

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA**

VANIA AYAKA NAKANO

**Micropropagação de espécies de helicônia, caracterização
morfológica e identificação molecular de bactérias contaminantes**

**Piracicaba
2008**

VANIA AYAKA NAKANO

**Micropropagação de espécies de helicônia, caracterização
morfológica e identificação molecular de bactérias contaminantes**

Dissertação apresentada ao Centro de Energia Nuclear na
Agricultura da Universidade São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia na Agricultura e no
Ambiente

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Pinheiro Martinelli

**Piracicaba
2008**

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Nakano, Vania Ayaka

Micropropagação de espécies de helicônia, caracterização morfológica e identificação molecular de bactérias contaminantes/ Vania Ayaka Nakano; orientadora Adriana Pinheiro Martinelli. - - Piracicaba, 2008.

81 p.: fig.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Bacteriologia molecular 2. Cultura de tecidos vegetais 3. Microrganismos endofíticos 4. Organogênese vegetal 5. Plantas ornamentais I.
Título

CDU 582.548.21:631.53

Ao meu pai Yukio Nakano (*in
memoriam*), por proporcionar asas
aos nossos sonhos, o meu amor
eterno.

DEDICO

À minha família e um carinho especial aos
meus avôs Isohei e Chioei pelo amor
incondicional, incentivo e apoio em todos os
meus momentos.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Ao longo desta trajetória, dificilmente farei jus a todos que merecem o meu sincero e profundo AGRADECIMENTO. No entanto, desafiando o alcance da memória e a limitação do espaço físico, segue sumariamente uma pequena demonstração do meu carinho.

A Deus, a Santo Benedito e São Judas Tadeu...

À minha orientadora Profa. Dra. Adriana Pinheiro Martinelli pela confiança, ensinamentos e incentivo. Minha eterna admiração e agradecimento, pela oportunidade de crescer na vida acadêmica e pessoal.

"Professora.... quero lhe agradecer por todo este período, gostaria que soubesse que sua ajuda me foi de grande valia e pessoas como você estão sempre prontas para fortalecer a amizade e a esperança dos sonhos. Obrigado por sua atenção e pelo carinho dedicado. Tudo o que fazemos pensando em ajudar ao próximo, pela própria lei da natureza, nos é devolvido em dobro. Que o Universo te cubra de bênçãos, oferecendo sempre novas conquistas e felicidade."

À Profa. Dra. Siu Mui Tsai pelo apoio, incentivo e ensinamentos, imprescindíveis para realização deste trabalho. Que a vida continue lhe proporcionando todo reconhecimento de sua dedicação.

À Alice Noemi Aranda-Peres, toda a minha admiração, pela garra e coragem com que enfrenta a vida, por toda a ajuda e orientação desde a minha chegada a Piracicaba.

À Profa. Dra. Beatriz M. J. Mendes e o Prof. Dr. Augusto Tulmann Neto pelo apoio constante no desenvolvimento deste trabalho.

À Benedita Inês Franco Possignolo Rodrigues pela amizade, grande apoio e ensinamentos indispensáveis para o sucesso deste trabalho.

Ao Núcleo de Amparo a Pesquisa em Microscopia Eletrônica na Pesquisa Agropecuária, NAP/MEPA, ESALQ/USP, ao Prof. Dr. Elliot Watanabe Kitajima e à Técnica do Laboratório de Histopatologia e Biologia Estrutural de Plantas, Mônica Lanzoni Rossi, pela amizade e sua dedicação na realização do trabalho de microscopia.

Ao Técnico de informática João Geraldo Brancalion pela edição das ilustrações apresentadas neste trabalho.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura, ao Laboratório de Biotecnologia Vegetal CENA/USP, a toda sua equipe de secretários, a Associação de Pós-Graduandos e a Comissão Organizadora do XII e XIII ECPG, por todo apoio, pela agradável convivência e por agregarem novos valores a minha vida.

À equipe de secretárias do programa de pós-graduação do Centro de Energia Nuclear na Agricultura: Cláudia, Neuda e Sônia por toda a atenção e pelos serviços prestados.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

À Flora Alfredo Tilli e ao Prof. Dr. Paulo Hercílio Viegas Rodrigues por cederem gentilmente as plantas utilizadas e pelas valiosas sugestões para o início deste trabalho.

À Edjane Freitas Gonçalves pela amizade, convivência e a pronta ajuda com as análises estatísticas.

À Técnica do Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Renata Beatriz Cruz, pelo constante apoio, torcida e principalmente pela grande amizade.

Aos Técnicos do Laboratório de Biologia Molecular, Fábio Duarte, Francisco Montrazzi, José Elias Gomes e Wagner Piccinini por todo apoio e ajuda.

Aos Técnicos do Laboratório de Melhoramento de Plantas José Benedito Alves e Paulo Cassieri, por todo apoio.

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia Vegetal, a quem dedico um carinho especial pela convivência e apoio: Alessandra Hara, Ana Paula Chiaverini Pinto, Andréa Dias Koehler, Carolina Monte Bello, Eveline Tavano, Fabiana Muniz, Janaynna Barbosa, Liliane Stipp, Luciana Castelotti, Renan Packer e Sylvia Silveira.

A todos os amigos do Laboratório de Biologia Molecular, por todo o apoio e sugestões. Um agradecimento especial à Bianca Furlan, Daniela Campos e Fabiana Cannavan, que colaboraram diretamente com o desenvolvimento deste trabalho.

À minha família, Isohei, Chioei, Yukio, Fuyuko, Maria, Daniela e Daniel Nakano, por toda dedicação, amor incondicional e apoio, pois esta conquista é nossa! Meu sincero agradecimento.

À família que me permitiu escolher: Débora Sansini, Katherine Batagin, Shirley Famelli e Solange Bueno, com todo carinho.

Aos amigos que conquistei ao longo deste trajeto pelos momentos de descontração.

E a você, que contribuiu com o desenvolvimento deste trabalho e/ou colaborou na minha formação acadêmica ou pessoal e por ventura, não encontre seu nome acima, peço desculpas pela falha, o meu profundo agradecimento.

Como pode se notar, esta conquista envolve o trabalho de toda uma equipe. A todos mais uma vez, minha sincera gratidão pela realização de mais um sonho!

“Agradecer é admitir que houve um minuto em que se precisou de alguém.

Agradecer é reconhecer que o homem jamais poderá lograr para si o dom de ser auto-suficiente.

Aos nossos mestres que nos convidaram a voar em sua sabedoria, mesmo sabendo que este voar dependeria de suas asas.

Aos nossos mestres que, pela sua presença, marcaram nossa vida e em um simples gesto ou até mesmo num olhar nos transmitiram palavras.

A vocês, o meu simples, mas eterno agradecimento!”

(autor desconhecido)

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	10
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS.....	13
1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 Características Botânicas da helicônia.....	19
2.2 Características específicas das espécies estudadas neste trabalho.....	21
2.2.1 <i>Heliconia bihai</i>	21
2.2.1.1 <i>Heliconia bihai</i> cv. Peach Pink.....	21
2.2.2 <i>Heliconia ortrotricha</i>	21
2.2.2.1 <i>Heliconia ortrotricha</i> L. Anderss. cv. Total Eclipse.....	21
2.2.2.2 <i>Heliconia ortrotricha</i> cv. Candy Cane.....	22
2.3 Propagação de helicônias.....	22
2.3.1 Propagação sexual.....	22
2.3.2 Propagação assexual.....	23
2.4 Importância do cultivo <i>in vitro</i> na floricultura.....	24
2.4.1 Micropropagação de helicônias.....	26
2.4.1.1 Meio de Cultura para o cultivo <i>in vitro</i> de helicônias.....	28
2.4.1.2 Desinfecção.....	30
2.4.1.3 Contaminação bacteriana.....	31
2.4.1.3.1 Microrganismo endofítico.....	32
2.4.1.3.2 Identificação das comunidades bacterianas.....	33
2.4.2 Aclimação.....	34
3 MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1 Cultivo <i>in vitro</i>	36
3.1.1 Obtenção de material vegetal.....	36
3.1.2 Introdução <i>in vitro</i> de helicônia.....	36
3.1.3 Multiplicação <i>in Vitro</i>	38
3.1.4 Cultivo <i>in vitro</i> de <i>H. ortrotricha</i> cv. Candy Cane.....	39
3.1.5 Aclimação	40

3.2 Caracterização de microrganismos contaminantes na introdução <i>in vitro</i> de três cultivares de <i>Heliconia</i> sp.....	41
3.2.1 Isolamento da comunidade bacteriana proveniente da contaminação dos explantes <i>in vitro</i>	41
3.2.2 Isolamento da comunidade bacteriana endofítica de helicônia.....	41
3.2.3 Caracterização das bactérias isoladas utilizando a técnica ARDRA.....	42
3.2.4 Identificação dos isolados	43
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
4.1 Cultivo <i>in vitro</i>	45
4.1.1 Obtenção de material vegetal.....	45
4.1.2 Introdução <i>in vitro</i> de helicônia.....	45
4.1.3 Multiplicação <i>in vitro</i>	50
4.1.4 Cultivo <i>in vitro</i> de <i>H. ortotricha</i> cv. Candy Cane.....	50
4.1.5 Aclimação	56
4.2 Caracterização de microrganismos contaminantes na introdução <i>in vitro</i> de três cultivares de <i>Heliconia</i> sp.....	61
4.2.1 Isolamento da comunidade bacteriana proveniente da contaminação dos explantes <i>in vitro</i>	61
4.2.2 Isolamento da comunidade bacteriana endofítica de helicônia.....	62
4.2.3 Caracterização das bactérias isoladas utilizando a técnica ARDRA.....	64
4.2.4 Identificação dos isolados	67
5 CONCLUSÕES	72
6 REFERÊNCIAS.....	74

RESUMO

Micropropagação de espécies de helicônia, caracterização morfológica e identificação molecular de bactérias contaminantes

O gênero *Heliconia* tem participação crescente na floricultura tropical, sendo utilizada principalmente como flor de corte e para o paisagismo. A aplicação da micropropagação na produção de helicônias 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, a multiplicação de híbridos e matrizes de grandes potenciais, a produção mais uniforme e redução do período até a colheita. Entretanto, o sucesso do processo de micropropagação depende de vários fatores, entre eles, o estabelecimento do explante *in vitro*, a adequação do meio de cultura e a escolha do melhor substrato na fase de aclimação, como estudadas no presente trabalho. Uma das maiores dificuldades enfrentadas no estabelecimento *in vitro* dos explantes de helicônias é a contaminação bacteriana. De acordo com os resultados obtidos, as cultivares *Heliconia bihai* cv. Peach Pink, *H. ortotricha* Candy Cane e *H. ortotricha* L. Anderss cv. Total Eclipse respondem diferentemente aos tratamentos de assepsia testados. A utilização do meio MS (Murashige; Skoog, 1962), com a concentração normal dos sais MS, 2,5 mg/ L BAP e 0,10 mg/L ANA foi o meio de cultura mais adequado para o cultivo *in vitro* de *H. ortotricha* cv. Candy Cane, proporcionando uma boa taxa de brotação por explante e plantas bem desenvolvidas. Durante a aclimação das plantas de *H. ortotricha* Candy Cane, as misturas de Plant Max[®] Horticultura + Fibra de coco e Plant Max[®] Horticultura + Casca de arroz carbonizado foram superiores em relação aos outros substratos testados, tanto pelo maior índice de plantas sobreviventes, quanto pelo maior crescimento da parte aérea, apresentando uma boa coloração das folhas e um maior desenvolvimento do sistema radicular. Para identificação dos contaminantes, 100 isolados de bactérias foram obtidos de meios de cultura contaminados e das folhas das plantas de casa de vegetação e submetidos a análises moleculares para a caracterização por Análise de Restrição de DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA) e identificação pelo sequenciamento parcial do gene 16S rRNA. As bactérias isoladas das folhas de helicônia em meios de cultura TSA e R2A foram somente quatro gêneros nas três cultivares, identificados como *Arthrobacter* sp., *Xanthomonas* sp., *Burkholderia* sp. e *Rhizobium* sp.. Em meio de cultura contaminado constatou-se a presença de *Burkholderia* sp. nas culturas de *H. ortotricha* Candy Cane e *H. ortotricha* L. Anderss. cv. Total Eclipse e de *Burkholderia* sp. e *Rhizobium* em *H. bihai* cv. Peach Pink. As bactérias contaminantes durante o estabelecimento *in vitro* dos explantes de helicônias podem ser, portanto, provenientes das comunidades endofíticas da planta matriz fornecedora do explante.

Palavras-chave: Cultivo *in vitro*, contaminação bacteriana, substrato, *H. ortotricha*, *H. bihai*.

ABSTRACT

The *Heliconia* genus has increasing participation in the tropical floriculture, used mainly as cut flower and for landscape. The use of micropropagation in the process of heliconia production can improve product quality and productivity, providing large-scale and efficient plant multiplication, independently of the season, clonal multiplication of hybrids and other valuable plants, consequently with a more uniform production and possibility of a shorter period for harvesting. However, the success of the micropropagation process depends on various factors, such as the explant establishment *in vitro*, culture medium and a suitable substrate for acclimatization, which were studied in this work. Bacterial contamination is one of the difficulties for the *in vitro* establishment of heliconia explants. The results showed that *Heliconia bihai* cv. Peach Pink, *H. ortotricha* Candy Cane and *H. ortotricha* L. Anderss. cv. Total Eclipse responded differently to the descontamination treatments used. The use of full strength of MS (Murashige; Skoog, 1962) medium supplemented with 2,5 mg/L BAP and 0,10 mg/L ANA was the best for the *in vitro* culture of *H. ortotricha* cv. Candy Cane, providing good multiplication rates, with well developed plants. *H. ortotricha* Candy Cane acclimatization showed better results in substrate mixtures containing Plant Max® Horticulture + Coconut fiber and Plant Max® Horticulture + Rind of carbonized rice with better rates of survival, better development of the aerial parts and root system development. For identification of the contaminantes, 100 bacteria isolates were obtained from contaminated culture media and leaves of greenhouse plants and submitted to morphological and molecular analyses to characterization for Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA) and identification for partial 16S rRNA gene sequencing. The bacterial isolates obtained from the leaves in TSA and R2A culture media had been only four species in the three heliconia cultivars, and were identified as *Arthrobacter* sp., *Xanthomonas* sp., *Burkholderia* sp. and *Rhizobium* sp.. In culture media contaminated *Burkholderia* sp. was evidenced in cultures of *H. ortotricha* Candy Cane and *H. ortotricha* L. Anderss. cv. Total Eclipse and *Burkholderia* sp. and *Rhizobium* sp. in *H. bihai* cv. Peach Pink. The bacterial contaminants observed during the *in vitro* establishment of heliconia explants originated from the endophytic community of the plants which were used as explant sources.

Key words: *In vitro* culture, bacterial contamination, substrate, *H. ortotricha*, *H. bihai*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Inflorescências de *Heliconia bihai* cv. Peach Pink (A), *Heliconia ortrotricha* L. Anderss. cv. Total Eclipse (B), *Heliconia ortrotricha* cv. Candy Cane (C)..... 22
- Figura 2 – Porcentagem de sobrevivência de ápices caulinares introduzidos *in vitro*, após diferentes tratamentos para desinfecção dos explantes (tratamentos descritos na Tabela 2).*, em três cultivares de helicônia..... 47
- Figura 3 – Introdução *in vitro* de ápices caulinares de helicônia: A) Ápice caulinar de helicônia introduzido *in vitro* em meio MS líquido; B) Aspecto do explante 7 dias após a introdução *in vitro*; C-D) Contaminação bacteriana de explante em meio de cultura líquido (C) e semi-sólido (D); E) Regeneração de ápice caulinar de helicônia estabelecido *in vitro*. F) Característica do explante após 45 dias em cultivo *in vitro*. G) Explante exibindo brotações após 60 dias do estabelecimento *in vitro* do ápice caulinar..... 49
- Figura 4 – Culturas *in vitro* de *H. ortrotricha* cv. Candy Cane. Combinação fatorial de duas concentrações dos sais MS (50% e 100%) e duas concentrações (0,10 e 0,25 mg/L) de dois fitorreguladores (ANA e IBA) em meio de cultura. (A-B) Tratamento 1, 50%MS + 0,1 mg/L ANA; Tratamento 2, 50%MS + 0,25 mg/L ANA; Tratamento 3, 50%MS + 0,1 mg/L IBA; Tratamento 4, 50%MS + 0,25 mg/L IBA. (C-D) Tratamento 5, 100%MS + 0,1 mg/L ANA; Tratamento 6, 100%MS + 0,25 mg/L ANA; Tratamento 7, 100%MS + 0,1 mg/L IBA; Tratamento 8, 100%MS + 0,25 mg/L IBA..... 51
- Figura 5 – Aumento no número médio de brotos obtidos *in vitro* em cultura de *Heliconia ortrotricha* cv. Candy Cane em meio de cultura contendo 2,5 mg/L BAP e variações na concentração de sais e auxina, ao longo de 12 semanas..... 53
- Figura 6 – Massa de matéria fresca (A) e massa de matéria seca (B) de explantes de *Heliconia. ortrotricha* cv. Candy Cane cultivados por 12 semanas em meios com diferentes concentrações de sais MS, ANA e IBA e acrescidos de 2,5 mg/L de BAP, calculados sobre um terço dos explantes e seus respectivos brotos obtidos..... 56
- Figura 7 – Sobrevivência de plântulas de *H. ortrotricha* cv. Candy Cane após 60 dias em condições de aclimação, sob diferentes substratos..... 57
- Figura 8 – Massa de matéria fresca (A) e seca (B) da parte aérea de *H. ortrotricha* cv. Candy Cane, cultivadas em Plant Max® Horticultura (1), Plant Max® Horticultura + Fibra de coco (2), Plant Max® Horticultura + Casca de arroz carbonizado (3) e Plant Max® Horticultura + Fibra de coco + Casca de arroz carbonizado (4)..... 58
- Figura 9 – Massa de matéria fresca (A) e seca (B) do sistema radicular de *H. ortrotricha* cv. Candy Cane, cultivadas em 4 diferentes substratos: Plant Max® Horticultura (1), Plant Max® Horticultura + Fibra de coco (2), Plant Max® Horticultura + Casca de arroz carbonizado (3) e Plant Max® Horticultura + Fibra de coco + Casca de arroz carbonizado (4)..... 59

- Figura 10 – Aspecto geral de plântulas de *H. ortotricha* cv. Candy Cane durante aclimação em diferentes substratos. A) Tratamento 1, Plant Max® HT; B) Tratamento 2, Plant Max® HT + Fibra de côco Amafibra; C) Tratamento 3, Plant Max® HT + Casca de arroz carbonizada; D) Tratamento 4, Plant Max® HT + Fibra de côco Amafibra + Casca de arroz carbonizada; E) Tamanho das plantas após 60 dias de plantio em casa de vegetação, sendo da esquerda para a direita plântula representativa de: Tratamento 1, Plant Max® HT; Tratamento 2, Plant Max® HT + Fibra de côco Amafibra; Tratamento 3, Plant Max® HT + Casca de arroz carbonizada; Tratamento 4, Plant Max® HT + Fibra de côco Amafibra + Casca de arroz carbonizada..... 60
- Figura 11 – Frequência das colônias de acordo com as características morfológicas isoladas das folhas de casa de vegetação no meio de cultura TSA (A) e R2A (B) das três cultivares de helicônia..... 63
- Figura 12 – Padrões obtidos das culturas de bactérias isoladas das três cultivares de helicônia pela técnica ARDRA em gel de agarose (2%). A e B) Padrões das bactérias obtidas dos meios de cultura contaminados utilizando as enzimas *Hha* e *Rsa*, respectivamente; C e D) Comparação entre os padrões das bactérias isoladas das folhas da casa de vegetação de *H. ortotricha* cv. Candy Cane com as enzimas *Hha* e *Rsa*, respectivamente. 1) Padrão molecular; 2) Padrão 2; 3) Padrão 3; 4) Padrão 6; 5) Padrão 7; 6) Padrão 8; 9) Padrão 4; 10) *Escherichia coli*; 11) *Pseudomonas fluorescens*, 12) *Pseudomonas stutzeri* 65
- Figura 13 – Padrões de clivagem obtidos pela técnica ARDRA das bactérias isoladas do meio de cultura contaminados (A) e das folhas da casa de vegetação (B) das três cultivares de helicônia..... 66
- Figura 14 – Isolados de bactérias obtidos a partir de meio de cultura de introdução contaminado e folhas de plantas cultivadas em casa de vegetação de *H. bihai* cv. Peach Pink, *H. ortotricha* cv. Candy Cane e *H. ortotricha* L. Anderss. cv. Total Eclipse, observados em microscópio estereoscópico (A, D, G, J, M, P), microscopia eletrônica de varredura (B, E, H, K, N, Q) e de transmissão (C, F, I, L, O, R), identificados molecularmente como sendo: A-C) *Burkholderia* sp.; D- F) *Rhizobium* sp.; G-I) *Arthrobacter* sp.; J-L) *Xanthomonas* sp.; M-O) *Burkholderia* sp.; P-R) *Rhizobium* sp..... 71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Número de ápices caulinares de três cultivares de helicônia, obtidos a partir do rizomas cultivados em casa de vegetação, para introdução <i>in vitro</i>	37
Tabela 2 –	Tratamentos para desinfecção de ápices caulinares de <i>H. bihai</i> cv. Peach Pink, <i>H. ortrotricha</i> cv. Candy Cane, <i>H. ortrotricha</i> L. Anderss. cv. Total Eclipse.	37
Tabela 3 –	Número de explantes introduzidos <i>in vitro</i> de três cultivares de helicônia, utilizando-se quatro tratamentos para desinfecção.....	38
Tabela 4 –	Tratamentos com modificações na concentração de sais MS e auxinas (ANA e IBA) para cultivo de <i>H. ortrotricha</i> cv. Candy Cane em delineamento fatorial, 2x2x2.....	39
Tabela 5 –	Tratamentos e proporções das misturas de substratos utilizadas na aclimação de <i>H. ortrotricha</i> cv. Candy Cane.....	40
Tabela 6 –	Quantificação de bactérias isoladas de meios de cultura de introdução <i>in vitro</i> de três cultivares de helicônia em dois meios de cultura (TSA e R2A) (UFC/mL).....	62
Tabela 7 –	Quantificação de bactérias isoladas de folhas de plantas cultivadas em casa de vegetação de três cultivares de helicônia em dois meios de cultura (TSA e R2A) (UFC/g de massa fresca de folhas).....	62
Tabela 8 –	Identificação das bactérias isoladas do meio de cultura de <i>H. ortrotricha</i> e <i>H. bihai</i> , identificadas através do seqüenciamento completo do gene 16S DNAr..	68
Tabela 9 –	Identificação das bactérias isoladas das folhas de o meio de cultura de <i>H. bihai</i> cv. Peach Pink, <i>H. ortrotricha</i> cv. Candy Cane e <i>H. ortrotricha</i> L. Anderss. cv. Total Eclipse.....	68

1 INTRODUÇÃO

As transformações ocorridas no movimento paisagístico e no cenário sócio-econômico mundial em meados do século XX, influenciaram na valorização do senso ecológico e na divulgação da beleza exótica, integrando a projeção dos jardins com a vegetação nativa pré-existente, contribuindo na difusão e na preservação de muitas espécies tropicais. Neste contexto, a floricultura tropical incidiu, tornando-se uma atividade de maior expressão na região Nordeste brasileira e surgindo como grande alternativa para o desenvolvimento de pequenas propriedades rurais, promovendo a inclusão social, diminuindo o êxodo rural e agregando novas tecnologias ao longo da cadeia produtiva de plantas ornamentais, consolidando-se como uma atividade altamente competitiva e sustentável.

A floricultura tropical movimenta US\$ 400 milhões por ano e o setor corresponde a menos de 5% das exportações brasileiras, sendo este um indicativo da ampla perspectiva de expansão, impulsionada substancialmente pela sua boa aceitação no mercado, devido à alta durabilidade pós-colheita, a resistência durante o transporte, o exotismo e a alta diversidade de formas e cores das brácteas.

O gênero *Heliconia* é o único representante da família Heliconiaceae e tem participação crescente na floricultura. As plantas são geralmente usadas como flor de corte e para o paisagismo, cujo principal atrativo é a inflorescência terminal, formada pelas brácteas vistosas, cores contrastantes e texturas variáveis, na qual abrigam as flores propriamente ditas. As helicônias atuam como plantas pioneiras no processo de regeneração da vegetação, auxiliam na recuperação de solos degradados e mantêm importantes relações coevolutivas com espécies animais responsáveis pela sua polinização, desempenhando um importante papel nos ecossistemas tropicais.

A aplicação da biotecnologia no setor, atua na otimização da produtividade e na melhoria da qualidade do produto, entre elas, a prática da cultura de tecidos contribui na produção de mudas saudáveis, viáveis e uniformes, diminui o período até a colheita, proporciona a multiplicação rápida e em grande escala de híbridos e matrizes potenciais e fornece maior resistência às plantas contra os fitopatógenos, por apresentar um bom estado nutricional e o sistema radicular bem desenvolvido.

O processo de micropropagação possibilita a maior rapidez regenerativa dos explantes, facilitando a propagação quando as tecnologias convencionais são difíceis, a obtenção de plantas independente da estação do ano e a preservação do fenótipo e da atividade fisiológica da planta-matriz. No entanto, a ocorrência de bons resultados na micropropagação dependem da otimização de enumeras variáveis como: a adequação do meio de cultura, suprindo as necessidades nutricionais para o crescimento, o desenvolvimento e a multiplicação das plantas *in vitro*; a escolha do melhor substrato na fase de aclimatação, promovendo as condições físicas e químicas favoráveis para a adaptação das plântulas ao ambiente *ex vitro* e o bom desenvolvimento do sistema radicular. Ao final, uma das principais dificuldades na micropropagação de helicônias é a contaminação bacteriana dos explantes *in vitro*, a qual afeta o desenvolvimento da planta pela competição dos nutrientes, ou exudando substâncias que acidificam o meio de cultura e ou liberando reguladores vegetais.

Desta forma, o presente trabalho visou: a padronização de um protocolo de assepsia para a micropropagação de *Heliconia bihai* cv. Peach Pink, *H. ortrotricha* L. Anderss. cv. Total Eclipse e *H. ortrotricha* cv. Candy Cane, buscando alternativas para o controle da contaminação bacteriana durante o estabelecimento do explante *in vitro*; a identificação de bactérias presentes no meio de cultura e em plantas matrizes, com o intuito de definir a origem da contaminação durante a introdução *in vitro*; a multiplicação de *H. ortrotricha* cv. Candy Cane, sob diferentes concentrações de sais e reguladores vegetais no meio de cultura e subsequente avaliação da aclimatação das plântulas sob diferentes substratos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A floricultura é um dos segmentos mais dinâmicos e avançados do agronegócio contemporâneo, destacando-se expressivamente no que tange à estrutura de mercado, à diversificação de espécies e variedades, à difusão de novas tecnologias de produção, à profissionalização dos agentes da cadeia e na sua integração com programas de inclusão social, diminuindo o êxodo rural e valorizando o trabalho da mulher e de jovens de baixa renda em algumas regiões brasileiras (TANIO; SIMÕES, 2005).

De acordo com Buainain e Batalha (2007), a atividade mundial de produção de flores e plantas ornamentais ocupa uma área estimada em 190 mil hectares e movimentava valores próximos a US\$ 60 bilhões por ano. A floricultura nacional move R\$ 2 bilhões (SEBRAE, 2005) e a participação na exportação mundial é de apenas 0,22%, correspondendo a 3% do faturamento do setor (SEBRAE, 2005; BUAINAIN; BATALHA, 2007). Segundo a Secretaria de Comércio Exterior do Ministério do Desenvolvimento (SECEX, 2008), as exportações dos produtos da floricultura brasileira atingiram o valor de US\$35,3 milhões em 2007, representando um aumento de 9,1% em relação ao ano anterior.

A vasta extensão territorial do Brasil promove a grande diversidade climática e edáfica, favorecendo a multiplicidade dos componentes da cadeia produtiva da floricultura como a produção de bulbos, mudas, flores e as folhagens de corte, tanto de plantas de clima temperado, como de tropical (BUAINAIN; BATALHA, 2007). Outro êxito é fundamentado na possibilidade de obter produtos e seus derivados ao longo de todo o ano a custos relativamente baixos e a sua maior produtividade no período entre outubro e abril, a qual coincide com o inverno das principais regiões produtoras do hemisfério norte (MOTOS, 2005).

Buainain e Batalha (2007) relatam que a floricultura brasileira é caracterizada por um significativo crescimento e dinamismo na produtividade na maioria dos estados nos últimos cinco anos, aumentando também as diferenciações econômicas, políticas e sociais entre as regiões e seus pólos produtores.

O aumento da renda da população, a busca pela sustentabilidade, o maior investimento na divulgação e a facilidade de acesso aos produtos, tanto nos pontos de venda físicos como

via internet, são fatores de médio prazo que reforçam o crescimento do consumo de flores no mercado interno, que no momento atual, consome praticamente tudo que produz. No entanto, o consumo per capita anual de flores no Brasil é de US\$ 4,7, um valor extremamente baixo em relação aos países desenvolvidos, como a Suíça, onde o consumo alcança US\$ 174 por ano, ou os Estados Unidos, com US\$ 58 por ano, ou seja, um mercado ainda pouco explorado com amplas perspectivas de desenvolvimento (BUAINAIN; BATALHA, 2007).

Em meados do século XX, os trabalhos de Roberto Burle Marx revolucionaram o movimento paisagístico moderno brasileiro, quebrando a formalidade dos jardins, a qual seguia a tendência européia e o uso intensivo de plantas temperadas. Os jardins projetados por Burle Marx buscavam a integração com a natureza local, além de uma associação de espécies tropicais nativas, contribuindo na divulgação, na difusão e na preservação de muitas espécies brasileiras, entre elas algumas helicônias e marantáceas. A valorização das formas assimétricas em contexto ecologicamente correto, agrupando as plantas em harmonia paisagística com a vegetação pré-existente era sempre um resultado observado por sua influência no paisagismo empregado nos atuais Jardins Botânicos brasileiros (VEIGA *et al.*, 2003).

As profundas modificações no cenário sócio-econômico mundial influenciam na preferência dos consumidores, que motivados pelo senso ecológico e pela divulgação da beleza exótica, procuram cada vez mais produtos que representem o apelo ecológico e de aparência peculiar, valorizando as plantas silvestres e tropicais (OLIVEIRA, 1996).

Brainer e Oliveira (2006), enfatizam que a partir do final do século XX a floricultura no Nordeste Brasileiro se tornou uma atividade de maior expressão econômica, com foco na produção de espécies de clima tropical. Atualmente a atividade se concentra nos estados de Pernambuco, Bahia, Ceará e Alagoas, ocupando áreas mais privilegiadas em termos climáticos e de oferta de água e fazendo uso intensivo dos fatores de produção, com destaque para a elevada geração de emprego por área cultivada, contribuindo para ocupação da mão-de-obra local e obtenção de divisas.

Segundo Brainer e Oliveira (2006), o trabalho na floricultura possui a vantagem de não ter a sazonalidade como as outras atividades agrícolas da região Nordeste, principalmente como as monoculturas de cana-de-açúcar. Sendo uma atividade desenvolvida em pequenas

áreas de agricultura familiar, pode se consolidar como uma atividade competitiva e sustentável (BUAINAIN; BATALHA, 2007), absorvendo principalmente a mão-de-obra familiar e permanente (KIYUNA *et al.*, 2004). O estudo realizado por Brainer e Oliveira (2006), indica que 89,60% da mão-de-obra utilizada pela floricultura nordestina é permanente e os outros 10,40% são empregos temporários.

O município de Macarás, Bahia, foi o primeiro a implantar o projeto floricultura comunitária como uma forma de promover a inclusão social, mantendo jovens de baixa renda em suas próprias terras. O projeto recebeu o Prêmio Dubai, concedido pela Organização das Nações Unidas (ONU) às melhores práticas de assentamento humano em 2002 (SEBRAE, 2005).

Um levantamento feito pela SEBRAE (2003) ressalta que entre as 200 espécies de flores mais cultivadas no país, cerca de 160 são tropicais. Isoladamente, o mercado mundial de flores tropicais movimenta US\$ 400 milhões por ano, e o setor corresponde a menos de 5% das exportações brasileiras (OPITZ, 2005).

O exotismo, a diversidade de formas e cores das brácteas, a beleza, a resistência durante o transporte, a alta durabilidade pós-colheita e a boa aceitação do mercado são características que favorecem substancialmente a comercialização das flores e plantas ornamentais tropicais no mercado interno (LOGES, 2005) e aumentam as perspectivas de expansão para o exigente mercado europeu e americano (SEBRAE, 2005).

Devido a estes fatores, diversos órgãos públicos estabeleceram programas federais, estaduais e regionais estimulando a floricultura. Neste processo, universidades e unidades da Embrapa começaram a desenvolver trabalhos visando definir sistemas de produção e oferta de mudas de qualidade para os produtores. O Banco do Nordeste do Brasil entra com as linhas de crédito para produção e comercialização e financia projetos de pesquisa desenvolvidos pelas instituições regionais. Os governos estaduais e o Sebrae promovem a presença de técnicos nacionais e internacionais para cursos e conferências, capacitando os floricultores locais e fornecendo informações sobre a concorrência, avaliando oportunidades e riscos, identificando as tendências e as expectativas dos consumidores. As Secretarias Estaduais de Agricultura e empresas de extensão rural operam apoiando a atividade (BRAINER; OLIVEIRA, 2006).

As ações que visam a maior integração da produção proporcionam aos produtores incorporarem novas tecnologias, possibilitando avanços na produtividade, na melhoria da qualidade, acesso a utilização insumos de boa qualidade e ecologicamente corretos e no desenvolvimento de sistemas logísticos eficientes para a distribuição dos produtos, aperfeiçoando o processo e agregando competitividade à beleza das flores e plantas ornamentais brasileiras. Desta forma, intensificam a profissionalização do sistema de produção, certificando as boas práticas e viabilizando a entrada das flores brasileiras no exterior e a disponibilidade de produtos com mais qualidade para o mercado interno (SEBRAE, 2005; BUAINAIN; BATALHA, 2007).

As helicônias são plantas tropicais que têm participação crescente na floricultura. Brainer e Oliveira (2006), afirmam que 23,40% dos produtores nordestinos pesquisados utilizam as diversas espécies de helicônias como cultura principal e 23,53% empregam como a segunda principal cultura. As principais helicônias exploradas no Nordeste são: *Heliconia bihai*, *H. rostrata*, *H. psittacorum x spathocircinata*, *H. wagneriana*, *H. chartacea*, *H. collinsiana*, *H. caribaea x bihai*, *H. rauliniana*, *H. psittacorum*, *H. ortotricha*, entre outras.

2.1 Características Botânicas das helicônias

Cronquist (1981), classifica as helicônias como pertencentes à divisão Magnoliophyta, classe Liliopsida, ordem Zingiberales. Originalmente eram incluídas na família Musaceae, porém, a partir de 1941, foi estabelecido por Nakai como único representante da família Heliconiaceae, interpretação endossada por Broschat e Donselman (1983), Kress *et al.* (2001) e Lamas (2004).

O gênero *Heliconia* é o único representante da família Heliconiaceae (CRONQUIST, 1981). Segundo estimativas de Berry e Kress (1991), o número de espécies de helicônias varia entre 200 e 250. São plantas de origem neotropical, com ampla distribuição nas Américas, entre os Trópicos de Câncer e de Capricórnio, existindo um pequeno número de espécies procedentes das Ilhas do Pacífico Sul (CRONQUIST, 1981; ANDERSON, 1989; BERRY; KRESS, 1991; CASTRO, 1995). Seu plantio comercial ocorre ao longo de toda faixa tropical do mundo, incluindo a África e a Ásia (BERRY; KRESS, 1991).

As plantas são herbáceas, eretas, atingindo de 0,5m a 10,0m de altura, conforme a espécie. O pseudocaule é constituído pela justaposição do pecíolo ou pelo limbo foliar, podendo apresentar uma camada de cera branca em algumas espécies. O rizoma é subterrâneo e simpodial. Cada folha é formada por um pecíolo e a lâmina foliar, usualmente verde, porém certas espécies apresentam a face abaxial castanha ou vermelha, principalmente ao longo das margens. A inflorescência é terminal, apresentando um rápido desenvolvimento, é ereta ou pendular, composta por uma raquis alongada, na qual se inserem as brácteas espadiformes e formam um arranjo alternado reto ou espiralado. As brácteas apresentam tamanhos, texturas e cores variáveis, muitas vezes, compostas por cores contrastantes, favorecendo sua aceitação no mercado (DANIELS; STILES, 1979; BERRY; KRESS, 1991; CASTRO,1995). As flores propriamente ditas são envolvidas e protegidas pelas brácteas, são hermafroditas, apresentam seis estames com filetes livres e anteras lineares, sendo 1 estéril e 5 funcionais. As sépalas e pétalas variam nos tons entre amarelo a branco e as flores exudam uma grande quantidade de néctar, tornando-se atrativas aos agentes polinizadores como os beija-flores, alguns insetos e pequenos vertebrados (BERRY; KRESS, 1991; CASTRO,1995).

Algumas características que diferenciam a família Heliconiaceae das outras da mesma ordem são: apresenta um único óvulo em cada lóculo, a sépala média é adaxial, o fruto é do tipo esquizocarpo e as sementes não apresentam arilo (CRONQUIST,1988).

As helicônias são popularmente conhecidas por “bananeira de jardim”, “bico de papagaio” e “paquevira”, desempenham um importante papel nos ecossistemas, pois atuam como plantas pioneiras no processo de regeneração natural. Podem participar da recuperação de solos degradados, mantêm importantes relações coevolutivas com espécies animais, as quais são responsáveis por sua polinização e estas plantas são componentes freqüentes nos bosques e sub-bosques da vegetação tropical, ou mesmo compoendo a flora de ambientes abertos (LAMAS, 2004).

As espécies são classificadas quanto ao hábito vegetativo, conforme o tipo de arranjo das folhas, nas seguintes categorias: musóides, canóides ou zingiberóides (BERRY; KRESS, 1991). Outra classificação sugerida por Watson e Smith (1979), baseia-se no tipo de inflorescência: 1. Inflorescência em um único plano; 2. Inflorescência ereta em mais de um plano; 3. Inflorescência pendente em um único plano; 4. Inflorescência pendente em mais de um plano.

2.2 Características específicas das espécies estudadas neste trabalho

2.2.1 *Heliconia bihai*

Segundo Castro e Graziano (1997), a *H.bihai* é uma espécie que engloba grande quantidade de variedades. A espécie é geralmente usada como flor de corte e para o paisagismo, sendo cultivadas em locais desde pleno sol até 50% de sombreamento. As plantas são típicas de florestas densas e baixas altitudes, com hábito musóide, com inflorescências eretas e brácteas em um único plano.

2.2.1.1 *Heliconia bihai* cv. Peach Pink

Esta cultivar apresenta a inflorescência formada por 5 a 8 brácteas, em sua maioria amarelo-alaranjada e nas brácteas terminais ganham um tom rosa claro a creme, ou branco, com listras verdes escuras ao longo do bordo (Figura 1 A), tornando-se mais claras nas brácteas e as plantas atingem até 3,6 metros (*Heliconia bihai* cv. PEACH PINK, 2006).

2.2.2 *Heliconia ortrotricha*

A espécie é caracterizada pelas flores de tamanho médio, coloração contrastante, boa qualidade pós-colheita, um longo período de florescimento, hábito musóide, comprimento de 0,8 a 3,5 metros de comprimento, pseudocaule com a coloração verde médio e folhas glabras (CRILEY; UCHIDA; FU,2003). Os bons atributos da *H. ortrotricha* para a comercialização têm aumentado a sua demanda no mercado, favorecendo a produção (CASTRO; GRAZIANO,1997).

2.2.2.1 *Heliconia ortrotricha* L. Anderss. cv. Total Eclipse

A inflorescência desta espécie é classificada como ereta e em único plano e as brácteas apresentam a coloração vermelho escuro a preto (Figura 1 B). A planta apresenta a altura de 2,5 a 4 metros e são utilizadas como flor de corte e para o paisagismo (BARROS; GÓMEZ, 1998).

2.2.2.2 *Heliconia ortrotricha* cv. Candy Cane

A cultivar Candy Cane apresenta as brácteas vermelhas, uma faixa branca, uma listra verde na borda e a inflorescência atinge 50 centímetros (Figura 1 C). O período entre a emergência do broto até a inflorescência atingir o ponto de corte varia de 131 a 248 dias. A inflorescência desenvolve num período mais curto nos brotos de primavera e verão do que no período de outono e inverno. O fotoperíodo mais curto neste último período, influencia no desenvolvimento das plantas, a qual apresenta porte menor do que os brotos de verão (CRILEY, UCHIDA, FU 2003).

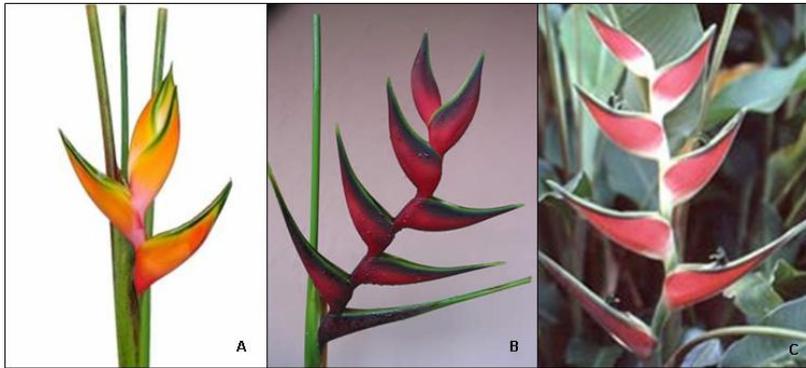


Figura 1: Inflorescências de *Heliconia bihai* cv. Peach Pink (A), *Heliconia ortrotricha* L. Anders. cv. Total Eclipse (B), *Heliconia ortrotricha* cv. Candy Cane (C).

2.3 Propagação de helicônias

Berry e Kress (1991) e Castro (1995), ressaltam que as helicônias são plantas geófitas, as quais perpetuam tanto pelas suas sementes, como pelo seu órgão subterrâneo especializado, denominado rizoma, cuja função principal é a reserva de nutrientes e água para o crescimento e desenvolvimento sazonal, assegurando a sobrevivência da espécie.

2.3.1 Propagação sexual

Na região neotropical, os beija-flores são polinizadores exclusivos das helicônias, atraídos pelas suas brácteas coloridas, as quais variam entre os tons de vermelho, rosa, laranja e amarelo. A inflorescência é usualmente formada por brácteas, abrigando inúmeras flores e cada flor permanece aberta por apenas um dia. As flores em muitas espécies de helicônia são

autocompatíveis e geralmente a polinização cruzada é inibida pela incompatibilidade sexual, ocasionando rara produção de híbridos naturais (BERRY; KRESS, 1991).

Os frutos do tipo baga contêm de uma a três sementes envolvidas por um endocarpo bastante duro, dificultando a germinação, caracterizando-a como um processo lento e difícil (CASTRO, 1993; CASTRO, 1995; SIMÃO; SCATENA, 2003 ; MARQUES, 2004). Os frutos imaturos são amarelos ou verdes, tornando-se azuis ou violeta quando maduros nas regiões neotropicais e alaranjados e vermelhos nas regiões malanesianas (CASTRO, 1995). As sementes variam em tamanho e forma, conforme a espécie, mas em sua maioria são triangulares, com 2 lados achatados e um arredondado (MARQUES, 2004).

O período de germinação é bastante variado, ocorrendo na maioria das espécies num prazo de 120 dias, levando três anos em algumas espécies (MARQUES, 2004), pois dependem do grau de desenvolvimento do embrião e das condições do habitat das espécies. As sementes de helicônia são bastante exigentes em luz para a germinação (CASTRO, 1995).

Simão e Scatena (2003), constataram que o período de germinação de sementes de *Heliconia velloziana* L. Emygd. ocorreu entre quatro e seis meses, provavelmente pelo embrião indiferenciado e o endocarpo pétreo. A germinação é hipógea e a plântula do tipo criptocotiledonar. Observaram que as duas primeiras estruturas foliares nas plântulas são escamiformes e as raízes adventícias são mais conspícuas do que a raiz primária.

2.3.2 Propagação assexual

O método convencionalmente utilizado na produção comercial de helicônias é a propagação pela divisão de rizomas. Neste processo as plantas matrizes devem apresentar características como: elevada produtividade, vigor e sanidade. Um rizoma considerado ideal é aquele que apresenta um mínimo de três gemas e, dependendo da época do ano podem ser plantados diretamente no campo, ou plantados em sacolas plásticas e preferencialmente colocadas sob irrigação e sombreamento entre 30 e 60%, o que facilita o enraizamento. O tempo de desenvolvimento da planta, desde a brotação até a formação das primeiras flores, pode ocorrer de quatro a cinco meses após o plantio (LAMAS, 2004). Entretanto, este método dificulta a obtenção de grandes quantidades de mudas e não possibilita a variabilidade genética

(DE PAULA, 2000). Kampf (2000), ressalta ainda que este método facilita a disseminação de agentes patogênicos e microrganismos endofíticos.

Outro método de propagação vegetativa de helicônias é a cultura de tecidos (LAMAS, 2004), proporcionando vantagens, como a obtenção rápida de plantas praticamente adultas, propagação de híbridos que dificilmente produzem sementes e na obtenção de plantas idênticas à planta matriz (GEORGE, 1993).

Segundo Criley e Broschat, (1992), os rizomas das helicônias formam touceiras de população monoclonal. A emissão de perfilhos emerge principalmente da periferia da touceira (CRILEY, 1989). Em geral, a variação do número de perfilhos em helicônia é associada às características genéticas, mas as condições climáticas são fator de grande importância (GEERTSEN, 1989).

O hábito de crescimento pode ser agrupado ou aberto. As plantas com crescimento agrupado se desenvolvem lentamente e com hastes verticais, formando touceiras mais fechadas. Espécies com crescimento aberto apresentam desenvolvimento rápido e touceiras com arquitetura dispersa, ocupando um espaço maior (CRILEY, 1988).

Em estudo realizado por Simão e Scatena (2003), acompanhando o desenvolvimento de segmentos de rizoma de *Heliconia velloziana* L. Emygd., constataram que os rizomas emergem raízes a partir de quatro semanas e brotos a partir de quatro a seis semanas, com a formação inicial de catáfilos, e depois dois protófilos.

2.4 Importância do cultivo *in vitro* na floricultura

Seguindo a tendência mundial, os avanços científicos e tecnológicos têm consolidado o desenvolvimento e a ampliação do setor de flores e plantas ornamentais no Brasil. Tais modificações são observadas através da melhoria dos controles fitossanitários, na adoção de modernas técnicas de gerenciamento e venda da produção, especialmente o leilão eletrônico e a venda pela internet, aprimoramento do sistema logístico, padronização e melhoria das embalagens, na criação de um sistema de controle produtivo garantindo a rastreabilidade dos produtos, na desfronterização das organizações envolvidas nestas relações comerciais, na busca de maior competitividade e na seleção de novas variedades com apelos comerciais e

adaptadas às condições específicas do ambiente em diferentes regiões (BUAINAIN; BATALHA, 2007).

Tanio e Simões (2005) afirmam que os principais fornecedores de insumos atualmente são também os fornecedores de mudas micropropagadas, introduzindo a biotecnologia na composição desta cadeia de suprimentos, contribuindo para uma maior produtividade, qualidade, padronização e a utilização de insumos melhores, permitem a maior durabilidade pós-colheita, agregando importante valor ao produto. Neste mercado, empresas internacionais se destacam como fornecedoras, podendo-se citar os grupos: Schoenmaker van Zanten, Schoenmaker de Wit, Schoenmaker Humako e Interplant.

Bachraz (1995) afirma que as práticas convencionais de propagação comercial muitas vezes desperdiçam tempo, trabalho e dinheiro com sementes improdutivas ou ferindo as plantas pelo processo da enxertia, expondo-as e tornando mais suscetíveis ao ataque de fungos, bactérias, vírus, insetos e outros fatores ambientais, exigindo o uso intensivo de manejo químico na obtenção de matrizes de qualidade. Neste contexto, a cultura de tecido é um método importante de propagação, devido à produção de plantas saudias, viáveis, diminuindo o período até a colheita, multiplicação rápida e em grande escala de plantas matrizes com características desejáveis e híbridos, permite a produção de plantas independentemente das condições climáticas e ao longo de todo o ano, livres de nematóides e possibilitando maior uniformidade no florescimento. Apesar, das plantas provenientes de cultura de tecido não serem imunes ao ataque de doenças, as mesmas apresentam sistema radicular bem desenvolvido e um bom estado nutricional, ou seja, a planta sadia é uma das principais características para maior resistência contra as doenças.

O cultivo *in vitro* é um importante instrumento na biologia vegetal, facilitando a compreensão dos processos da biologia do desenvolvimento e para a utilização e a conservação dos recursos genéticos vegetais (WITHERS; WILLIANS, 1998), contribuindo tanto para a fase de conservação como de avaliação dos acessos, coleções de trabalho e bancos de germoplasma (BACHRAZ, 1995; FERREIRA; CALDAS; PEREIRA, 1998). Bachraz (1995), acrescenta que a integração da cultura de tecidos ao controle biológico e ao melhoramento genético são fundamentais para sistemas de produção sustentáveis.

Os processos de cultura de tecidos vegetais compreendem um conjunto de técnicas, nas quais um explante (células, tecido ou um órgão) é cultivado sob condições assépticas em meio nutritivo. Este processo se baseia na totipotencialidade das células, ou seja, na capacidade de qualquer célula do organismo vegetal apresentar todas as informações genéticas necessárias à regeneração de uma planta completa (FRÁGUAS *et al.*, 1999)

2.4.1 Micropropagação de helicônias

O sistema padrão de micropropagação, segundo Grattapaglia e Machado (1998), baseia-se em três estágios: a seleção dos explantes, a desinfestação e a cultura em meio nutritivo sob condições assépticas; a multiplicação dos propágulos sob sucessivas subculturas em meio adequado; a transferência dos explantes para meio de enraizamento e subsequente aclimatização.

Uma das principais vantagens da micropropagação é a maior rapidez regenerativa em relação a outros métodos de propagação vegetativa convencionalmente utilizados, facilitando a propagação quando as tecnologias convencionais são difíceis ou até mesmo impossíveis de serem utilizadas (George, 1993). Esta técnica vem sendo empregada na produção comercial de plantas e flores ornamentais, pois oferece a possibilidade de propagação de clones em qualquer época do ano (Fráguas *et al.*, 1999) e por estar relacionada não apenas à preservação do fenótipo, mas também da atividade fisiológica da planta-matriz (Grattapaglia & Machado, 1998).

O estudo de Nannetti (1994) determinou uma metodologia básica de micropropagação de *Heliconia* sp, comparando a ação de benzilaminopurina (BAP, 0,0 mg/L; 2,5 mg/L; 5,0 mg/L; 10,0 mg/L) e thidiazuron (TDZ, 0,025 mg/L; 0,250 mg/L; 0,500 mg/L; 1,000 mg/L) em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962). Constatou o maior número de brotos nos explantes estabelecidos em meio contendo 2,5 mg/L de BAP e entre os tratamentos com TDZ a maior brotação ocorreu na concentração de 0,25 mg/L. Em um segundo experimento, os explantes de *Heliconia* sp foram cultivados em meio MS, acrescido de 0,25 mg/L TDZ e após 2, 4, 8, 16, 32 dias, os explantes foram transferidos para meio MS sem regulador vegetal. Após 60 dias foi verificado um máximo de produção de brotos com 8 dias de exposição ao TDZ. Em um terceiro experimento conduzido, os explantes foram imersos em solução com 0,25 mg/L de TDZ por 5, 10, 20, 40, 80 minutos e cultivados em meio MS, verificando um maior número e tamanho de

brotos com 80 minutos de imersão. Dando continuidade, a autora, testou diferentes quantidades de nitrogênio (840,00 mg/L; 551,60 mg/L; 407,40 mg/L; 335,44 mg/L; 263,00 mg/L) e cálcio (880,00 mg/L; 440,00 mg/L; 220,00 mg/L; 110,00 mg/L; 0,00 mg/L), combinados fatorialmente com 2,5 mg/L de BAP e 0,25 mg/L de TDZ. Observou que a adição de 840,00 mg/L de NH_4NO_3 produziu o maior número de brotos no meio de cultura com BAP e entre os meios com TDZ a concentração de 335,44 mg/L de NH_4NO_3 favoreceu a brotação e o aumento do tamanho dos brotos. O acréscimo de 880,00 mg/L de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ acarretou maior brotação tanto nos tratamentos com BAP, como TDZ. Entretanto, o tamanho dos brotos foi superior nas concentrações de 220,00 mg/L e 840,00 mg/L, nos meios com TDZ e BAP respectivamente.

No estudo de Nathan; Goh e Kumar (1992), ápices caulinares e brotações laterais de *Heliconia psittacorum* foram introduzidos em meio MS modificado com diferentes concentrações de 6-benziladenina (BA, 0 μM ; 10 μM ; 20 μM ; 40 μM e 80 μM), combinados a ácido 3-indolacético (AIA, 0 μM ; 1 μM e 10 μM). O crescimento dos explantes foi crescente de acordo com o aumento da concentração de BA, principalmente nos meios contendo 40 μM de BA e 0 μM de AIA. Entretanto, o tratamento com 80 μM de BA prejudicou o crescimento dos explantes e as três concentrações de AIA não apresentaram diferenças significativas durante o estabelecimento. As concentrações de 0 μM ; 5 μM ; 10 μM ; 20 μM ; e 40 μM de BA foram testados em meio MS sem a adição de água de coco para a multiplicação dos explantes. A maior taxa de proliferação de brotos foi no tratamento com 10 μM de BA após seis semanas. Os autores ressaltaram que observaram dois tipos de formação dos brotos: brotos individuais provenientes da gema central e um conjunto de três a cinco brotos originados das gemas axilares.

Goh; Nathan e Kumar (1995), testaram o meio MS modificado com uma combinação em delineamento fatorial de ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4 - D, 10 μM , 20 μM , 40 μM e 80 μM) e BA (10 μM , 20 μM e 40 μM) para a organogênese direta e a indução de calos em fragmentos de 1 mm da base de plântulas estabelecidas *in vitro* de *Heliconia psittacorum* L.f. 'Choconiana', concluindo que a presença de 10 μM de 2,4 - D produz a formação de explantes enraizados, 40% dos explantes submetidos ao tratamento com 80 μM de 2,4 - D apresentaram uma alta formação de calos morfogênicos e que os altas concentrações de citocinina reduziram a formação de gemas.

Dias e Rodrigues (2001), utilizaram ápices caulinares e ápices florais em três estágios de desenvolvimento da inflorescência: brácteas fechadas, metade das brácteas abertas e todas as brácteas abertas. Os explantes foram inoculados em meio MS acrescido de 2,0 g/L Phytigel, 30,0 g/L sacarose, 10 ml/L vitamina Morel, 3,5 ml/L BA, sob pH 5,8. Observaram que após cinco dias, todos os ápices caulinares apresentaram contaminação, mesmo apresentando um bom desenvolvimento inicial. A contaminação de todos os ápices florais de brácteas semi-abertas e abertas foi constatada após dez dias e em um terço dos ápices florais fechados. O estudo segue com o isolamento das colônias de bactérias dos meios de culturas, identificadas com teste bioquímico, a qual verificou a presença de *Pseudomonas* sp nos ápices florais e *Pseudomonas* sp e *Klebsiella* sp. nos ápices caulinares.

2.4.1.1 Meio de Cultura para o cultivo *in vitro* de helicônias

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

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

Diniz *et al.* (1999), acrescentam que a quantidade e o balanço de nutrientes proporcionados aos explantes são fatores determinantes para a sua utilização durante o cultivo *in vitro*. Os elementos essenciais são requeridos pelas plantas em quantidades variáveis conforme a espécie e o estágio de desenvolvimento. Os macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg e S) são elementos essenciais exigidos em maiores quantidades pelas plantas, envolvidos diretamente no metabolismo da planta, fazendo parte de um constituinte essencial (enzima) ou exigido para um passo metabólico específico (reação enzimática) (MALAVOLTA, 1980). Diniz *et al.* (1999), acrescentam ainda que existem poucas informações disponíveis sobre o

comportamento em relação à nutrição *in vitro*, acrescentando que a quantidade fornecida e o balanço de nutrientes são fatores determinantes na sua utilização pelas plantas. Concluíram que os explantes de bananeira cultivadas *in vitro* apresentam a maior taxa de absorção de nutrientes durante os primeiros 20 dias de cultivo, sendo o fósforo o nutriente mais rapidamente absorvido e a quantidade de macronutrientes utilizada pelo explante seguindo a ordem: $K > N > Ca \geq P > Mg > S$. A concentração e o acúmulo de nutrientes se diferenciam no rizoma, na folha e no pseudocaule, as maiores concentrações de N, P e K se encontram no pseudocaule e Ca, Mg e S é maior no rizoma. Entretanto, o maior acúmulo de N, K, Ca, Mg e S ocorrem no rizoma e as folhas apresentam o maior acúmulo de fósforo.

Os fitorreguladores suprem as deficiências dos teores endógenos de hormônios nos explantes, os quais se encontram isolados das regiões produtoras na planta-matriz. George (1993) revela que o ANA é a auxina mais utilizada em meios de multiplicação, seguido pelo IBA, porém, as concentrações de auxina são freqüentemente baixas, quando comparadas com as das citocininas, mantendo um balanço entre auxina/citocinina menor do que um, pois concentrações excessivas de auxina podem inibir a multiplicação ou favorecer demasiadamente a formação do sistema radicular ou a formação de calos (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). A citocinina quebra a dominância do meristema apical e induz a proliferação de gemas axilares e as diversas combinações de citocinina com outros fitorreguladores são muito comuns para o ajuste dos meios. Entre elas o BAP tem sido muito eficaz para promover multiplicação de partes aéreas e indução de gemas adventícias. A determinação do balanço entre citocinina e auxina otimiza o protocolo de micropropagação, produzindo partes aéreas suficientemente alongadas, permitindo a passagem direta da fase de alongamento e um maior equilíbrio entre o desenvolvimento entre a parte aérea e o sistema radicular (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Amari (2001) enfatiza que a taxa de multiplicação de *Musa acuminata* var. Dwarf Cavenish é associada à disponibilidade mineral e à sua absorção. Desta forma, testou quatro concentrações dos sais do meio MS (0%, 50%, 100% e 200%), acrescidos de 1-2 mg/L BA, 3% sacarose e 0,8% Difto Bitek TM ágar em pH 5,5, avaliando a taxa de multiplicação, a porcentagem de formação de raízes, altura dos explantes, peso fresco e seco dos explantes e a variação aparente dos explantes. Concluiu que a quantidade total de nutrientes fornecidos pelo meio de cultura influenciou diretamente na taxa de crescimento e absorção dos mesmos pelo

explantes, observando que o aumento do crescimento e da qualidade das plantas foram proporcionais à maior absorção dos nutrientes pelos explantes.

No estudo desenvolvido por Utino; Carneiro e Chaves (2001), envolvendo explantes de bananeira 'Prata' (*Musa spp*, AAB), diferentes concentrações de sais MS (33,33%, 50% e 100%), dois níveis de ácido ascórbico (0 e 25mg/L) e três frequências de subcultivos (7, 14 e 28 dias) foram testados, verificando que a massa fresca das plantas varia apenas em relação à concentração dos sais MS, aumentando linearmente em relação à maior concentração.

2.4.1.2 Desinfecção

Grattapaglia e Machado (1998) afirmam que uma das etapas mais difíceis da micropropagação é a obtenção do tecido descontaminado, evitando a sua inviabilidade após o isolamento e um dos principais fatores limitantes encontrados na micropropagação de espécies de helicônias é a contaminação bacteriana dos explantes durante o cultivo *in vitro*.

Os pré-tratamentos aplicados, a forma de manejo e a origem das plantas matrizes são determinantes para o controle da contaminação por microrganismos, principalmente quando relacionada aos microrganismos endofíticos. Desta forma, um cronograma rígido de pulverização com bactericida sistêmico possibilita a redução da comunidade bacteriana das plantas matrizes (FRANCLET; BOULAY, 1982).

Um dos manejos adotado por Nathan; Goh e Kumar (1992) e Nannetti (1994) para controlar a presença de microrganismos nas plantas foi a coleta dos rizomas e a sua incubação em sacos plásticos por 7 e 14 dias, respectivamente, estimulando a brotação e fazendo com que estes novos brotos entrem o contato o mínimo possível com os microrganismos do ambiente, especialmente aqueles presentes nos substratos.

No estudo realizado por Nathan; Goh e Kumar (1992), o protocolo de desinfecção adotado para *Heliconia psittacorum* foi a lavagem das gemas axilares em água corrente por 15 minutos, imersão em etanol (80%) durante 30 segundos, 15 minutos em solução de NaOCl (0,8%) em contínua agitação e duas lavagens com água destilada, durante 5 minutos.

Durante a introdução de gemas de *Heliconia* sp., Nannetti (1994) utilizou a imersão em solução de ácido cítrico (200 mg/L), 2 minutos em solução de etanol (95 %), posterior imersão em solução de NaOCl (0,8 %), pH 6, durante 15 minutos e três lavagens com água destilada esterilizada.

Rodrigues (2005) estabeleceu os ápices caulinares de *H. rauliniana* utilizando apenas solução de NaOCl (30 %, produto comercial, 2,5% cloro ativo) e Tween-80 (0,1 %) durante 20 minutos e três lavagens com água destilada esterilizada.

2.4.1.3 Contaminação bacteriana

Um dos problemas enfrentados pelos laboratórios comerciais de cultura de tecidos é a contaminação bacteriana e há grande dificuldade na identificação da fonte de inóculo e o seu controle (TRANPASERT; REED,1998). As bactérias encontradas na contaminação dos explantes em cultura de tecidos provêm de uma vasta e diversificada escala de grupos ecológicos (STEAD; HENNESSY; WILSON, 1998). Stead; Hennessy e Wilson (1998) e Cassells (2001), acrescentam que a contaminação dos explantes introduzidos no meio de cultura ocorre pela presença de microrganismos endofíticos ou microrganismos do biofilme resistentes à desinfecção superficial. Outras fontes são os agentes patogênicos, os microrganismos comuns encontrados no ambiente, ou contaminantes acidentais inseridos durante a manipulação das plantas *in vitro*.

Cassells (2001) afirma que os microrganismos presentes no meio de cultura afetam o desenvolvimento das plantas *in vitro*, competindo com os explantes pelos nutrientes do meio de cultura, podendo permanecer latentes até a troca do meio de cultura adequado, permanecendo imperceptíveis visualmente e afetando o crescimento da cultura e ou exudando substâncias que acidificam o meio de cultura ou liberando reguladores vegetais.

Nannetti (1994), Artehortua (1997) e Dias e Rodrigues (2001) encontraram grande dificuldade em estabelecer explantes de helicônia *in vitro* devido à contaminação bacteriana. Nannetti (1994) cita a utilização do antibiótico Claforam no meio de cultura, pois resultados preliminares mostraram 100 % de contaminação bacteriana e nenhum desenvolvimento do explante.

No estudo de Albuquerque *et al.* (2006), visando testar diferentes concentrações de óleo essencial de *Lippia gracilis* no controle da ação de microrganismos no meio de cultura de alguns híbridos de *Heliconia*, isolaram em meio NYDA contaminantes associados aos ápices caulinares introduzidos em meio MS, identificando a presença de oito espécies de fungos e de bactérias como: *Salmonella choleraesuis-dirizonae*, *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter hormoechei*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus cereus* e *Klebsiella pneumoniae*.

2.4.1.3.1 Microrganismos endofíticos

Endofíticos são organismos que em pelo menos uma fase do seu ciclo de vida, habitam o interior de tecidos da parte aérea de plantas assintomáticas, sendo denominados endófitos facultativos ou verdadeiros conforme o grau de interação dos mesmos com as plantas hospedeiras (AZEVEDO, 2002). As interações podem ser de simbiose, mutualismo, comensalismo ou trofobiótico e geralmente, as bactérias endofíticas são provenientes da rizosfera, ou da superfície aérea das plantas e/ou são transmitidas pelas sementes (RYAN *et al.*, 2008). Ryan *et al.* (2008) acrescentam que algumas bactérias endofíticas podem beneficiar seus hospedeiros promovendo o crescimento e o aumento do rendimento; agem como agentes de biocontrole; podem produzir substâncias com grande potencial de uso na medicina, na agricultura ou na indústria; colaboram com a solubilização do fosfato e na fixação do nitrogênio e apresentam grande potencial na remoção de contaminantes do solo, otimizando a biorremediação.

A presença de organismos endofíticos em helicônia foi constada por diversos autores (AKIEW *et al.*, 1990; ATEHORTUA, 1997; DIAS; RODRIGUES, 2001; RODRIGUES, 2005). Segundo Rodrigues (2005), este é um fator que prejudica consideravelmente a expansão do cultivo *in vitro* de helicônias, devido à alta taxa de contaminação das culturas. Outro fator que afeta negativamente o estabelecimento e o desenvolvimento de trabalhos de cultura de tecido deste gênero é a inexistência de mudas saudáveis.

Atehortua (1997) enfatiza a dificuldade de eliminar *Pseudomonas solanacearum* durante o estabelecimento *in vitro* de explantes de rizoma das helicônias. Dias e Rodrigues (2001) identificaram a presença de *Pseudomonas* sp. e de *Klebsiella* sp. a partir de contaminantes isolados de meio de cultura de *Heliconia bihai*, concluindo ainda que a utilização de

antimicrobianos bactericidas se constitui em uma medida necessária para o controle dos contaminantes.

Rodrigues (2005) testou os antimicrobianos cloranfenicol, cefotaxima e a associação cloranfenicol e cefotaxima em doses 50, 150, 250 e 500 mg/L em meio MS, suplementado com 3,5 mg/ L BAP, como forma de controle das bactérias endofíticas encontradas em *Heliconia rauliniana*. Após 50 dias de avaliação, constatou que cefotaxima aplicada isoladamente, na dose de 500 mg/L, foi a forma mais eficiente de controle dos endofíticos para esta espécie de helicônia. O cloranfenicol, apesar do controle efetivo dos endofíticos, apresentou-se inadequado ao cultivo *in vitro*, sendo cito-tóxico aos explantes.

2.4.1.3.2 Identificação das comunidades bacterianas

Louws; Rademaker e Bruijn (1999), afirmam que os estudos de filogenia e ecologia microbiana, baseados em aspectos moleculares, utilizam principalmente as diferenças da composição dos genes ribossomais. Os ácidos ribonucleicos ribossomais (rRNA) são considerados os biopolímeros mais adequados para estudos de diversidade. Seus genes são universalmente distribuídos e apresentam elevado grau de conservação e a variabilidade pode apresentar-se em maior ou menor extensão, em diferentes regiões da molécula (Lane et al., 1985). Nas bactérias o gene 16S ribossomal (16S rRNA) é amplamente utilizado e o seqüenciamento deste fragmento possibilita a identificação de microrganismos ao nível de gênero ou possivelmente até espécie, permitindo uma correlação entre o genótipo e o ambiente estudado (CHENEY *et al.*, 2000).

A técnica conhecida como ARDRA (Amplified Ribossomal DNA Restriction Analysis) se baseia em padrões de restrição enzimática e no grau de conservação dos sítios de restrição do rRNA, que refletem padrões filogenéticos. Esta técnica pode avaliar a variabilidade genética de uma população, caracterizando os isolados pelos padrões de restrição de determinados genes, acessando o polimorfismo dos genes ribossomais. A técnica consiste na amplificação do fragmento e posterior digestão do rDNA com enzimas de restrição, formando grupos de acordo com a similaridade das bandas observadas e as diferenças nos perfis de bandas mostram a diversidade entre e dentro dos grupos bacterianos cultivados, agrupando os indivíduos de genótipos semelhantes (KUKLINSKY-SOBRAL *et al.*, 2004).

Estudos elaborados por Reed, Buckley e DeWilde (1995), verificaram por testes bioquímicos que 83% das bactérias isoladas de meio de cultura onde plântulas de hortelã foram cultivadas *in vitro* são Gram-negativas e 17% são Gram-positivas, contribuindo nas escolhas dos antibióticos testados posteriormente, adotando como enfoque principal o controle das bactérias Gram-negativas.

Bactérias foram isoladas de meio de cultura no qual plântulas de morango foram cultivadas e quatro espécies de *Pseudomonas*, duas espécies de *Xanthomonas* e duas espécies de *Enterobacter* foram identificadas por testes bioquímicos, avaliando o antibiótico mais adequado para o controle da contaminação *in vitro*. O controle precoce da contaminação promove melhores resultados na obtenção de plantas de morango *in vitro* e menor fitotoxicidade, devido ao menor tempo de exposição (TANPRASERT; REED, 1998).

Pereira; Mattos e Fortes (2003) isolaram, caracterizaram e identificaram por métodos bioquímicos oito estirpes de bactérias pertencentes à família Acetobacteriaceae e Enterobacteriaceae em batata (*Solanum tuberosum*), cultivares Astrid, Baronesa e Eliza, cultivadas *in vitro*, enfatizando que a identificação das bactérias é importante para o sucesso do controle da contaminação dos explantes *in vitro* pelo uso de antibióticos, devido ao alto custo do tratamento e pela fitotoxicidade, devendo agir apenas sobre os contaminantes específicos das culturas.

2.4.2 Aclimação

A aclimação *ex vitro* das plantas obtidas por cultura de tecidos, consiste de um progressivo aumento da irradiância sob alta umidade relativa do ambiente, com gradativa redução umidade até o final da fase de adaptação (CAMPOSTRINI; OTONI, 1995). Algumas das mudanças fisiológicas sofridas pelas plantas durante a aclimação são a suscetibilidade ao estresse hídrico, pois há um aumento na taxa de transpiração, devido à diminuição da umidade relativa e aumento da intensidade luminosa; a passagem para um estado autotrófico realizando fotossíntese; o sistema radicular se adapta para incrementar rapidamente a absorção de sais sendo que a planta fica vulnerável à ação dos agentes patogênicos, pois é transferida de um ambiente asséptico para o natural (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

O mesocarpo do fruto coco é comumente utilizado como substratos no cultivo de diversas espécies vegetais e é constituído aproximadamente por 30% de fibra e 70% de lignina e celulose. Apresentam lenta biodegradação, são hidrofílicas, retendo de oito a dez vezes o seu peso em água e tem alta porosidade, aumentando a retenção de água e constituindo em um excelente estimulador no desenvolvimento do sistema radicular. Outras características da fibra de coco é a capacidade de manter o pH, redução de temperatura, diminuição da compactação e aumento da penetração da irrigação, fatores esses que contribuem para redução dos efeitos da seca, na economia da água de irrigação e a melhoria das condições ambientais para os microrganismos associados às raízes das plantas (NUNES; SANTOS; SANTOS, 2007).

Segundo Minami (1995), a casca de arroz carbonizada possui forma floculada, é leve, de fácil manuseio, com grande capacidade de drenagem, pH levemente alcalino, baixa capacidade de retenção de umidade, rica em cálcio e potássio, livre de nematóides e patógenos devido ao processo de carbonização. Klein et al. (2002), avaliaram as alterações nas propriedades físico-hídricas de substratos comerciais, com a mistura de casca de arroz carbonizada em diferentes proporções, concluindo que a casca de arroz pode ser utilizada para otimizar as propriedades físico-hídricas de substratos hortícolas, melhorando a disponibilidade de água às plantas e a porosidade de aeração.

Rodrigues *et al.* (2005) avaliaram o comportamento de mudas de *H. bihai* Lobster Claw I micropropagadas no processo de aclimação, em diferentes substratos (areia lavada, vermiculita (textura média) e PlantMax[®] Horticultura) e níveis de sombreamento (0, 30, 40, 50, 60, 70 e 80%). O melhor desempenho foi observado nos substratos areia lavada e PlantMax[®] Horticultura e nas condições de sombreamento a partir de 50 %, em especial 70 % e 80 %.

Santos *et al.* (2004) testaram três substratos orgânicos (casca de arroz carbonizada, pó de casca de coco seco e verde) em combinação fatorial com dois adubos (Vitasolo e húmus de minhoca), na aclimação de plântulas de *Heliconia psittacorum* L., provenientes de micropropagação. Entre os substratos, a casca de arroz foi superior, seguido por pó de casca de coco seco e depois pelo pó de casca de coco verde. Entre os adubos o húmus foi mais eficiente que o Vitasolo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cultivo *in vitro*

3.1.1 Obtenção de material vegetal

Mudas de *Heliconia ortrotricha* cv. Candy Cane foram gentilmente cedidas pela Flora Alfredo Tilli (Campinas, SP) e mudas de *H. ortrotricha* L. Anderss. cv. Total Eclipse e *H. bihai* cv. Peach Pink foram obtidas da coleção particular do Prof. Dr. Paulo Hercílio Viegas Rodrigues. As plantas foram estabelecidas em vasos (30x30cm) contendo uma mistura de substrato Plant Max® Horticultura e fibra de côco Amafibra (textura média) na proporção 1:1. Inicialmente as nove mudas de *Heliconia ortrotricha* cv. Candy Cane, as quatro de *H. ortrotricha* L. Anderss. cv. Total Eclipse e as seis de *H. bihai* cv. Peach Pink, compostas por um rizoma com um a três pseudocaulis, foram mantidos em casa de vegetação com 30% de sombreamento, sobre bancadas. Utilizou-se o sistema de irrigação manual, de uma a duas vezes por dia, mantendo-se os vasos sempre úmidos, mas evitando o encharcamento.

As matrizes receberam adubação quinzenal com NPK, formulação 8-4-8. Brotos laterais com 5 a 25 cm de altura desenvolvidos nas touceiras matrizes foram as fontes de explantes para obtenção dos ápices vegetativo e introdução *in vitro*.

3.1.2 Introdução *in vitro* de helicônia

Ápices caulinares das três cultivares foram introduzidos (Tabela 1) conforme a emissão de perfilhos das plantas matrizes seguindo a metodologia modificada adotada por Rodrigues (2005), utilizando-se solução de 30 % NaOCl (produto comercial, 2,5% cloro ativo) durante 20 minutos, três lavagens com água destilada esterilizada e introduzidas em meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), acrescido de 30 g/L sacarose, 1 mg/L BAP (benzilaminopurina), 250 mg/L cefotaxima e 2 g/L phytigel.

Tabela 1: Número de ápices caulinares de três cultivares de helicônia, obtidos a partir do rizomas cultivados em casa de vegetação, para introdução *in vitro*.

Cultivar	Número de explantes
<i>H. bihai</i> cv. Peach Pink	16
<i>H. ortrotricha</i> cv. Candy Cane	11
<i>H. ortrotricha</i> L. Anderss. cv. Total Eclipse	10

Devido aos resultados preliminares insatisfatórios, testou-se um protocolo para a desinfecção dos ápices caulinares (Tabela 2), começando por um pré-tratamento das plantas matrizes em casa de vegetação com solução de Agrimicina (1 %), aplicadas na base das plantas, uma semana antes da extração dos brotos laterais para estabelecimento *in vitro*. Após a extração, os brotos laterais foram lavados e mantidos em água corrente por 12 horas, seguido de imersão em solução de etanol (80 %), por 1 minuto, sob agitação e submetidos aos seguintes tratamentos: imersão em solução de 25, 50 ou 75% NaOCl (produto comercial Q-Boa, 2,5% cloro ativo) durante 20 minutos em sonicador Branson B-220 (50/60 Hz), 3 lavagens em água esterilizada e flambados sob condições assépticas, ou foram emergidos em de 25 % NaOCl (produto comercial Q-Boa, 2,5% cloro ativo) durante 20 minutos em sonicador, 3 lavagens em água esterilizada, emergidas em etanol (92,8°), flambados e mantidos em solução de cefotaxima (4 %) por 48 horas antes da introdução dos ápices caulinares no meio de cultura (Tabela 2).

Tabela 2: Tratamentos para desinfecção de ápices caulinares de *H. bihai* cv. Peach Pink, *H. ortrotricha* cv. Candy Cane, *H. ortrotricha* L. Anderss. cv. Total Eclipse.

Tratamentos	1	2	3	4
Agrimicina (1%)	X	X	X	X
Água corrente durante 12 horas	X	X	X	X
Etanol (80%) por 1 minuto	X	X	X	X
NaOCl* por 20 minutos	25%	50%	75%	25%
3 lavagens em água esterilizada	X	X	X	X
Etanol (92,8 %)	X	X	X	X
Flambagem	X	X	X	X
Cefotaxima (4%) por 48 horas				X

* produto comercial Q-Boa, 2,5% cloro ativo

Os ápices caulinares foram introduzidos em meio líquido MS modificado com metade da concentração dos sais MS, acrescido de 30 g/L sacarose, 1 mg/L BAP (benzilaminopurina), 40 mg/L de glutamina, 20 mL/L água de côco, 500 mg/L cefotaxima e o pH ajustado a 5,8, sendo as culturas mantidas durante a primeira semana sob agitação. Passado este período, os explantes foram transferidos para o mesmo tipo de meio de cultura MS modificado acrescido de 2 g/L de phytigel, mantendo-os durante os próximos 30 dias. Em seguida, os explantes foram mantidos em meio de cultura MS completo acrescido de 30 g/L sacarose, 2,5 mg/L BAP, 40 mg/L glutamina, 45 mg/L sulfato de adenina, 500 mg/L cefotaxima e o pH ajustado a 5,8 anteriormente à autoclavagem, durante 3 meses. O número de explantes introduzidos foram de acordo com a emissão de perfilhos das plantas matrizes e os respectivos tratamentos para o estabelecimento *in vitro* dos ápices caulinares.

Tabela 3: Número de explantes introduzidos *in vitro* de três cultivares de helicônia, utilizando-se quatro tratamentos para desinfecção*.

Cultivar	Tratamento	Número de explantes
<i>H. bihai</i> cv. Peach Pink	1	47
	2	17
	3	19
<i>H. ortrotricha</i> cv. Candy Cane	1	49
	2	18
	3	19
	4	10
<i>H. ortrotricha</i> L. Anderss. cv. Total Eclipse	1	36
	2	13
	3	10

*Tratamentos para desinfecção descritos na Tabela 2.

Após 14, 28 e 60 dias os explantes foram avaliados quanto à porcentagem de plantas sobreviventes e ao fim da primeira semana os recultivos ocorriam a cada 30 dias.

3.1.3 Multiplicação *in vitro*

Após a regeneração dos ápices caulinares das três cultivares estabelecidas *in vitro*, os explantes foram transferidos para o meio de multiplicação, o qual consta de sais MS acrescido de 30 g/L sacarose, 2 g/L phytigel, 2,5 mg/L BAP, 40 mg/L glutamina, 0,45 mg/L sulfato de

adenina e o pH ajustado a 5,8 anteriormente à autoclavagem. As culturas foram repicadas a cada 4 semanas, durante 5 meses.

3.1.4 Cultivo *in vitro* de *H. ortotricha* cv. Candy Cane

O sucesso no estabelecimento dos ápices caulinares de *H. ortotricha* cv. Candy Cane, com sua regeneração e seu bom perfilhamento *in vitro*, permitiram que testes com modificações no meio MS fossem realizados. O experimento teve como base o meio de cultura MS com a adição de 30 g/L sacarose, 2 g/L phytigel, 2,5 mg/L BAP, 40 mg/L glutamina, 0,45 mg/L sulfato de adenina e o pH ajustado a 5,8, em delineamento fatorial, 2x2x2, com 2 concentrações de macronutrientes do meio MS e duas concentrações de reguladores de crescimento ANA (ácido naftalenoacético) e AIA (ácido indolacético), gerando 8 tratamentos, como mostra a Tabela 4:

Tabela 4: Tratamentos com modificações na concentração de sais MS e auxinas (ANA e IBA) para cultivo de *H. ortotricha* cv. Candy Cane em delineamento fatorial, 2x2x2.

TRATAMENTOS	0,10 mg/L de ANA	0,25 mg/L de ANA	0,10 mg/L de AIA	0,25 mg/L de AIA
MS 50%	1	2	3	4
MS 100%	5	6	7	8

O delineamento experimental foi em blocos casualizados conduzidos em 2 blocos, com os 8 tratamentos contendo 3 repetições da unidade experimental, constituída por um frasco com 50 ml de meio (12 x 6 cm) de cultura, abrigando 3 explantes e conduzido durante 12 semanas na sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas, temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e $19 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ de radiação luminosa fornecidas por lâmpadas fluorescentes branca fria. A variável analisada foi o número de brotos em todos os explantes e os dados foram transformados segundo raiz quadrada de $(X+1)$. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% com o uso do programa SAS. Uma avaliação final ocorreu com um terço do material *in vitro*, coletado ao acaso entre a totalidade das culturas, para avaliação de massas fresca e seca, na qual os dados foram transformados segundo logaritmo de $(X+1)$ e comparadas pelo teste-T ao nível de 5%. Este material constava de touceiras de brotações, com algumas raízes. O restante das culturas foi repicado e transferido para meio contendo metade dos sais MS, acrescido de 30 g/L sacarose, 2 g/L

phytagel e o pH ajustado a 5,8 anteriormente à autoclavagem, por 4 semanas, visando uniformização e enraizamento para obtenção de material para experimentos de aclimação.

3.1.5 Aclimação

Ao final da fase de uniformização de *H. ortotricha* cv. Candy Cane, as plantas enraizadas foram lavadas em água corrente para a retirada do excesso de meio de cultura e transferidas para bandejas de 24 células contendo diferentes misturas de substratos, conforme Tabela 5, visando a aclimação.

Tabela 5: Tratamentos e proporções das misturas de substratos utilizadas na aclimação de *H. ortotricha* cv. Candy Cane.

Tratamento	Mistura	Proporção
1	Plant Max [®] Horticultura	1
2	Plant Max [®] Horticultura + Fibra de côco Amafibra (fibroso)	1:1
3	Plant Max [®] Horticultura + casca de arroz carbonizado	1:1
4	Plant Max [®] Horticultura+ Fibra de côco Amafibra (fibroso) + casca de arroz carbonizado	1:1:1

Para aclimação, as folhas das plântulas foram cortadas parcialmente, visando evitar a perda excessiva de água através da transpiração e mantidas em ambiente protegido com 70% de sombreamento e com sistema de nebulização intermitente por 1 minuto a intervalos de 3 horas, quatro vezes ao dia (entre 7 e 19h). Os parâmetros avaliados durante a aclimação de plantas de *H. ortotricha* cv. Candy Cane provenientes de cultivo *in vitro* foram a porcentagem de sobrevivência após 30 e 60 dias em casa de vegetação e a massa fresca e seca da parte aérea e do sistema radicular aos 60 dias. O experimento foi instalado seguindo o delineamento em blocos casualizados, combinando fatorialmente 4 substratos e 2 avaliações e as porcentagens médias foram comparadas pelo teste Tukey ao nível de 5%. A avaliação da massa fresca e seca da parte aérea e do sistema radicular foram comparadas pelo teste-T ao nível de 5% .

3.2 Caracterização de microrganismos contaminantes na introdução *in vitro* de três cultivares de *Heliconia* sp

A elevada taxa de contaminação bacteriana das culturas foi um fator de grande dificuldade para o sucesso da introdução *in vitro*, desta forma, buscou-se caracterizar as bactérias mais comumente observadas nos meios de cultura, comparando com os isolados de folhas, visando a identificação da fonte de inóculo e possíveis medidas para seu controle.

3.2.1 Isolamento da comunidade bacteriana proveniente da contaminação dos explantes *in vitro*

Após 3 dias de cultivo dos ápices caulinares de *H. ortotricha* Candy Cane, *H. ortotricha* L. Anderss. cv. Total Eclipse e *H. bihai* Peach Pink estabelecidas *in vitro*, o meio líquido se tornava turvo, indicando o crescimento bacteriano. Desta forma, os meios foram homogenizados e 10 mL do meio contaminado foram diluídos em 90 mL de solução de NaCl 0,85%, seguida de uma diluição seriada, finalizando na concentração 10^{-5} .

Com o auxílio de uma pipeta, 100 μ L de cada diluição, foram plaqueados nos meios de cultura Tryptone Soya Agar 10% (TSA) (ARAÚJO et al., 2002) e R2A (REASONER; GELDREICH, 1985) para o isolamento das bactérias, ou seja, cada diluição foi plaqueada em dois tipos de meio, contendo 2 repetições e cultivadas por 72 horas em BOD, a 28° C e sem iluminação, visando a avaliação do número de colônias.

O número de colônias foi contado a olho nú, em cada uma das placas e, em seguida, colônias individuais foram purificadas em meio Luria Broth (LB) (SOMESEGARAN; HOBEN, 1994) solidificado com 15 g/L de ágar, através de 3 repicagens subseqüentes no mesmo meio.

3.2.2 Isolamento da comunidade bacteriana endofítica de helicônia

As colônias de bactérias endofíticas foram isoladas de folhas de plantas crescidas em casa-de-vegetação de *H. ortotricha* cv. Candy Cane, *H. ortotricha* L. Anderss. cv. Total Eclipse e *H. bihai* cv. Peach Pink, dando-se preferência às plantas visualmente saudáveis e coletando-se as folhas de posição mediana, utilizando-se apenas a parte central do limbo e descartando-

se a nervura central. A desinfecção das folhas seguiu o protocolo de Araújo *et al.* (2001) e um grama de folha foi macerado em 3 mL de solução NaCl (0,85%). A diluição seriada foi realizada até a concentração 10^{-3} , plaqueando-se 100 μ L de cada diluição em meios TSA e R2A, com 3 repetições e cultivadas durante 72 horas em estufa tipo BOD, a 28° C e sem iluminação.

As colônias foram quantificadas visualmente e purificadas em meio LB, solidificado com 15 g/L de ágar, fazendo-se 3 repicagens. De acordo com a frequência de bactérias nas folhas foram isoladas: 10, 5 e 5 colônias brancas, amarelas e laranjas, respectivamente em *H. bihai* cv. Peach Pink; e 10 colônias brancas, 10 colônias laranjas e 5 colônias amarelas de *H. ortotricha* L. Anderss. cv. Total Eclipse e cv. Candy Cane, para análise utilizando-se a técnica de ARDRA.

3.2.3 Caracterização das bactérias isoladas utilizando a técnica ARDRA

As colônias individuais foram previamente separadas em 4 grupos distintos, de acordo com as suas características morfológicas como: colônias laranjas, colônias amarelas, colônias brancas e colônias brancas do meio de cultura, pois os isolados dos meios de cultura contaminados não apresentaram diversidade morfológica, verificando a presença de apenas um tipo de colônia (brancas) nos três meios, muito parecida com os isolados brancos das folhas. Entre as bactérias de folhas não se notou diferenças entre as colônias laranjas, amarelas e brancas isoladas das plantas das três cultivares de helicônias.

O trabalho seguiu com a semeadura em meio LB líquido das colônias purificadas de bactérias, de acordo com a frequência verificada no isolamento. Desta maneira, semeando-se: 10 colônias brancas de cada meio de cultura contaminado; 5 colônias amarelas e 10 colônias laranjas e brancas de *H. ortotricha* cv. Candy Cane e *H. ortotricha* L. Anderss. cv. Total Eclipse; 10 colônias brancas e 5 colônias laranjas e amarelas de *H. bihai* cv. Peach Pink, totalizando 100 isolados. Mantendo as colônias semeadas em agitação de 180 rpm, por 48 horas a 28°C.

A extração de DNA foi realizada utilizando o protocolo CTAB descrito por Doyle e Doyle (1990). O DNA extraído foi utilizado para amplificação do gene 16S ribossomal (16S DNAr) em reação de amplificação em volume de 50 μ L, com os primers RD1 e FD1 5 pMoles/ μ L,

acrescidas de 1,5 mM MgCl₂, 10 μM dNTP, 1,5 U *Taq* DNA polimerase, 5 μL solução tampão 1X e aproximadamente 1 μL DNA.

Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 1 %, purificados e aproximadamente 300-500 ng foram digeridos pela enzima de restrição *Hha* (Invitrogen) e *Rsa* (Promega), de acordo com as instruções dos fabricantes. As seqüências de cortes das enzimas de restrição (endonucleases) utilizadas no estudos são:

- *Rsa* I: GT↓AC

-*Hha* I: GCC↓C

As cepas de *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 13525) e *Pseudomonas stutzeri* (ATCC 31258), doadas pela Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro, RJ), foram utilizadas como padrões positivos. O produto da digestão foi separado em gel de agarose 2%, corado em solução de brometo de etídio e fotodocumentado.

3.2.4 Identificação dos isolados

Os diferentes padrões de clivagem observados pela técnica ARDRA permitiram uma maior precisão na caracterização dos isolados, viabilizando a seleção dos haplótipos a serem amplificados para identificação por meio do seqüenciamento do gene 16S DNAr. Desta maneira, 40 isolados foram seqüenciados parcialmente se utilizando somente a extremidade FD1, entre as amostras podemos citar: 10 isolados brancos do meio de cultura (4 colônias de *H. ortotricha* cv. Candy Cane, 3 de *H. ortotricha* L. Anderss. cv. Total Eclipse e 3 de *H. bihai* cv. Peach Pink); das bactérias de folhas de *H. ortotricha* cv. Candy Cane e *H. bihai* cv. Peach Pink foram escolhidas 2 colônias laranjas, 5 brancas e 3 amarelas; das amostras de *H. ortotricha* L. Anderss. cv. Total Eclipse foram selecionadas 2 colônias laranjas, 4 brancas e 4 amarelas. Os fragmentos de DNA foram seqüenciados em seqüenciador automatizado, 3100 Genetic Analyzer da Abi Prism e as seqüências obtidas de cada isolado foram identificadas pela análise de BLAST no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Ao final, foram selecionados representantes de cada grupo para seqüenciamento do gene 16S DNAr . Ao final, foram selecionados haplótipos de cada grupo para seqüenciamento do gene 16S DNAr total pelo kit DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing for

MegaBACE (Amersham Biosciences), seguindo as instruções do fabricante. Os primers 16S utilizados foram FD1, 357 f, 754 f, 1114 f e RD1, os quais foram amplificados, tiveram a fita anti-senso 16S DNAr totalmente seqüenciada, submetida ao programa Phred/Phrap/Consed para leitura do traço do cromatograma, avaliando a qualidade de cada base individualmente, identificando e mascarando os vetores para a montagem da seqüência completa e para a afiliação filogenética dos haplótipos utilizando o BLAST.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Cultivo *in vitro*

4.1.1 Obtenção de material vegetal

Observações semelhantes aos estudos realizados por Costa *et al.* (2006), foram feitos com *H. ortrotricha* e *H. bihai*, as quais apresentam hábito de crescimento agrupado, formando touceiras fechadas e o desenvolvimento das hastes verticais lentos. No entanto, quando comparados a *H. ortrotricha* L. Anderss. cv. Total Eclipse a *H. ortrotricha*.cv. Candy Cane e *H. bihai* cv. Peach Pink apresentaram uma taxa de brotação relativamente superior. Ao fim, verificou-se o aumento do número de brotações, em todas as cultivares, nas épocas mais quentes do ano.

As helicônias formam touceiras de população monoclonal com emissão de perfilhos, as quais se desenvolvem principalmente na periferia da touceira (CRILEY, 1989). As características genéticas e as condições climáticas têm forte influência no perfilhamento (GEERTSEN, 1989), conforme também observado em nossas condições.

4.1.2 Introdução *in vitro* de helicônia

Os estabelecimentos preliminares de ápices caulinares de helicônia *in vitro* seguindo a metodologia estabelecida por Rodrigues (2005), para *H. rauliniana*, mostrou-se inadequado para *H. bihai* cv. Peach Pink, *H. ortrotricha* L. Anderss. cv. Total Eclipse e Candy Cane (Tabela 1), pois 100% dos explantes apresentaram contaminação bacteriana nas primeiras 72 horas, afetando o desenvolvimento e inviabilizando completamente os explantes entre 15 e 30 dias após a introdução *in vitro*. Desta forma, buscou-se uma nova metodologia para desinfecção dos ápices caulinares para viabilizar o estabelecimento *in vitro* dos explantes.

Após a introdução *in vitro*, observou-se que a fase crítica na contaminação dos explantes recém introduzidos *in vitro* são os primeiros 14 dias nas três cultivares (Figura 2), ocorrendo as maiores taxas de perda dos ápices caulinares, por contaminação bacteriana neste período.

No estabelecimento de *H. bihai* cv. Peach Pink (Figura 2 A), os melhores tratamentos de assepsia aplicados aos ápices caulinares foram o Tratamento 1 e 3 e aos 60 dias não apresentaram diferença significativa nas taxas de sobrevivência que foram 21,28% e 15,79%, respectivamente. A solução de NaOCl (50%) proporcionou a menor taxa de sobrevivência (5,88%) ao fim de 60 dias.

H. ortotricha cv. Candy Cane, após desinfecção utilizando o tratamento 4, apresentou taxa de sobrevivência de 50% na última avaliação (Figura 2 B), sendo este o maior índice encontrado em todas as cultivares estudadas. Em contraste, o tratamento 2 proporcionou sobrevivência de apenas 5,55 % dos explantes, a menor taxa de sobrevivência observada. Ao final, o tratamento 1 e 3 apresentaram índices de sobrevivência de 28,57% e 31,58%, respectivamente, não havendo diferença significativa entre esses dois tratamentos.

As melhores respostas verificadas no controle da contaminação bacteriana de *H. ortotricha* L. Anderss. cv. Total Eclipse foi observada utilizando-se os tratamentos de assepsia 3 e 2, com taxas de sobrevivência 40,00 % e 38,46 %, respectivamente (Figura 2 C), não havendo diferença significativa entre esses dois tratamentos, sendo que a menor taxa de sobrevivência observada para este cultivar foi de 27,78% utilizando-se o Tratamento 1.

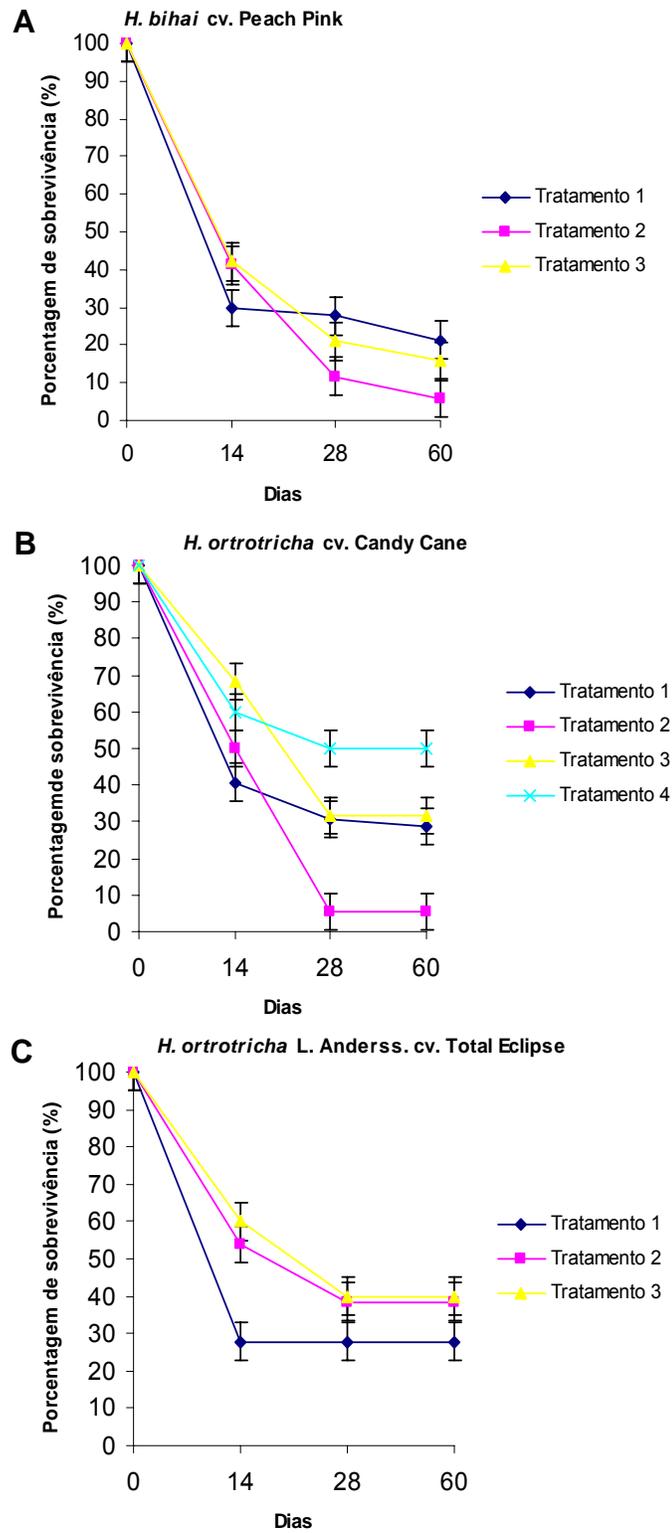


Figura 2: Porcentagem de sobrevivência de ápices caulinares introduzidos *in vitro*, após diferentes tratamentos para desinfecção dos explantes (tratamentos descritos na Tabela 2).*, em três cultivares de helicônia.

Analisando a literatura verificou-se que o controle de microrganismos mediante aplicações de fungicidas e bactericidas sistêmicos, entre eles o sulfato de estreptomicina (Agrimicina), têm sido bastante eficientes durante o pré-tratamento das plantas matrizes em casa de vegetação para reduzir a contaminação no isolamento dos explantes (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Os mesmos autores acrescentam que a lavagem em água corrente das fontes de explantes antes da desinfecção auxilia na eliminação de partículas de poeiras e outras fontes de contaminação superficiais, bem como na lixiviação de compostos fenólicos, prevenindo a oxidação durante o estabelecimento *in vitro*.

Durante a desinfecção propriamente dita, inúmeras substâncias de ação germicida são empregadas, entre elas o etanol e o NaOCl, soluções mais comumente utilizadas, tanto pela sua eficiência, como pela facilidade ao acesso. As concentrações, as combinações entre os princípios ativos desinfectantes e o tempo de exposição variam de acordo com a sensibilidade do tecido. Devido a este fator, diferentes concentrações foram testadas, a fim de definir a melhor concentração, considerando a obtenção do tecido descontaminado e evitando a sua inviabilidade.

A remoção do resíduo de cloro, pelas sucessivas lavagens com água destilada autoclavada, é essencial para a não interferência do cloro na regeneração dos explantes (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). De maneira geral, nenhuma das três cultivares de helicônia apresentou influência negativa quanto à concentração ou ao resíduo de cloro utilizado, verificando-se a regeneração de todos os explantes não contaminados. Isto é confirmado pelo fato de que a maior concentração de NaOCl (75%) testada está entre os melhores resultados com *H. bihai* cv. Peach Pink e *H. ortotricha* L. Anderss. cv. Total Eclipse e em *H. ortotricha* cv. Candy Cane o tratamento apresentou menor taxa de sobrevivência apenas quando comparado com o tratamento 4. A tolerância ao cloro é dependente de cada espécie, sendo que as mais sensíveis podem demonstrar toxicidade a partir de um nível de 3.000 mg/kg (matéria seca) e as mais tolerantes a partir de um nível de 20.000 mg/kg de matéria seca (FURLANI, 2004).

Segundo Cid e Zimmermann (2006), algumas das alternativas para contornar o problema da contaminação *in vitro* seriam a adoção de antibióticos como estratégias terapêuticas na cultura de tecido. Grattapaglia e Machado (1998) acrescentam que os antibióticos são freqüentemente usados durante a desinfecção ou incorporados ao meio de cultura, a viabilidade do seu uso é determinada tanto pela sua toxicidade para as células

vegetais, como pela capacidade bacteriostática ou bactericida no meio de cultura, abrangendo o maior espectro de ação possível. Em *H. ortotricha* cv. Candy Cane, a utilização do antibiótico cefotaxima, tanto no meio de cultura, quanto na assepsia, determinou a menor perda de explantes pela contaminação bacteriana de todos os tratamentos testados, proporcionando a sobrevivência de 40% dos ápices caulinares introduzidos. Os antibióticos são agrupados conforme o modo de ação e a cefotaxima comumente utilizada em cultivo *in vitro* para controle de agrobactéria, age inibindo a síntese de parede celular (CID; ZIMMERMANN, 2006).

De acordo com Assis *et al.* (1998), a utilização do banho ultra-som visa o desalojamento de toda microbiota epifítica, agindo na retirada de bactérias remanescentes durante a desinfecção. A adição dos pré-tratamentos (solução de Agrimicina e água corrente), a utilização do sonicador durante a imersão em solução de NaOCl e a adição de cefotaxima no meio de cultura viabilizaram o estabelecimento *in vitro* dos explantes das três cultivares de helicônia (Figuras 3 A e B), devido à redução e ao controle da contaminação bacteriana na fase de regeneração dos explantes (Figuras 3 C e D), viabilizando o cultivo e a sua multiplicação *in vitro* (Figuras 3 E, F e G).

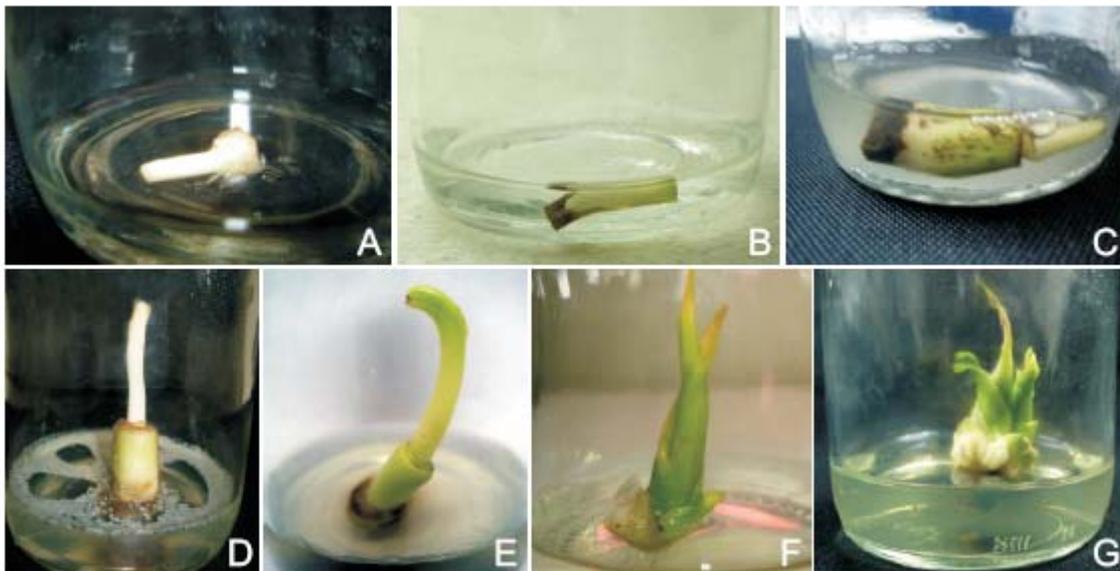


Figura 3: Introdução *in vitro* de ápices caulinares de helicônia: A) Ápice caulinar de helicônia introduzido *in vitro* em meio MS líquido; B) Aspecto do explante 7 dias após a introdução *in vitro*; C-D) Contaminação bacteriana de explante em meio de cultura líquido (C) e semi-sólido (D); E) Regeneração de ápice caulinar de helicônia estabelecido *in vitro*. F) Característica do explante após 45 dias em cultivo *in vitro*. G) Explante exibindo brotações após 60 dias do estabelecimento *in vitro* do ápice caulinar.

4.1.3 Multiplicação *in vitro*

Apesar da utilização do mesmo meio de multiplicação para três cultivares de helicônias, o desenvolvimento de brotações foi bastante diferenciado entre as cultivares e inclusive quando comparado com o perfilhamento destas plantas em casa de vegetação. *H. bihai* cv. Peach Pink assim como a *H. ortrotricha* cv. Candy Cane, apresentaram um índice de perfilhamento satisfatório em casa de vegetação. No entanto, durante o cultivo *in vitro* a primeira espécie apresentou nula ou baixa quantidade de perfilhamento, enquanto *H. ortrotricha* cv. Candy Cane manteve a boa taxa de multiplicação, verificando-se também, a produção do primeiro broto aos 28 dias após o estabelecimento *in vitro*.

O perfilhamento de *H. ortrotricha* L. Anderss. cv. Total Eclipse em casa de vegetação foi o mais baixo, quando comparado às outras duas cultivares. Todavia, durante o cultivo *in vitro*, apresentou um número de brotações melhor do que *H. bihai* cv. Peach Pink, porém, bem mais baixo do que *H. ortrotricha* cv. Candy Cane. A brotação ocorreu entre os 30 e 75 dias após o estabelecimento *in vitro*.

Diniz *et al.* (1999), afirmam que os teores de nutrientes necessários para plantas de bananeira variam entre as cultivares, assim como entre os diferentes estádios de desenvolvimento. Desta forma, como foi observado neste trabalho, as diferentes cultivares de helicônias responderam diferentemente ao mesmo meio de cultura durante a multiplicação, sugerindo a necessidade de um estudo aprofundado na determinação da composição orgânica e mineral do meio de cultura para diferentes cultivares, focalizando a quantidade nutricional imprescindível para manter o desenvolvimento e a diferenciação *in vitro* (MEZZETTI; ROSATI; CASALICCHIO, 1991).

4.1.4 Cultivo *in vitro* de *H. ortrotricha* cv. Candy Cane

Ao final de doze semanas foi observado que o tratamento utilizando MS 50% favoreceu na regeneração do sistema radicular (Figura 4 A). No entanto, quando tomamos como referência a concentração de sais MS (50% e 100%), não houve grandes diferenças nos aspectos visuais da parte aérea, principalmente nas plantas do tratamento MS 50%, quanto o crescimento da altura ou no diâmetro do pseudocaule das plântulas (Figura 4 B e D) e em todos

os tratamentos as folhas mais novas se apresentaram com leve aspecto amarelado nas pontas, talvez demonstrando alguma deficiência mineral ou fitotoxidade.

Considerando-se os tratamentos realizados e os resultados obtidos, observou-se que o tratamento 5 (MS 100% + 0,10 ANA) é o meio de cultura mais adequado para o cultivo *in vitro* de *H. ortotricha* cv. Candy Cane. Apesar do tratamento 7 (MS 100% + 0,10 IBA) proporcionar a quantidade de brotação equivalente, as plantas no tratamento 5 apresentaram-se mais desenvolvidas quando comparado ao tratamento 7 apresentando coloração mais esverdeada tanto da folha como da pseudocaule (Figuras 4 C e D).

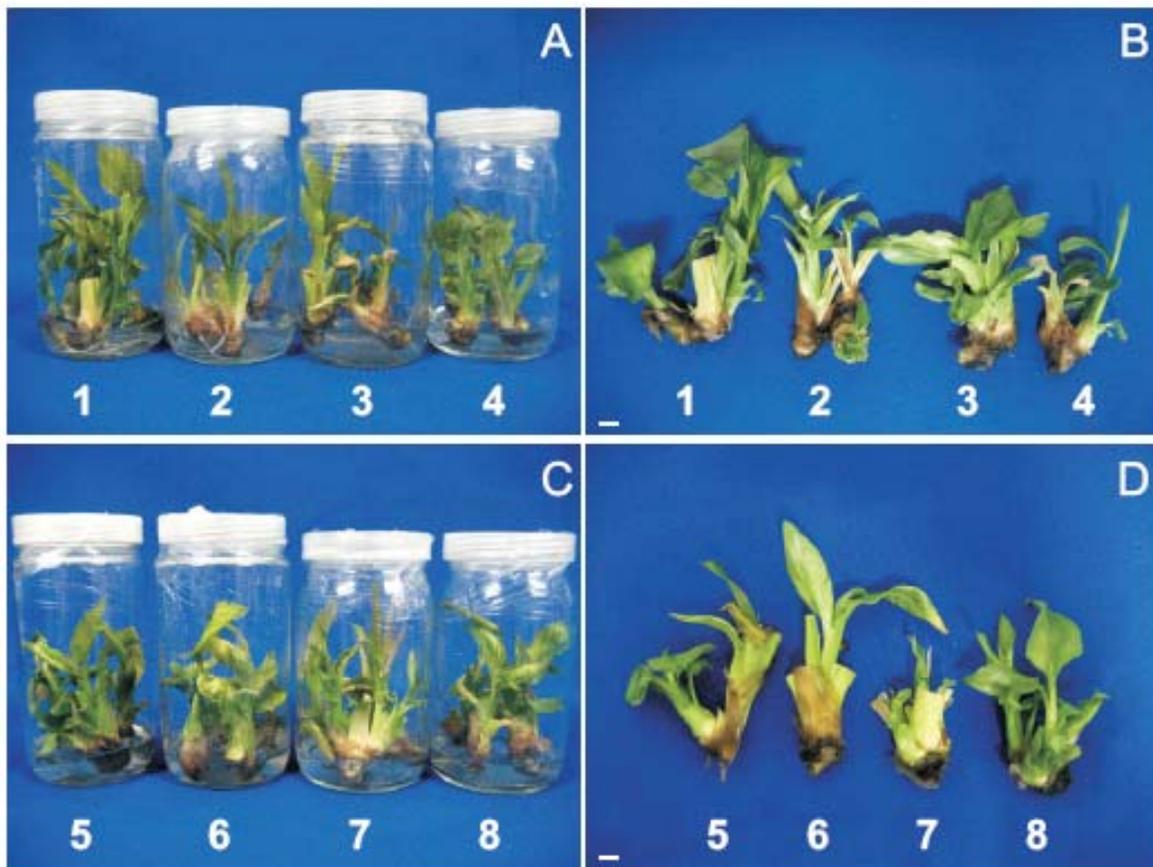


Figura 4: Culturas *in vitro* de *H. ortotricha* cv. Candy Cane. Combinação fatorial de duas concentrações dos sais MS (50% e 100%) e duas concentrações (0,10 e 0,25 mg/L) de dois fitorreguladores (ANA e IBA) em meio de cultura. (A-B) Tratamento 1, 50%MS + 0,1 mg/L ANA; Tratamento 2, 50%MS + 0,25 mg/L ANA; Tratamento 3, 50%MS + 0,1 mg/L IBA; Tratamento 4, 50%MS + 0,25 mg/L IBA. (C-D) Tratamento 5, 100%MS + 0,1 mg/L ANA; Tratamento 6, 100%MS + 0,25 mg/L ANA; Tratamento 7, 100%MS + 0,1 mg/L IBA; Tratamento 8, 100%MS + 0,25 mg/L IBA.

De acordo com a análise estatística, os melhores tratamentos quanto ao vigor do explante relacionado ao aumento do número médio de brotos foram os tratamentos 1 (MS 50% + 0,10 ANA), 2 (MS 50% + 0,25 ANA), 5 (MS 100% + 0,10 ANA), e 7 (MS 100% + 0,10 IBA) como mostra a Figura 5, proporcionando um número médio de 2,8, 2,7, 3,0 e 3,3 brotos por explante matriz, respectivamente, ao final de 12 semanas. Seguidos pelos tratamentos 4 (MS 50% + 0,25 IBA, 2,7 brotos/explante), 6 (MS 100% + 0,10 ANA, 2,3 brotos/explante) e 8 (MS 100% + 0,25 IBA, 2,6 brotos/explante). O menor número de brotos foi gerado pelo tratamento 3 (MS 50% e 0,10 IBA), tendo um valor médio de 1,8 brotos por explante.

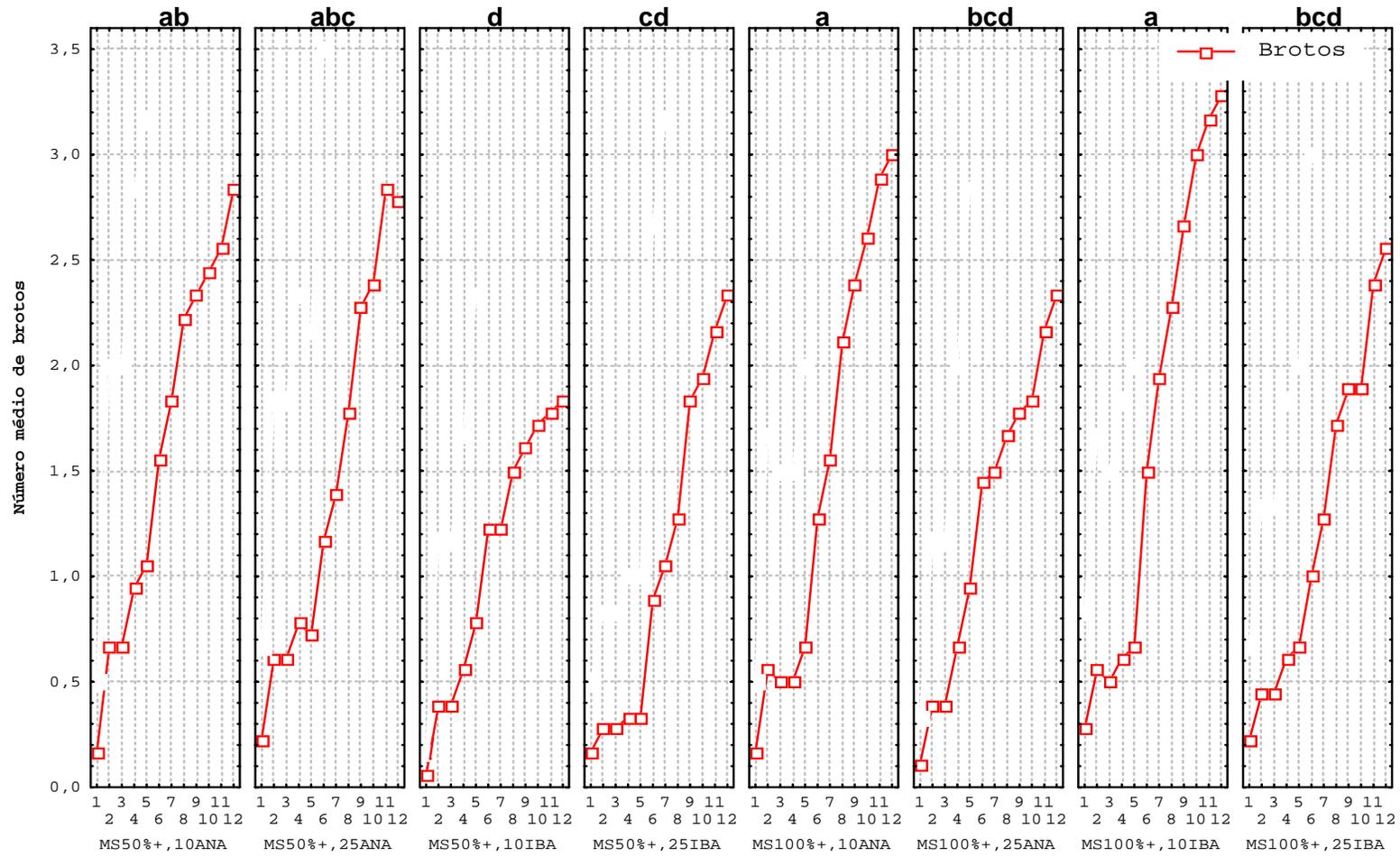


Figura 5: Aumento no número médio de brotos obtidos *in vitro* em cultura de *Heliconia ortotricha* cv. Candy Cane em meio de cultura contendo 2,5 mg/L BAP e variações na concentração de sais e auxina, ao longo de 12 semanas.

A falta de conhecimento sobre a relação entre o meio de cultivo e sua interação com o explantes nas diferentes fases do desenvolvimento, assim como a forma de absorção, o transporte, o acúmulo e a distribuição dos nutrientes pelas diferentes partes dos explantes e a indisponibilidade de dados na literatura sobre os níveis críticos de nutrientes para o cultivo *in vitro* de helicônias, exacerbou os testes com as modificações do meio MS, a fim de ajustar a formulação do meio básico para o desenvolvimento *in vitro* de *H. ortotricha* cv. Candy Cane. Entretanto, os tratamentos não apresentaram variações lineares no aumento médio do número de brotos em relação ao tempo (semanas). As respostas dos tratamentos à quantidade de brotos por plantas sofreram influência da interação dos fatores testados, tanto das concentrações de sais MS, quanto na concentração e do tipo de auxina utilizada na composição do meio de cultura, sugerindo a necessidade de estudos fisiológicos mais aprofundados em relação ao mecanismo de ação, absorção e transporte de fitorreguladores e nutrientes nas plantas *in vitro*, assim como o comportamento de fitormônios em relação ao estado nutricional das plântulas, já que estes não foram ainda realizados para as espécies estudadas neste trabalho.

Os resultados demonstraram que a utilização de ANA proporcionou melhores resultados do que o IBA nos tratamentos com MS 50%, quanto à quantidade de brotações. No entanto, nos tratamentos com MS 100%, o melhor resultado está mais relacionado à proporção auxina:citocinina (0,10 mg/L auxina:2,5 mg/L citocinina), do que ao tipo de auxina. Grattapaglia e Machado (1998) afirmam que as concentrações de auxina utilizadas durante a multiplicação das plantas *in vitro* devem manter um balanço entre auxina/citocinina menor do que 1, pois concentrações excessivas de auxina podem inibir a multiplicação ou favorecer demasiadamente a formação do sistema radicular ou a formação de calo.

De maneira geral, houve variação na massa da matéria fresca dos explantes, sendo maior nos tratamentos com a maior concentração de nutrientes, MS 100 % (Figura 6 A). Estatisticamente, porém, não se observaram diferenças quando comparados aos tratamentos MS 50% 1, 2 e 4. O tratamento 3 apresentou o menor número de brotos e a menor massa da matéria fresca. Estes resultados se assemelham aos obtidos por Utino; Carneiro e Chaves (2001), os quais testaram diferentes concentrações dos sais MS (33,33%, 50% e 100%), dois níveis de ácido ascórbico (0 e 25mg/L) e três frequências de subcultivos (7, 14 e 28 dias) para explantes de bananeira 'Prata' (*Musa* sp. AAB), observando que a massa fresca variou linearmente seguindo a equação $y = 1,3404 + 0,0137x$ em relação à concentração dos sais MS.

Amari (2001), estudando diferentes concentrações dos sais MS (0%, 50%, 100% e 200%) verificou alguns aspectos críticos na disponibilidade e absorção dos nutrientes no crescimento *in vitro* de *Musa acuminata* L., concluindo que a quantidade total de nutrientes fornecidos pelo meio de cultura influenciou diretamente na taxa de crescimento e absorção dos mesmos pelo explantes, observando que o aumento do crescimento e da qualidade das plantas foi proporcional à maior absorção dos nutrientes pelos explantes.

Em relação à massa da matéria seca, os resultados não apresentaram diferenças entre os tratamentos (Figura 6 B), indicando que as pequenas alterações observadas na matéria fresca, entre os tratamentos, está mais relacionada à retenção de água do que com o acúmulo de matéria seca.

Ao final, não houve uma relação linear entre a altura dos explantes (dados não apresentados), o número médio de brotos e o tempo de cultivo, mas em todos os tratamentos as plantas apresentaram tamanho suficiente para passarem diretamente para o meio de enraizamento, dispensando a fase de alongamento.

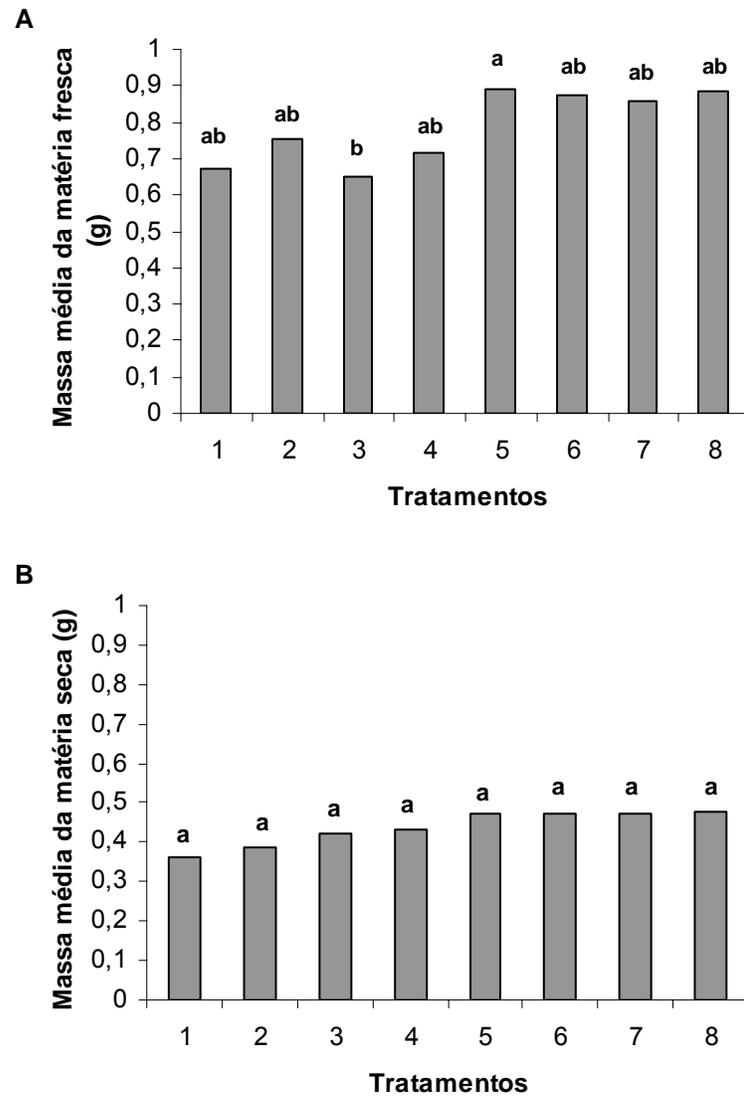


Figura 6: Massa de matéria fresca (A) e massa de matéria seca (B) de explantes de *Heliconia. ortotricha* cv. Candy Cane cultivados por 12 semanas em meios com diferentes concentrações de sais MS, ANA e IBA e acrescidos de 2,5 mg/L de BAP, calculados sobre um terço dos explantes e seus respectivos brotos obtidos.

4.1.5 Aclimação

Após 30 dias em câmara de nebulização para aclimação, as plantas sobreviventes se mostraram totalmente adaptadas, apresentando um visível crescimento no diâmetro e na altura do pseudocaule e com renovação total e/ou parcial das folhas, mostrando crescimento da área

foliar. Era possível observar diferenças visuais entre os tratamentos, tanto na taxa de sobrevivência, as quais foram superiores nos tratamentos 1, 2 e 3, apresentando 79 % das plantas vivas nos três tratamentos, quanto ao maior crescimento das plantas submetidas ao tratamento 2. O tratamento 4 apresentou o menor índice de sobrevivência (56 %). A maior taxa de perda de plantas ocorreu nos primeiros 30 dias, sendo esta a fase crítica para a sobrevivência das mesmas.

Aos 60 dias, a oscilação do percentual de sobrevivência foi baixa, mantendo o padrão do resultado da primeira avaliação, observando-se porcentagem de sobrevivência de 69,79%, 69,79%, 70,83% e 56,25% (Figura 7) para os tratamentos 1, 2, 3 e 4, respectivamente.

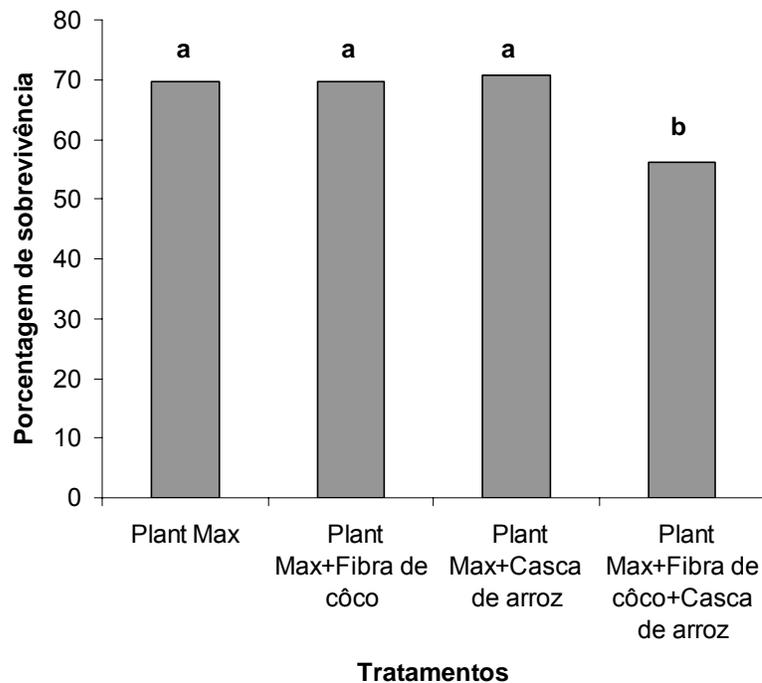


Figura 7: Sobrevivência de plântulas de *H. ortotricha* cv. Candy Cane após 60 dias em condições de aclimatação, sob diferentes substratos.

As misturas 2, 3 e 4 proporcionaram uma maior disponibilidade de água para as plantas, proporcionando maior massa fresca, tanto da parte aérea (figura 8 A), quanto do sistema radicular (Figura 9 A), quando comparado à utilização do substrato Plant Max puro. Possivelmente este resultado se deu pela propriedade hidrofílica da fibra de coco ou pela influência que a casca de arroz carbonizada exerce sob as propriedades físico-hídricas do substrato, a qual permite maior disponibilidade de água para a planta. A capacidade dos

substratos manterem a água é uma característica desejável para obtenção da uniformidade das plantas e um bom estande (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000), no entanto, a quantidade de água retida não implica propriamente no crescimento vegetal. As plantas submetidas ao tratamento 4 apresentam o menor acúmulo de matéria seca e observa-se uma correlação direta entre o índice de sobrevivência e o acúmulo de matéria seca, tanto da parte aérea (Figura 8 B), como do sistema radicular (Figura 9 B). Provavelmente a composição química bem balanceada do substrato Plant Max, contendo os nutrientes N, P, K, Ca e Mg (SMIDERLE, 2001) tenham influenciado no desenvolvimento das plantas, pois o tratamento 4 possuía a menor proporção de Plant Max e as plantas não receberam qualquer tipo de complementação nutricional. A determinação da proporção volumétrica dos substratos, a determinação da composição nutricional, a densidade, a aeração e a retenção de umidade ideais para um ótimo desenvolvimento das plantas em casa de vegetação é prejudicada pelas dificuldades na reprodução de características favoráveis do solo pelos substratos (GOMES et al., 1985).

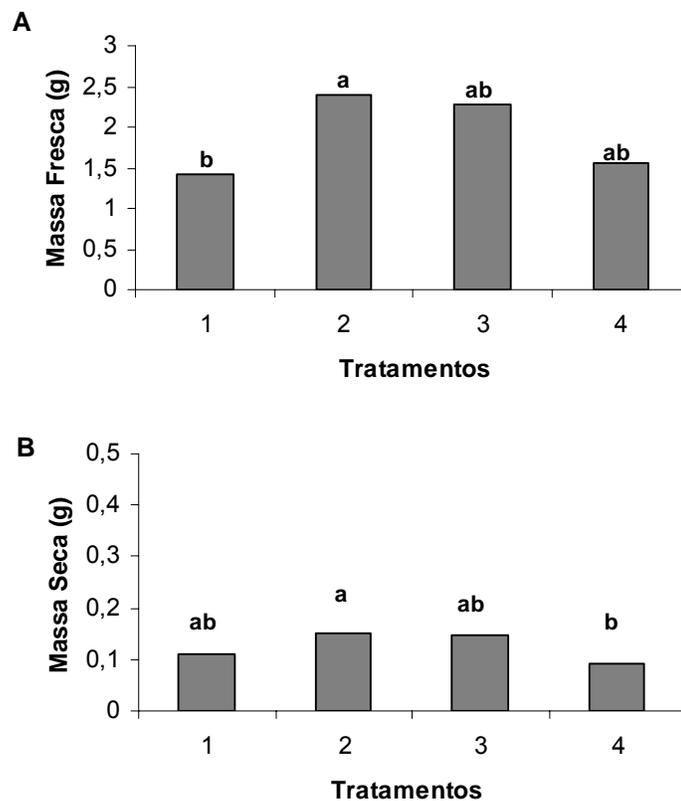


Figura 8: Massa de matéria fresca (A) e seca (B) da parte aérea de *H. ortotricha* cv. Candy Cane, cultivadas em Plant Max® Horticultura (1), Plant Max® Horticultura + Fibra de coco (2), Plant Max® Horticultura + Casca de arroz carbonizado (3) e Plant Max® Horticultura + Fibra de coco + Casca de arroz carbonizado (4).

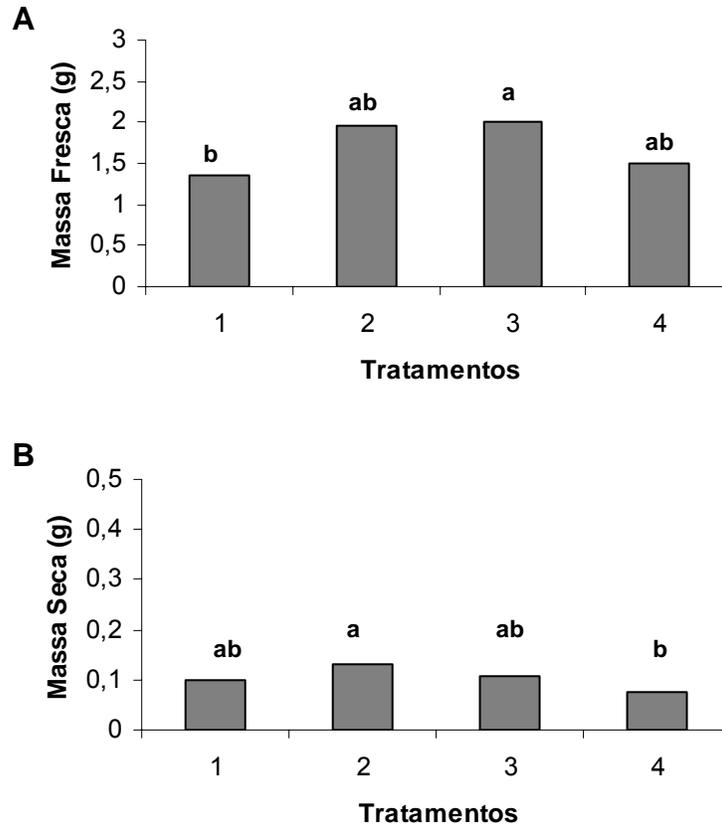


Figura 9: Massa de matéria fresca (A) e seca (B) do sistema radicular de *H. ortotricha* cv. Candy Cane, cultivadas em 4 diferentes substratos: Plant Max® Horticultura (1), Plant Max® Horticultura + Fibra de coco (2), Plant Max® Horticultura + Casca de arroz carbonizado (3) e Plant Max® Horticultura + Fibra de coco + Casca de arroz carbonizado (4).

Em estudo realizado por Santos *et al.* (2004), durante a aclimação de plântulas de *Heliconia psittacorum* L., no qual foram avaliados os parâmetros da parte aérea como a altura da planta, diâmetro do pseudocaule, número de folhas e área foliar, testando a combinação de três substratos orgânicos (casca de arroz carbonizada, pó de casca de coco seco e verde) fatorialmente com dois adubos (Vitasolo e húmus de minhoca), constatou-se que as misturas que apresentam valores de porosidades e aeração extremos (alto e baixo) resultaram em menor desenvolvimento vegetal, concluindo que entre os substratos, a casca de arroz foi superior, seguido por pó de casca de coco verde e depois pelo pó de casca de coco verde

Apesar da pequena diferença estatística, o presente trabalho também constatou uma pequena superioridade das misturas de Plant Max® Horticultura + Fibra de coco e Plant Max®

Horticultura + Casca de arroz carbonizado em relação aos outros substratos testados, tanto pela maior taxa de sobrevivência das plantas (Figura 10 A, B, C, e D), quanto ao maior crescimento da parte aérea, apresentando uma melhor coloração das folhas (Figura 10 E) e um maior desenvolvimento do sistema radicular (Figura 9 B).



Figura 10: Aspecto geral de plântulas de de *H. ortotricha* cv. Candy Cane durante aclimação em diferentes substratos. A) Tratamento 1, Plant Max® HT; B) Tratamento 2, Plant Max® HT + Fibra de côco Amafibra; C) Tratamento 3, Plant Max® HT + Casca de arroz carbonizada; D) Tratamento 4, Plant Max® HT + Fibra de côco Amafibra + Casca de arroz carbonizada; E) Tamanho das plantas após 60 dias de plantio em casa de vegetação, sendo da esquerda para a direita plântula representativa de: Tratamento 1, Plant Max® HT; Tratamento 2, Plant Max® HT + Fibra de côco Amafibra; Tratamento 3, Plant Max® HT + Casca de arroz carbonizada; Tratamento 4, Plant Max® HT + Fibra de côco Amafibra + Casca de arroz carbonizada.

4.2 Caracterização de microrganismos contaminantes na introdução *in vitro* de três cultivares de *Heliconia* sp

4.2.1 Isolamento da comunidade bacteriana proveniente da contaminação dos explantes *in vitro*

Considerando as características morfológicas das colônias, observou-se baixa diversidade de bactérias contaminantes em meio de cultura de introdução do material de helicônia em estudo, sendo que todas as colônias obtidas a partir de meios de cultura cultivados com as três cultivares de helicônia apresentaram coloração branca. Desta forma, estas foram denominadas “bactérias brancas de meio de cultura”. Após a análise molecular (ver item 4.2.4), as colônias foram identificadas como pertencentes ao gênero *Burkholderia* em culturas de *H. ortrotricha* cv. Candy Cane e *H. ortrotricha* L. Anderss. cv. Total Eclipse. Em culturas de *H. bihai* cv. Peach Pink a maior parte dos isolados foram identificados como *Rhizobium* sp. e uma pequena fração como *Burkholderia* sp..

Cultivando-se as bactérias em meios de cultura TSA e R2A observou-se variação na quantidade de bactérias nas diferentes cultivares e crescimento diferencial dos diferentes gêneros de bactérias nos meios de cultura utilizados (Tabela 6). As colônias obtidas de culturas de *H. ortrotricha* cv. Candy Cane e *H. ortrotricha* L. Anderss. cv. Total Eclipse apresentaram crescimento significativamente maior em meio TSA, do que em R2A. Este comportamento, é provavelmente justificado pela composição nutricional mais rica de TSA em relação a R2A (ARAÚJO *et al.*, 2002). Em colônias obtidas a partir de culturas de *H. bihai* cv. Peach Pink observou-se o inverso, ou seja, o crescimento bacteriano foi semelhante em ambos os meios de cultura. Possivelmente, o fato de ocorrerem dois gêneros de bactérias, *Rhizobium* e *Burkholderia*, este comportamento foi alterado, uma vez que o meio R2A é utilizada para o isolamento de *Rhizobium* (SOMESEGARAN; HOBEN, 1994).

Tabela 6: Quantificação de bactérias isoladas de meios de cultura de introdução *in vitro* de três cultivares de helicônia em dois meios de cultura (TSA e R2A) (UFC/mL).

Cultivar	TSA	R2A
<i>H. bihai</i> cv. Peach Pink	1,9x10 ⁹	2,0x10 ⁹
<i>H. ortrotricha</i> cv. Candy Cane	4,1x10 ⁹	2,4x10 ⁹
<i>H. ortrotricha</i> L. Anderss. cv. Total Eclipse	0,8x10 ⁸	3,3x10 ⁷

4.2.2 Isolamento da comunidade bacteriana endofítica de helicônia

Cálculos baseados no modelo apresentado por Araújo *et al.* (2002), permitiram a quantificação de UFC/g de folha, verificando que a quantidade de bactérias isoladas de *H. ortrotricha* L. Anderss. cv. Total Eclipse é consideravelmente maior do que nas outras duas cultivares (Tabela 7) e as plantas de *H. bihai* cv. Peach Pink apresentaram os menores valores de UFC/g de folha.

Tabela 7: Quantificação de bactérias isoladas de folhas de plantas cultivadas em casa de vegetação de três cultivares de helicônia em dois meios de cultura (TSA e R2A) (UFC/g de massa fresca de folhas).

Cultivar	TSA	R2A
<i>H. bihai</i> cv. Peach Pink	1,2x10 ⁴	1,8x10 ⁴
<i>H. ortrotricha</i> cv. Candy Cane	3,8x10 ⁴	4,2x10 ⁴
<i>H. ortrotricha</i> L. Anderss. cv. Total Eclipse	1,4x10 ⁵	1,4x10 ⁵

As bactérias isoladas das três cultivares de helicônias, tanto do meio TSA, como em meio R2A apresentaram características morfológicas semelhantes e assim foram denominadas: colônias laranjas, colônias amarelas e colônias brancas. Em todas as cultivares as colônias brancas apareceram em maior proporção do que as colônias amarelas ou laranjas, independentemente das diluições em meio TSA (Figura 11 A) e R2A (Figura 11 B), confirmando que as colônias brancas (*Rhizobium* sp. e *Burkholderia* sp.) são as mais freqüentes nas três

cultivares, coincidindo com as observações nos meios de cultura de introdução de helicônia (item 4.2.1.). Ao fim, verificamos nas Figuras 11 e 12 que as frequências das bactérias obtidas de folhas de *H. bihai* cv. Peach Pink e *H. ortrotricha* L. Anderss. cv. Total Eclipse são semelhantes, diferindo de *H. ortrotricha* cv. Candy Cane, a qual apresentou uma maior proporção de colônias amarelas, principalmente em meio R2A. Esta variação na proporção de bactérias pode ter ocorrido pela diferença na origem das plantas matrizes, já que as matrizes de *H. bihai* cv. Peach Pink e *H. ortrotricha* L. Anderss. cv. Total Eclipse tiveram a mesma procedência e as matrizes de *H. ortrotricha* cv. Candy Cane foram obtidas em outro local.

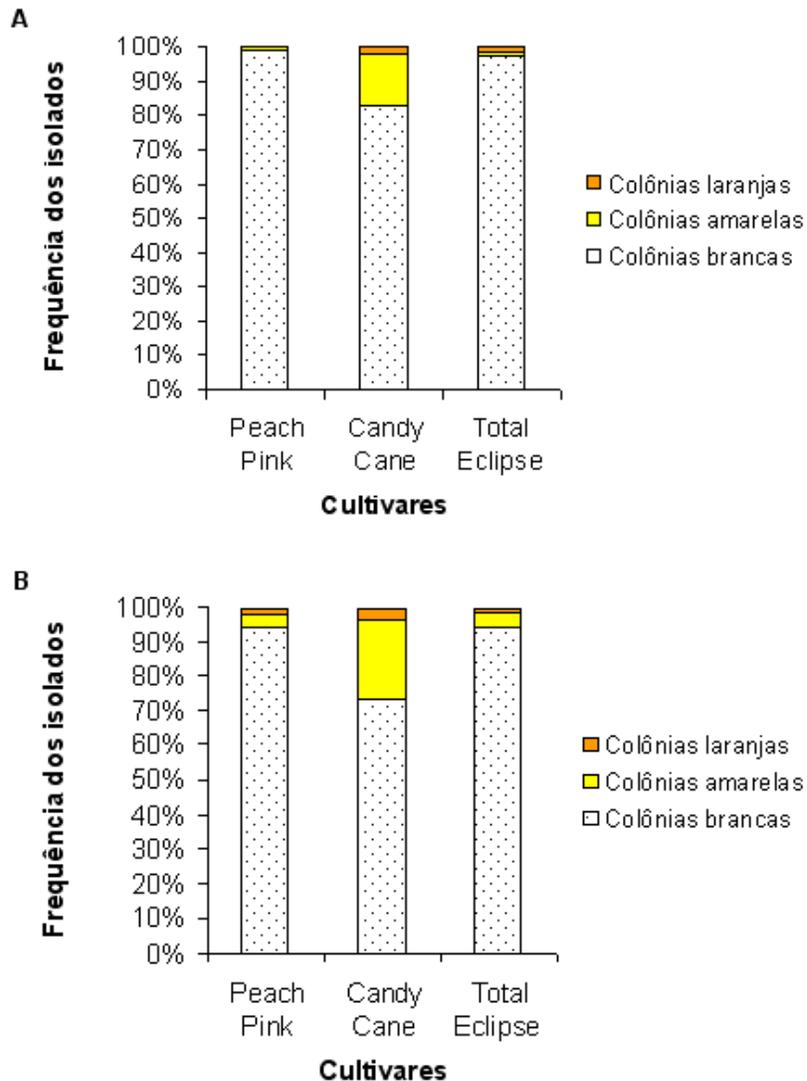


Figura 11: Frequência das colônias de acordo com as características morfológicas isoladas das folhas de casa de vegetação no meio de cultura TSA (A) e R2A (B) das três cultivares de helicônia.

4.2.3 Caracterização das bactérias isoladas utilizando a técnica ARDRA

Através dos resultados obtidos nas análises utilizando ARDRA (Figuras 12 e 13), verificou-se que o padrão de clivagem das bactérias brancas isoladas dos meios de cultura de *H. ortrotricha* L. Andersson. cv. Total Eclipse e *H. ortrotricha* cv. Candy Cane é idêntico (Figuras 12 A e B), sendo denominado de padrão 1, que corresponde a *Burkholderia* sp.. No entanto, em *H. bihai* cv. Peach Pink, entre os dez isolados analisados, nove apresentaram um mesmo padrão, denominado padrão 2, correspondendo a *Rhizobium* sp. (Figura 12 A) e apenas um isolado apresentou o padrão 1, correspondendo ao mesmo isolado das bactérias isoladas das duas cultivares de *H. ortrotricha*, comprovando que a maior parte dos isolados de *H. bihai* cv. Peach Pink são diferentes dos isolados de *H. ortrotricha*.

Nas bactérias isoladas das folhas de helicônia (Figuras 12 C e D) observaram-se que nas três cultivares as colônias laranjas apresentam um mesmo padrão de corte (padrão 3, Figuras 12 C e D), sendo identificadas como *Arthrobacter* sp.. Entre as colônias amarelas isoladas das três cultivares foram obtidos dois haplótipos, denominados de padrão 4 (*Xanthomonas* sp.) e padrão 5 (*Burkholderia* sp.) (Figuras 12 C e D). A ocorrência de três haplótipos (padrão 6 *Rhizobium* sp., padrão 7, *Rhizobium* sp. e padrão 8, *Burkholderia* sp.) (Figuras 12 C e D) mostrou a diversidade de colônias brancas (folhas) em *H. ortrotricha* cv. Candy Cane. Entretanto, entre as colônias brancas isoladas de *H. bihai* cv. Peach Pink e *H. ortrotricha* L. Andersson. cv. Total Eclipse foram encontrados apenas dois haplótipos, presentes também em *H. ortrotricha* cv. Candy Cane, os quais foram denominados de padrão 6 e padrão 7 (*Rhizobium* sp.). Os resultados comprovam que a diversidade dos isolados obtidos de folhas é baixa, ocorrendo apenas quatro gêneros de bactérias (*Arthrobacter*, *Burkholderia*, *Rhizobium* e *Xanthomonas*) os quais estão presentes nas três cultivares de helicônia estudadas. A técnica de ARDRA permitiu a caracterização de alguns dos isolados em diferentes haplótipos, caracterizados pelos padrões de clivagem do gene 16S rRNA.

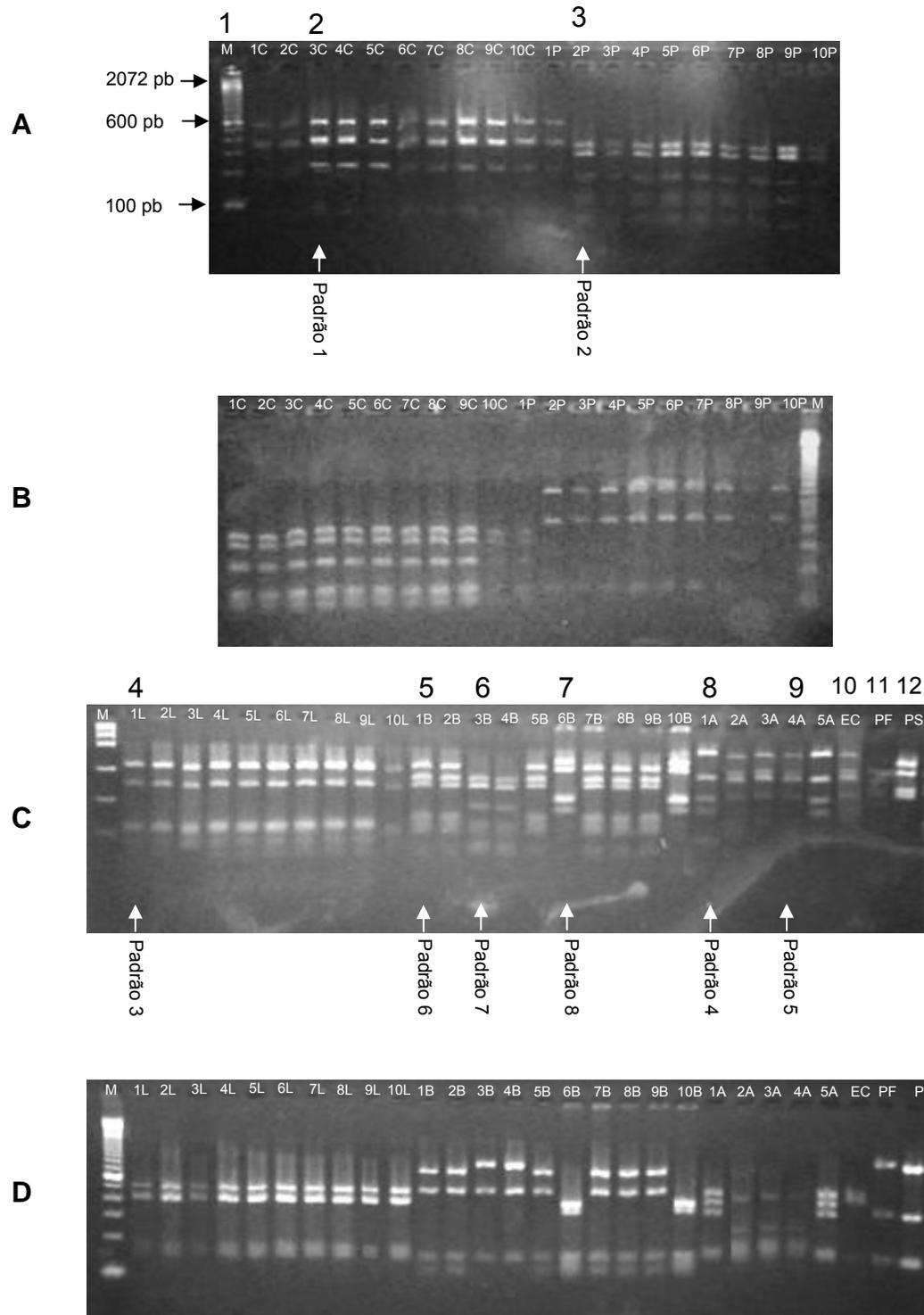


Figura 12: Padrões obtidos das culturas de bactérias isoladas das três cultivares de helicônia pela técnica ARDR em gel de agarose (2%). A e B) Padrões das bactérias obtidas dos meios de cultura contaminados utilizando as enzimas *Hha* e *Rsa*, respectivamente; C e D) Comparação entre os padrões das bactérias isoladas das folhas da casa de vegetação de *H. ortotricha* cv. Candy Cane com as enzimas *Hha* e *Rsa*, respectivamente. 1) Padrão molecular; 2) Padrão 2; 3) Padrão 3; 4) Padrão 6; 5) Padrão 7; 6) Padrão 8; 9) Padrão 4; 10) *Escherichia coli*; 11) *Pseudomonas fluorescens*, 12) *Pseudomonas stutzeri*.

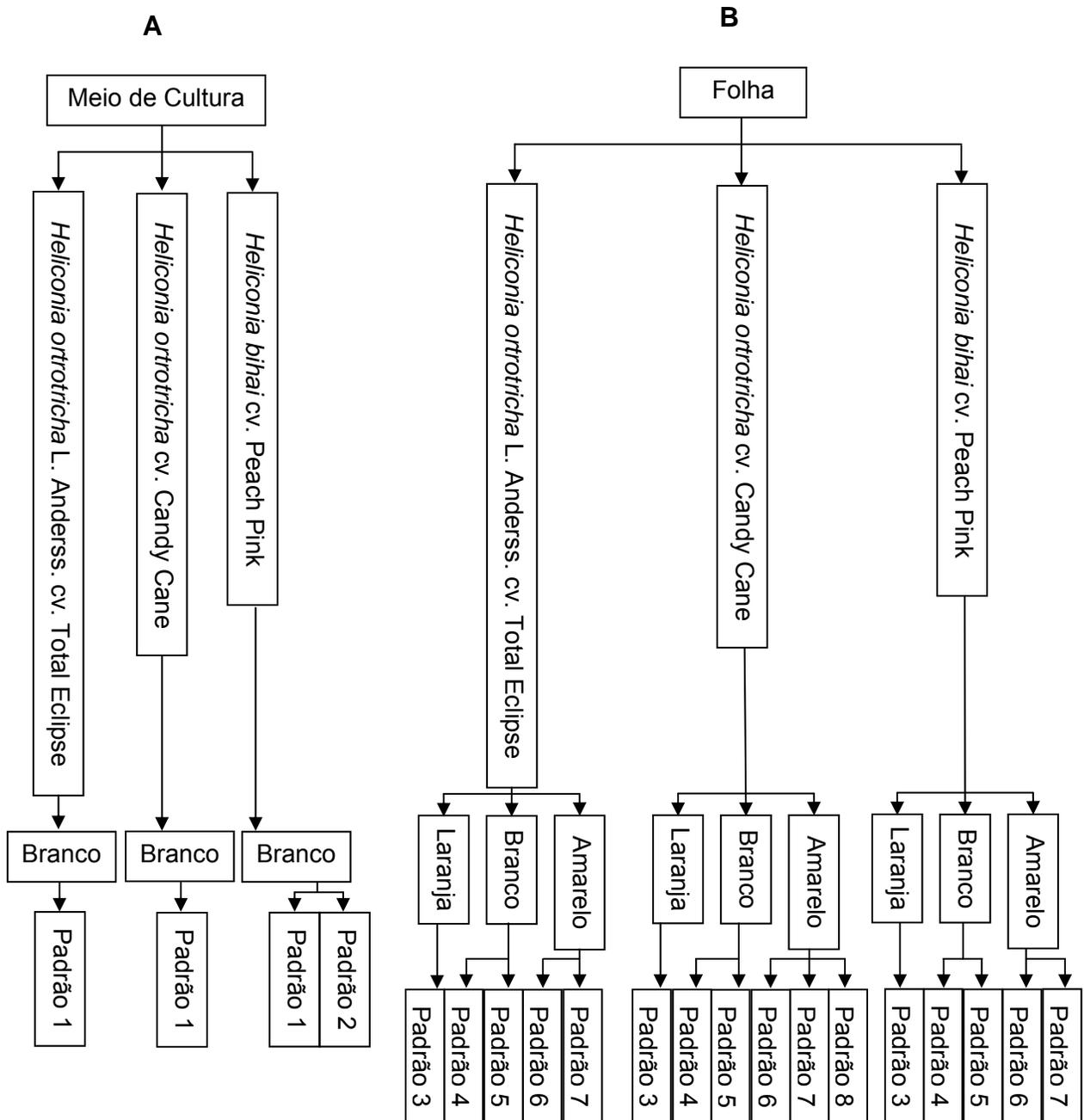


Figura 13: Padrões de clivagem obtidos pela técnica ARDRA das bactérias isoladas do meio de cultura contaminados (A) e das folhas de plantas de casa de vegetação (B) das três cultivares de helicônia.

4.2.4 Identificação dos isolados

Diversas técnicas de biologia molecular são utilizadas no intuito de classificar e identificar, com rapidez, simplicidade e precisão, diferentes espécies bacterianas, assim como avaliar a contribuição direta ou indireta dos microrganismos para as plantas (DOBBELAERE *et al.*, 2003).

A possibilidade de caracterização dos isolados pela análise de ARDRA, permitiu a seleção dos representantes de cada grupo morfológico e seus haplótipos, baseada no padrão de clivagem das enzimas, seguido do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA. De acordo com os resultados obtidos no sequenciamento parcial, os isolados foram reunidos em grupos e desses grupos foi retirado um representante para o sequenciamento completo do gene 16S rDNA. Desta forma, foram identificadas as bactérias isoladas do meio de cultura (Tabela 8), determinando a presença de bactérias do gênero nos isolados provenientes de culturas de *H. Ortotricha*. Em meio de cultivo de *H. bihai* observou-se que as bactérias são pertencentes aos gêneros *Burkholderia* e *Rhizobium*.

Entre as 70 colônias de bactérias isoladas das folhas das três cultivares (Tabela 9), a identificação e a frequência sobre a quantidade dos isolados para análise de ARDRA são respectivamente: padrão 3 (35 %), classificada como pertencente ao gênero *Arthrobacter*; 4 (8 %), gênero *Xanthomonas*; 5 (12 %), gênero *Burkholderia*; e 6 (27 %), 7 (14 %) como pertencente ao gênero *Rhizobium* e 8 (3 %) gênero *Burkholderia*.

Tabela 8: Identificação das bactérias isoladas do meio de cultura de *H. ortotricha* e *H. bihai*, identificadas através do seqüenciamento completo do gene 16S rRNA.

Cultivar	ARDRA		Tamanho da seq. (pb)	Identidade	
	Padrão	Freqüência		RDP (nível determinado)	Melhor correspondência no <i>Genbank</i> (similaridade)
<i>H. ortotricha</i>	1	70%	1427	<i>Burkholderia</i> (gênero)	<i>Burkholderia pseudomallei</i> NZ_AAMB02000036.1 (95%)
<i>H. bihai</i>	2	30%	992	<i>Rhizobium</i> (gênero)	<i>Rhizobium etli</i> NZ_ABRC01002880.1(97%)
Total		100%			

Tabela 9: Identificação das bactérias isoladas das folhas de o meio de cultura de *H. bihai* cv. Peach Pink, *H. ortotricha* cv. Candy Cane e *H. ortotricha* L. Anders. cv. Total Eclipse.

Padrão	ARDRA		Tamanho da seq. (pb)	Identidade	
	Freqüência			RDP (nível determinado)	Melhor correspondência no <i>Genbank</i> (similaridade)
3	35%		1327	<i>Arthrobacter</i> (gênero)	<i>Arthrobacter chlorophenolicus</i> NZ_ABKU01000167.1 (92%)
4	8%		1249	<i>Xanthomonas</i> (gênero)	<i>Xanthomonas oryzae</i> NZ_AAQN01000001.1 (96%)
5	12%		1426	<i>Burkholderia</i> (gênero)	<i>Burkholderia pseudomallei</i> NZ_AAHS03000017.1 (93%)
6	27%		1216	<i>Rhizobium</i> (gênero)	<i>Rhizobium etli</i> NZ_ABRC01002880.1 (94%)
7	14%		1191	<i>Rhizobium</i> (gênero)	<i>Rhizobium etli</i> NZ_ABRC01002880.1 (97%)
8	3%		1374	<i>Rhizobium</i> (gênero)	<i>Rhizobium leguminosarum</i> NZ_ABKO01000001.1 (94%)
Total	100%				

Os organismos endofíticos isoladas de helicônias foram descritos em diferentes trabalhos (AKIEW *et al.*, 1990; ARTEHORTUA, 1997; DIAS; RODRIGUES, 2001; RODRIGUES, 2005), de maneira geral, constatando-se a presença de *Pseudomonas* sp. e/ou *Klebsiella* sp. No entanto, o presente estudo verificou a presença de outras bactérias como:

- *Burkholderia* sp. (Figuras 14 A-C e M-O). Estrada *et al.* (2002), descrevem a presença deste gênero em milho e Ting *et al.* (2008) em bananeiras silvestres. O gênero *Burkholderia* possui uma ampla distribuição no ecossistema, sendo as bactérias isoladas na água, no solo e associadas a plantas, fungos, animais e seres humanos. Apresentam grande potencial agrícola e biotecnológico, sendo classificados como gram-negativos, mesófilos e capazes de acumular poli- β -hidroxialcanoatos como materiais de reserva (PALLERONI, 1997). Muitas espécies são competentes na produção de compostos antimicrobianos, agentes de biocontrole, fixadores biológicos de nitrogênio, produtores de plásticos biodegradáveis e contribuem na biorremediação (CARTWRIGHT; CHILTON; BENSON, 1995; HEUER *et al.*, 1997; EL BANNA; WINKELMANN, 1998).
- *Rhizobium* sp. (Figuras 14 D-F e P-R), bactérias denominadas como promotores de crescimento, colaborando na absorção de nutrientes em plantas leguminosas e não-leguminosas por Cavalvante e Dobereiner (1988) e Chanway (1996). A complexa associação entre *Rhizobium* e planta é verificada pela presença de leghemoglobina dentro do tecido nodular pelo complexo de nitrogenase, a qual catalisa a redução de N_2 e diversos transpotadores de elétrons localizados dentro das bactérias nos nódulos. Nesta associação simbiótica a planta contribui com carboidratos fotossintéticos, os quais provavelmente são utilizados pelas bactérias como açúcar, em retorno o vegetal recebe nitrogênio utilizável na forma de aminoácidos (BURRIS, 1974).
- *Arthrobacter* sp. (Figuras 14 G-I) foram isoladas de *Populus trichocarpa* x *deltoides* cv. “Hazendans” e “Hoogvorst”, utilizadas na fitorremediação de áreas contaminadas com BTEX e são associadas com a otimização do potencial fitorremediador destas árvores (MOORE *et al.*, 2006). O gênero *Arthrobacter* é composto de bactérias gram-positivas, aeróbicas, catalase-positiva, bactérias não-esporogênicas, apresentam morfologia baciliforme (KEDDIE *et al.*, 1986) e as espécies são divididas em dois grupos principais baseando-se na composição da parede celular do tipo peptídeoglicano e menaquinona

(KEDDIE et al., 1986; STACKEBRANDT; SCHUMANN, 2000). Uma das características apresentada pelo gênero é a heterogenidade fenotípica das mais de 35 espécies descritas (STACKEBRANDT; SCHUMANN, 2000).

- *Xanthomonas* sp. (Figuras 14 J-L), são descritas como associadas a árvores com amplo potencial fitorremediador por Moore *et al.* (2006). São bactérias gram-negativas, capsuladas e apresentam motilidade, compostas por flagelos polares (SWINGS *et al.*, 1990).

Levando em consideração as características dos gêneros de bactérias observados tanto em meio de cultura, como em folhas de plantas em casa de vegetação, sendo que as bactérias isoladas do meio de cultura também foram isoladas das folhas das plantas, podemos concluir que a fonte de contaminação dos explantes *in vitro* provém de microrganismos endofíticos, provenientes de solo, já que todas as bactérias identificadas são microrganismos tipicamente encontrados no solo. Dath e Devadath (1983), afirmam que a entrada de bactérias na planta ocorre através dos hidatódios, dos estômatos e/ou pelos ferimentos das folhas ou raízes. Ao penetrar no sistema vascular, as bactérias se multiplicam e são amplamente distribuídas em toda a planta. O vento, a chuva, a inundação e a água de irrigação são fatores que contribuem na dispersão das bactérias de uma planta para outra.

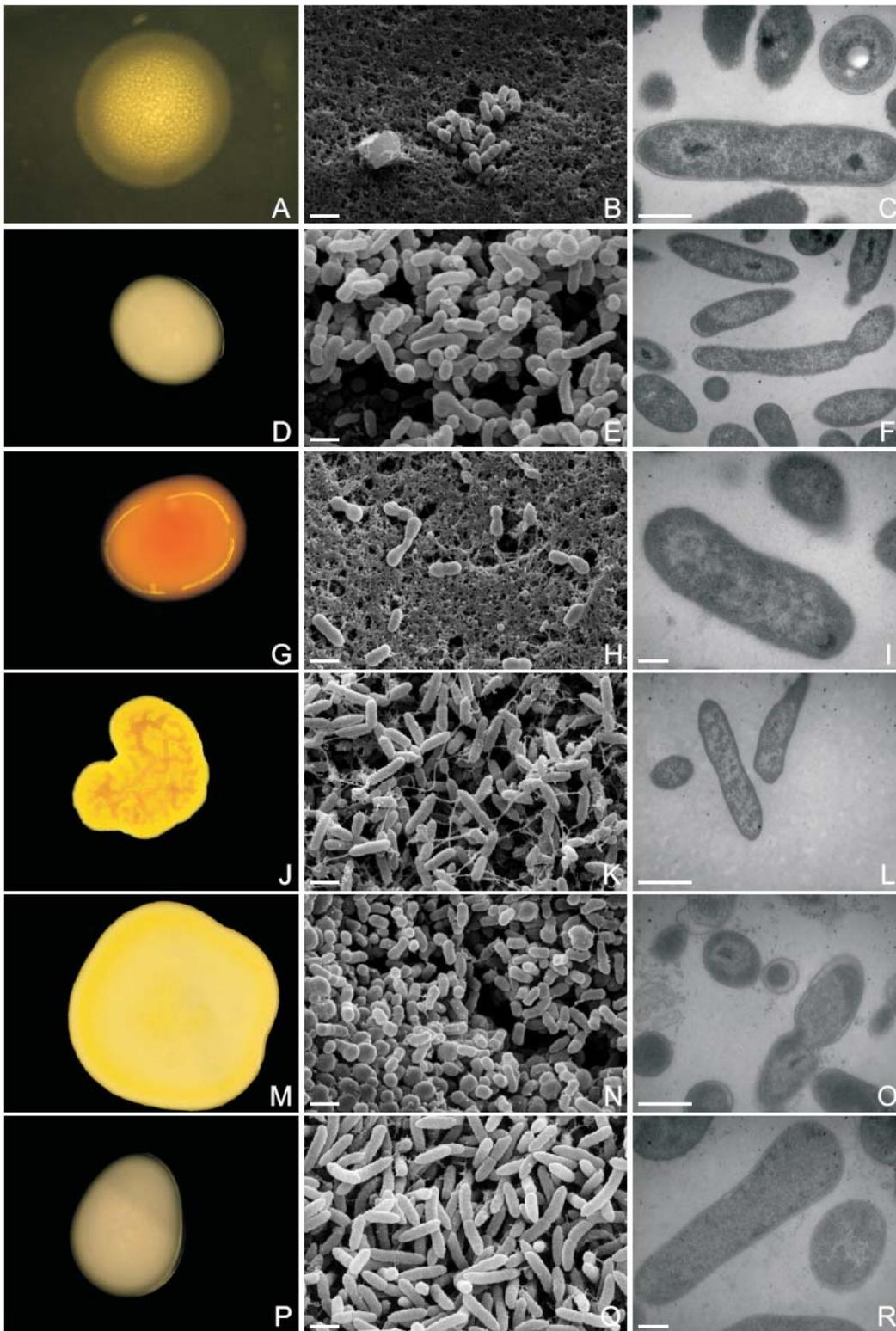


Figura 14: Isolados de bactérias obtidos a partir de meio de cultura contaminado e de folhas de plantas cultivadas em casa de vegetação de *H. bihai* cv. Peach Pink, *H. ortotricha* cv. Candy Cane e *H. ortotricha* L. Anderss. cv. Total Eclipse, observados em microscópio estereoscópico (A, D, G, J, M, P), microscopia eletrônica de varredura (B, E, H, K, N, Q) e de transmissão (C, F, I, L, O, R), identificados molecularmente como sendo: A-C) *Burkholderia* sp.; D- F) *Rhizobium* sp.; G-I) *Arthrobacter* sp.; J-L) *Xanthomonas* sp.; M-O) *Burkholderia* sp.; P-R) *Rhizobium* sp

5 CONCLUSÕES

- As três cultivares de helicônia apresentam o desenvolvimento das hastes verticais lento em casa de vegetação. No entanto, *H. ortotricha* cv. Candy Cane e *H. bihai* cv. Peach Pink apresentaram maior taxa de perfilhamento quando comparada a *Heliconia ortotricha* L. Anderss. cv. Total Eclipse.
- *H. ortotricha* L. Anderss. cv. Total Eclipse, *H. ortotricha* cv. Candy Cane e *H. bihai* cv. Peach Pink responderam diferentemente aos tratamentos de assepsia. Os melhores resultados obtidos para o estabelecimento *in vitro* para a primeira cultivar foram os tratamentos com solução NaOCl 50% (2) e NaOCl 75% (3), a segunda obteve maior sobrevivência com a solução NaOCl 25% + 48h cefotaxima (4) e a terceira respondeu melhor à solução NaOCl 25 % (1) e NaOCl 75 % (3).
- A *H. ortotricha* cv. Candy Cane proporcionou boa multiplicação durante o cultivo *in vitro*, porém, a *H. bihai* cv. Peach Pink e a *H. ortotricha* L. Anderss. cv. Total Eclipse apresentaram um índice muito baixo de brotações.
- O meio Murashige e Skoog (1962), com concentração normal de sais, acrescida de 2,5 mg/L BAP e 0,10 ANA foi o meio de cultura mais adequado para o cultivo *in vitro* de *H. ortotricha* cv. Candy Cane, considerando-se o número de brotações e as características gerais das plantas, sendo que o meio MS 100% + 0,10 IBA apresentou a mesma taxa de brotação (3, 0 e 3,3 brotos por explante, respectivamente).
- Durante a aclimação de *H. ortotricha* Candy Cane, as plantas cultivadas nas misturas de Plant Max[®] Horticultura + Fibra de coco e Plant Max[®] Horticultura + Casca de arroz carbonizado, proporcionaram uma boa taxa de sobrevivência (69,79% e 70,83%, respectivamente), acompanhado de um bom desenvolvimento visual das plantas, apesar de terem sido observadas diferenças significativas entre os substratos.
- A utilização da técnica de ARDRA para caracterização e seqüenciamento para identificação permitiram verificar a presença de *Arthrobacter* sp., *Xanthomonas* sp., *Burkholderia* sp. e *Rhizobium* sp. nas folhas das três cultivares de helicônia após assepsia externa, constatando-se que as bactérias contaminantes durante o

estabelecimento *in vitro* dos explantes de helicônias podem ser provenientes das comunidades de bactérias pré-existentes na planta matriz fornecedora do explante. Notou-se a presença constante dos gêneros *Burkholderia* sp. e *Rhizobium* nos meios de cultura dos explantes, correspondendo também aos gêneros que apareceram em maior proporção entre as bactérias isoladas das folhas.

6 REFERÊNCIAS

- AMARI, M. E. Mineral uptake by banana (*Musa acuminata* L.) explant *in vitro*. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 560, p. 387-389, 2001.
- AKIEW, S.; HYDE, K.; DIATLOFF, L.; PETERSON, R. Bacterial wilt of heliconia plants from Oahu, Hawaii. **ACIAR Bacterial Wilt Newsl**, Canberra, v. 6, p. 5, 1990.
- ALBUQUERQUE, C. C.; CAMARA, T. R.; MARIANO, R. L. R.; WILLADINO, L.; MARCELINO JÚNIOR, C.; ULISSES, C. Antimicrobial action of the essential oil of *Lippia gracilis* Schauer. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Paraná, v. 49, n. 4, p. 527-535, 2006.
- ARAÚJO, W. L.; LIMA, A. O.S.; AZEVEDO, J. L.; MARCON, J.; SOBRAL, J. K.; LACAVAL, P. T. **Manual: isolamento de microrganismos endofítios**. Piracicaba: CALQ, 2002. 86 p.
- ASSIS, S. M. P.; SILBEIRA, E. B.; MARIANO, R. L. R.; MENEZES, D. Bactérias endofíticas: método de isolamento e potencial antagônico no controle da podridão negra em repolho. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 24, p. 216-220, 1998.
- ATEHORTUA, L. Heliconias: A new challenge for the Colombian floricultural industry. **Biotechnology and Development Monitor**, Amsterdam, v. 31, p. 20-21, 1997.
- AZEVEDO, J. L. Biologia molecular de microrganismos endofíticos e o controle de doença em citrus. In: REUNIÃO DE GENÉTICA DE MICRORGANISMOS, Pirenópolis, 23., 2002. Curitiba: Universidade Estadual de Goiás, 2002. p. 32.
- BACHRAZ, D. Y. **The role of tissue culture in agriculture diversification**. Réduit: Food and Agricultural Research Council, 1995. p. 96-101.
- BARROS, V. M.; GÓMEZ, J. J. B. **Heliconias de Antioquia: guía de identificación y cultivo**. Medellín: Universidad de Antioquia; Departamento de Biología, 1998. 194 p.
- BERRY, F.; KRESS, J. **Heliconia: an identification guide**. Washington: Smithsonian Institution Press, 1991. 334 p.
- BRAINER, M. S. C. P.; OLIVEIRA, A. A. P. Perfil da floricultura no Nordeste Brasileiro. In: CONGRESSO DA SOBER, 44., 2006, Fortaleza. Fortaleza: BNB, 2006. 1 CD-ROM.
- BROSCHAT, T. K.; DONSELMAN, H. Heliconias: a promising new cut flower crop. **HortScience**, Alexandria, v. 18, n. 1, P. 445-447, 1983.
- BUAINAIN, A. M.; BATALHA, M. O. **Cadeia produtiva de flores e mel**. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Política Agrícola, Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura, 2007. 140 p.
- BURRIS, R. H. Biological nitrogen fixation. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 54, p. 443-449, 1974.

CARTWRIGHT, D. K.; CHILTON, W. S.; BENSON, D. M. Pyrrolnitrin and phenalazine production by *Pseudomonas cepacia*, strain 5E5B, a biocontrol agent of *Rhizoctonia solani*. **Applied and Environmental Microbiology**, Berlin, v. 43, p. 211-216, 1995.

CAMPOSTRINI, E.; OTONI, W. C. Aclimação de plantas: abordagens recentes. **ABCTP-Notícias**, Recife, v. 2, n. 4, p. 15-21, 1995.

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

CASSELLS, A. C. Contamination and its impact in tissue culture. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 560, p. 353-359, 2001.

CASTRO, C. E. F. **Helicônias como flores de corte: adequação de espécies e tecnologia pós-colheita**, 1993. 191 f. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade São Paulo, Piracicaba, 1993.

CASTRO, C. E. F. **Helicônia para exportação: aspectos técnicos da produção**. Brasília: Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária; FRUPEX, 1995. 44 p.

CASTRO, C. E. F.; GRAZIANO, T. T. Espécies do gênero *Heliconia* (Heliconiaceae) no Brasil. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 3, n. 2, p. 15-28, 1997.

CAVALCANTE VA, DOBEREINER J. A new acid tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 108, p. 23–31, 1988.

CHANWAY CP. Endophytes they're not just fungi! **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 74; p. 321–322, 1996.

COSTA, A. S.; LOGES, V.; CASTRO, A. C. R.; VERONA, A. L.; PESSOA, C. O.; SANTOS, V. F. O perfilhamento e expansão de touceiras de helicônias. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 4, p. 460-463, 2006.

CHENEBY, D.; PHILIPPOT, L.; HARTMANN, A.; HENAULT, C.; GERMON, J. C. 16S r DNA analysis for characterization of denitrifying bacteria isolated from three agricultural soils. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 34, p. 121-128, 2000.

CID, L. P. B.; ZIMMERMANN, M. J. A contaminação *in vitro* de plantas. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, Brasília, p. 1-20, 2006.

CRILEY, R. A. Propagation methods for gingers and heliconias. **Bulletin Heliconia Society International**, Honolulu, v. 2, p. 6-7, 1988.

CRILEY, R. A. Development of *Heliconia* and *Alpinia* in Hawaii: cultivar selection and culture. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 246, p. 247-258, 1989.

CRILEY, R. A.; BROSCHEAT, T. K. *Heliconia*: botany and horticulture of new floral crop. **Horticultural Review**, Westport, v. 14, p. 1-55, 1992.

CRILEY, R. A.; UCHIDA, J. Y.; FU, Z. Productivity and periodicity of flowering in *Heliconia ortrotricha* cultivars. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 624, p. 207-212, 2003.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1981. 1262 p.

CRONQUIST, A. **The evolution and classification of flowering plants**. New York: Botanical Garden, 1988. 555 p.

DANIELS, G. S.; STILES, F. G. The *Heliconia* taxa of Costa Rica keys and descriptions. **Brenesia**, San Jose, v. 15, n. 1, p. 150, 1979.

DATH, A. P.; DEVADATH, S. Role of inoculum in irrigation water and soil in the incidence of bacterial blight of rice. **Indian Phytopathology**, New Delhi, v. 36, p. 142-144, 1983.

DE PAULA, C.C. **Cultivo de bromélias**. Viçosa: Editora Aprenda Fácil, 2000. 140 p.

DIAS, M. A.; RODRIGUES, P. H. V. Fontes de explantes e contaminantes isolados em cultivo *in vitro* de helicônia. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 7, n. 2, p. 165-168, 2001.

DINIZ, J. D. N.; GONÇALVES, A. N.; HERNANDEZ, F. F. F.; TORRES, A. C. Absorção de macronutrientes por explantes de bananeira *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 7, p. 1201-1209, 1999.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rizosphere. **Critical Reviews in Plant Science**, Boca Raton, v. 22, p. 107-149, 2003.

DOYLE, J. J. T.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Rochester, v. 12, p. 13-18, 1990.

EL BANNA, N.; WINKELMANN, G. Pyrrolnitrin from *Burkholderia cepacia*: antibiotic activity against fungi and novel activities against streptomycetes. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 85, p. 69-78, 1998.

ESTRADA, P.; MAVINGUI, P.; COURNOYER, B.; FONTAINE, F.; BALANDREAU, J.; CABALLERO-MELLADO, J. A N₂-fixing endophytic *Burkholderia* sp. associated with maize plants cultivated in Mexico. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 48, p. 285-294, 2002.

FERREIRA, M. E.; CALDAS, L. S.; PEREIRA, E. A. Aplicação da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: EMBRAPA, 1998. p. 21-44.

FRÁGUAS, C. B.; PEREIRA, A. R.; RODRIGUES, V. A.; FERREIRA, E. A.; PASQUAL, M. **Propagação *in vitro* de espécies ornamentais**. Lavras: UFLA, 1999.

- FRANCLET, A.; BOULAY, M. Micropropagation of frost resistant *Eucalyptus* clones. **Australian Forest Research**, Canberra, v. 13, p. 83-89, 1982.
- FURLANI, A. M. C. Nutrição mineral. In: KERBAUY G. B. (Org.). **Fisiologia vegetal**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Kogan, 2004. p. 1-452
- GEERTSEN V. Influence of photoperiod and temperature on the growth and flower production of *Heliconia psittacorum* 'Tay'. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 252, p. 117-122, 1989.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: EMBRAPA, 1998. p. 99-169.
- GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture**. London: The Technology Exegetics, 1993. 574 p.
- HELICONIA bihai* cv. Peach Pink. Disponível em: http://heliconiaparadise.com/H.bihai_cv.Peach_Pink.htm. Acesso em: 11 abr. 2006.
- GOH, C. J.; NATHAN, M. J.; KUMAR, P. P. Direct organogenesis and induction of morphogenic callus through thin section culture of *Heliconia psittacorum*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 62, p. 113-120, 1995.
- GOMES, J. M.; PEREIRA, A. R.; REZENDE, G. C. de; MACIEL, L. A. F. Uso de diferentes substratos na produção de mudas de *Eucalyptus grandis* em tubetes de bandejas de isopor. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 9, n. 1, p. 58-86, 1985.
- HEUER, H. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 63, p. 3233-3241, 1997.
- KÄMPF, A. N. **Produção comercial de plantas ornamentais**. Guaíba: Livraria e Editora Agropecuária, 2000. 254 p.
- KEDDIE, R. M.; COLLINS, M. D.; JONES, D. Genus *Arthrobacter* Conn and Dimmick. In: SNEATH, P. H. A.; MAIR, N. S.; SHARPE, M. E.; HOLT, J. G. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986. v. 2, p. 1288-1301.
- KIYUNA, I.; FRANCISCO, V. L. F. S.; COELHO, P. J.; CASER, D. V.; ASSUMPÇÃO, R.; ÂNGELO, J. A. Floricultura brasileira no início do século XXI: o perfil do produtor. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 34, n. 4, p. 14-32, 2004.
- KLEIN, V. A.; CAMARA, R. K.; SIMON, M. A.; DIAS, S. T. Casca de arroz carbonizada como condicionador de substrato. In: FURLANI, A. M. C. **Caracterização, manejo e qualidade de substratos para produção de plantas**. Campinas: Instituto Agrônomo, 2002. 17-28 p.
- KRESS, W. J.; PRINCE, L. M.; HAHN, W. J.; ZIMMER, E. A. Unraveling the evolutionary radiation of the families of the Zingiberales using morphological and molecular evidence. **Systematic Biology**, Washington, v. 50, n. 6, p. 926-944, 2001.

KUKLINSKY-SOBRAL, J.; ARAUJO, W. L.; MENDES, R.; GERALDI, I. O.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; AZEVEDO, J. L. Isolation and characterization of soybean associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 6, p. 1244-1251, 2004.

LAMAS, A. M. Floricultura topical – Técnicas de cultivo. Recife: SEBRAE-PE, 2004. 65 p.

LANE, D. L.; PACE, B.; OLSEN, G. J.; STAHL, D. A.; SOGIN, M. L.; PACE, N. R. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. **Proceedings of National Academy of Science of the USA**, Washington, v. 82, p. 6955-6959, 1985.

LOGES, V.; TEIXEIRA, M. C. F.; CASTRO, A. C. R.; COSTA, A. S. Colheita, pós-colheita e embalagem de flores tropicais em Pernambuco. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 3, p. 699-702, 2005.

LOUWS, F. J.; RADEMAKER, J. L.W.; BRUIJN, F. J. D. The three Ds of PCR-based genomic analysis of phyto-bacteria: Diversity, detection, and disease diagnosis. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 37, p. 81-125, 1999.

MALAVOLTA, E. **Elementos de nutrição mineral das plantas**. São Paulo: Ceres, 1980. 251 p.

MARQUES, J. M.; COELHO, P. J. A.; FERREIRA, M. A.; AMARAL, Z. P. S.; TORRES, A. C.; AMORIM, J. C.; BUSO, J. S. C. **Estudo da variabilidade genética entre indivíduos de populações de *Heliconia bihai* e *Heliconia rostrata***. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004. 15 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 69). Disponível em: <http://www.cenargen.embrapa.br/publica/trabalhos/bp069.pdf>. Acesso em: 20 jan. 2006.

MEZZETTI, B.; ROSATI, P.; CASALICCHIO, G. *Actinidia deliciosa* C. F. Liang *in vitro*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 25, p. 91-98, 1991.

MINAMI, K. **Produção de mudas de alta qualidade em horticultura**. São Paulo: Fundação Salim Farah Maluf, 1995. 128 p.

MOORE, F. P.; BARAC, T.; BORREMANS, B.; OEYEN, L.; VANGRONSVELD, J.; LELIE, D. V. D.; CAMPBELL, C. D.; MOORE, E. R.B. Endophytic bacterial diversity in poplar trees growing on a BTEX-contaminated site: The characterization of isolates with potential to enhance phytoremediation. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 29, p. 539–556, 2006.

MOTOS, J. R. O futuro da floricultura brasileira na Europa. **Boletim Ibraflor informativo**, Campinas, v. 9, n. 45, p. 1-7, 2005.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Kobenhan, 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**, Alexandria, v. 27, n. 5, p. 450-452, 1992.

NANNETTI, D. C. **Utilização da cultura de tecidos vegetais na micropropagação e maturação de *Heliconia* sp.** 1994. 106 f. Dissertação (Mestrado)- Escola Superior de Agricultura de Lavras, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1994.

NUNES, M. U. C.; SANTOS, J. R.; SANTOS, T. C. **Tecnologia para biodegradação da casca de coco seco e outros resíduos do coqueiro**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2007. 5 p. (Circular Técnica, 46).

OLIVEIRA, M. J. P. M. J. G. **Tecnologia pós colheita de *Heliconia* spp.** 1996. 111 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996.

OPITZ, R. As perspectivas para o mercado mundial de flores tropicais. In: SEMANA INTERNACIONAL DA FRUTICULTURA, FLORICULTURA E AGROINDÚSTRIA, 12., 2005, Fortaleza. Fortaleza: Frutal, 2005. 1 CD-ROM.

PALLERONI, N. J. Prokaryotic diversity and the importance of culturing. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 72, p. 3-19, 1997.

PEREIRA, J. E. S.; MATTOS, M. L. T.; FORTES, G. R. L. Identificação e controle com antibióticos de bactérias endofíticas contaminantes em explantes de batata micropropagados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 7, p. 827-834, 2003.

REASONER, D. J.; GELDREICH, E. E. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potato water. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 49, p. 1-2, 1985.

REED, B. M.; BUCKLEY, P. M.; DeWILDE, T. N. Detection and eradication of endophytic bacteria from micropropagated mint plants. **In Vitro Cellular and Developmental Biology**, Charlotte, v. 31, p. 53-57, 1995.

RODRIGUES, P. H. V. *In vitro* establishment of *Heliconia rauliniana* (Heliconiaceae). **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 62, n. 1, p. 69-71, 2005.

RODRIGUES, P. H. V.; LIMA, A. M. L. P.; AMBROSANO, G. M. B.; DUTRA, M. F. B. Acclimatization of micropropagated *Heliconia bihai* (Heliconiaceae) plants. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 62, n. 3, p. 299-301, 2005.

RYAN, R. P.; GERMAINE, K.; FRANKS, A.; RYAN, D. J.; DOWLING, D. N. Bacterial endophytes: recent developments and applications. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 268, p. 1-9, 2008.

SANTOS, M. R. A.; TIMBÓ, A. L. O.; CARVALHO, A. C. P. P.; MORAIS, J. P. S. Avaliação de substratos e adubos orgânicos na aclimação de plântulas de *Heliconia psittacorum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 10, p. 1049-1051, 2004.

SEBRAE. **Projeto Setorial Integrado de Promoção das Exportações de Flores e Folhagens de Corte de Pernambuco** – PSI. Recife, 2003.

SEBRAE. Jardim de oportunidades: Flores e plantas ornamentais atraem investimentos e adubam lucros. **Sebrae Agronegócios**, Fortaleza, n. 1, out. 2005.

SECEX. Floricultura: desempenho do comércio exterior em 2007. **Análises e Indicadores do Agronegócio**, São Paulo, v. 3, n. 1, 2008.

SILVEIRA, C. A. P.; FACHINELLO, J. C.; FORTES, G. R. L.; CITADIN, I.; RODRIGUES, A. C.; QUEZADA, A. C.; SILVA, J. B. Multiplicação *in vitro* de porta-enxerto do gênero *Prunus* sob diferentes concentrações de BAP e dois meios de cultura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 3, p. 488-492, 2001.

SIMÃO, D. G.; SCATENA, V. L. Morphological aspects of the propagation in *Heliconia velloziana* L. Emygd. (Zingiberales: Heliconiaceae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 46, n. 1, p. 65-72, 2003.

SMIDERLE, O. J.; SALIBE, A. B.; HAYASHI, A. H.; MINAMI, K. Produção de mudas de alface, pepino e pimentão em substratos combinando areia, solo e plantmax®. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 19, n. 3, p. 253-257, 2001.

SOMESEgaran, P.; HOBEN, H. J. **Handbook for Rhizobia: methods in legume Rhizobium**. New York: Springer Verlag, 1994.

STACKEBRANDT, E.; SCHUMANN, P. Introduction to the taxonomy of actinobacteria. In *The Prokaryotes: an Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*, 3. ed. release 3.3. New York: Springer, 2000. Disponível em: <http://141.150.157.117:8080/prokPUB/index.htm>. Acesso em: 17 nov. 2006.

STEAD, D. E.; HENNESSY, J.; WILSON, J. Modern methods for identifying bacteria. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 52, p. 17-25, 1998.

SWINGS, J.; VAN DEN MOOTER, M.; VAUTERIN, L.; HOSTE, B.; GILLIS, M.; MEW, T.W.; KERSTERS, K. Reclassification of the causal agents of bacterial blight (*Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*) and bacterial leaf streak (*Xanthomonas campestris* pv. *oryzicola*) of rice as pathovars of *Xanthomonas oryzae*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 40, p. 309-311, 1990.

TANIO, D. S.; SIMÕES, S. C. **Cadeia de suprimentos de flores e plantas ornamentais no Brasil – uma nova abordagem para aumentar a participação do setor no mercado internacional**. Estudos realizados. Florianópolis: GELOG-UFSC, 2005.

TING, A. S. Y.; MEON, S.; KADIR, J.; RADU, S.; SINGH, G. Endophytic microorganisms as potential growth promoters of banana. **BioControl**, Dordrecht, v. 53, p. 541–553, 2008.

TRANPASERT, P.; REED, B. M. Detection and identification of bacterial contaminant of strawberry runner explants. **Plant Cell, Tissue, and Organ Culture**, Dordrecht, v. 52, p. 53-55, 1998.

UTINO, S.; CARNEIRO, I. F.; CHAVES, L. J. Crescimento e oxidação de explantes de bananeira prata (*Musa AAB*) *in vitro* IV. concentrações de sais, ácido ascórbico e frequências de subcultivos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 409-412, 2001.

VEIGA, R. F. A.; COSTA, A. A.; BENATTI JÚNIOR, R.; MURATA, I. M.; PIRES, E. G.; ROMA, R. P. C. R. Os jardins botânicos brasileiros. **O Agrônomo**, Campinas, v. 55, n. 1, p. 56-60, 2003.

WATSON, D. P.; SMITH, R. R. **Ornamental Heliconias**. Honolulu: Cooperative Extension Service, University of Hawaii, 1979. 12 p. (Circular, 482).

WITHERS, L. A.; WILLIAMS, J. T. Conservação *in vitro* de recursos genéticos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa, 1998. v. 1, p. 297-330.