

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

O Gênero *Heliconia* é constituído por plantas herbáceas rizomatosas, eretas, de 0,5 a 10,0 m de altura, conforme a espécie, e com folhas de vários tamanhos. O pseudocaule é formado pela justaposição das lâminas foliares. As espécies possuem um rizoma subterrâneo, comumente usado para propagação. A inflorescência emerge do ponto de crescimento terminal e apresenta um rápido desenvolvimento. Esta consiste de um pedúnculo alongado, no qual se inserem as brácteas espatiformes de variado tamanho, textura e cor. A bráctea inferior apresenta-se frequentemente sem flores e as demais mostram flores que variam em comprimento, forma e cor, conforme a espécie. As inflorescências podem ser eretas ou pendentes. O fruto, tipo baga, geralmente abriga uma a três sementes, com 1,5 cm de diâmetro cada uma (Figura 1). As sementes variam em tamanho e forma (DANIELS; STILES, 1979).



Figura 1 - Fruto maduro de *H. chartacea* Lane ex Barreiros cv. "Sexy Scarlet".
EMBRAPA Amazônia Oriental, Belém-PA, 2009.

Originalmente incluído na Família *Musaceae*, o Gênero *Heliconia*, em função de suas características próprias de individualização, passou a constituir Família *Heliconiaceae*, como único representante. A primeira descrição botânica de espécies de *Heliconia* foi realizada por Plumier, em 1703 (KRESS, 1984). De acordo com Castro, May e Gonçalves (2007) esta é uma descrição sucinta e genérica do Gênero *Bihai*, denominação inicial do Gênero *Heliconia*. Posteriormente, em 1771, Linnaeus descreveu o Gênero *Heliconia* designando como Espécie-tipo à *Heliconia bihai*, caracterizada pelas brácteas vermelhas e flores amarelas. Castro (1995) reporta o fato de que em 1771, o cientista Linnaeus batizou o Gênero *Heliconia* ao fazer

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

referência ao Monte Helicon, situado na região da Beócia, na Grécia, local onde, segundo a mitologia, residiam Apolo e suas Musas.

Estima-se que 250 espécies fazem parte desse belo e diversificado grupo, porém, somente cerca de 180 foram, até o momento, descritas (BERRY; KRESS, 1991).

Esse gênero pertence à Classe *Liopsida* e à Ordem *Zingiberales* (Ordem a que pertencem as bananeiras (*Musa* spp)), de acordo com Cronquist (1988). Nativo das regiões tropicais, é, dentre, os vários grupos de plantas, um dos que mais se destaca. A beleza, a exuberância, o colorido e a durabilidade de suas inflorescências são de interesse crescente para o mercado de floricultura nacional e internacional. As plantas deste gênero formam touceiras que devem ser divididas a cada dois anos para multiplicação (CASTRO, 1995) e são descritas por Marques et al. (2004) como grandes herbáceas perenes.

As plantas do Gênero *Heliconia* são consideradas geófitas, pois se perpetuam não somente pelas suas sementes, mas também pelos seus órgãos subterrâneos especializados, cuja função principal é servir como fonte de reservas, nutrientes e água para o crescimento sazonal e, assim, assegurar a sobrevivência das espécies (CASTRO, 1995).

A cultivar “Sexy Scarlet” (Figura 2) proveniente das Guianas, apresenta uma linda inflorescência escarlate, pendente e com orientação espiralada (MOSCA et al., 2004; COSTA, 2009) e folhas musóides (semelhante à bananeira); cada inflorescência é constituída por 4 a 14 brácteas (SBRT–SENAI, 2009), que apresentam cerosidade (LOGES et al., 2005).



Figura 2 - Planta de *H. chartacea* Lane ex Barreiros cv. "Sexy Scarlet".
EMBRAPA Amazônia Oriental, Belém-PA, 2009.

As diferentes espécies de *Heliconia* têm sobrevivido e se propagado por anos, devido a bem sucedida relação de troca com seus agentes polinizadores (beija-flores) e dispersores de sementes (roedores e outros pássaros) (SBRT–SENAI, 2009). As plantas deste gênero fornecem o néctar aos polinizadores e a polpa dos frutos aos dispersores. Em retribuição, os beija-flores transferem o pólen, fazendo o cruzamento natural, e os roedores e outros pássaros dispersam as sementes, espalhando as plantas pelo seu habitat (SBRT–SENAI, 2009).

A propagação dá-se, principalmente, via multiplicação de rizomas, os quais apresentam um grande número de fitopatógenos, o que possibilita alto índice de disseminação de doenças (DIAS; BARROS; CARVALHO, 2005; DIAS et al., 2006).

A propagação sexuada de *Heliconia* é limitada, pois embora ocorra polinização e fertilização, as sementes podem conter embriões não desenvolvidos ou pouco desenvolvidos que não germinam. Outras vezes, devido à dureza de uma das camadas externas da semente, denominada de testa, os embriões não conseguem germinar (TORRES et al., 2005a, 2005b) ou têm a germinação dificultada (SIMÃO; SCATENA, 2003).

Simão, Scatena e Bouman (2005) descreveram, em seus trabalhos, a formação dos embriões de seis espécies do Gênero *Heliconia*. Inicialmente, cada

embrião apresentou um núcleo e um nucléolo proeminentes. A primeira divisão transversal conduziu à formação do proembrião, tornando-o globular após diversas divisões e, posteriormente, reniforme. No fruto maduro ou quase maduro, o embrião mostrou-se longitudinalmente alongado, ligeiramente curvado no ápice e cilíndrico na seção transversal, com o eixo hipocótilo-radicular, situado na porção basal, bastante reduzido. Cada embrião apresentou-se, nos primeiros estágios, envolvido por uma parede ligeiramente espessa. Esta parede da semente tornou-se cada vez mais lignificada em estágios posteriores, tornando-se uma barreira física com alto grau de dificuldade para a germinação.

Essas limitações na reprodução deste e de outros gêneros podem ser contornadas pela utilização da técnica de resgate de embriões (TORRES et al., 2005b; DIAS; BARROS; CARVALHO, 2005). Esta técnica propicia a propagação rápida de plantas, a recuperação de plantas livres de doenças, a conservação e intercâmbio de germoplasma, a introdução de germoplasma como semente botânica e a superação da dormência de sementes (TORRES et al., 2005a).

Para o cultivo *in vitro* de embriões jovens, uma das estratégias adotadas é a incubação no escuro, quando a espessura dos tecidos envolventes *in vivo* for suficiente para barrar a maior parte da penetração da luz incidente. Os embriões das fanerógamas estão alojados em óvulos, os quais estão protegidos pelas paredes do ovário, o que constitui um ambiente estéril (HU; FERREIRA, 1998). Ao longo do processo de embriogênese, o funículo (estrutura que conecta o óvulo à parede do ovário), separa-se do óvulo e este último torna-se um sistema nutricional isolado (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001).

Diversos são os fatores que afetam a eficiência e o sucesso do cultivo de embriões *in vitro*, tais como: a maturidade fisiológica da semente, a desinfestação da semente, a remoção inadequada do embrião, a escolha do meio nutritivo adequado, os reguladores de crescimento utilizados, as substâncias fenólicas liberadas e as condições ambientais de cultivo (CARVALHO; ARAÚJO, 2007).

1.2 A IMPORTÂNCIA DA PROPAGAÇÃO *IN VITRO*

A cultura de tecidos é o cultivo asséptico de qualquer parte viva da planta (explante) em meio de cultura sintético sob condições controladas de temperatura, umidade e luminosidade, para gerar uma nova planta (LAMEIRA et al., 2000). Kerbauy (1997) destaca a importância prática e potencial dessa ferramenta

tecnológica nas áreas agrícola, florestal, horticultural, bem como na pesquisa básica em geral.

Os explantes podem ser frações de tecidos, órgãos ou células em suspensão. Essa técnica baseia-se, principalmente, na totipotencialidade das células (CALDAS; HARIDASSAN; FERREIRA, 1998). E tem sido especialmente útil para espécies propagadas vegetativamente (FERREIRA; CALDAS; PEREIRA, 1998). A técnica mais difundida atualmente na cultura de tecidos vegetais é a propagação *in vitro* ou micropropagação e é assim denominada em função do pequeno tamanho dos propágulos utilizados como explantes (LAMEIRA et al., 2000).

A escolha do explante é determinada pelo objetivo final do projeto. É imprescindível observar as condições fitossanitárias, fisiológicas e nutricionais da planta doadora de explante *in vivo* (LAMEIRA et al., 2000). Embriões zigóticos são utilizados, atualmente, com muita frequência, como explantes, por serem constituídos por tecidos de elevada totipotência (SILVA, 2005).

A germinação de sementes *in vitro* é outra técnica que pode ser utilizada para produção de mudas ou como ponto de partida para obtenção de explantes sadios (plântulas), para posterior subcultivo. Mas o problema da segregação genética, devido à grande variabilidade nas sementes, ocasionada pela ocorrência de fecundação cruzada, deve ser resolvido (MORAES, 2007), através de polinização controlada.

Para a realização da propagação *in vitro*, Grattapaglia e Machado (1998) descrevem três passos importantes: 1) seleção de explantes, desinfestação e cultivo em meio nutritivo sob condições assépticas; 2) multiplicação dos propágulos mediante sucessivos subcultivos em meio próprio para a multiplicação; 3) transferência das partes aéreas produzidas para meio de enraizamento e subsequente transplântio das plantas obtidas para substrato ou solo (aclimatização).

1.2.1 Seleção de explantes, desinfestação e cultivo em meio nutritivo sob condições assépticas

Diversos explantes podem ser utilizados para iniciar a propagação *in vitro* de uma planta. Na seleção dos explantes devem ser considerados aspectos como o nível de diferenciação do tecido utilizado e a finalidade da micropropagação. Teoricamente, qualquer tecido pode ser utilizado como explante, em vista da totipotência das células vegetais. Na prática, entretanto, procura-se utilizar explantes que contenham maior proporção de tecido meristemático ou que tenham maior capacidade de expressar a totipotência (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

O tamanho do explante utilizado depende essencialmente do objetivo da propagação *in vitro*. Caso se pretenda eliminar algum microrganismo sistêmico como vírus, bactéria ou micoplasma, considerar, evidentemente, que quanto menor o explante isolado ou quanto mais isolado das regiões subjacentes vascularizadas, maior a chance de sucesso. Mesmo considerando microrganismos contaminantes superficiais, o fato de levar menos tecido para condições assépticas reduz a quantidade desses microrganismos. Outra vantagem de se trabalhar com quantidades mínimas de tecido é a redução dos controles correlativos do restante da planta, que podem diminuir a capacidade de resposta do explante *in vitro*. (BONGA, 1987 apud GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Portanto, a probabilidade de se isolar tecidos livres de vírus e outros agentes causadores de doenças está inversamente relacionada ao tamanho do explante (MURASHIGE, 1977, apud TORRES; TEIXEIRA; POZZER, 1998). Desse modo, vários autores relataram que a proliferação de gemas axilares é preferida para micropropagação; além de reproduzir *in vitro* um fenômeno natural, esse sistema é mais facilmente controlado e apresenta uma fidelidade genética muito alta (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Por isso, um fator limitante no estabelecimento do processo de micropropagação é a obtenção de explantes livres de contaminantes (LEMOS, 2003). Mas essa questão tende a ser minimizada, pois as ferramentas biotecnológicas disponíveis viabilizam um grande avanço nas pesquisas sobre patógenos (ÁLVAREZ et al., 2005).

A dificuldade maior na etapa de desinfestação reside em se obter tecido descontaminado sem conduzi-lo à morte, quando isolado. São determinantes os pré-

tratamentos aplicados na planta-matriz para o sucesso dessa etapa de trabalho, principalmente no que se refere aos microrganismos endógenos. Várias substâncias com ação germicida são utilizadas para fazer a desinfestação dos explantes, os mais comuns são etanol e os compostos à base de cloro (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Os meios nutritivos utilizados para a cultura de células, tecidos e órgãos de plantas fornecem as substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos e controlam, em grande parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro*. Macro e micronutrientes, vitaminas, inositol, fonte de açúcar (geralmente sacarose) e, eventualmente, outros compostos orgânicos constituem o meio básico. As variações mais frequentes do meio básico dizem respeito à composição de macronutrientes. (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Diversas formulações de meios básicos têm sido utilizadas no início do cultivo. Não há uma formulação padrão, mas o meio de cultura MS, de Murashige e Skoog (1962) (ANEXO 1) é utilizado no cultivo *in vitro* da grande maioria das espécies (CALDAS; HARIDASAN; FERREIRA, 1998). São utilizados também os meios de cultura Knopp, WPW e B5 (CARVALHO et al., 2008).

1.2.2 Multiplicação dos propágulos mediante sucessivos subcultivos em meio próprio para a multiplicação

O principal objetivo da fase de multiplicação é produzir o maior número de plantas possível no menor espaço de tempo. Além das altas taxas de multiplicação são essenciais a qualidade e a homogeneidade das partes aéreas produzidas (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Após a regeneração das plântulas, as mesmas são submetidas a vários subcultivos. O que implica sucessivas transferências das plântulas, após retirada de excessos foliares e radiculares, para meios de cultura enriquecidos com reguladores de crescimento. (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Para a multiplicação de brotos, a partir de gemas axilares ou apicais, de plantas lenhosas ou herbáceas, é de elevada importância a utilização de citocininas, que têm como principal função a divisão celular (CID, 2000).

Os reguladores de crescimento podem ser utilizados isoladamente, como relatado por Barboza e Caldas (2001), que utilizaram 6-Benzilaminopurina (BAP) para regeneração de brotos estiolados de abacaxizeiro ou em associação com

outros reguladores de crescimento, como ANA (Ácido Naftaleno Acético), proposto eficientemente por Guerra et al. (1999), para a multiplicação de brotos das cultivares de abacaxizeiro “Primavera” e “Perolera” e por Lemos et al. (1998), ao pesquisar a mesma espécie, utilizando a cultivar “Cabeça-de-onça”. Os autores observaram maior multiplicação de brotos com a interação proporcionada pelos dois reguladores de crescimento supracitados.

Piza, Lima e Brasil (2001) reportaram o fato de que o conjunto de dois ou mais grupos de reguladores de crescimento, pode vir a maximizar a multiplicação de brotos.

1.2.3 Transferência das partes aéreas produzidas para meio de enraizamento e aclimatização

Após obtenção da planta completa (parte aérea + raiz) ocorre o transplântio (embora para algumas espécies seja mais viável a emissão de raízes *ex vitro*), que envolve a transferência da planta da condição *in vitro* para casa de vegetação, onde é submetida a uma fase de aclimatização e endurecimento (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998), adaptando-se às condições ambientais de cultivo (FAUTH et al., 1994), com o uso de substratos mineral-orgânicos apropriados (USBERTI FILHO et al., 1995). A Alta taxa de sobrevivência, obtida em plantas aclimatizadas *ex vitro*, depende do correto tratamento (CALVETE; KAMPF; SUZIN, 2002).

Os substratos são utilizados isoladamente ou em diversas combinações, como demonstraram as pesquisas desenvolvidas por Guerra et al. (1999) e Weber et al. (2003) para a aclimatização de plantas de abacaxizeiro obtidas *in vitro*.

Algumas espécies, durante o processo de propagação *in vitro*, necessitam de uma fase de alongamento, enquanto que em outras, a fase de enraizamento é dispensável, sendo assim, o esquema sofre adaptações de acordo com as peculiaridades específicas (GRATTAPALIA; MACHADO, 1998).

Em pesquisas com abacaxizeiro micropropagado, Piza, Lima e Brasil (2001) verificaram o efeito benéfico da interação de BAP e ANA para o crescimento de brotos; ressalta-se que o uso de giberelinas¹ é mais frequentemente relatado em pesquisas sobre alongamento de brotos, pois um dos efeitos fisiológicos básicos da giberelina exógena em planta é a aceleração do crescimento caulinar (MATSUMOTO, 2000).

Em estudos com curauá (*Ananas comosus* var. *erectifolius* L.B. Smith) Lameira et al. (2000) relataram que essa espécie pode alongar-se sem a necessidade de reguladores de crescimento, sendo o mesmo observado na fase de enraizamento. Grattapaglia e Machado (1998) comentaram que os tipos e concentrações de auxinas² são os fatores que em geral mais influenciaram o enraizamento. Esses mesmos autores explicaram que meios líquidos tendem a estimular a formação de um sistema radicular mais completo.

Rodrigues et al. (2005), em suas pesquisas com a espécie *Heliconia bihai*, observaram que a fase de enraizamento *in vitro* não se mostrou necessária.

¹ Giberelinas: um dos hormônios vegetais cujos efeitos biológicos relacionam-se com a estimulação de divisão e/ou alongamento celular ou outros efeitos fisiológicos.

² Auxinas: termo genérico empregado para a classe de hormônios vegetais e reguladores de crescimento que induzem o alongamento celular e/ou outros efeitos fisiológicos. Dentre as auxinas destacam-se: AIA, AIB, ANA e 2,4 D.

2 JUSTIFICATIVA

Por ser um cultivo relativamente novo no Brasil, poucos centros de pesquisa têm se dedicado ao estudo do *Gênero Heliconia*, principalmente no que diz respeito à propagação *in vitro* (RODRIGUES, 2005; RODRIGUES et al., 2006b). Essas limitações técnico-científicas ocasionam perdas econômicas, incremento nos custos da produção e fechamento de mercados internacionais (RESTREPO, 2007).

O cultivo de *Heliconia* tem um importante papel social, pois demanda grande mão-de-obra, principalmente, na colheita, onde o uso de maquinário é reduzido (MARQUES et al., 2004), podendo ser praticada em áreas de agricultura familiar (CASTRO, 2007). Outra aplicação é a utilização do resíduo agrícola, produto do corte das flores das plantas de *Heliconia*, na produção de papel artesanal (SEBRAE, 2009).

No Brasil, a comercialização de flores e plantas ornamentais está em franco crescimento, onde o PIB do negócio está estimado em US\$ 1,2 bilhões, entretanto, as exportações brasileiras não têm ultrapassado os US\$ 15 milhões por ano, bem abaixo da Colômbia (US\$ 560 milhões), do Equador (US\$ 150 milhões) e do Zimbábue (US\$ 60 milhões) (MARQUES et al., 2004).

A produção nacional deste gênero tem crescido significativamente, especialmente na Região Nordeste, como relatado por Rodrigues et al. (2006a, 2006b), com destaque para o estado de Pernambuco (COSTA et al., 2006, 2009). De acordo com Oliveira (2006), o Pará desponta como estado promissor na produção de flores tropicais.

A floricultura no Brasil é caracterizada por ser relativamente recente (ROCHA, 2007), com início na década de 70 (SILVA, 2005). E apesar de ter potencial de crescimento, o setor precisa estar mais organizado para que haja integração entre todos os elos da cadeia produtiva. Deve-se atentar para a falta de tradição e *know-how*, especificamente em relação às exportações, para que, então, coloque-se o produto brasileiro no exterior (OKUDA, 2000).

Além disso, o estímulo crescente à produção de flores nas mais diversas regiões do país está ocorrendo, ainda que sem ações coordenadas, quanto às melhores variedades a serem utilizadas ou mesmo quanto à capacidade do mercado em absorver a maior quantidade de flores, nem sempre de boa qualidade (ZANELLA, 2006). Ressalta-se que há grande interesse comercial pelas cultivares

“Sexy Scarlet” e “Sexy Pink”, da Espécie *Heliconia chartacea* Lane ex Barreiros (DIAS; BARROS; CARVALHO, 2005).

O cultivo do Gênero *Heliconia* despertou o interesse de vários países pela busca de conhecimento científico, como subsídio para a otimização da produção comercial, pois trata-se de uma promissora vertente do agronegócio mundial. E, por conseguinte, protocolos de propagação *in vitro* de *Heliconia* foram desenvolvidos na Tailândia, por Aranyrat, Sae-Lim e Phasurawong (2002); em Trinidad e Tobago, por Cockburn (1996); na Índia, por Kumar e Sooch (2002), entre outros.

Sendo assim, a aplicabilidade da técnica de propagação *in vitro*, na produção de *Heliconia*, pode atuar na otimização da produtividade e na melhoria da qualidade do produto, proporcionando a multiplicação rápida e em grande escala das mudas, independentemente do período do ano. Assim como a multiplicação de híbridos e matrizes de grandes potenciais, a produção mais uniforme e a redução do período até a colheita (NAKANO, 2008).

A propagação *in vitro* tem um papel importante, também, para a resolução de problemas relacionados à domesticação de *Heliconia*, a começar pela aceleração da germinação, que pode demorar de três meses até três anos para acontecer, no que concerne à propagação natural, via sementes (ATEHORTUA, 1997).

Esses fatores reforçam a necessidade de desenvolvimento de um sistema de cultivo que vise o aproveitamento do potencial econômico desse gênero. Nesse sentido, a aplicabilidade da propagação *in vitro*, com ênfase na técnica de resgate de embriões, surge como alternativa viável para suprir tal necessidade.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo desenvolver metodologias eficientes para a regeneração *in vitro* de *Heliconia chartacea* Lane ex Barreiros cv. “Sexy Scarlet”.

3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

Estudar os efeitos dos fatores, bactericida e concentração de regulador de crescimento BAP, na eficiência de regeneração de plântulas *in vitro*, a partir de embriões zigóticos, de *Heliconia chartacea* Lane ex Barreiros cv. “Sexy Scarlet”.

4 HIPÓTESE DE TRABALHO

H_0 = a regeneração de plântulas *in vitro* de *Heliconia chartacea* Lane ex Barreiros cv. “Sexy Scarlet” é influenciada pelo efeito do bactericida estreptomicina e por diferentes concentrações do regulador de crescimento BAP.

5 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia de Plantas da EMBRAPA Amazônia Oriental, Belém-PA.

Foram utilizados como fontes de explantes, frutos maduros de coloração roxa (Figura 1) da Espécie *Heliconia chartacea* Lane ex Barreiros cv. "Sexy Scarlet", provenientes de plantas adultas, cultivadas no Campo Experimental da EMBRAPA Amazônia Oriental, Belém-PA.

Os frutos obtidos foram imersos em hipoclorito de sódio comercial (NaOCl) a 2,5%, por 15 minutos, e em seguida, despolidos. As sementes foram lavadas com água destilada e detergente comercial neutro, imersas em álcool a 70%, por 2 minutos; posteriormente imersas em NaOCl comercial a 0,5%, por 15 minutos, e lavadas 3 vezes com água *destilada e autoclavada. Os embriões zigóticos foram, então, excisados das sementes com auxílio de *alicate de unha autoclavado. Procedimento semelhante foi realizado por Dias, Barros e Carvalho (2005), utilizando a mesma cultivar.

O embrião maduro das angiospermas consiste em um eixo, portando um ou dois cotilédones (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001). No presente trabalho, apenas o eixo cotiledonar, que corresponde a um dos componentes do embrião zigótico, foi utilizado como explante (Figura 3).

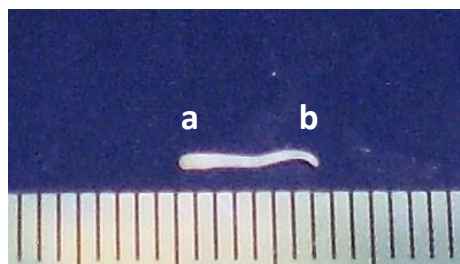


Figura 3 – Eixo cotiledonar de *H. chartacea* Lane ex Barreiros cv. "Sexy Scarlet", mostrando (a) bainha cotiledonar e (b) haustório. Escala de 1 mm. EMBRAPA Amazônia Oriental, Belém-PA, 2009.

Os explantes foram submetidos à assepsia e inoculados, com auxílio de *pinça estéril, em frascos autoclavados de 200 ml com 30 ml de meio de cultura (MS), solidificado com phytigel a 0,6%, autoclavado a 121⁰C por 20 minutos e com pH ajustado para 5,8, os quais foram tampados e vedados com película de parafilm e

armazenados em sala para crescimento como descrito por Torres et al. (2005a, 2005b) em suas pesquisas com *Heliconia rostrata*. Nos dois primeiros dias, foram mantidos sob ausência de luz e, posteriormente, sob fotoperíodo de 16 h.luz.dia⁻¹ com intensidade luminosa de 25 $\mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$ e temperatura de $25 \pm 3^\circ\text{C}$. Foram testados quatro tratamentos (Tabela 1).

TABELA 1- Tratamentos testados.

Tratamentos	Meio de Cultura	Bactericida	BAP
		Estreptomicina a 500 mg.L⁻¹	
T1	MS	-----	-----
T2	MS	X	-----
T3	MS	x	0,5 mg.L⁻¹
T4	MS	x	1,0 mg.L⁻¹

Nos tratamentos T2, T3 e T4, dentre as fontes de variação avaliadas, foi testado o bactericida estreptomicina, na concentração de 500 mg.L⁻¹, isoladamente e em associação ao regulador de crescimento BAP, nas concentrações de 0,5 e 1,0 mg. L⁻¹, respectivamente, para avaliar a eficiência do controle da assepsia e do estímulo deste regulador de crescimento na regeneração de plântulas.

Nestes tratamentos, o bactericida estreptomicina foi utilizado após a etapa em que as sementes foram submetidas às três lavagens com água destilada e autoclavada*, precedente à etapa em câmara de fluxo laminar. A excisão dos embriões zigóticos ocorreu, imediatamente, após a imersão, por 15 minutos, das sementes no bactericida supracitado.

O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado, utilizando-se 4 tratamentos que constaram de 30 eixos cotiledonares cada, distribuídos em 6 repetições constituídas por 5 frascos cada, contendo um eixo cotiledonar por frasco. Cada tratamento foi composto por 30 unidades experimentais, totalizando 120.

* Os instrumentos e a água destilada, utilizados na assepsia, foram autoclavados a 121^oC por 40 minutos.

A avaliação, aos 60 dias, considerou a porcentagem de plântulas regeneradas. Os dados obtidos foram submetidos, sem transformação, à análise de variância e ao teste de “Tukey”, para comparação de médias, ao nível de 95% de probabilidade, para avaliar a capacidade regenerativa dos embriões zigóticos em função da assepsia e da concentração de BAP.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados referentes às médias de regeneração de plântulas em função da assepsia e da concentração de BAP foram obtidos aos 60 dias. De acordo com análise de variância (Tabela 2), foram observadas diferenças altamente significativas entre os tratamentos testados ($F=5,9556$; $p=0,0048$).

As médias de regeneração de plântulas foram submetidas ao teste de “Tukey” e foram observadas diferenças altamente significativas entre os tratamentos T1 e T3 e diferenças significativas entre T2 e T3 e entre os tratamentos T3 e T4. Contudo, não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos T1, T2 e T4, em função da assepsia e da concentração de BAP (Figura 4).

TABELA 2 - Resumo da análise de variância para média de regeneração de plântulas aos 60 dias.

Fonte de variação	GL	S.Q.	Q. M.	F	p
Tratamentos	3	8933,3	2977,778	5,9556	0,0048
Erro experimental	20	10000,0	500,0		
Total	23	18933,3	-		

GL= Grau de liberdade; SQ = Soma dos quadrados; QM = Quadrado médio; F= Teste F; p = probabilidade

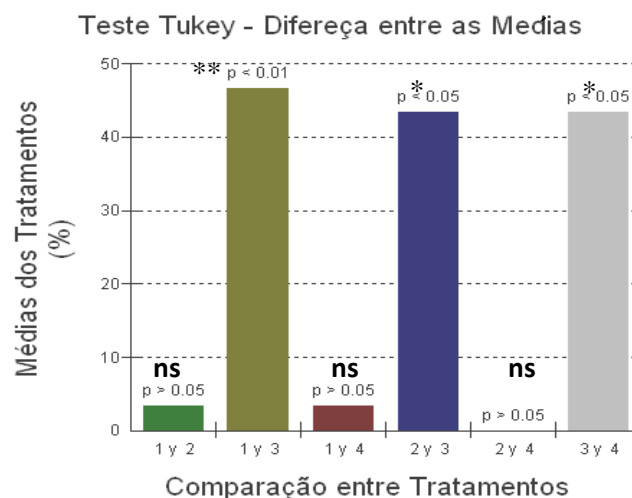


Figura 4 - Resultado das comparações entre as médias (%) dos tratamentos, através do Teste “Tukey” a 95% de probabilidade. * = significativa; ** = altamente significativa; ns = não significativa

Houve um aumento da média de regeneração de plântulas no tratamento T3, com o acréscimo de regulador de crescimento BAP a $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$, ao meio de cultura MS, concomitante com a utilização do bactericida estreptomicina a 500 mg.L^{-1} na assepsia das sementes.

A contaminação bacteriana tem sido abundantemente relatada em trabalhos de fitopatologia de plantas. Entre estas bactérias estão: *Erwinia ananas* (abacaxi); *Erwinia carotovora* (batata); *Pseudomonas syringae* (soja); *Xantomonas campestris* (feijão); *Pseudomonas cepacia* (cebola), enfim a lista é extensa e complexa demais, (ROMEIRO 1995 apud CID; ZIMMERMANN, 2006). Por esta abundância de bactérias em plantas, é que nos Estados Unidos, por exemplo, o uso de antibióticos na agricultura começou por volta de 1955, com o uso de sulfato de estreptomicina (CID; ZIMMERMANN, 2006).

Em função desta constatação é que o uso de antibióticos, como estratégia terapêutica, na cultura de tecidos de planta e no âmbito agrônômico ainda é persistente, apesar da existência de um olhar de desconfiança quanto ao seu uso pela questão da indução de resistência plasmidial. Agrava tal desconfiança, o fato de em agricultura, a quantidade de antibiótico ou quimioterápicos usados está sendo maior que no campo da saúde humana (AMABILE-CUEVAS, 2003 apud CID; ZIMMERMANN, 2006).

Os antibióticos na sua definição clássica são substâncias produzidas por microorganismos que inibem ou matam outros microrganismos. Em relação às bactérias, os antibióticos, podem ser agrupados conforme seu modo de ação: inibidores de síntese de: parede celular (cefotaxima, penicilina), proteínas (cloranfenicol, gentamicina, canamicina, estreptomicina, tetraciclina, puromicina, cicloheximida), DNA (Enoxacin), RNA (actinomicina D, rifampicina). Também existem os que alteram a permeabilidade iônica das membranas, mitocôndrias, (valinomicina, gramicidina A). Por outro lado, eles também podem ser agrupados conforme sua estrutura química: aminoglicosídeos (canamicina, neomicina, estreptomicina, gentamicina, G 418), quinolonas (enoxacin, ofloxacin); β -lactâmicos (penicilina, carbenicilina, ampicilina, cefalosporina); glicopeptídeos, (vancomicina); polimixinas (B-E), (REED e TANPRASET, 1995 apud CID; ZIMMERMANN, 2006).

O inverso foi observado com o aumento da concentração de BAP a 1,0 mg.L⁻¹, pois o uso de citocinina estimula maior produção de partes aéreas até determinada concentração, mas seu excesso é tóxico (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Os mesmos autores citam a vitrificação, como um dos sintomas que mais caracteriza a toxidez, tal sintoma é conceituado por Pasqual et al. (1991) como o aspecto brilhante ou vítreo apresentado por algumas plantas obtidas *in vitro*, embora não tenha sido observado neste trabalho. Em contrapartida, Dias, Barros e Carvalho (2005) obtiveram melhores resultados em meio de cultura MS suplementado com BAP a 1,0 mg.L⁻¹, para regeneração de plântulas *in vitro*, a partir de embriões zigóticos, da mesma cultivar.

É provável que o genótipo da planta tenha interferido diretamente nesta divergência de resultados, pois o genótipo determina diferentes respostas nos diferentes estágios da micropropagação; além da idade e atividade fisiológica da planta-matriz (HARBAGE; STIMART, 1996, apud PEDROTTI; VOLTOLINI, 2001),

Torres et al. (2005b) comprovaram em suas pesquisas, com *Heliconia rostrata*, que o embrião zigótico, em desenvolvimento, foi capaz de biossintetizar as citocininas necessárias para sua regeneração, sem a necessidade de regulador de crescimento complementar. Silva (2005) observou em suas pesquisas que os embriões zigóticos provenientes de frutos maduros de *H. bihai* cv. "(L.) L. Lobster Claw Two" favoreceram a formação de embriões somáticos em meio de cultura MS, sem regulador de crescimento.

O mesmo autor, em seus trabalhos com *Heliconia chartacea*, pesquisou a embriogênese somática, por meio da técnica de indução de calos, e a cultivar "Sexy Scarlet" mostrou-se menos responsiva que a cultivar "Sexy Pink". O autor relatou que mesmo sendo cultivares da mesma espécie, o genótipo exerceu uma influência no comportamento *in vitro* e isso pode estar associado à recalcitrância de determinadas espécies de *Liopsida* (monocotiledôneas).

Em pesquisas com bananeira, Silva, Matos e Alves (1998) não comprovaram eficiência da técnica de resgate de embriões. Mas Neves, Silva e Oliveira (2001, 2002) avaliaram com eficiência esta técnica na germinação *in vitro* de embriões zigóticos maduros, de bananeira, e comprovaram que não foi necessária a presença de reguladores de crescimento para tal finalidade. Resultado semelhante foi obtido por Camolesi et al. (2007) que estudaram o número de brotos obtidos e o grau de oxidação para regeneração *in vitro* de bananeira cv. "Maçã", utilizando ápices

caulinares, como explantes, os quais foram submetidos a tratamentos com substâncias antioxidantes. O menor grau de oxidação foi obtido com o pré-tratamento dos ápices caulinares em $0,25 \text{ g L}^{-1}$ de ácido cítrico e $0,75 \text{ g L}^{-1}$ de citrato de potássio, sem a adição desses antioxidantes ao meio de cultura MS constituído pela metade da concentração dos sais ($\frac{1}{2}$ MS), sem reguladores de crescimento e com a ocorrência de regeneração de brotos.

Rodrigues (2005) obteve em seus estudos com os antimicrobianos cloranfenicol, cefotaxima e a forma associada cloranfenicol + cefotaxima em concentrações de 50, 150, 250 e 500 mg.L^{-1} , aplicados ao meio de cultura MS suplementado com $3,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP, melhor controle de endofíticos na assepsia de ápices caulinares de *Heliconia rauliniana*, utilizados como explantes, com o bactericida cefotaxima a 500 mg.L^{-1} , isoladamente. Resultado semelhante foi obtido por Shiau, Wang e Tsay (1999), em suas pesquisas com *Heliconia psittacorum* cv. "Rhizomatosa", utilizando ápices caulinares. Foram testadas as concentrações de 25, 50, 100 e 500 mg.L^{-1} de Cefotaxima para controlar a contaminação nos explantes. Menor taxa de contaminação foi observada nos brotos regenerados a partir de ápices caulinares, submetidos à assepsia com cefotaxima a 500 mg.L^{-1} , por um período de três dias em meio de cultura MS líquido, sem regulador de crescimento.

No presente trabalho, a utilização de estreptomicina a 500 mg.L^{-1} mostrou-se eficiente no controle da assepsia de sementes de *Heliconia chartacea* Lane ex Barreiros cv. "Sexy Scarlet", contribuindo para o êxito da regeneração de plântulas *in vitro* (Figura 5).



Figura 5 - Plântula de *H. chartacea* Lane ex Barreiros cv. "Sexy Scarlet" regenerada aos 60 dias. EMBRAPA - Amazônia Oriental, Belém-PA, 2009.

É provável que pelo fato dos explantes utilizados serem constituídos por tecidos não vascularizados, os mesmos sejam livres de bactérias endofíticas (LAMEIRA, 2000), provenientes da planta matriz fornecedora dos explantes (NAKANO, 2008), provavelmente existentes.

Através de observação visual foi possível perceber que a germinação dos embriões zigóticos ocorreu entre o sétimo e o décimo dia em todos os tratamentos testados. Período de tempo bem inferior à germinação das sementes de *Heliconia* sob condições naturais. Todavia, não foi realizada análise estatística para esta variável de resposta, pois os embriões zigóticos germinados foram regenerados, na sua totalidade, em plântulas completas. Foi observado, também, que a regeneração dos embriões zigóticos, em plântulas completas, ocorreu em torno do trigésimo dia, após inoculação *in vitro*. Não foi observada a ocorrência de oxidação, como esperado, em função da excisão dos embriões zigóticos ter sido realizada sem causar lesão tecidual.

Os resultados obtidos neste pré-protocolo sinalizam os passos a serem seguidos em futuros experimentos para otimização das metodologias desenvolvidas.

No que concerne ao meio de cultura, estudos devem ser realizados em relação ao seu estado físico, na tentativa de diminuir os custos de produção, assim como em sua composição, em relação às concentrações dos sais, considerando,

também, a viabilidade de desenvolver uma composição orgânica, mas de acordo com o contexto ecológico atual. O que, conseqüentemente, implicará também a utilização de diferentes concentrações e combinações de fitormônios.

Deve-se viabilizar, também, o desenvolvimento de metodologias de polinização controlada, o que possibilitará manter o caráter clonal da técnica de propagação *in vitro*, via resgate de embriões, em todas as suas etapas. Assim como obter maior controle das características agrônômicas desejáveis das flores e mudas, visando atender às exigências de mercado.

Estudos preliminares foram realizados para a execução deste trabalho que objetivou identificar as condições *in vitro* mais viáveis para assepsia de sementes e regeneração de plântulas da cultivar “Sexy Scarlet”, testando concentrações de BAP e a presença ou ausência do bactericida estreptomicina. E, através desses estudos, que funcionaram como ponto de partida para este pré-protocolo, foi possível definir:

a) a metodologia mais adequada para excisão do embrião, como medida preventiva para evitar ou minimizar a ocorrência de oxidação, observada nesses estudos, e para a regeneração completa de plântulas, indicando a necessidade de excisão sem lesão tecidual, preservando o embrião íntegro;

b) a inviabilidade de incluir o cotilédone como explante, pois devido à sua constituição farinácea, o mesmo não resistiu à pré-assepsia e foi naturalmente diluído;

c) a necessidade de utilização de um bactericida, devido à grande ocorrência de contaminação, por bactérias, observada;

d) o bactericida testado; optando-se pela estreptomicina, por apresentar um histórico de utilização na agricultura, acessibilidade, amplo espectro de ação e custo de mercado reduzido;

e) a concentração de estreptomicina a ser testada, com base em trabalhos científicos de propagação *in vitro* de espécies de *Heliconia* e de *Musa* spp. (bananeira), descritos na literatura, embora com a utilização de outro bactericida. Foi testado o bactericida cefotaxima, que apresenta maior custo de mercado e com distribuição restrita à rede hospitalar, e cujos resultados indicaram a concentração

de 500 mg.L⁻¹ como mais eficiente no controle da assepsia de ápices caulinares das espécies supracitadas;

f) as concentrações de BAP, testadas, considerando que, nesses estudos, ocorreu regeneração em meio de cultura MS, sem a necessidade desse regulador de crescimento; uma evidência de que o embrião foi capaz de se regenerar sem a necessidade de regulador de crescimento exógeno ou que a necessidade, caso existente, seria em baixas concentrações;

g) o tempo, em dias, suficiente para a regeneração completa das plântulas e, conseqüentemente, para uma eficiente coleta dos dados em todos os tratamentos testados;

Descreve-se, portanto, como metodologia eficiente para regeneração *in vitro* da cultivar “Sexy Scarlet”, a utilização de embriões zigóticos, como explantes; a assepsia das sementes com o bactericida estreptomicina a 500 mg.L⁻¹ e a utilização do meio de cultura MS, solidificado com phytigel a 0,6% e suplementado com BAP a 0,5 mg. L⁻¹, comprovando-se a hipótese de trabalho.

Em suma, a espécie *Heliconia chartacea* Lane ex Barreiros cv. “Sexy Scarlet” apresentou, segundo os resultados obtidos nesse trabalho, adaptabilidade satisfatória às técnicas de cultura de tecidos utilizadas, comprovando-se ter potencial para o processo de propagação *in vitro*.

7 CONCLUSÕES:

- a) A maior percentagem de plântulas regeneradas de *Heliconia chartacea* Lane ex Barreiros cv. “Sexy Scarlet” ocorreu na presença de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP.
- b) O bactericida estreptomicina, na concentração de 500 mg.L^{-1} , foi eficiente no controle da assepsia de sementes de *Heliconia chartacea* Lane ex Barreiros cv. “Sexy Scarlet”, para obtenção de plântulas *in vitro*.

8 REFERÊNCIAS

- ÁLVAREZ, E. et al. Applying biotechnology tools to control plant diseases. **Fitopatol. Colombiana**. Colômbia, 28, 2, 93-97, 2005.
- ARANYNAT, S.; SAE-LIM, P.; PHASURAWONG, P. *In vitro* micropropagation of *Heliconia* sp. King Mongkut's Agricultural Journal Thailand. Tailândia, 20, 3, 38-46, 2002. **Resumo**.
- ATEHORTUA, L. "Heliconias: A new challenge for the Colombian floricultural industry." **Biotechnology and Development Monitor**. Colômbia, 31, 20-21, 1997.
- BARBOZA, S. B. S. C.; CALDAS, L. S. Estiolamento e Regeneração na multiplicação *in vitro* do abacaxizeiro híbrido PE X SC-52. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 36, 3, 2001.
- BERRY, F.; KRESS, W. J. **Heliconia: an identification guide**. Washington and London: Smithsonian Institution Press, 1991. 334 p.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios Nutritivos In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. 1ª. ed. Brasília-DF: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), 1998, 1, 87-132, 509 p.
- CALVETE, E. O.; KAMPF, A. N.; SUZIN, M. Concentração de sacarose no enraizamento *in vitro* de morangueiro. **Hortic. Bras.**, 20, 2, 186-191, 2002.
- CAMOLESI, M. R.; KAIHARA, E. S.; SACONI, C. G.; FARIA, R. T. de; NEVES, C. S. V. J. Oxidation reduction of *in vitro* propagation of bananeira cv. Maçã plants. **Ciênc. Agrotec.**, 31, 4, 1237-1241, 2007.
- CARVALHO, A. dos S. et al. CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIÕES DE NECTARINEIRA. In: **XX Congresso Brasileiro de Fruticultura**, 2008, Vitória-ES. **Anais**.
- CARVALHO, J. M. F. C.; ARAÚJO, S. de S. Aplicação do Cultivo de Embrião Zigótico ou Imaturo, no Melhoramento Vegetal. **Documentos**. Campina Grande-PB, 170, 2007, 35 p.
- CASTRO, C. E. F. Helicônias para exportação: aspectos técnicos da produção. Brasília-DF: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) - MAARA. **FRUPEX**, 1995. 44p.
- CASTRO, A. C. R. de. Deficiência de Macronutrientes em Helicônia 'Golden Torch'. 102 f. **Tese** (Doutorado em Botânica). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE. 2007.

CASTRO, C. E. F. de; MAY, A.; GONÇALVES, C. Nomenclature review of species of genus *Heliconia* (*Heliconiaceae*). **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**. Campinas-SP, 13, 1, 1-89, 2007.

CID, L. P. B. **Introdução aos hormônios vegetais**: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) - Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasília-DF, 2000. 180 p.

CID, L. P. B.; ZIMMERMANN, M. J. A contaminação *in vitro* de plantas. **Boletim de Pesquisa**: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) - Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasília-DF, 20 p, 122, 2006.

COCKBURN, B. V. Studies in the *in-vitro* propagation of *Heliconia* spp. 158 f **Dissertação**. St. Augustine-Trinidad e Tobago. 1996. **Resumo**.

COSTA, A. S. da. et al. Perfilamento e expansão de touceiras de *Heliconia*. **Hortic. Bras.** Brasília-DF, 24 ,4, 460-463, 2006.

COSTA, A. S. da. Conservação pós-colheita, sintomas e respostas fisiológicas da senescência e injúria por frio em hastes florais de *Heliconia bihai* (L.). **Tese** (Doutorado em Botânica). 83 f. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE. 2009.

COSTA, A. S. et al. *HELICONIA* GENOTYPES UNDER PARTIAL SHADE: II. EVALUATION OF FLOWERING STEMS. **Acta Hort.**, 813, 171-176, 2009.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**: Columbia University Press. New York, 1988. 1262 p.

DANIELS, G. S.; STILES, F. G. The *Heliconia* taxa of Costa Rica. **Keys & Descriptions**. **Brenesia**, 15, 1, 1979, 150 p.

DIAS, G. de M. G.; BARROS, L. de M.; CARVALHO, A. C. P. P de. PROPAGAÇÃO DE *Heliconia chartacea* CV. SEXY SCARLET POR CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE FECUNDAÇÃO ABERTA. In: III ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA) AGROINDÚSTRIA TROPICAL. 2005. Fortaleza-CE. **Resumos**, p. 23.

DIAS, G. de M. G.; BARROS, L. de M.; CARVALHO, A. C. P. P de; RODRIGUES, J. S. Alongamento e enraizamento *in vitro* de mudas de *Heliconia lingulata*. IV ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA)- AGROINDÚSTRIA TROPICAL. 2006. Fortaleza-CE. **Resumos**.

FAUTH, A. et al. Aclimatização de mudas de abacaxi (*Ananas comosus* (L.) Merrill) resistentes à fusariose, cultivadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Cruz das Almas-BA, 16, 2, 7-12, 1994.

FERREIRA, M. E.; CALDAS, L. S.; PEREIRA, E. A. Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. 1ª. ed. Brasília-DF: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), 1998, 1, 21-43, 509 p.

GRATAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. 1ª. ed. Brasília-DF: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), 1998, 1, 180-260, 509 p.

GUERRA, M. P. et al. Estabelecimento de um protocolo regenerativo para a micropropagação do abacaxizeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília-DF, 34, 9, 1557-1563, 1999.

HU, C. Y.; FERREIRA, A. G. Cultura de embriões. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. 1ª. ed. Brasília-DF: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), 1998, 1, 371-394, 509 p.

KERBAUY, G. B. Clonagem de plantas *in vitro*: uma realidade. **Biotecnologia: Ciência & Desenvolvimento**, 1, 1, 1997.

KRESS, W. J. Systematics of Central American *Heliconia* (*Heliconiaceae*) with pendant inflorescences. **J. Arnold Arbor**. Harvard, 65, 4, 429-532, 1984.

KUMAR, R.; SOOCH, M. Planting material in floriculture: selection and limitations. **Indian Horticulture**, 46, 4, 10-13, 2002. **Resumo**.

LAMEIRA, O. A. et al. Cultura de Tecidos (**Manual**): Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) – CPATU. Belém-PA, 66, 2000, 39 p.

LEMOS, O. F. de et al. Efeito de reguladores de crescimento na multiplicação *in vitro* de brotos de abacaxizeiro. **Boletim de Pesquisa**: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) – CPATU. Belém-PA, 204, 1998. 14 p.

LEMOS, O.F. de. Mutagênese e Tecnologia *in vitro* no Melhoramento Genético da pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.).159 f. **Tese** (Doutorado em Agronomia). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), Piracicaba-SP. 2003.

LOGES, V. et al. Colheita, pós-colheita e embalagem de flores tropicais em Pernambuco. **Hortic. Bras.** Brasília-DF, 23, 3, 2005.

MARQUES, J. M. et al. Estudo da variabilidade genética entre indivíduos de populações de *Heliconia Bihai* e *Heliconia rostrata*. **Boletim de Pesquisa**: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) - Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasília-DF, 69, 2004,15p.

MATSUMOTO, K. Giberelinas. In: CID, L. P. B. **Introdução aos hormônios vegetais**. Brasília-DF: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) - Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. 180 p.

MORAES, C. F. Propagação por rebentos e germinação de sementes *in vitro* da alcachofra. 158 f. **Dissertação** (Mestrado em Agronomia). Universidade de Passo Fundo – RS. 2007.

MOSCA, J. L. et al. Helicônia: Descrição, Colheita e Pós-Colheita. **Documentos**: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) - Agroindústria Tropical. Fortaleza-CE, 91, 2004. 33 p.

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

NAKANO, V. A. Micropropagação de espécies de helicônia, caracterização morfológica e identificação molecular de bactérias contaminantes. 81 f. **Dissertação** (Mestrado em Ciências). Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, Piracicaba-SP. 2008.

NEVES, T. dos S.; SILVA, S. de O. e; OLIVEIRA, R. P. de. Resgate *in vitro* de embriões em genótipos diplóides de bananeira. **Pesq. Agropec. Bras.** Brasília-DF, 36, 2, 2001.

NEVES, T. dos S.; SILVA, S. de O. e; OLIVEIRA, R. P. de. Desenvolvimento *in vitro* de plântulas de diplóides de bananeira obtidas a partir de cultura de embriões. **Rev. Bras. Frutic.** Jaboticabal-SP, 24,1, 2002.

OKUDA, T. Mercado de flores tem grande potencial no país. **Frutas e Legumes**. São-Paulo, 1, 3, 22-26, 2000.

OLIVEIRA, R. F. de. et al. Produção de Flores de *Heliconia bihai* com adubação mineral e orgânica. **Comunicado Técnico**: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) – CPATU Belém-PA, 166, 2006. 5 p.

PASQUAL, M. et al. Influência de 6-Benzilaminopurina, sacarose e ágar sobre a vitrificação de brotos de pereira *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília-DF, 26, 1919-1924, 1991.

PEDROTTI, E. L; VOLTOLINI, J. A. Enraizamento *ex vitro* e aclimatização do porta-enxerto de macieira M.9. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 23, 2, 234-239, 2001.

PIZA, M. de T.; LIMA, G. P. P.; BRASIL, O. G. Reguladores vegetais na micropropagação do abacaxizeiro. **Revista Ceres**, 48, 280, 681-690, 2001.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHOHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 6^a ed. Guanabara Koogan, 2001. 906 p.

RESTREPO, J. J. A. Enfermedades en la producción de Heliconias en los departamentos de Caldas, Risaralda y Quindío. **Agron.**, 15, 1, 45 - 61, 2007.

ROCHA, J. C. Comercialização de flores e folhagens tropicais no município de Ilhéus-BA. 2007. 55 f. **Monografia** (Bacharelado em Ciências Econômicas). Universidade de Santa Cruz. Ilhéus-BA.

- RODRIGUES, P. H. V. *In vitro* establishment of *Heliconia rauliniana* (Heliconiaceae). **Sci. Agric.** Piracicaba-SP, 62, 1, 2005.
- RODRIGUES, P. H. V. et al. Acclimatization of micropropagated *Heliconia bihai* (Heliconiaceae) plants. **Sci Agric.**, 62, 3, 2005.
- RODRIGUES, P. H. V et al. *Heliconia bihai* var. Lobster Claw I: Cut flower field production from micropropagated versus rhizome-derived plants. **Floriculture, ornamental and plant biotechnology: advances and topical issues**. London: Global Science Books, 558-560, 2006.
- RODRIGUES, P. H. V. et al. Propagação de mudas de helicônia em biorreator de imersão temporária. **Bragantina**. Campinas-SP, 65, 1, 29-35, 2006.
- SBRT (Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas)/SENAI (Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial). Disponível em: <http://www.sbrt.ibict.br>. Acesso em 12 de agosto de 2009.
- SEBRAE (Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas). Disponível em: <http://www.df.sebrae.com.br>. Acesso em 12 de setembro de 2009.
- SHIAU, Y. J.; WANG, T. Y.; TSAY, H. S. Studies on Tissue Culture of *Heliconia psittacorum* cv. Rhizomatosa . Effect of Cefotaxime and Plant Growth Regulators on Growth of Shoot Tip Explants *in Vitro*. **Jour. Agric. Res.** China, 48, 4, 42-51,1999.
- SILVA, C. U. de C. Cultivo *in vitro* de espécies de *Heliconia* (*Heliconia* spp.) mediante embriogênese somática e embriões zigóticos. 87 f. **Tese** (Doutorado em Botânica). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE. 2005.
- SILVA, S. de O e; MATOS, A. P. de; ALVES, E. J. Melhoramento Genético da Bananeira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 5, 1998, 11 p.
- SIMÃO, D. G.; SCATENA, V. L. Morphological aspects of the propagation in *Heliconia velloziana* L. Emygd. (Zingiberales: Heliconiaceae). **Braz. Arch. Biol. Technol.** Curitiba-PR, 46, 1, 2003.
- SIMÃO, D. G.; SCATENA, V. L.; BOUMAN F. Anther development, microsporogenesis and microgametogenesis in *Heliconia* (Heliconiaceae, Zingiberales). **Flora**, 202, 148-160, 2007.
- TORRES, A. C.; TEIXEIRA, S. L.; POZZER, L. Cultura de ápices caulinares e cultura de plantas livres de vírus. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. 1^a. ed. Brasília-DF: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), 1998, 1, 133-146, 509 p.
- TORRES, A. C. Efeito da sacarose, cinetina, isopentenil adenina e zeatina no desenvolvimento de embriões de *Heliconia rostrata* *in vitro*. **Hortic. Bras.**, 23, 3, 789-792, 2005.

TORRES, A. C. et al. Produção de mudas de *Heliconia rostrata* Livres de Doenças via cultura de Embriões. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) - Hortaliças – Brasília-DF, 6, 2005, 13 p.

USBERTI FILHO, J. A. Inheritance of leaf spiness and segregation of leaf color in pineapple (*Ananas comosus* L. Merrill). **Brasilian Journal of Genetics**, 18, 4, 547-552, 1995.

WEBER, O. B. Efeito da bactéria diazotrófica em mudas micropropagadas de abacaxizeiro Cayenne Champac em diferentes substratos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília-DF, 38, 6, 689-696, 2003.

ZANELLA, M. Cadeia de produção de *Zantedeschia* spp. no estado de São Paulo. Florianópolis-SC. 2006. **Relatório**.

ANEXO A - Composição do meio de cultura MS (MURASHIGE E SKOOG, 1962).

Composto	Concentração (mg. L⁻¹)
Macronutrientes	
NH ₄ NO ₃	1, 650
KH ₂ PO ₄	170
KNO ₃	1, 900
MgSO ₄ . 7H ₂ O	370
CaCl ₂ . 2H ₂ O	440
Fe-EDTA	
FeSO ₄ . 7H ₂ O	27,8
Na ₂ EDTA. 2H ₂ O	37,3
Micronutrientes	
MnSO ₄ . 4H ₂ O	22,3
ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	8,6
H ₃ BO ₃	6,2
KI	0,83
Na ₂ MoO ₄ . 2 H ₂ O	0,25
CuSO ₄ . 5 H ₂ O	0, 025
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0, 025
Vitaminas	
Tiamina – HCl	0,10
Piridoxina –HCl	0,50
Ácido nicotínico	0,50
Glicina	2,00
Mio-inositol	100,00
Fonte carbono	
Sacarose	30, 000
pH	5,8

ANEXO B - Artigo científico extraído do plano de tese

CULTIVO *IN VITRO* DE *Heliconia chartacea* Lane ex Barreiros CV. “Sexy Scarlet” A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS - *Heliconiaceae*

RESUMO: O experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia de Plantas da EMBRAPA Amazônia Oriental, Belém-PA. As fontes de explantes utilizadas foram frutos maduros de *Heliconia chartacea* Lane ex Barreiros cv. “Sexy Scarlet”, provenientes de plantas cultivadas no campo. Essa espécie é uma *Heliconiaceae* de alto interesse econômico para o mercado de floricultura nacional e internacional. O objetivo deste trabalho foi desenvolver metodologias eficientes para propagação *in vitro* de plântulas, a partir de embriões zigóticos, desta espécie. O experimento foi constituído das etapas de assepsia, estabelecimento e regeneração de plântulas. Os dados foram coletados aos 60 dias e foi observada menor taxa de regeneração de plântulas em meio de cultura MS e maior taxa de regeneração de plântulas em meio de cultura MS suplementado com bactericida estreptomicina a 500 mg.L⁻¹ e regulador de crescimento BAP a 0,5 mg.L⁻¹.

TERMOS PARA INDEXAÇÃO: *Heliconia*, Regulador de Crescimento, Propagação *in vitro*, Cultivo de Embrião.

IN VITRO* CULTURE OF *Heliconia chartacea* Lane ex Barreiros CV. “Sexy Scarlet”¹ FROM ZYGOTIC EMBRYOS - *Heliconiaceae

ABSTRACT: The experiment was made in the Biotechnology of Plants Laboratory of EMBRAPA Amazonia Oriental, Belem-Para, with the objective to develop efficient methodologies for *in vitro* propagation of *Heliconia chartacea* Lane ex Barreiros cv. “Sexy Scarlet”, from zygotic embryos. This species is a *Heliconiaceae* of high economic interest for the national and international flowers’s market. The sources of explants were mature fruits of this species, proceeding from the field. The phases of the experiments were the stages of asepsis, establishment and plants regeneration. The data had been collected to the 60 days and it was observed minor tax of plants regeneration in culture medium MS and bigger tax of plants regeneration, in culture medium MS supplemented with 500 mg.L⁻¹ of bactericidal streptomycin and 0,5 mg.L⁻¹ of growth regulator BAP.

INDEX TERMS: *Heliconia*, Growth Regulator, Micropropagation, Embryo Culture.

1 INTRODUÇÃO

A Família *Heliconiaceae*, nativa das regiões tropicais, é dentre os vários grupos de plantas um dos que mais se destaca. A beleza, a exuberância, o colorido e a durabilidade de suas inflorescências são de interesse crescente para o mercado de floricultura nacional e internacional.

Cerca de 250 espécies fazem parte desse belo e diversificado grupo, porém somente cerca de 180 foram, até o momento, descritas. As inflorescências apresentam coloração variada: amarela, vermelha, roxa, pink, alaranjada, entre outras. Podem ser de tamanho pequeno, médio e grande, dependendo da espécie e, ainda, pendentes ou emergir da base da planta. De acordo com Dias, Barros e Carvalho (2005), existe grande interesse comercial pelas cultivares “Sexy Scarlet” e “Sexy Pink”, da espécie *Heliconia chartacea*.

A propagação dá-se, principalmente, via multiplicação de rizomas. Contudo, de acordo com Dias, Barros e Carvalho (2005), os rizomas apresentam um grande número de fitopatógenos, o que possibilita alto índice de disseminação de doenças.

A propagação sexuada de helicônia é limitada, pois, embora ocorra polinização e fertilização, as sementes podem conter embriões não desenvolvidos ou pouco desenvolvidos que não germinam. Outras vezes, devido à dureza do endocarpo, os embriões não conseguem germinar (TORRES et al., 2005).

Os mesmos autores comentam que essa limitação pode ser contornada pela utilização da técnica de resgate de embriões. Essa técnica propicia a propagação rápida de plantas, a recuperação de plantas livres de doenças, a conservação e intercâmbio de germoplasma, a introdução de deste como semente botânica e a superação da dormência de sementes.

Por ser uma cultura relativamente nova no Brasil, poucos centros de pesquisa têm se dedicado ao seu estudo, principalmente no que diz respeito ao cultivo *in vitro* (RODRIGUES et al, 2006).

Esses fatores ressaltam a necessidade de desenvolvimento de um sistema de cultivo que vise ao aproveitamento do potencial econômico desta família. Nesse sentido, a aplicação da propagação *in vitro*, com ênfase na técnica de cultivo de embriões, surge como alternativa viável para suprir tal necessidade.

Este trabalho objetivou desenvolver metodologias eficientes para a propagação *in vitro* de *Heliconia chartacea* cv. “Sexy Scarlet”.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia de Plantas da EMBRAPA Amazônia Oriental, Belém-PA.

Foram utilizados como fontes de explantes, frutos maduros de coloração roxa (Figura 1) da espécie *Heliconia chartacea* cv. “Sexy Scarlet”, provenientes de plantas adultas, cultivadas no Campo Experimental da EMBRAPA Amazônia Oriental, Belém-PA (Figura 2).

Os frutos obtidos foram imersos em hipoclorito de sódio comercial a 2,5%, por 15 minutos e, em seguida, despulpados. As sementes foram lavadas com água destilada e detergente comercial neutro, imersas em álcool a 70%, por 2 minutos; posteriormente imersas em NaOCl comercial a 0,5 %, por 15 minutos, e lavadas 3 vezes com água destilada e autoclavada a 121⁰ C por 40 minutos. Os embriões zigóticos foram, então, excisados das sementes com auxílio de alicate de unha autoclavado a 121⁰ C por 40 minutos. Procedimento semelhante foi realizado por Dias, Barros e Carvalho (2005), utilizando a mesma cultivar.



Figura 1 - Fruto maduro de *H. chartacea* Lane ex Barreiros cv. “Sexy Scarlet”. EMBRAPA Amazônia Oriental, Belém-PA, 2009.



Figura 2 - Planta de *H. chartacea* Lane ex Barreiros cv. "Sexy Scarlet"
EMBRAPA Amazônia Oriental, Belém-PA, 2009.

Os explantes foram preservados e, posteriormente, inoculados, após imersão em NaOCl 0,5%, por 15 minutos, e 3 lavagens com água destilada e autoclavada a 121^o C por 40 minutos, em câmara de fluxo laminar, sob condições assépticas, como descrito por Torres et al (2005 a, 2005 b) em suas pesquisas com *Heliconia rostrata*. No presente trabalho, apenas o eixo cotiledonar, que corresponde a um dos componentes do embrião zigótico, foi utilizado como explante (Figura 3).

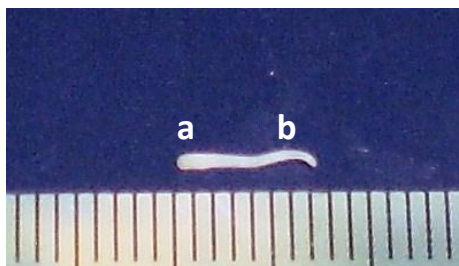


Figura 3 - Eixo cotiledonar de *H. chartacea* Lane ex Barreiros cv. "Sexy Scarlet", mostrando (a) bainha cotiledonar e (b) haustório. Escala de 1 mm.
EMBRAPA Amazônia Oriental, Belém-PA, 2009.

Após assepsia, os explantes foram inoculados, com auxílio de pinça estéril, em frascos autoclavados de 200 ml com 30 ml de meio de cultura MS, solidificado com ágar a 0,6%, autoclavado a 121 °C por 20 minutos e com pH ajustado para 5,8, os quais foram tampados e vedados com película de parafilm e armazenados em sala para crescimento. Nos dois primeiros dias foram mantidos sob ausência de luz e, posteriormente, sob fotoperíodo de 16 h.luz. dia⁻¹ com intensidade luminosa de 25 $\mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$ de irradiância e temperatura de $25 \pm 3^\circ\text{C}$.

Nos tratamentos T2, T3 e T4, dentre as fontes de variação avaliadas, foi testado o bactericida estreptomicina, na concentração de 500 mg.L⁻¹, isoladamente e em associação ao regulador de crescimento 6-Benzilaminopurina (BAP), nas concentrações 0,0, 0,5 e 1,0 mg.L⁻¹, respectivamente, para avaliar a eficiência da assepsia e do estímulo deste regulador de crescimento na regeneração de plântulas.

Nestes tratamentos, o bactericida estreptomicina foi utilizado após a etapa em que as sementes foram submetidas às três lavagens com água destilada e autoclavada a 121 °C por 40 minutos, precedente à etapa em câmara de fluxo laminar. A excisão dos embriões zigóticos ocorreu, imediatamente, após a imersão, por 15 minutos, das sementes no bactericida supracitado.

Os tratamentos testados corresponderam a: T1= MS; T2= MS + estreptomicina a 500 mg.L⁻¹; T3= MS + BAP a 0,5 mg.L⁻¹ + estreptomicina a 500 mg.L⁻¹; T4= MS + BAP a 1,0 mg.L⁻¹ + estreptomicina 500mg.L⁻¹.

O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado, utilizando-se 4 tratamentos que constaram de 30 eixos cotiledonares cada, distribuídos em 6 repetições constituídas por 5 frascos cada, contendo um eixo cotiledonar por frasco. Cada tratamento foi composto por 30 unidades experimentais, totalizando 120.

A avaliação, aos 60 dias, considerou a percentagem de plântulas regeneradas. Os dados obtidos foram submetidos, sem transformação, à análise de variância e ao teste de “Tukey”, para comparação de médias, para avaliar a capacidade regenerativa dos eixos cotiledonares em função da assepsia e da concentração de BAP.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados referentes às médias de regeneração de plântulas em função da assepsia e da concentração de BAP foram obtidos aos 60 dias. De acordo com análise de variância (Tabela 1), foram observadas diferenças altamente significativas entre os tratamentos testados ($F=5,9556$; $p=0,0048$).

As médias de regeneração de plântulas foram submetidas ao teste de “Tukey” (Figura 4), ao nível de 95% de probabilidade, e foram observadas diferenças altamente significativas entre os tratamentos T1 e T3 e diferenças significativas entre T2 e T3 e entre os tratamentos T3 e T4. Contudo, não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos T1, T2 e T4, em função da assepsia e da concentração de BAP.

TABELA 1 - Resumo da Análise de Variância para média de regeneração de plântulas aos 60 dias.

Fonte de variação	GL	S.Q.	Q. M.	F	<i>p</i>
Tratamentos	3	8933.3	2977.778	5.9556	0.0048
Erro experimental	20	10000.0	500.0		
Total	23	18933.3	-		

GL= Grau de liberdade; SQ = Soma dos quadrados; QM = Quadrado médio; F= Teste F; *p* = probabilidade

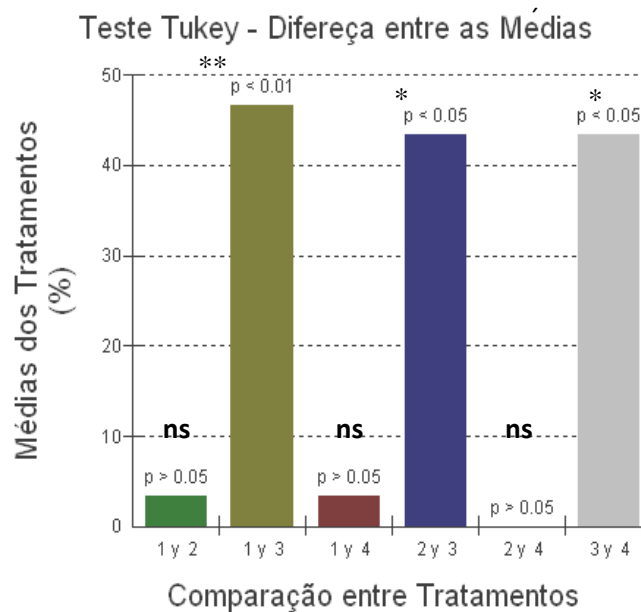


Figura 4 - Resultado das comparações entre as médias (%) dos tratamentos, através do Teste “Tukey” a 95% de probabilidade. * = significativo; ** = altamente significativo; ns = não significativo.

Houve uma tendência no aumento da média de regeneração de plântulas no tratamento T3, com o acréscimo de regulador de crescimento BAP a $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$, juntamente com a utilização do bactericida estreptomicina a 500 mg.L^{-1} ao meio de cultura MS.

E o inverso foi observado com o aumento da concentração de BAP a $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$, pois o uso de citocinina estimula maior produção de partes aéreas até determinada concentração, mas seu excesso é tóxico (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Contudo, Dias, Barros e Carvalho (2005) obtiveram melhores resultados em meio de cultura MS suplementado com BAP a $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$, para desenvolvimento de plântulas *in vitro*, a partir de embriões zigóticos, da mesma cultivar.

É provável que o genótipo da planta tenha interferido diretamente nesta divergência de resultados, pois o genótipo determina diferentes respostas nos diferentes estágios da micropropagação; além da idade e atividade fisiológica da planta-matriz (HARBAGE; STIMART, 1996, apud PEDROTTI; VOLTOLINI, 2001),

Torres et al. (2005 b) comprovaram em seus trabalhos, com *H. rostrata*, que o embrião zigótico, em desenvolvimento, foi capaz de biossintetizar as citocininas necessárias para seu crescimento, sem a necessidade de regulador de crescimento complementar.

Rodrigues (2005) obteve, com o bactericida cefotaxima a 500 mg.L^{-1} , melhor controle na assepsia de ápices caulinares de *H. rauliniana* utilizados como explantes. No presente trabalho, a utilização de estreptomicina a 500 mg.L^{-1} mostrou-se eficiente na assepsia de sementes de *H. chartacea* cv. "Sexy Scarlet", contribuindo de modo decisivo para o êxito da regeneração de plântulas *in vitro*. (Figura 5).



Figura 5 - Plântula de *H. chartacea* cv. "Sexy Scarlet" regenerada aos 60 dias. EMBRAPA- Amazônia Oriental, Belém-PA, 2009.

4 CONCLUSÕES :

- a) A maior percentagem de plântulas regeneradas de *H. chartacea* cv. "Sexy Scarlet" ocorreu na presença de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP.

- b) O bactericida estreptomicina, na concentração de 500 mg.L^{-1} , foi eficiente na assepsia de sementes de *H. chartacea* cv. "Sexy Scarlet", para obtenção de plântulas *in vitro*.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DIAS, G. de M. G.; BARROS, L. de M.; CARVALHO, A. C. P. P de. PROPAGAÇÃO DE *Heliconia chartacea* CV. SEXY SCARLET POR CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE FECUNDAÇÃO ABERTA. In: III ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA) AGROINDÚSTRIA TROPICAL. 2005. Fortaleza-CE. **Resumos**, p. 23.

GRATAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. 1ª. ed. Brasília-DF: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), 1998, 1, 180-260, 509 p.

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

PEDROTTI, E. L; VOLTOLINI, J. A. Enraizamento *ex vitro* e aclimatização do porta-enxerto de macieira M.9. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 23, 2, 234-239, 2001.

RODRIGUES, P. H. V. *In vitro* establishment of *Heliconia rauliniana* (*Heliconiaceae*). **Sci. Agric.** Piracicaba-SP, 62, 1, 2005.

RODRIGUES, P. H. V. et al. Propagação de mudas de helicônia em biorreator de imersão temporária. **Bragantia**. Campinas-SP, 65, 1, 29-35, 2006.

TORRES, A. C. Efeito da sacarose, cinetina, isopentenil adenina e zeatina no desenvolvimento de embriões de *Heliconia rostrata in vitro*. **Hortic. Bras.**, 23, 3, 789-792, 2005.

TORRES, A. C. et al. Produção de mudas de *Heliconia rostrata* Livres de Doenças via cultura de Embriões. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) - Hortaliças – Brasília-DF, 6, 2005, 13 p.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela bolsa concedida (ao primeiro autor), à EMBRAPA Amazônia Oriental, Belém-PA, por disponibilizar a maior parte dos recursos financeiros necessários à execução do experimento e à UFPA, pela oportunidade de realizar o curso de Doutorado.

ANEXO C - Comprovante de submissão de artigo científico**PUBLICADOR- UFRA**

Comissão Editorial – Editora UFRA (Universidade Federal Rural da Amazônia)

Artigo Submetido com Sucesso

Número do Protocolo: **2009000120**

Título do Artigo: **CULTIVO *IN VITRO* DE *H. chartacea* Lane ex Barreiros CV.”Sexy Scarlet” A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS – *Heliconiaceae*¹**

Autores: **Elvilene de Melo e Silva Albim^{2*}, Rommel Mario Rodríguez Burbano³, Oriel Filgueira de Lemos⁴, Marli Costa Poltronieri⁵, Paulo Luiz Contente de Barros⁶**

Área: **AGRONOMIA**

Submetido em: **06/05/2009 - 13:54:36**

* Autor Responsável pelo envio do Artigo pelo Sistema.

¹ Extraído do Plano de Tese de Doutorado do primeiro autor.

² Bióloga, MSc. em Agronomia e Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular-UFPA/Bolsista do CNPq-Brasil. E-mail: elvilene@ig.com.br

³ Dr. em Ciências Biológicas (Genética) – UFPA – Orientador.

⁴ Dr. em Genética e Melhoramento de Plantas - EMBRAPA Amazônia Oriental, Belém-PA.

⁵ MSc. em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) - EMBRAPA Amazônia Oriental, Belém-PA.

⁶ Dr. em Recursos Florestais e Engenharia Florestal. – UFRA.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)