermediate between benzyladenine, kinetin or isopentenyladenine in *Miscanthus sinensis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v.35, p.173-179, 1993.
- van NIEUWKERK, J.P.; ZIMMERMAN, R.H.; FORDHAM, I. Thidiazuron stimulation of apple shoot proliferation "in vitro". **HortScience**, Mont Vernon, v.21, p.516-518, 1986.
- PROEBSTING, W.M. Rooting of douglas-fir stem cuttings: relative activity of IBA and NAA. **HortScience**, Mont Vernon, v.19, n.6, p.854-856, 1984.
- SATO, A. Y. **Propagação de Gérbera de vaso através da cultura de tecidos**. Lavras: ESAL, 1994. 95 p. (Dissertação- Mestrado em Fitotecnia).
- SEABROOK, J.E.A. Narcissus (Daffodil). In: AMMIRATO, P.V.; EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; BAJAJ, Y.P.S. **Handbook of Plant Cell Culture**. V. Ornamental Species. New York: McGraw-Hill Publishing Company, 1990. p.577-597.
- SINGHA, S.; BISSONNETTE, G.H.; DOUBLE, M.L. Methods for sterilising instruments contaminated with *Bacillus* sp. from plant tissue cultures. **Horticultural Science**, v.22, p.659, 1987.
- SWAMY, R.D.; SAHIJRAM, L. Micropropagation of banana from male floral apices cultured "in vitro". **Scientia Horticulturae**, Índia, v.3, n.40, p.181-188, 1989.
- THOMAS, J.C.; KATTERMAN, F.R. Cytokinin activity induced by thidiazuron. **Plant Physiology**, Washington, v.81, p.681-683, 1986.
- THORPE, T.A. Enraizamiento de los brotes y preparación para su transplante. **Cultivo de Tejidos en la Agricultura**, 1980. p.130.
- WENT, F.W.; THIMANN, K.V. Root formation. **Phytohormones**, New York: Mac Millan, 1937. p.183-206.
- ZIMMERMAN, T.W.; SCORZA, R. Shoot growth and proliferation of peach under varying environmental regimes. **HortScience**, Mont Vernon, v.27, p.696, 1992.

3 EFEITO DE DIFERENTES NÍVEIS DE NITROGÊNIO E CÁLCIO, COMBINADOS COM BAP E TDZ, NO DESENVOLVIMENTO DE *Heliconia* sp. "IN VITRO"

RESUMO


Explantes secundários medindo de 20 a 30 mm de comprimento foram transferidos para meio MS com BAP (2,5 mg/L) e meio MS com TDZ (0,25 mg/L) nos quais variou-se a concentração de nitrogênio e relação $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$, constituindo-se o 1º experimento, e concentração de cálcio, 2º experimento. No 1º experimento variou-se as quantidades fornecidas de nitrogênio (em mg/L): 840,00; 551,60; 407,40; 335,44 e 263,20. Quando se utilizou BAP o maior número de brotos observados foi com a adição de nitrogênio total no meio MS (840,00 mg/L). Para TDZ o maior número e maior tamanho de brotos observados foi com a adição de 335,44 mg/L de nitrogênio. Tanto para BAP como para TDZ a ausência da solução NH_4NO_3 no meio, ou seja, redução do nitrogênio total, foi favorável para o maior desenvolvimento do sistema radicular. No 2º experimento variou-se as quantidades fornecidas de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (em mg/L): 880; 440; 220; 110, e ausência do nutriente. Tanto para BAP como para TDZ o maior crescimento de explante secundário foi observado com 880 mg/L de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, o dobro de cálcio usualmente utilizado no meio MS. Para tamanho de brotos em BAP o melhor nível encontrado foi também o dobro da concentração, e, para TDZ a utilização de metade da concentração usual de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

(220 mg/L) proporcionou o maior crescimento de brotos. A quantidade normal de cálcio no meio MS, (440 mg/L de $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$), favoreceu a formação de brotos para TDZ. Os níveis de 110 e 220 mg/L de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ foram ótimos para enraizamento para meio com TDZ e no meio com BAP, respectivamente.

3.1 REFERENCIAL TEÓRICO

Depois da sacarose os minerais constituem o grupo mais importante de nutrientes para o desenvolvimento “in vitro”. Há uma larga escolha de combinações de macro e microelementos e esta é fortemente dependente da espécie de planta a ser micropropagada (Pierik, 1987). Segundo Murashige e Skoog (1962) mesmo os tecidos originários de diferentes partes de uma planta podem possuir diferentes requerimentos para um desenvolvimento satisfatório, como tal, nunca um único meio pode ser recomendado como inteiramente satisfatório para todos os tipos de tecidos e órgãos.

O meio de Murashige e Skoog (1962) é muito popular porque a maioria das plantas reagem favoravelmente a ele. Entretanto a relação de nutrientes deve ser melhor estudada para cada espécie, pois, a quantidade de sais neste meio é elevada. Por exemplo *Gerbera* é sensível a sais “in vitro” tal como *Rhododendron* e *Kalmia* (Pierik, 1987). Segundo George e Sherrington (1984), apesar dos macronutrientes do meio MS ser um bom ponto inicial para o desenvolvimento de outro meio, soluções mais diluídas poderiam ser mais adequadas em algumas circunstâncias. Eriksson (1965) conseguiu acentuar a taxa de desenvolvimento da cultura de células de *Haplopappus gracilis* reduzindo a concentração de nitrato de amônio do meio MS para 75%.



Nitrogênio e cálcio estão incluídos entre os seis elementos, (nitrogênio, fósforo, enxofre, cálcio, potássio, magnésio), que são requeridos em grandes quantidades, comparativamente, e por isso determinados de macroatomtos. De acordo com recomendações da Associação Internacional de Fisiologia de Plantas os elementos requeridos pelas plantas em concentrações maiores que $0,5 \text{ mMol L}^{-1}$ são referidos como macroatomtos e aqueles requeridos em concentrações menores que $0,5 \text{ mMol L}^{-1}$ são microatomtos (De Fossard, 1976). Qualitativamente os nutrientes inorgânicos requeridos para várias plantas parecem ser razoavelmente constantes.

De acordo com George e Sherrington (1984), o desenvolvimento e morfogênese em cultura de tecidos são acentuadamente influenciados pela disponibilidade de nitrogênio e a forma na qual o mesmo é fornecido. Apesar do nitrogênio (N) ser algumas vezes parcialmente provido em forma orgânica, é usual suprir N em forma de íons NH_4^+ e NO_3^- . O total de N requerido é de 168 a 840 mg/L, e a quantidade de NH_4^+ varia de 108-360 e NO_3^- de 372 a 2480 mg/L. A maioria das plantas priorizam a absorção de NO_3^- à NH_4^+ , apesar de existirem exceções. É necessário encontrar o balanço ideal de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ para o ótimo crescimento e desenvolvimento "in vitro" (George e Sherrington, 1984).

Normalmente o meio de cultura não é tamponado, e a adoção de concentrações de íons de amônio e nitrato têm, portanto, sido mais adequada para o controle de pH que para o requerimento do tecido vegetal para uma ou outra forma de nitrogênio. Absorção de nitrato requer um pH ácido, mas torna o meio mais básico. Pelo contrário a absorção de amônio torna o meio mais ácido, pela excreção de H^+ . Com o abaixamento do pH a absorção de amônio é inibida. Portanto, em meios que não são tamponados a absorção eficiente de nitrogênio pode depender da presença de ambos os íons (George e Sherrington, 1984).

Plantas podem se desenvolver em soluções contendo nitrogênio somente na forma de nitrato, tanto que pesquisadores chegaram a assumir que íons de amônio eram desnecessários (George e Sherrington, 1984). Meios tal como Gautheret (1942) e White (1943), possuíam unicamente nitrato. Entretanto, quando nitrato é a única fonte de nitrogênio, nitrito pode ser acumulado no meio e tornar-se tóxico, pela baixa atividade da enzima redutase de nitrito (Jordan e Fletcher, 1979).

O meio B₅ (Gamborg, Miller e Ojima, 1968) contém níveis mais altos de NO₃⁻ e baixa concentração de NH₄⁺, níveis superiores a 2 mM NH₄⁺ foram depreciativos para o desenvolvimento de células de soja. Ohira, Ojima e Fujiwara (1973), trabalhando com suspensão de células de arroz observaram benefícios com o aumento da concentração de NO₃⁻ e NH₄⁺ em relação ao meio B₅ de Gamborg.

Evans, Sharp e Paddock (1976), observaram um bom desenvolvimento de calos de soja quando NH₄NO₃ (meio MS), foi substituído por (NH₄)₂SO₄, e a concentração molar de NH₄⁺ foi reduzida para aproximadamente um terço.

Nitsch e Nitsch (1969) concluíram que NH₄⁺ foi indesejável para o desenvolvimento de alcachofra, pois 0,1 mM de cloreto de amônio causou redução no crescimento. Já Wood e Braun (1961), investigando o desenvolvimento de *Catharanthus roseus*, obtiveram evidentes benefícios pela adição de amônio no meio de White (1943).

Knudson (1946) descobriu que sementes de orquídeas têm favorável germinação "in vitro" em meio contendo íons de amônio. Morel (1960), obteve resultados pioneiros na formação de protocormos de orquídea "in vitro" em meio contendo 136,8 mg/L NH₄⁺ e 527,0 mg/L NO₃⁻. A importância de íons de amônio para o desenvolvimento de plântulas de orquídea tem sido enfatizada por outros pesquisadores como Uesato (1973), Ichihashi e Yamashita (1977),

e Ichihashi (1979) citados por George e Sherrington (1984). O íon NH_4^+ é essencial “in vitro” para o desenvolvimento de protocormos em orquídea (De Bruijne e Debergh, 1974 citados por George e Sherrington, 1984).

O íon NH_4^+ influencia na divisão celular. Segundo Meyer e Abel (1975) o fator que determina formação de parede celular somente é efetivo quando NH_4^+ está presente no meio. O fornecimento de nitrogênio reduzido estimula a divisão de protoplastos (Poirier-Hamon, Rao e Harada, 1974) e células em cultura, além de abaixar o requerimento dos tecidos por citocinina. Por exemplo, Sargent e King (1974) citados por George e Sherrington (1984), determinaram que células de soja são dependentes de citocinina quando cultivadas em meio contendo nitrogênio na forma de NO_3^- , mas independente de citocinina quando NH_4^+ estava presente. Similarmente, em experimentos de Meyer e Abel (1975), a presença de NH_4^+ ou glutamina reduzia a necessidade de citocinina em protoplastos de fumo, e a divisão se procedia sem nenhuma adição de citocinina quando uréia foi adicionada ao meio. Nitrogênio reduzido pode ser importante para a formação direta de brotos em algumas espécies. Cotilédones de alface reduziram a formação de brotos quando NH_4NO_3 foi omitido dos sais de Miller (1961), segundo Doerschug e Miller (1967).

O desenvolvimento de plantas “in vitro” é possível em meio contendo somente íons NH_4^+ , mas é geralmente lento ou não existente para meios não tamponados. O desenvolvimento é normalmente mais rápido quando ambos os íons estão disponíveis (George e Sherrington, 1984).

O cálcio funciona como regulador do metabolismo celular da planta (Kauss, 1987), além de ser um dos constituintes da parede celular. Estudos indicaram que Ca^{2+} é essencial em condições “in vitro” e que a ausência deste macroelemento prejudica a formação da parede celular, conseqüentemente tornando-a suscetível às injúrias (Eklund e Eliasson, 1990).

Experimentos realizados por pesquisadores da Universidade de Tecnologia do Texas, A.W. Roberts e C.H. Haigler citados por Herman (1991), indicaram a importância do cálcio para incrementar o processo de diferenciação de células de plantas "in vitro". Os autores demonstraram também que a diferenciação de elementos de vaso por células do mesofilo de *Zinnia elegans* em suspensão é inibida pela redução de cálcio abaixo do nível de 1 mM.

Segundo Herman (1991), Jansen e Vries obtiveram acréscimo na produção de embriões somáticos em cenoura quando aumentaram a concentração de cálcio do meio acima de 40 mg/L.

Desamero et al. (1993), micropropagando melancia, determinaram que foi mínima a utilização de Ca^{++} em meio de multiplicação e alongamento. Resíduos de Ca^{++} do meio foram quantificados após 35 dias de cultura, encontrou-se 81,0% da concentração de cálcio inicial.

O'Brien e Lindsay (1993) regeneraram plantas de protoplasto da espécie *Eustoma grandiflorum* (Griseb.) Schinners. A viabilidade dos protoplastos e conseqüente regeneração de plantas foram dependentes do nível de cálcio no meio de cultura. O mais alto potencial regenerativo ocorreu quando o nível de CaCl_2 foi de 440 mg/L. Hiperhidricidade foi observada em plantas desenvolvidas em meios com 220 e 880 mg/L de CaCl_2 , as quais não se regeneraram.

3.2 OBJETIVO

Este experimento teve por objetivo determinar as quantidades adequadas dos nutrientes cálcio e nitrogênio, combinados com BAP e TDZ, a partir do meio MS, para o ótimo desenvolvimento de *Heliconia* sp. "in vitro".

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

Explantos secundários com 20 a 30 mm de comprimento foram transferidos para meio MS suplementado com 2,5 mg/L de BAP ou 0,25 mg/L de TDZ. Ao meio foi acrescentado 6,5 g/L de ágar, e o pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem. Os tubos de ensaio (25 x 150 mm), com 15 ml de meio, vedados com tampa plástica, foram autoclavados a 120°C durante 20 minutos.

Após a inoculação os explantes foram colocados em sala de crescimento a temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e 2000 lux de luminosidade.

O modelo estatístico utilizado para os experimentos com nitrogênio e cálcio foi o Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) com 5 repetições por tratamento e 4 tubos por repetição.

As avaliações foram realizadas 40 dias após a inoculação dos explantes.

-Variação dos níveis de nitrogênio e relação $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$

Variou-se a concentração de nitrogênio através da manipulação da solução estoque que contém 1650 mg/L de nitrato de amônio, permanecendo invariável a solução estoque de 1900 mg/L de nitrato de potássio, do meio Murashige e Skoog (1962).

Constituiu-se dez tratamentos com cinco níveis de nitrogênio e dois reguladores de crescimento. Os cinco níveis obtidos de nitrogênio estão demonstrados na Tabela 8.

Foram avaliadas as seguintes características por tratamento: número e tamanho de brotos, coloração de folhas, tamanho do explante secundário, número de raízes, peso da matéria fresca e peso da matéria seca de raiz e da parte aérea.

TABELA 8. Variação dos níveis de nitrogênio e relação $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ do meio MS. ESAL, Lavras-M.G., 1994.

Tratamentos (Variação da solução NH_4NO_3)	mM		N total em mM	N total em mg/L	Relação dos íons $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$	% N do meio MS
	NO_3	NH_4				
1 (1/1)	39,40	20,60	60,00	840,00	1,91:1,0	100
2 (1/2)	29,10	10,30	39,40	551,60	2,82:1,0	66
3 (1/4)	23,95	5,15	29,10	407,40	4,65:1,0	49
4 (1/8)	21,38	2,58	23,96	335,44	8,30:1,0	40
5 (0)	18,80	0,00	18,80	263,20	-	31

- Variação dos níveis de cálcio

Para a realização deste experimento várias concentrações de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ foram adicionadas ao meio MS constituindo-se 5 níveis de cálcio, como mostra a Tabela 9, a seguir:

TABELA 9. Variação dos níveis de cálcio do meio MS. ESAL, Lavras-M.G., 1994.

Tratamento	Quantidade de cálcio fornecida em relação ao meio MS	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (mM)	Concentração de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (mg/L)
1	0	0	0
2	1/4	0,75	110
3	1/2	1,49	220
4	1	2,99	440
5	2	5,98	880

Variando-se também o tipo de citocinina utilizada BAP (2,5 mg/L) ou TDZ (0,25 mg/L) constituiu-se ao todo 10 tratamentos.

Foram avaliadas as seguintes características por tratamento: número e tamanho de brotações, coloração de folhas, número de raízes e tamanho de explantes secundários.

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1 Variação dos níveis de nitrogênio e relação $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$

Os diferentes níveis de nitrogênio não afetaram o crescimento de brotos de *Heliconia* sp. quando se utilizou BAP no meio de cultura. Mas para a formação dos brotos o melhor tratamento foi o que forneceu a quantidade total de nitrogênio do meio MS (840 mg/L) com a utilização de BAP (Figura 23). Pode-se observar um baixo índice de formação de brotos no presente experimento, quando comparado com experimentos anteriores (Tabelas 10 e 11). Isto provavelmente se deve aos sucessivos cultivos do explante.

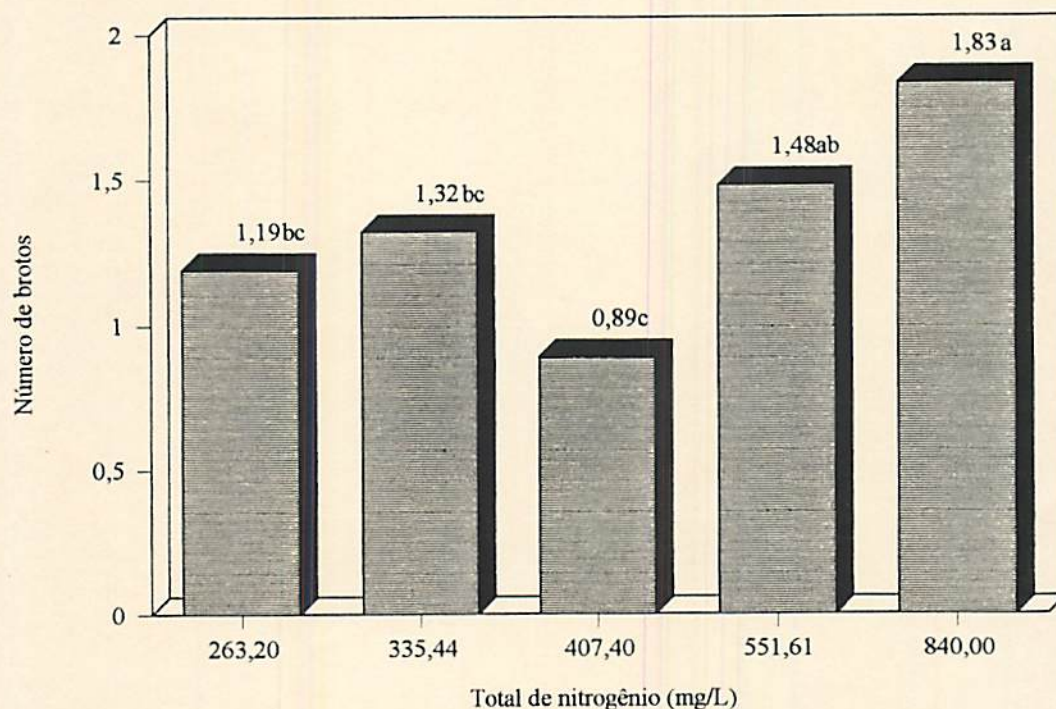


FIGURA 23. Produção de brotos em *Heliconia* sp. com vários níveis de nitrogênio no meio de cultura MS e adição de 2,5 mg/L de BAP, após 40 dias de cultivo. ESAL, Lavras-M.G., 1994.

Segundo Doerschug e Miller (1967) nitrogênio reduzido pode ser importante para a formação direta de brotos em algumas espécies. Nos tratamentos realizados NH_4^+ foi reduzido de 370,80 mg/L, quantidade normal do meio MS, até a ausência total de amônio no meio de cultura. Esta redução causou a menor produção de brotos quando se utilizou o regulador de crescimento BAP. De acordo com Meyer e Abel (1975) o íon NH_4^+ influencia na divisão celular, segundo os autores o fator que determina a formação de parede celular somente é efetivo quando NH_4^+ está presente no meio. Poirier - Hamon, Rao e Harada (1974) citam que o fornecimento de nitrogênio reduzido estimula a divisão de protoplastos, além de abaixar o requerimento dos tecidos por citocinina. Sargent e King (1974), citados por George e Sherrington (1984), em experimento com células de soja determinaram que estas são dependentes de citocinina quando cultivadas em meio contendo nitrogênio na forma de NO_3^- , mas independente de citocinina quando NH_4^+ estava presente no meio.

Discordando com essas afirmações alguns autores afirmaram que plantas podem se desenvolver em soluções contendo nitrogênio somente na forma de nitrato e que íons de amônio eram desnecessários (George e Sherrington, 1984). Meios como o de Gautheret (1942) e White (1943) possuem unicamente nitrato.

Quando utilizou-se TDZ no meio de cultura o fornecimento de 335,44 mg/L de nitrogênio e redução da quantidade total de NH_4^+ de 370,80 para 46,44 mg/L foi mais eficiente para a formação e crescimento de brotos (Figuras 24.A e 24.B). A menor necessidade de nitrogênio reduzido para a formação de brotos de TDZ em relação a BAP provavelmente se deve a alta atividade biológica de thidiazuron para a divisão de células. A obtenção de brotos maiores com menor quantidade de NH_4^+ no meio (46,44 mg/L) com a utilização de TDZ concorda com Nitsch e Nitsch (1969) que concluíram que NH_4^+ foi indesejável para o desenvolvimento de

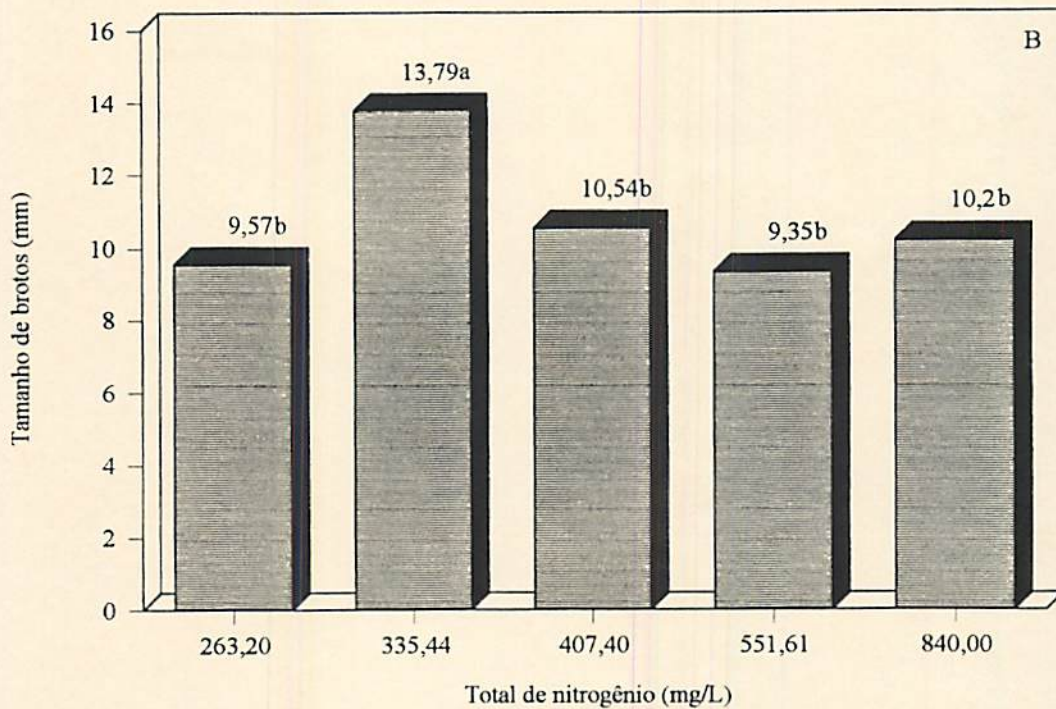
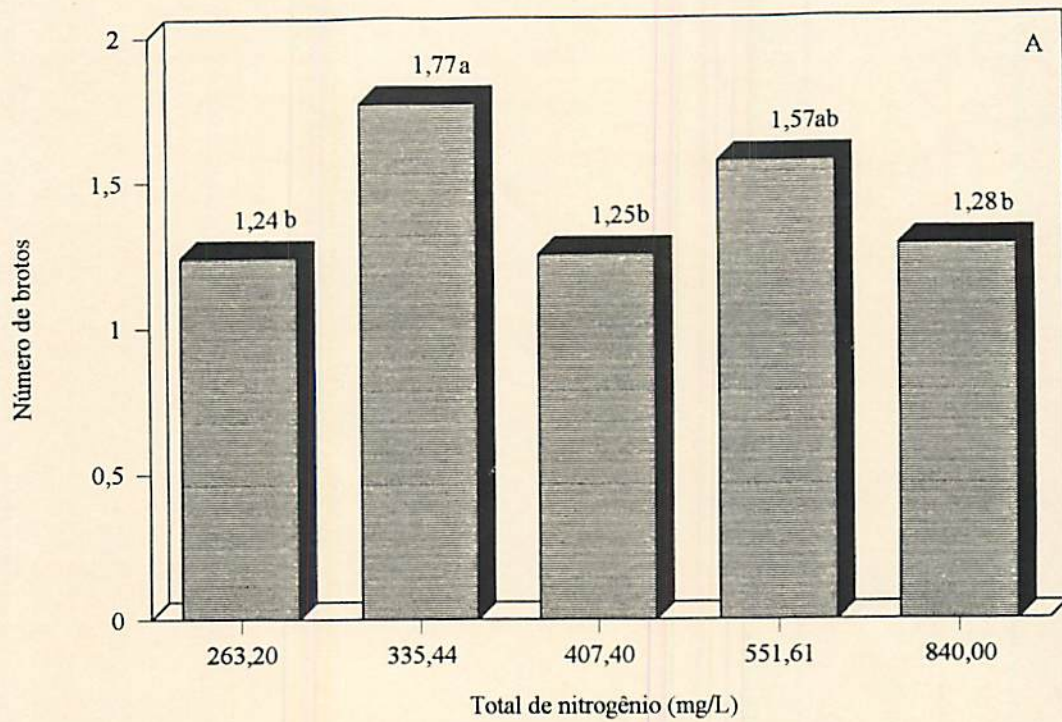


FIGURA 24. Produção (A) e crescimento de brotos (B) de *Heliconia* sp., com vários níveis de nitrogênio no meio de cultura MS e adição de 0,25 mg/L de TDZ. ESAL, Lavras-M.G., 1994.

alcachofra, pois 0,1 mM de cloreto de amônio causou redução no crescimento. Também Evans, Sharp e Paddock (1976), observaram um bom desenvolvimento de calos de soja quando a concentração molar de NH_4^+ foi reduzida para aproximadamente um terço. Por outro lado Uesato (1973), Ichihashi e Yamashita (1977) e Ichihashi (1979) citados por George e Sherrington (1984), enfatizam a importância de íons de amônio para o desenvolvimento de plântulas de orquídea.

A ausência da solução NH_4NO_3 permitiu o desenvolvimento de um maior número de raízes quando se utilizou TDZ (Figura 25.A) e maior peso da matéria fresca de raízes quando se utilizou BAP (Figura 25.B). Este resultado pode ser explicado segundo a relação C/N. Segundo Haissig (1986) a relação carbono/nitrogênio tem sido utilizada para estimar a influência de nitrogênio e de carboidrato em enraizamento. De acordo com o autor geralmente a alta relação C/N favorece o enraizamento. Considerando que o nível de carbono manteve-se constante em todos os tratamentos, a alteração da relação C/N ocorreu segundo o fornecimento de NH_4NO_3 . A máxima relação C/N pode ter ocorrido com a ausência de NH_4NO_3 no meio quando então obteve-se um maior enraizamento de *Heliconia* sp. para meio suplementado com BAP.

Níveis de nitrato têm mostrado estrita relação com enraizamento. Segundo Hyndman, Hasegawa e Bressan (1982) nitrato influenciou positivamente o enraizamento de brotos da roseira. Com a ausência da solução NH_4NO_3 no meio de cultura a fonte de nitrogênio inorgânico dos explantes foi KNO_3 . A presença de íons nitrato pode ter beneficiado então o enraizamento de *Heliconia* sp.

O tamanho do explante secundário cultivado não foi afetado pelos diversos tratamentos (Tabelas 10 e 11). Também pode-se observar nas Tabelas 10 e 11 que os diferentes níveis de nitrogênio não causaram alteração em peso da matéria fresca e peso da matéria seca da parte aérea da plântula.

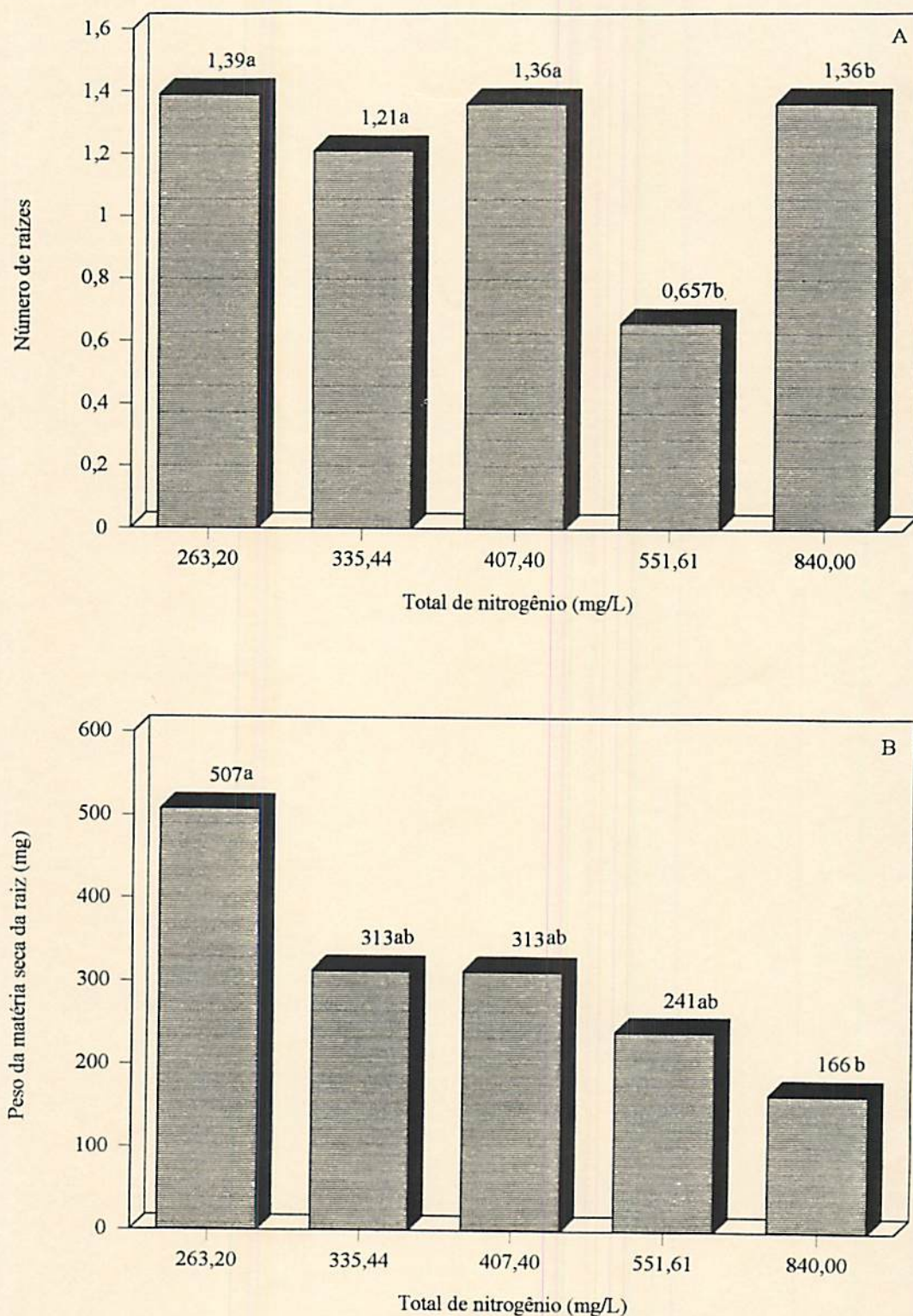


FIGURA 25. Quantidade de raízes produzidas com 0,25 mg/L de TDZ (A) e peso da matéria fresca (PMF) de raízes com 2,5 mg/L de BAP (B), através da variação de níveis de nitrogênio no meio MS para *Heliconia* sp. ESAL, Lavras-M.G., 1994.

TABELA 10. Características avaliadas em *Heliconia* sp. através da variação de níveis de nitrogênio fornecido em meio MS suplementado com 2,5 mg/L de BAP. ESAL, Lavras-M.G., 1994.

Total de N em mg/L	Número médio de brotos	Tamanho médio dos brotos (mm)	Tamanho médio do explante (mm)	Número médio de raízes	Raiz		Parte aérea		Teor de N na planta (%)
					PMF (mg)	PMS (mg)	PMF (mg)	PMS (mg)	
840,00	1,83 a	17,0 a	36,8 a	3,99 a	170 b	10 a	1940 a	140 a	7,96
551,60	1,48 ab	17,0 a	36,7 a	4,22 a	240 ab	20 a	1540 a	120 a	6,20
407,40	0,90 c	16,3 a	35,6 a	3,41 a	310 ab	20 a	1520 a	120 a	6,26
335,44	1,32 bc	15,9 a	36,2 a	4,02 a	310 ab	20 a	1750 a	130 a	5,53
263,20	1,20 bc	13,9 a	34,8 a	4,27 a	510 a	30 a	1270 a	130 a	2,76

Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

TABELA 11. Características avaliadas em *Heliconia* sp. através da variação de níveis de nitrogênio fornecido em meio MS suplementado com 0,25 mg/L de TDZ ESAL, Lavras-M.G., 1994.

Total de N em mg/L	Número médio de brotos	Tamanho médio de brotos (mm)	Tamanho médio de explante (mm)	Número médio de raízes	Raiz		Parte aérea		Teor de N na planta (%)
					PMF (mg)	PMS (mg)	PMF (mg)	PMS (mg)	
840,00	1,28 b	10,2 b	35,3 a	1,36 a	20 a	3 a	1690 a	130 a	7,32
551,60	1,57 ab	9,3 b	35,1 a	0,66 b	10 a	1 a	1580 a	140 a	6,60
407,40	0,25 b	10,5 b	34,2 a	1,36 a	20 a	2 a	1100 a	100 a	6,50
335,44	1,77 a	13,8 a	33,9 a	1,21 a	50 a	5 a	1850 a	130 a	6,24
263,20	1,24 b	9,6 b	34,5 a	1,39 a	20 a	2 a	1430 a	100 a	3,88

Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

O teor de nitrogênio na planta, fornecido pela análise mineral da parte aérea, demonstra um nível decrescente de absorção deste nutriente pelo explante secundário a medida que se diminuía a disponibilidade de nitrogênio no meio de cultura (Tabelas 10 e 11).

Como nas diversas características avaliadas obteve-se resultados similares nos tratamentos com ou sem presença de NH_4NO_3 no meio de cultura, exceção feita para número e tamanho de brotos em TDZ, enraizamento e número de brotos em BAP (Figura 26), pode-se supor que as quantidades mínimas de nitrogênio assimiladas por *Heliconia* sp. em meio com BAP (2,76%) e com TDZ (3,88%) foram suficientes para o desenvolvimento da plântula, além desta ter priorizado a absorção de nitrato ao amônio, então suprimido do meio. Segundo George e Sherrington (1984) plantas podem se desenvolver em soluções contendo somente nitrogênio na forma de nitrato, pois a maioria das plantas priorizam a absorção de NO_3^- a NH_4^+ .

3.4.2 Variação dos níveis de cálcio

Avaliando-se tamanho dos explantes secundários pode-se observar que quando se utilizou o dobro de cálcio indicado para o meio MS, 880 mg/L, conseguiu-se obter maior crescimento dos explantes secundários para o meio suplementado com BAP (57,1mm) e suplementado com TDZ (65,6 mm), Tabela 12 e Figuras 27.A e 27.B. O nível de cálcio 880 mg/L foi prejudicial para a espécie *Eustoma grandiflorum* segundo O'Brien e Lindsay (1993). Os autores observaram hiperhidricidade em plantas desenvolvidas com esta quantidade de cálcio. Entretanto este nível de cálcio também influenciou positivamente o tamanho de brotos quando se utilizou BAP (Figura 28.A), mas para TDZ a concentração de 220 mg/L foi a que causou um maior incremento para o tamanho de brotos, como podemos observar através da Figura 28.B.

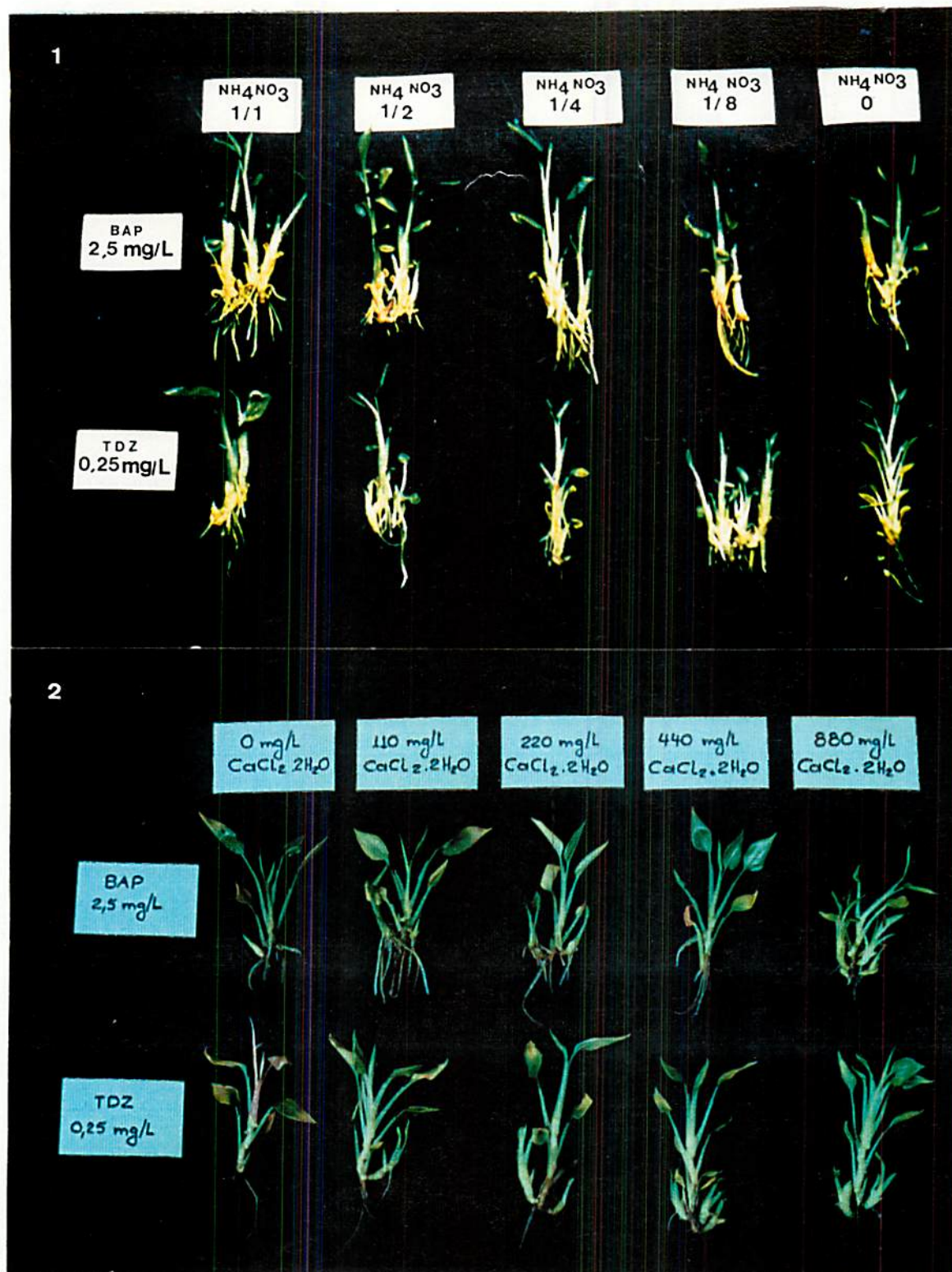


FIGURA 26. Desenvolvimento de *Heliconia* sp. com a utilização de vários níveis de nitrogênio (1) e cálcio (2) combinados com BAP e TDZ, após 40 dias de cultivo. ESAL, Lavras-M.G., 1994.

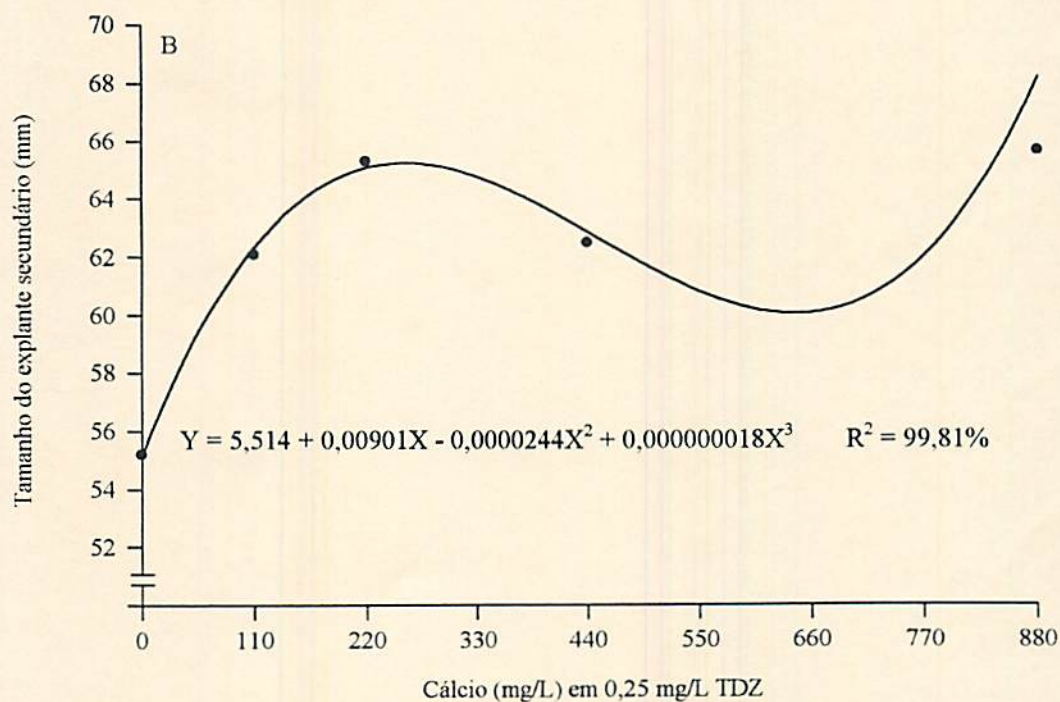
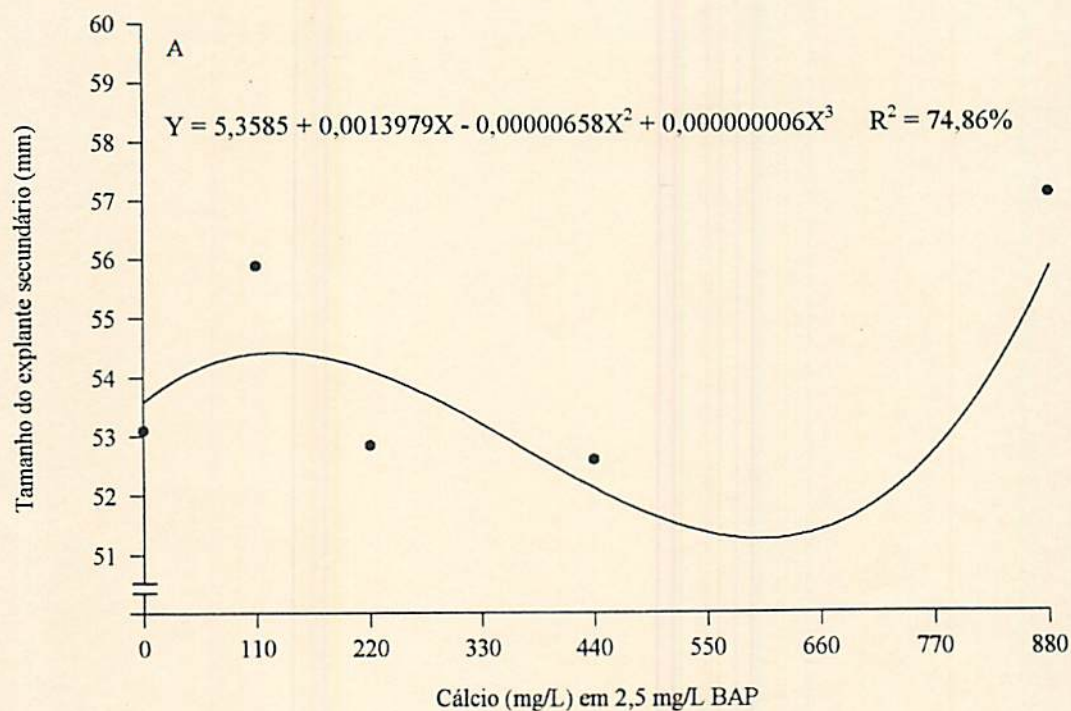


FIGURA 27. Crescimento de explantes secundários de *Heliconia* sp. com diferentes níveis de cálcio em meio MS suplementado com 2,5 mg/L de BAP (A) e 0,25 mg/L de TDZ (B). ESAL, Lavras-M.G., 1994.

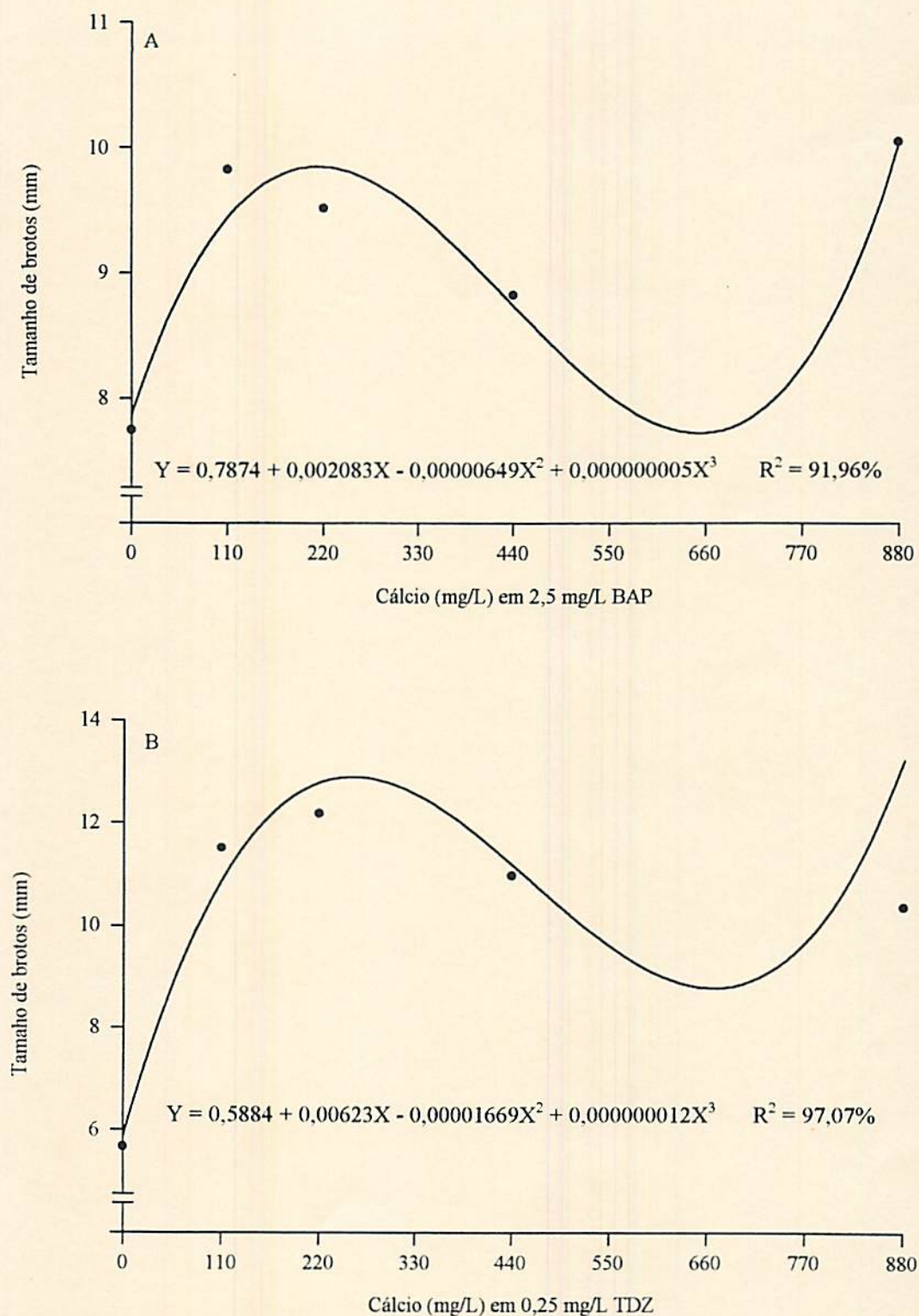


FIGURA 28. Crescimento de brotos de *Heliconia* sp. com diferentes níveis de cálcio em meio MS suplementado com 2,5 mg/L de BAP (A) e 0,25 mg/L de TDZ (B). ESAL, Lavras-M.G., 1994.

A quantidade de 440 mg/L de cálcio, normalmente fornecida pelo meio MS, foi a que mais favoreceu a formação de brotos quando o meio foi suplementado com TDZ (Figura 29). No trabalho de O'Brien e Lindsay (1993) com *E. grandiflorum* o mais alto potencial regenerativo também ocorreu com o nível de CaCl_2 em 440 mg/L. Quando se utilizou BAP os diferentes níveis de cálcio não influenciaram significativamente a formação de brotos, sendo que os diferentes tratamentos apresentaram resultados similares. Desamero et al. (1993) micropropagando melancia, determinaram que foi mínima a utilização de cálcio em meio de multiplicação e alongamento. Encontrou-se 81% da concentração de cálcio inicial no meio após 35 dias de cultura.

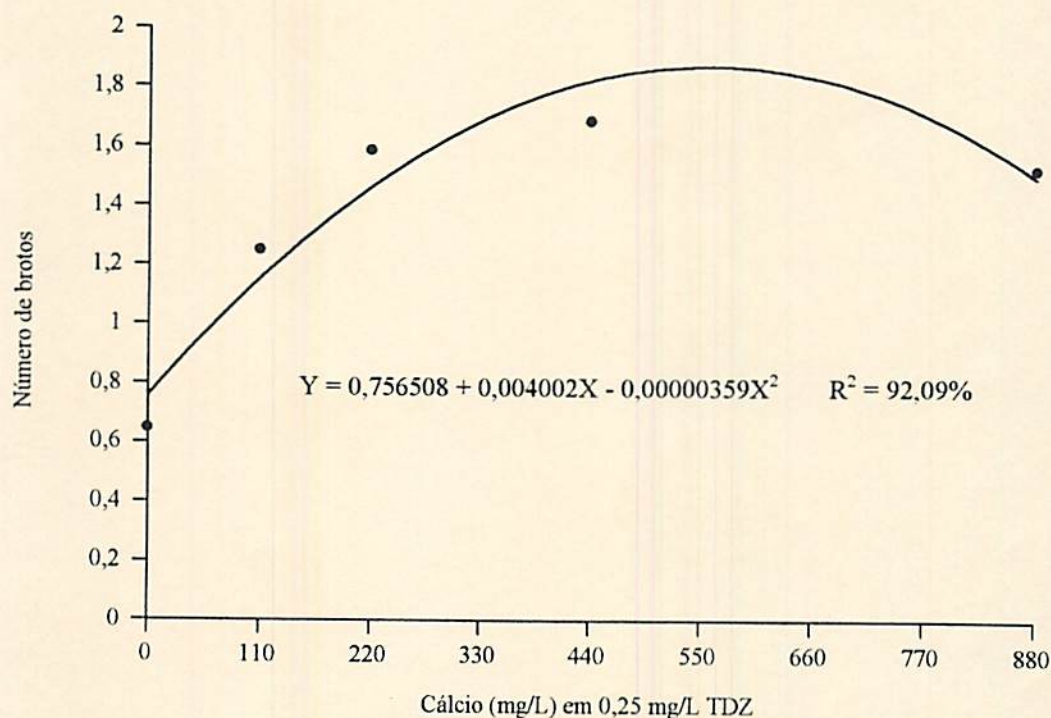


FIGURA 29. Número de brotos obtidos com níveis crescentes de cálcio em meio MS suplementado com 0,25 mg/L de TDZ. ESAL, Lavras-M.G., 1994.

O maior enraizamento para TDZ e BAP foi obtido com 110 e 220 mg/L de cálcio, respectivamente (Tabela 12).

TABELA 12. Efeito do cálcio associado com BAP e TDZ no crescimento de explantes secundários, número e crescimento de brotos e número de raízes de *Heliconia* sp. ESAL, Lavras-M.G., 1994.

Total de cálcio em mg/L	Tamanho médio de explante (mm)		Número médio de brotos		Tamanho médio de brotos (mm)		Número médio de raízes	
	BAP	TDZ	BAP	TDZ	BAP	TDZ	BAP	TDZ
0	53,1	55,2	0,91	0,65	7,8	5,7	2,14	0,95
110	55,9	62,1	1,02	1,25	9,8	11,5	1,66	1,85
220	52,8	65,3	0,81	1,59	9,5	12,2	2,88	1,18
440	52,6	62,5	0,99	1,69	8,8	11,0	2,23	1,50
880	57,1	65,6	1,04	1,53	10,0	10,4	1,75	1,53

A diferença na necessidade de cálcio dos explantes secundários para crescimento, formação de brotos e enraizamento, além das diferenças impostas pela adição de distintos reguladores de crescimento no meio de cultura (TDZ e BAP) pode ser explicada por Murashige e Skoog (1962).

A diferença entre os tratamentos não foi discrepante para nenhuma das características avaliadas acima relacionadas (Tabela 12). Quanto à coloração de folhas os níveis de cálcio abaixo do comumente utilizado no meio MS, 440 mg/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, apresentaram folhas amareladas mostrando sintomas da deficiência do nutriente. Com a ausência do nutriente no meio e quando se forneceu apenas 1/4 do $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ do meio MS (110 mg/L), observou-se necroses foliares, que culminaram com o aumento do tempo de exposição das plântulas ao meio deficiente (Figura 26).

3.5 CONCLUSÕES

O meio com 840 mg/L de nitrogênio, suplementado com BAP, forneceu maior número de brotações.

O meio com 335,44 mg/L de nitrogênio, suplementado com TDZ, forneceu maior número de brotações.

O meio sem NH_4NO_3 induziu maior sistema radicular tanto com BAP ou com TDZ.

O aumento da concentração de cálcio do meio MS, de 440 para 880 mg/L, favoreceu o crescimento de explantes secundários de *Heliconia* sp., além de interferir positivamente na formação de brotos (número e tamanho) quando se utilizou a citocinina BAP.

Quando se utilizou TDZ a quantidade normal de cálcio do meio MS, 440 mg/L, favoreceu a produção de brotos.

O enraizamento foi maior com a utilização de 220 e 110 mg/L de cálcio com BAP e TDZ, respectivamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DE FOSSARD, A. **Tissue culture for plant propagators**. Armidale: University of New England, 1976. 240p.
- DESAMERO, N.V.; ADELBERG, J.W.; HALE, A.; YOUNG, R.E.; RHODES, B.B. Nutrient utilization in liquid/membrane system for watermelon micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v.33, p.265-271, 1993.
- DOERSCHUG, M.R.; MILLER, C.O. Stimulation of shoots formation in lettuce. **American Journal of Botany**, Columbus, v.54, p.410-413, 1967.
- EKLUND; ELIASSON, L. Effects of calcium ion concentration on cell wall synthesis. **Journal of Experimental Botany**, London, v.41, p.863-867, 1990.

- ERIKSSON, T. Studies on the growth requirements and growth measurements of cells cultures of *Haplopappus gracilis*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.18, p.976-993, 1965.
- EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; PADDOCK, E.F. Studies on the growth requirements of soybean cells. **Phytomorphology**, Delhi, v.26, p.379-383, 1976.
- GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells, **Experimental Cell Research**, New York, v.50, p.151-158, 1968.
- GHAUTHERET, R.J. **Manuel Technique de Culture des Tissus Vigetaux**. Paris: Masson Cie, 1942. 334p.
- GEORGE, E.F.; SHERRINGTON, P.D. **Tissue culture media: Plant propagation by tissue culture**. Eastern Press, 1984. 709p.
- HERMAN, E.B. **Recent advances in plant tissue culture regeneration, micropropagation and media**. New York: Agritech Consultants, 1991. 323p.
- HYNDMAN, S.E.; HASEGAWA, P.M.; BRESSAN, R.A. Stimulation of root initiation from cultured rose shoots through the use of reduced concentrations of mineral salts. **HortScience**, Mont Vernon, v.17, p.82-83, 1982.
- JORDAN, D.B.; FLETCHER, J.S. The relationship between NO_2^- accumulation, nitrate reductase and nitrite reductase in suspension cultures of Paul's Scarlet Rose. **Plant Science**, Limerick, v.17, p.95-99, 1979.
- KAUSS, H. Some aspects of calcium - dependent regulation in plant metabolism. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v.38, p.47-72, 1987.
- KNUDSON, L. A revised medium for growth of orchid. **American Orchid Society Bulletin**, U.S.A., v.15, p.214-217, 1946.
- MEYER, Y.; ABEL, W.O. Studies of wall cell formation. **Planta**, Berlin, v.123, p.33-40, 1975.
- MILLER, C.O. Tissue culture media. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v.12, p.395-408, 1961.
- MOREL, G. Studies of orchids growth. **American Orchid Society Bulletin**, USA, v.29, p.495-497, 1960.
- 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.
- NITSCH, J.P.; NITSCH, C. Haploid plants from pollen grains. **Plant Science**, Limerick, v.163, p.85-87, 1969.

- O'BRIEN, I.E.W.; LINDSAY, G.C. Protoplasts to plants of Gentianaceae. Regeneration of lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) is affected by calcium ion preconditioning, osmolality and pH of the culture media. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v.33, p.31-37, 1993.
- OHIRA, K.; OJIMA, K.; FUJIWARA, A. Studies on the nutrition of rice cell culture I. A simple, defined medium for rapid growth in suspension culture. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v.14, n.6, p.1113-1121, 1973.
- PIERIK, R.L.M. "In vitro" culture of higher plants. Netherlands: Martinus Nijhoff Publishers, 1987. 344p.
- POIRIER-HAMON, S.; RAO, P.S.; HARADA, H. Culture of mesophyll protoplasts and stem segments of *Antirrhinum majus* (Snapdragon): Growth and organization of embryoids. **Journal of Experimental Botany**, London, v.25, p.752-760, 1974.
- WHITE, P.R. **A handbook of tissue culture**. New York: Ronald Press, 1943. 524p.
- WOOD, H.N.; BRAUN, A.C. Utilization of NH_4NO_3 in growth of *Catharanthus roseus* **Proceedings National Academic Science, USA**, v.47, p.1907-1913, 1961.

4 UTILIZAÇÃO DE MICORRIZAS VESICULAR-ARBUSCULARES (MVA) EM MUDAS MICROPROPAGADAS DE *Heliconia* sp. DURANTE O PERÍODO DE ACLIMATAÇÃO

RESUMO

Plântulas de *Heliconia* sp., micropropagadas, foram aclimatadas em substratos inoculados com três espécies de fungos micorrízicos (*Glomus clarum* Nicol. & Schenck, *G. etunicatum* Becker & Gerd, *Gigaspora margarita* Becker & Hall), uma mistura destes (inóculo múltiplo) e testemunha. As plântulas foram mantidas em bandejas, em casa de vegetação. Após 90 dias foram avaliadas quanto ao desenvolvimento da parte aérea e sistema radicular, número de brotações e porcentagem de colonização, além de análise de nutrientes minerais da parte aérea. *G. margarita* causou uma maior porcentagem de colonização com conseqüente aumento de comprimento e peso da matéria seca de raiz, sem contudo afetar o desenvolvimento da parte aérea, que não diferiu significativamente para os vários tratamentos. *Glomus clarum* foi mais eficiente na absorção de nutrientes com exceção de ferro e manganês. A testemunha apresentou menor teor de fósforo, magnésio e enxofre do que as plantas inoculadas.

4.1 REFERENCIAL TEÓRICO

Micorrizas vesicular-arbusculares (MVA) são associações mutualísticas formadas por fungos da família Endogonaceae e raízes da maioria das espécies vegetais, cuja ocorrência, embora mais acentuada em solos de baixa fertilidade, tem sido constatada nos mais diversos ecossistemas (Lopes, Siqueira e Zambolim, 1983).

A distribuição das micorrizas (VA) é generalizada no ambiente terrestre, tendo sido constatada das regiões árticas aos trópicos (Gerdemann, 1968).

Segundo Trappe e Berch (1985), a associação entre fungos e raízes foi primeiramente observada por Meyer em 1829 e em 1842 Karl Nageli observou estruturas fúngicas dentro de células radiculares de *Iris* spp. Cinco anos mais tarde Siegfried Reissek publicou um artigo sobre micorrizas em orquídea (Siqueira, 1985). Mas, Frank citado por Lopes, Siqueira e Zambolim (1983), foi quem empregou pela primeira vez o termo micorriza (do grego, mikes = fungo; rhiza = raiz).

As MVAs ocorrem praticamente em 80 % das plantas vasculares (Trappe, 1977). Pirozynski e Malloch, citados por Lopes, Siqueira e Zambolim (1983), sugeriram a hipótese de que a condição micotrófica foi essencial para a evolução das plantas do ambiente aquático para o terrestre.

A penetração das células da planta pelo fungo, se dá através de um processo de invaginação da plasmalema, sendo a hifa totalmente envolvida por material de origem da planta (Siqueira, 1985). Há então a formação de arbúsculos, que constituem o sítio de troca entre os dois organismos (Cox et al., 1975), vesículas, que são estruturas de reserva (Gerdemann, 1968), com grânulos de lipídio em seu interior (Holley e Peterson, 1979), e esporos característicos. O micélio

formado externamente funciona como uma extensão do sistema radicular da planta hospedeira, aumentando a interface raiz-solo e, conseqüentemente, a absorção de nutrientes, principalmente fósforo, e água do solo (Lopes, Siqueira e Zambolim, 1983).

Substancial número de plantas micropropagadas não sobrevivem quando transferidas de condições "in vitro" para as condições ambientais da casa de vegetação ou campo. Estes têm substancialmente umidade relativa mais baixa, alta luminosidade, ambiente não asséptico, os quais são estressantes para plantas micropropagadas (Preece e Sutter, 1991). Plantas micorrizadas são capazes de melhor adaptação em condições estressantes, como as encontradas em período de aclimação (Huiming et al., 1993).

Huiming et al. (1993), utilizando MVA, conseguiram uma taxa de sobrevivência significativamente mais alta para plantas micropropagadas de *Gerbera jamesonii*. O peso da matéria seca das plantas foi significativamente mais alto, além da ocorrência do aumento do número de flores para plantas colonizadas por MVA.

Segundo Lopes, Siqueira e Zambolim (1983) a inoculação comercial tem se mostrado vantajosa em viveiros de citros e plantas ornamentais nos Estados Unidos.

O grau de dependência ao micotrofismo varia com as espécies vegetais e condições de solo e clima. As plantas que se associam com endófitos formadores de MVA são aparentemente micotróficas facultativas (Lopes, Siqueira e Zambolim, 1983). Segundo Kruckelmann (1975) a variabilidade de susceptibilidade à formação das MVA parece ser controlada geneticamente, podendo estender-se até mesmo a nível de variedade (Bertheau et al. citado por Lopes, Siqueira e Zambolim, 1993).

O ciclo da planta determina em que período ela se beneficia mais da micorrização. Espécies com maior capacidade de absorção de fósforo, com abundância de pêlos radiculares, se

beneficiam menos da micorrização. De acordo com Baylis (1975), espécies com sistema radicular extremamente ramificado dependem menos dos fungos micorrízicos para a absorção de nutrientes mesmo em solos muito deficientes. Conforme se aumenta o nível de fertilidade, a dependência à condição micorrízica decresce até um ponto em que a planta se torna imune à colonização (Lopes, Siqueira e Zambolim, 1983).

Diferentes espécies e isolamentos de uma mesma espécie de fungo são também responsáveis por variações no grau de colonização e funcionamento da simbiose (Lopes, Oliveria e Neptune, 1980). Certas espécies ou tipos de esporos são mais favorecidos por determinadas plantas em dada condição (Mosse, 1981). Também diferentes espécies e variedades de fungos micorrízicos diferem na sua habilidade de incrementar o crescimento vegetal.

A resposta em crescimento que se verifica nas plantas micorrízicas é determinada por processos opostos, um efeito benéfico devido ao aumento de absorção de fósforo do solo, causado pelo fungo, e outro detrimental, provocado pela utilização de produtos fotossintetizados pelo fungo (Lopes, Siqueira e Zambolim, 1983). O fósforo é translocado até os arbúsculos, onde é trocado com a planta por metabólitos originados da fotossíntese (Siqueira, 1985). O dreno ou competição por produtos da fotossíntese pode depreciar o crescimento da planta porque segundo Powell e Bagyaraj (1984) a biomassa fúngica nas raízes e rizosfera pode representar até 17% do peso da matéria seca das raízes ou de 1 a 5% do carbono fixado pela planta. Segundo Tinker citado por Lopes, Siqueira e Zambolim (1983) apenas 10% da matéria seca das MVA é biomassa fúngica. De acordo com Siqueira (1985), geralmente depressão no crescimento ocorre em condições de elevado suprimento de fósforo, baixa iluminação e temperaturas inadequadas, quando a colonização é reduzida mas é suficiente para provocar drenos de carboidratos.

O simbiote funciona como um competidor por produtos elaborados pela planta, que aumenta a respiração das raízes em até 74% (Pang e Paul citado por Lopes, Siqueira e Zambolim, 1983). Segundo Allen et al. (1981), para compensar essas perdas, as plantas colonizadas exibem maiores taxas fotossintéticas. De acordo com Lopes, Siqueira e Zambolim (1983), o balanço dos dois processos normalmente resulta em aumento no crescimento das plantas colonizadas, mas pode também resultar em redução no caso de plantas crescendo em altos níveis de fósforo disponível. Segundo os autores esse aspecto foi investigado por Stribley et al. (1980), os quais propuseram a hipótese da “perda de peso da matéria seca” da planta bem nutrida em fósforo, causada pelos fungos MVA. A intensidade de fluxo desses dois processos determinará se a natureza da simbiose é mutualística, antagonística ou parasítica (Siqueira e Colozzi-Filho, 1986).

De acordo com Phillips e Hayman (1970) devido ao fungo não causar alterações visuais nas raízes, a constatação da presença da MVA apresenta certa dificuldade. Para se verificar a colonização, as raízes têm que ser devidamente coradas e observadas microscopicamente. Como cita Gerdemann e Nicolson (1963) para a constatação da presença do fungo no solo deve-se fazer peneiramento via úmida e observação microscópica dos esporos, seguido de centrifugação em solução de sacarose (Lopes, Siqueira e Zambolim, 1983).

A partir de 1968 foram desenvolvidas técnicas para determinação dos efeitos da inoculação no crescimento das plantas e na absorção de fosfato (Mosse, 1973).

Para avaliações de mudas jovens o peso é o indicador mais sensível da resposta da planta aos diferentes tratamentos. A parte aérea deve ser avaliada separadamente porque freqüentemente ocorrem respostas distintas entre parte aérea e raízes. O comprimento total das raízes em mudas jovens é também sensível aos tratamentos e podem ser medidos diretamente. É de extrema importância o relacionamento da resposta das plantas com a colonização das raízes,

relacionando o crescimento das plantas à micorrização. Segundo experimentos realizados por Abbott e Robson (1981), o crescimento do trevo estava intimamente relacionado com a porcentagem de raízes colonizadas em cada estágio de desenvolvimento da planta.

Declerck et al. (1993) trabalhando com *Musa acuminata* e com duas espécies de MVA, *Glomus mosseae* (Nicol. & Gerd.) Gerd & Trappe e *Glomus geosporum* (Nicol. & Gerd.) Walker, obteve um maior peso da matéria seca de brotos e maior peso da matéria fresca de raiz. Sendo que a simbiose também aumentou a quantidade de P e K dos brotos, mas diminuiu a quantidade de N quando comparados com as plantas controle.

Resultados significativos são obtidos, como o de Andrade et al. (1993), que trabalhando com *Acosmium nitens* (Vog.) Yakoul, na Venezuela, distinguiram três diferentes grupos: os que apresentaram os mais baixos valores, não micorrizados; os que apresentaram desenvolvimento intermediário, com solo não esterelizado e os de mais alto valores, em tratamentos com MVA.

4.2 OBJETIVO

Com objetivo de se verificar a dependência de plântulas de *Heliconia* sp. às diversas espécies de fungos micorrízicos, durante o período de aclimação, realizou-se o presente experimento.

4.3 MATERIAL E MÉTODOS

Inoculação do substrato:

Preparou-se o substrato composto de 50% de torta de filtro, 30% de solo e 20% de areia. Bem homogeneizado o substrato foi esterilizado com brometo de metila, por 7 dias, para a eliminação de fungos indígenas. Após adicionou-se o inóculo no substrato, constituindo-se 5 tratamentos, segundo mostra a Tabela 13.

TABELA 13. Espécies micorrizicas utilizadas para inoculação de *Heliconia* sp., quantidade de inóculo e de esporos por litro de substrato. ESAL, Lavras-M.G., 1994.

Tratamento	MVA	ml de inóculo/L de substrato	Nº esporos/L de substrato
1	Testemunha	-	-
2	<i>Glomus clarum</i>	67	6700
3	<i>Glomus etunicatum</i>	50	2750
4	<i>Gigaspora margarita</i>	58	2436
5	Inóculo múltiplo	- <i>G. clarum</i>	23
		- <i>G. etunicatum</i>	33
		- <i>G. margarita</i>	40

Contagem de esporos no substrato:

Após a inoculação fez-se então a extração e observação microscópica de esporos do substrato, da seguinte maneira:

1º) Mediu-se 50 ml de substrato (solo), em um becker, transferindo-o para um balde plástico.

2º) Lavou-se o solo 4 vezes, agitando-o com um bastão de vidro, e, passou-se o sobrenadante nas peneiras de malhas 0,710; 0,250; 0,105 e 0,053 mm respectivamente.

3º) Recolheu-se o material retido em cada peneira, em beakers de 50 ml, transferindo-o para tubos de centrifugação.

4º) Balanceou-se os tubos e centrifugou-se o material por 3 minutos a 3000 rpm.

5º) Descartou-se o sobrenadante.

6º) Adicionou-se solução de sacarose 50% p/v, agitou-se com um bastão, a mistura foi centrifugada por 2 minutos a 2000 rpm.

7º) Drenou-se o sobrenadante em peneira fina (0,044 mm, 0,053 mm), lavando rapidamente o material recolhido (esporos), com água, para eliminar o excesso de sacarose.

8º) Transferiu-se o material da peneira para placa de petri.

9º) Observou-se o material em microscópio estereoscópico (ampliação 10 e 40 x), para contagem de esporos.

Preparo das plântulas:

Mudas de *Heliconia* sp. medindo aproximadamente 50 a 70 mm, e já enraizadas, foram retiradas do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais e transferidas para a casa de vegetação, para o processo de aclimatação.

Inicialmente cada muda foi retirada do tubo de ensaio, com o auxílio de uma pinça. As raízes foram lavadas em água corrente, retirando o excesso de água. As mudas foram mantidas em bandejas forradas com papel de filtro molhado, prontas para o plantio.

Plantio das mudas e condução dos tratamentos:

Cada tratamento foi instalado em bandeja de isopor de 72 células. As mudas foram plantadas intercaladas, ocupando-se apenas 36 células. O experimento foi montado segundo Delineamento Inteiramente Casualizado com 5 tratamentos, 6 repetições e 6 plantas por repetição.

As bandejas foram mantidas em casa-de-vegetação, debaixo de sombrite, que reduziu o excesso de luminosidade e temperatura.

As mudas foram regadas em dias alternados com água destilada para evitar contaminação com outros tipos de fungos.

Após 90 dias as plantas foram coletadas, e foram analisadas as seguintes características: comprimento da parte aérea, número de folhas, comprimento de raiz, peso da matéria fresca e peso da matéria seca da parte aérea e sistema radicular, análise de nutrientes minerais da parte aérea (P, K, Ca, Mg, S, Cu, Zn, Fe e Mn) e porcentagem de colonização.

Avaliação da porcentagem de colonização:

Metodologia para extração, coloração e observação microscópica de infecção micorrízica em raízes:

1º) Retirar as raízes mais novas e tenras, lavando-as para retirada de solo e restos de matéria orgânica.

2º) Pesar 1 g de raízes limpas e colocar em cápsulas plásticas, identificando-as.

3º) Colocar as cápsulas em becker contendo KOH 10%, e aquecer em capela (90°C) por 1 hora, ou autoclavar (15 PSI) por 10 minutos.

4º) Drenar o KOH e lavar com água a cápsula com o material.

5º) Colocar água acidificada (HCl 1%) e agitar por 3 a 4 minutos.

6º) Derramar o HCl e aplicar o corante (Tripan blue em lactofenol 0,05%).

7º) Aquecer (90°C) em capela, por 10 a 60 minutos, ou autoclavar (15 PSI) por 10 minutos.

8º) Transferir o material da cápsula plástica para placa de petri.

9º) Observar as raízes coradas em microscópio estereoscópico (ampliação de 10 e 40 x) para a avaliação da porcentagem de colonização (segundo Giovannetti e Mosse, 1980; Phillips e Hayman, 1970).

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 14 podemos observar os resultados numéricos do experimento.

A maior porcentagem de colonização observada resultou da inoculação com a MVA *Gigaspora margarita* que apresentou 55,95% de colonização do sistema radicular de *Heliconia* sp. (Figura 30.A). Esta colonização beneficiou o crescimento de raízes (179,9 mm) e peso da matéria seca das mesmas (173 mg), superando os demais tratamentos (Figuras 30.B e 31). Segundo experimentos realizados por Abbott e Robson (1981), o crescimento do trevo e peso da matéria seca da parte aérea, estava intimamente relacionado com a porcentagem de raízes colonizadas em cada estágio de desenvolvimento da planta. Contudo *G. margarita* não influenciou o desenvolvimento da parte aérea da planta, desenvolvimento este detectado através da altura da planta, número de folhas, peso da matéria fresca e seca da parte aérea.

A menor colonização de raízes (28,71%), foi observada pela inoculação com *Glomus etunicatum* (Figura 30.A), cabendo a esta MVA também o menor comprimento (126 mm) e peso da matéria seca (108 mg), igual estatisticamente ao inóculo múltiplo (104 mg), Figura 31.

TABELA 14. Resultados obtidos pela avaliação de plântulas de *Heliconia* sp. inoculadas com várias espécies de MVA. ESAL, Lavras-M.G., 1994.

Tratamentos	MVA	Colonização (%)	Comp. médio parte aérea (mm)	Nº médio folhas	Comp. médio de raiz (mm)	Parte aérea		Sistema radicular	
						PMF (mg)	PMS (mg)	PMF (mg)	PMS (mg)
1	Testemunha	0,0 c	135,1 a	6,31 ab	149,7 ab	1520 a	241 a	1,12 a	125 ab
2	<i>Glomus clarum</i>	40,36 ab	124,6 a	5,68 bc	139,3 ab	1400 a	230 a	0,90 a	125 ab
3	<i>Glomus etunicatum</i>	28,71 b	131,9 a	6,47 a	126,0 b	1590 a	263 a	1,18 a	108 b
4	<i>Gigaspora margarita</i>	55,95 a	137,4 a	5,19 c	179,9 a	1590 a	262 a	1,23 a	173 a
5	Inóculo múltiplo	46,95 a	122,8 a	5,18 c	134,2 ab	1370 a	240 a	1,16 a	104 b

Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

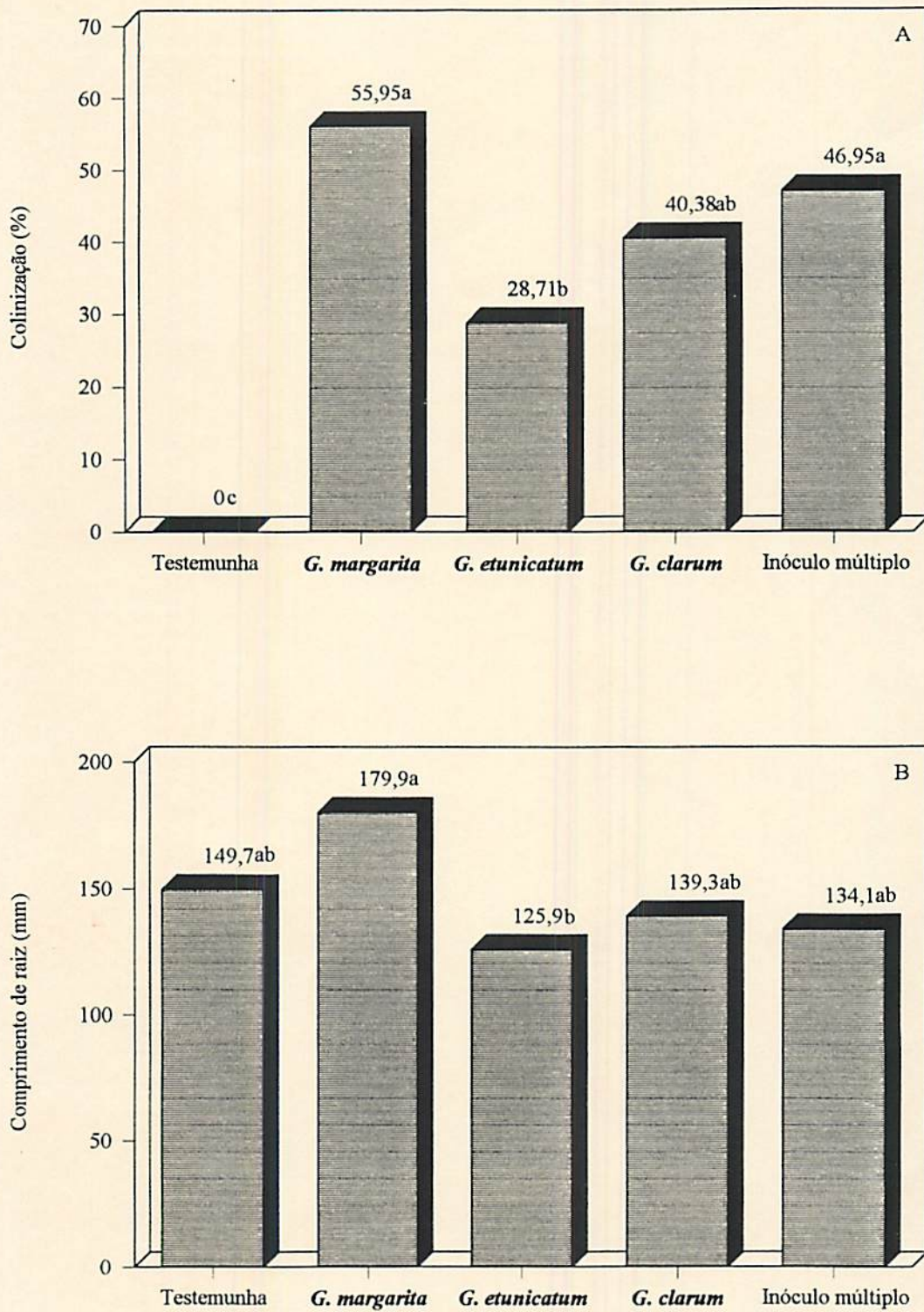


FIGURA 30. Colonização (%) - (A) e comprimento (mm) - (B) do sistema radicular em plântulas de *Heliconia* sp. inoculadas com diferentes espécies de MVA além da testemunha. ESAL, Lavras-M.G., 1994.

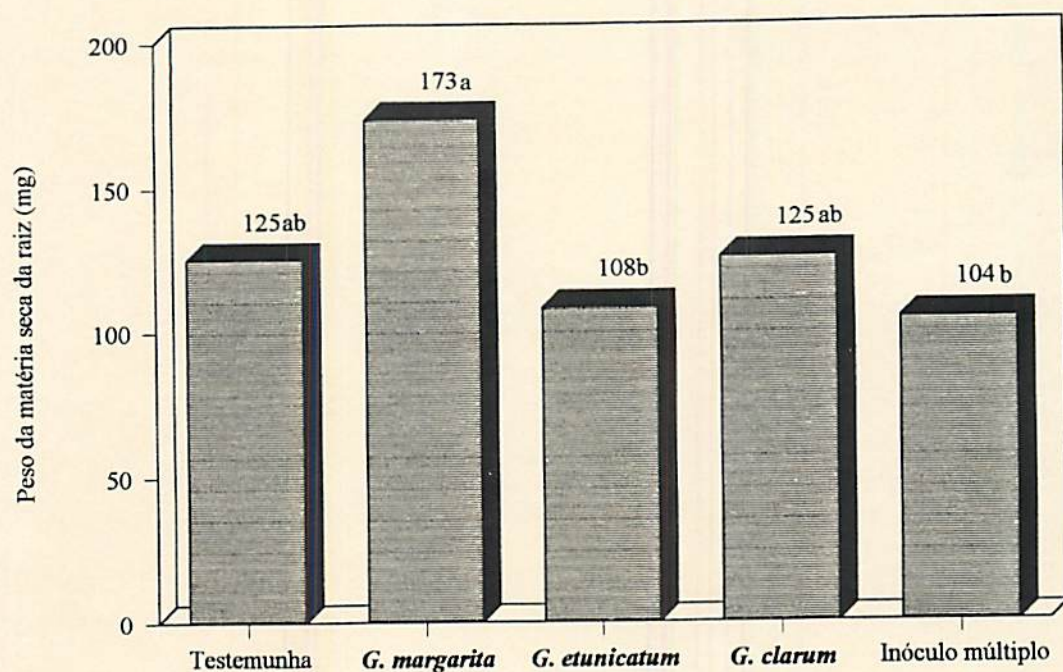


FIGURA 31. Peso da matéria seca (mg) do sistema radicular em plântulas de *Heliconia* sp. inoculadas com diferentes espécies de MVA além da testemunha. ESAL, Lavras-M.G., 1994.

Não houve diferença significativa entre os tratamentos para desenvolvimento da parte aérea.

Não ocorreu contaminação com esporos de MVA na testemunha, que não apresentou nenhuma colonização pelos fungos. Mesmo assim a testemunha apresentou desenvolvimento de sistema radicular (comprimento) estatisticamente igual a *Glomus clarum* e ao inóculo múltiplo e peso da matéria seca de raiz igual a *G. clarum* e superior ao inóculo múltiplo, devido provavelmente a competição entre as MVAs no tratamento com inóculo múltiplo.

As plantas inoculadas com *G. clarum* apresentaram maior teor de potássio, cálcio, magnésio, enxofre, cobre e zinco (Tabela 15). A testemunha absorveu menos fósforo do que as plantas micorrizadas, seguida por *G. etunicatum* que se apresentou menos eficiente em absorção

TABELA 15. Determinação de macro (%) e micronutrientes (ppm) através de análise mineral da parte aérea de *Heliconia* sp. oriunda de inoculação com diferentes espécies de MVA. ESAL, Lavras-M.G., 1994.

Tratamentos	P (%)	K (%)	Ca (%)	Mg (%)	S (%)	Cu (ppm)	Zn (ppm)	Fe (ppm)	Mn (ppm)
Testemunha	0,11	2,68	1,44	0,42	0,20	6,81	79,27	358,21	230,66
<i>Glomus clarum</i>	0,18	3,11	1,56	0,51	0,27	8,64	85,52	320,98	228,10
<i>Glomus etunicatum</i>	0,14	2,37	1,39	0,46	0,21	6,13	77,50	418,07	229,36
<i>Gigaspora margarita</i>	0,18	2,94	1,46	0,47	0,21	7,12	81,01	355,98	227,62
Inóculo múltiplo	0,18	2,28	1,56	0,45	0,21	7,65	81,84	315,79	227,18

de nutrientes quando comparada com as outras MVAs. A melhoria na absorção de nutrientes das plantas micorrizadas vem sendo demonstrada por alguns autores. Declerck et al. (1993) trabalhando com *Musa acuminata* e com duas espécies de MVAs, *Glomus mosseae* e *Glomus geosporum* obtiveram uma maior absorção de fósforo e potássio comparando-se com as plantas controle. Mosse (1957) também demonstrou que plantas colonizadas tiveram melhor absorção de nutrientes que as não colonizadas.

Os resultados mostram que, dentre as MVAs testadas *Gigaspora margarita* foi a que mais contribuiu para o desenvolvimento do sistema radicular em *Heliconia* sp. De acordo com Lopes e Siqueira (1981) e Lopes, Oliveira e Neptune (1980) *G. margarita* também foi a espécie mais eficiente em cafeeiro. É possível que em um período prolongado de cultivo, a micorriza venha incrementar também o desenvolvimento da parte aérea da planta, pois, o ciclo da planta pode determinar o período que ela mais se beneficia da micorrização.

Provavelmente devido ao vigor e rusticidade da *Heliconia* sp. não tenha havido uma diferença marcante entre testemunha e MVAs (Figura 32). Deve-se ressaltar que a testemunha foi o segundo melhor tratamento após *G. margarita*, demonstrando também um excelente desenvolvimento de sistema radicular, e, de acordo com Baylis (1975), as plantas com um sistema radicular bem ramificado dependem menos de MVA para a absorção de nutrientes, mesmo em solos muito deficientes. Baylis (1975) também enfatiza que espécies com abundância de pêlos radiculares e com maior capacidade de absorção de fósforo se beneficiam menos da micorrização. Deve-se também lembrar a existência da especificidade fungo-planta demonstrando a possibilidade dos fungos testados não terem sido os mais eficientes para esta espécie. Segundo Kruckelmann (1975) a variabilidade de susceptibilidade à formação das MVA, parece ser controlada geneticamente, podendo estender-se até mesmo a nível de variedade (Bertheau et al. citado por Lopes, Siqueira e Zambolim, 1983).



FIGURA 32. Resultado da utilização de várias espécies de micorrizas isoladamente (3, 4 e 5), mistura de inóculo (2) e ausência de inoculação (1) em mudas micropropagadas de *Heliconia* sp. ESAL, Lavras-M.G., 1994.

A helicônia adaptou-se às condições da casa de vegetação sem mostrar danos para a formação da muda. Obteve-se 98,9% de sobrevivência das plântulas (média dos tratamentos). Conforme citam Preece e Sutter (1991), normalmente um substancial número de plântulas micropropagadas não sobrevivem quando transferidas de condições "in vitro" para as condições ambientais da casa de vegetação, devido a umidade relativa mais baixa, alta luminosidade, ambiente não asséptico, os quais são estressantes para plantas micropropagadas. Assim sendo pode-se considerar a obtenção de um resultado satisfatório, com um alto índice de sobrevivência, na aclimação de *Heliconia* sp.

4.5 CONCLUSÕES

- *Gigaspora margarita* apresentou maior porcentagem de colonização (55,95%), resultando em um maior comprimento (180 mm) e peso da matéria seca (173 mg) do sistema radicular de mudas de *Heliconia* sp.

- *Glomus etunicatum* apresentou menor porcentagem de colonização (28,71%), resultando em um menor comprimento (126 mm) e menor peso da matéria seca (108 mg) do sistema radicular, inclusive quando comparada com plantas testemunhas.

- Os fungos micorrízicos tratados não mostraram efeito positivo no desenvolvimento da parte aérea da planta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, L.K.; ROBSON, A.D. Infectivity and effectiveness of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi: effect of inoculum types. *Journal of agriculture*, p.631-639, 1981.

- ALLEN, M.F.; SMITH, W.K.; MOORE, S.M.; CHRISTENSEN, M. Comparative water relations and photosynthesis of mycorrhizal and non-mycorrhizal *Bouteloua gracilis*. *The New Phytologist*, Cambridge, v.88, p.683-693, 1981.
- ANDRADE, Z. de; ESCALANTE, G.; FLORES, S.; HERRERA, R. Effects of VA-mycorrhiza on the growth of *Acosmium nitens* (Vog.) Yakoul inoculated with native *Rhizobium*, grown in nursery. In: NORTH AMERICAN CONFERENCE ON MYCORRHIZAE, 9, Ontario, 1993. **Abstracts...Ontario, 1993.**
- BAYLIS, G.T.S. The magnolioid micorrhiza and mycotrophy in root systems derived from it. In: SANDERS, F.E.; MOSSE, B.; TINKER, P.B. *Endomycorrhizas*. London: Academic Press, 1975. p.373-89.
- COX, G.; SANDERS, F.E.; TINKER, P.B.; WILD, J.A. Ultrastructural evidence relating to host-endophyte transfer in a vesicular-arbuscular mycorrhiza. In: SANDERS, F.E.; MOSSE, B. e TINKER, P.B. *Endomycorrhizas*. London, Academic Press, 1975. p.297-312.
- DECLERCK, S.; DEVOS, B.; DELVAUX, B.; PLENCHETTE, C.; STRULLU, D.G. Comparative effects of two strains of VAM on growth and nutrition of micropropagated bananaplants (*Musa acuminata* colla cv. Giant Cavendish). In: NORTH AMERICAN CONFERENCE ON MYCORRHIZAE, 9, Ontario, 1993. **Abstracts...Ontario, 1993.**
- GERDEMANN, J.W. Vesicular-arbuscular mycorrhiza and plant growth. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v.6, p.397-418, 1968.
- GERDEMANN, J.W.; NICOLSON, T.H. Spores of mycorrhizal endogenous species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions British Mycological Society*, London, v.46, p.235-246, 1963.
- GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New phytology*, Cambridge, v. 84, p. 489-500, 1980.
- HOLLEY, J.D.; PETERSON, R.L. Development of vesicular-arbuscular mycorrhiza in bean roots. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, v.57, p.1960-1978, 1979.
- HUIMING, W.; PARENT, S.; DUVAL, A.; GOSSELIN, A.; DESJARDINS, Y. Effect of vesicular-arbuscular mycorrhiza (VAM) on micropropagated gerbera, fern and miniature rose plantlets. In: NORTH AMERICAN CONFERENCE ON MYCORRHIZAE, 9, Ontario, 1993. **Abstracts...Ontario, 1993.**
- KRUCKELMANN, H.W. Effects of fertilizers, soils, soil tillage, and plant species on the frequency of endogone chlamydospores and mycorrhizal infection in arable soils. In SANDERS, F.E.; MOSSE, B.; TINKER, P.B. *Endomycorrhizas*. London: Academic Press, 1975. p.511-525.

- LOPES, E.S.; OLIVEIRA, E.; NEPTUNE, A.M.L. Efeito de espécies de micorrizas vesiculares arbusculares no siratro (*Macroptilium atropurpureum*). **Bragantia**, Campinas, v.39, p.241-245, 1980.
- LOPES, E.S.; SIQUEIRA, J.O. Vesicular-arbuscular mycorrhizas - their potential in phosphate nutrition in tropical regions. In: RUSSEL, R.S.; IGUE, K.; MEHTA, Y.R. (ed.). **The soil root system in relation to Brazilian agriculture**. Londrina: IAPAR, 1981. p.225-242.
- LOPES, E.S.; SIQUEIRA, J.O.; ZAMBOLIM, L. Caracterização das micorrizas vesicular-arbusculares (MVA) e seus efeitos no crescimento das plantas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.7, p.1-19, 1983.
- MOSSE, B. Advances in the study of vesicular-arbuscular mycorrhiza. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.11, p.171-196, 1973.
- MOSSE, B. Growth and chemical composition of mycorrhizal and non-mycorrhizal apples. **Nature**, v.179, p.922-924, 1957.
- MOSSE, B. **Vesicular-arbuscular mycorrhiza research for tropical agriculture**. Hawaii: Institut for Tropical Agricultural and Human Resources, 1981. 82p. (Research Bulletin, 194).
- PHILLIPS, J.M.; HAYMAN, D.S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. **Transactions British Mycological Society**, London, v.55, p.158-161, 1970.
- POWELL, C.L.E.; BAJYARAJ. **VA mycorrhiza**. Boca Raton: CRC Press, 1984. 234p.
- PREECE, J.E.; SUTTER, E.G. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H. **Micropropagation: technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1991. p.71-93.
- SIQUEIRA, J.O. Micorrizas: forma e função. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 1, Lavras, 1985. **Anais...**Lavras: ESAL, 1985.
- SIQUEIRA, J.O.; COLOZZI-FILHO, A. Micorrizas vesículo-arbusculares em mudas de cafeeiro II. Efeito do fósforo no estabelecimento e funcionamento da simbiose. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.10, n.3, 1986.
- TRAPPE, J.M. Selection of fungi for ectomycorrhizal inoculation in nurseries. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.15, p.203-222, 1977.
- TRAPPE, J.M.; BERCH, S.M. The prehistory of mycorrhizae: A.B. Frank's predecessors. In: NORTH AMERICAN CONFERENCE ON MYCORRHIZAE, 6, Oregon, 1985. **Proceedings...**Oregon: Forest Research Laboratory, 1985. p.2-11.