



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR**  
**CURSO DE BIOTECNOLOGIA**

**GÉSSICA HELLEN FROTA GOMES**

**ALONGAMENTO E ENRAIZAMENTO *in vitro* DE HELICÔNIA (*Heliconia latispatha*  
Bentham cv. Orange Gyro) EM FUNÇÃO DO FOTOPERÍODO E DA  
CONCENTRAÇÃO DE MACRONUTRIENTES DO MEIO DE CULTIVO MS**

**FORTALEZA**

**2018**

GÉSSICA HELLEN FROTA GOMES

ALONGAMENTO E ENRAIZAMENTO *in vitro* DE HELICÔNIA (*Heliconia latispatha*  
Bentham cv. Orange Gyro) EM FUNÇÃO DO FOTOPERÍODO E DA CONCENTRAÇÃO  
DE MACRONUTRIENTES DO MEIO DE CULTIVO MS

Monografia apresentada ao curso de  
Biotecnologia do Departamento de Bioquímica  
e Biologia Molecular da Universidade Federal  
do Ceará, como requisito parcial para obtenção  
do Título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Maria Izabel Gallão  
Supervisora: Ana Cristina Portugal Pinto de  
Carvalho

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- G614a Gomes, Géssica Hellen Frota.  
Alongamento e enraizamento in vitro de Helicônia (*Heliconia latispatha* Benth. cv. Orange Gyro) em função do fotoperíodo e da concentração de macronutrientes do meio de cultivo MS / Géssica Hellen Frota Gomes. – 2018.  
62 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2018.  
Orientação: Profa. Dra. Maria Izabel Gallão.  
Coorientação: Profa. Dra. Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho.
1. Micropropagação. 2. Histologia. 3. Clorofila.. I. Título.

CDD 661

---

GÉSSICA HELLEN FROTA GOMES

ALONGAMENTO E ENRAIZAMENTO *in vitro* DE HELICÔNIA (*Heliconia latispatha*  
Bentham cv. Orange Gyro) EM FUNÇÃO DO FOTOPERÍODO E DA CONCENTRAÇÃO  
DE MACRONUTRIENTES DO MEIO DE CULTIVO MS

Monografia apresentada ao curso de  
Biotecnologia do Departamento de Bioquímica  
e Biologia Molecular da Universidade Federal  
do Ceará, como requisito parcial para obtenção  
do Título de Bacharel em Biotecnologia.

Aprovada em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA

---

Dra. Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho  
Embrapa Agroindústria Tropical (CNPAT)

---

Profa. Dra. Maria Izabel Gallão  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra. Cristina Paiva da Silveira Carvalho  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

FORTALEZA

2018

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, à Deus e à Natureza, por me proporcionarem condições de finalizar não somente este trabalho, mas todos projetos que iniciei durante a Graduação em Biotecnologia e em minha vida.

Agradeço à minha família, por todo apoio, amor e paciência, além de não medirem esforços para que eu pudesse levar meus estudos adiante.

Aos meus amigos do curso de Biotecnologia, por estarem ao meu lado durante todos esses anos, pelos momentos de descontração, suporte e carinho, pelo incentivo à permanência no curso e ajuda de diversas formas.

Aos meus amigos do Laboratório de Biologia Celular Vegetal, que me ajudaram nos experimentos sempre que necessitei, pela paciência, cumplicidade e ensinamentos, em especial à Andreza Maciel, que ajudou muito em todo o processo do desenvolvimento das análises histológicas, compartilhando essa conquista comigo.

Aos meus amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, pela companhia e auxílio desde que entrei na EMBRAPA, pelos momentos de descontração, dentre eles o café durante à tarde, e àqueles que de outros laboratórios, porém não menos importantes, em especial Caroline Bento, que me ajudou durante a adaptação e chegada na empresa.

Ao Pedro Bruno Bushi, cuja paciência, amor e suporte foram essenciais para a conclusão deste trabalho. Agradeço por todo apoio psicológico, físico, e por muitos momentos acreditando em meu potencial, incentivando que eu buscasse o meu melhor.

À minha supervisora da EMBRAPA, Dra. Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho, por todas as vezes que disponibilizou seu tempo para nossas conversas, que sempre me impactaram muito; por todo auxílio na interpretação dos resultados, na montagem dos experimentos, paciência, dedicação, além dos incontáveis ensinamentos que jamais esquecerei.

À minha orientadora Prof. Dra. Izabel Gallão, por me acompanhar nessa jornada durante o último ano, disponibilizando seu laboratório para a realização da pesquisa, confiando e incentivando não só a mim, mas a todos os integrantes do Laboratório de Biologia Celular Vegetal.

À EMBRAPA, por disponibilizar sua estrutura para a realização de meus estágios, além de colaborar com a minha permanência na Universidade através de uma bolsa iniciação científica anteriormente, em outro projeto.

A Universidade Federal do Ceará e todo seu corpo docente, que realizam seu trabalho com tanto amor e dedicação, trabalhando incansavelmente para que nós, alunos, possamos contar com um ensino de extrema qualidade, assim como à Coordenação do curso de Biotecnologia, sempre solícitos na resolução de problemas e no gerenciamento de burocracias, trabalhando para a melhoria do curso continuamente.

A todos os pesquisadores, colaboradores, colegas que estiveram presente em minhas experiências de pesquisa durante esses anos de graduação.

Agradeço aos Órgãos e Agências de fomento à Pesquisa pelas bolsas de iniciação científica concedidas pelo Governo Brasileiro durante minha graduação. Com elas, pude não só permanecer e me manter na Universidade, como aprimorar meus conhecimentos nas mais diversas áreas que constituem a Biotecnologia através da participação de Congressos e Reuniões, dentro e fora do Estado do Ceará.

## RESUMO

*Heliconia latispatha* é uma planta ornamental adaptada ao clima tropical, cujas inflorescências são muito exóticas e com boa durabilidade pós-colheita; é uma espécie convencionalmente propagada vegetativamente através de seus rizomas. Entretanto, dificuldades de produção em larga escala, mudas restritas à determinadas épocas do ano, além de problemas fitossanitários fazem com que pesquisas relacionadas a métodos alternativos, como o cultivo *in vitro*, se tornem importantes para o setor de plantas ornamentais. Mesmo com a cultura de tecidos, em especial a propagação *in vitro*, tendo evoluído nos últimos anos, muitos estudos ainda utilizam formulações padrões para os meios de cultivo e/ou fotoperíodos inadequados, podendo acarretar em problemas morfológicos e fisiológicos no desenvolvimento e crescimento de espécies que possuem requisições minerais e fotoperiódicas muito restritas. Tendo isso em vista, objetivou-se neste trabalho avaliar as concentrações de macronutrientes do meio de cultivo para alongamento e enraizamento *in vitro* a partir de brotações de *Heliconia latispatha* Benth. cv. Orange Gyro em dois fotoperíodos. O experimento foi realizado com delineamento inteiramente casualizado em esquema 4 x 2, sendo 4 concentrações de macronutrientes do meio de cultura MS T1 (25%), T2 (50%), T3 (75%) e T4 (100%) e 2 fotoperíodos (12 horas e 16 horas de luz diária), totalizando 8 tratamentos. Foram utilizadas 6 repetições (frascos) por tratamento, sendo a unidade experimental constituída por um frasco contendo 3 explantes (brotações). O tratamento que consistiu em 75% de macronutrientes da concentração original do meio MS, no fotoperíodo de 12 horas, demonstrou ser o mais adequado ao alongamento e enraizamento de mudas micropropagadas de *Heliconia latispatha* Benth. cv. Orange Gyro, de forma a induzir as maiores médias de altura, não comprometendo as massas fresca e seca das mudas, bem como o comprimento da maior raiz e o diâmetro do pseudocaule, ao passo que também não afetou a produção de folhas, a produção de pigmentos fotossintetizantes nem a espessura foliar em relação aos tratamentos.

Palavras-chave: Micropropagação, histologia, clorofila.

## ABSTRACT

*Heliconia latispatha* is an ornamental plant adapted to the tropical climate, whose inflorescences are very exotic and with good post-harvest durability; is a species conventionally propagated vegetatively through its rhizomes. However, difficulties in large-scale production, seedlings restricted to certain times of the year, and phytosanitary problems make research related to alternative methods, such as *in vitro* cultivation, important for the ornamental plant sector. Even with tissue culture, especially *in vitro* propagation, having evolved in recent years, many studies still use patterns formulations for the culture media and standard photoperiods, which can lead to morphological and physiological problems in the development and growth of species that have very restricted mineral and photoperiodic requirements. The objective of this work was to evaluate the macronutrient concentrations of the culture medium for *in vitro* elongation and rooting from shoots of *Heliconia latispatha* Benth. cv. Orange Gyro in two photoperiods. The experiment was carried out with a completely randomized design in a factorial scheme, 4 x 2, with 4 macronutrient concentrations of MS medium, T1 (25%), T2 (50%), T3 (75%) and T4 (100%) and 2 photoperiods (12 hours and 16 hours of daily light), totaling 8 treatments. Six replicates (flasks) were used per treatment, the experimental unit consisting of a bottle containing 3 explants (shoots). The treatment with 75% of macronutrients in the photoperiod of 12 hours proved to be the most adequate for the elongation and rooting of micropropagated seedlings of *Heliconia latispatha* Benth. cv. Orange Gyro, in order to induce the highest averages of height, without compromising the fresh and dry masses of the seedlings, as well as the length of the longest root and the diameter of the pseudocaulis, while also did not affect the production of leaves, the production of photosynthetic pigments and leaf thickness in relation to the treatments.

Key-words: Micropropagation, histology, chlorophyll.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	Aspecto morfológico do gênero <i>Heliconia spp.</i> .....	5
Figura 2-	Inflorescência de <i>Heliconia latispatha</i> Benth. cv. 'Orange gyro' .....	6
Figura 3-	Princípio geral da cultura de tecidos vegetais.....	11
Figura 4-	<b>A:</b> Mudas micropropagadas de <i>Heliconia latispatha</i> Orange Gyro obtidas a partir da germinação <i>in vitro</i> de sementes usadas como fonte de explantes; <b>B:</b> Explante utilizado no experimento: brotação de <i>Heliconia latispatha</i> com tamanho aproximado de 2 cm, sem folhas e sem raízes.....	22
Figura 5-	Brotações de <i>Heliconia latispatha</i> Benth. cv. Orange Gyro aos 15 dias de cultivo <i>in vitro</i> nos fotoperíodos de <b>A:</b> 12 horas e <b>B:</b> 16 horas, sendo T1 (25%), T2 (50%), T3 (75%) e T4 (100%) de macronutrientes.....	23
Figura 6-	Análises morfológicas efetuadas em muda de <i>Heliconia latispatha</i> Benth. cv. Orange Gyro. <b>A:</b> medição da altura da muda; <b>B:</b> medição da maior raiz; <b>C:</b> medição do diâmetro do pseudocaule.....	24
Figura 7-	Média da altura das mudas micropropagadas de <i>Heliconia latispatha</i> Benth. cv. Orange Gyro em meios de cultivo contendo diferentes concentrações de macronutrientes e nos fotoperíodos de 12 e 16 horas, aos 35 dias de cultivo <i>in vitro</i> .....	28
Figura 8-	Média do diâmetro do pseudocaule de mudas micropropagadas <i>Heliconia latispatha</i> Benth. cv. Orange Gyro em meios de cultivo contendo diferentes concentrações de macronutrientes e nos fotoperíodos de 12 e 16 horas, aos 35 dias de cultivo <i>in vitro</i> .....	29
Figura 9-	Média do comprimento da maior raiz de mudas micropropagadas <i>Heliconia latispatha</i> Benth. cv. Orange Gyro em meios de cultivo contendo diferentes concentrações de macronutrientes e nos fotoperíodos de 12 e 16 horas, aos 35 dias de cultivo <i>in vitro</i> .....	30
Figura 10-	Média da massa fresca de mudas micropropagadas <i>Heliconia latispatha</i> Benth. cv. Orange Gyro em meios de cultivo contendo diferentes	

	concentrações de macronutrientes e nos fotoperíodos de 12 e 16 horas, aos 35 dias de cultivo <i>in vitro</i> .....	31
Figura 11-	Média da massa seca de mudas micropropagadas <i>Heliconia latispata</i> Bentham cv. Orange Gyro em meios de cultivo contendo diferentes concentrações de macronutrientes e nos fotoperíodos de 12 e 16 horas, aos 35 dias de cultivo <i>in vitro</i> .....	32
Figura 12-	Média do número de folhas de mudas micropropagadas <i>Heliconia latispata</i> Bentham cv. Orange Gyro em meios de cultivo contendo diferentes concentrações de macronutrientes e nos fotoperíodos de 12 e 16 horas, aos 35 dias de cultivo <i>in vitro</i> .....	33
Figura 13-	Figura 20- Médias da concentração de clorofila <b>a</b> em folhas de mudas micropropagadas <i>Heliconia latispata</i> Bentham cv. Orange Gyro em meios de cultivo contendo diferentes concentrações de macronutrientes e nos fotoperíodos de 12 e 16 horas, aos 35 dias de cultivo <i>in vitro</i> .....	35
Figura 14-	Médias da concentração de clorofila <b>b</b> em folhas de mudas micropropagadas <i>Heliconia latispata</i> Bentham cv. Orange Gyro em meios de cultivo contendo diferentes concentrações de macronutrientes e nos fotoperíodos de 12 e 16 horas, aos 35 dias de cultivo <i>in vitro</i> .....	35
Figura 15-	Figura 22- Médias da concentração de clorofila <b>total</b> em folhas de mudas micropropagadas <i>Heliconia latispata</i> Bentham cv. Orange Gyro em meios de cultivo contendo diferentes concentrações de macronutrientes e nos fotoperíodos de 12 e 16 horas, aos 35 dias de cultivo <i>in vitro</i> .....	36
Figura 16-	Médias da concentração de carotenoides em folhas de mudas micropropagadas <i>Heliconia latispata</i> Bentham cv. Orange Gyro em meios de cultivo contendo diferentes concentrações de macronutrientes e nos fotoperíodos de 12 e 16 horas, aos 35 dias de cultivo <i>in vitro</i> .....	36
Figura 17-	Média da espessura foliar do corte transversal de folhas de mudas micropropagadas de <i>Heliconia latispata</i> Bentham cv. Orange Gyro em	

	meios de cultivo MS contendo diferentes concentrações de macronutrientes e nos fotoperíodos de 12 e 16 horas, aos 35 dias de cultivo <i>in vitro</i> .....	37
Figura 18-	Corte transversal da folha de muda micropropagada de <i>Heliconia latispatha</i> Bentham cv. Orange Gyro corados em PAS, em aumento de 20X evidenciando os grânulos de polissacarídeos neutros citoplasmáticos, aos 35 dias de cultivo em meio MS contendo 25% de macronutrientes e fotoperíodo de 12 horas. Barra: 50 µm.....	38
Figura 19-	Corte transversal da folha de muda micropropagada de <i>Heliconia latispatha</i> Bentham cv. Orange Gyro corados em PAS, em aumento de 10X. Fotoperíodo de 12 horas: A: 25%; C: 50%; E: 75% e G: 100%; Fotoperíodo de 16 horas: B: 25%; D: 50%; F: 75% e H: 100% de macronutrientes do meio de cultivo MS, aos 35 dias de cultivo <i>in vitro</i> . Barra: 100 µm.....	39
Figura 20-	Corte transversal folha de muda micropropagada de <i>Heliconia latispatha</i> Bentham cv. Orange Gyro corados em PAS, em aumento de 20X. Fotoperíodo de 12 horas: A: 25%; C: 50%; E: 75% e G: 100%; Fotoperíodo de 16 horas: B: 25%; D: 50%; F: 75% e H: 100% de macronutrientes do meio de cultivo MS, aos 35 dias de cultivo <i>in vitro</i> . Barra: 50 µm.....	40

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Composição de diferentes meios de cultivo utilizados na cultura de tecidos <i>in vitro</i> .....	14
-----------	--	----

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>3</b>
2.1 Cultivo de plantas ornamentais .....	3
2.2 Características Botânicas da Família <i>Heliconiaceae</i> .....	4
2.2.1 <i>Heliconia latispatha</i> .....	6
2.3 Propagação de plantas .....	9
2.3.1 Propagação sexuada de Helicônias .....	10
2.3.2 Propagação assexuada de Helicônias .....	10
2.3.3 Micropropagação de Helicônias .....	12
2.3.3.1 Meio de cultivo .....	13
2.3.3.2 Nutrição Mineral .....	15
2.3.3.3 Fotoperíodo .....	19
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>21</b>
3.1 Objetivo Geral .....	21
3.2 Objetivos Específicos .....	21
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>22</b>
4.1 Material Vegetal .....	22
4.2 Formulações do Meio de Cultivo .....	22
4.3 Delineamento Experimental .....	23
4.4 Análises Morfológicas .....	24
4.5 Análises Histológicas por Microscopia Óptica .....	25
4.5.1 Inclusão do material em resina .....	25
4.5.2 Seccionamento no micrótomo .....	25
4.5.3 Coloração das lâminas contendo a amostra e análise da espessura foliar .....	25
4.6 Análises quantitativas de clorofila <i>a</i> , clorofila <i>b</i> , clorofila total e carotenoides .....	26
4.7 Análises estatísticas .....	27
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>28</b>
5.1 Características Morfológicas .....	28
5.2 Análise das concentrações de clorofila <i>a</i> , clorofila <i>b</i> , clorofila total e carotenoides .....	33
5.3 Análise histológica da espessura foliar .....	37

<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>41</b>
<b>7 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>42</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O comércio de flores e plantas ornamentais no Brasil, segundo Instituto Brasileiro de Floricultura (IBRAFLOR), é muito dinâmico, buscando inovações em produtos e serviços para melhor atender à demanda do mercado por novidades, com qualidade a preços competitivos. Além disso, enquanto outros ramos do agronegócio utilizam tecnologias com intensa mecanização na fase da pós-colheita, o setor de flores e plantas ornamentais, inclusive nos cultivos mais modernos, ainda utilizam considerável mão-de-obra, tendo em vista que o manuseio e transporte de flores é menos automatizado, além de que atividades de elaboração de arranjos e bouquets são essencialmente artesanais.

Dentre as espécies cultivadas no Brasil, os representantes do gênero *Heliconia* destacam-se por seu exotismo e beleza, com inflorescências suntuosas e coloridas, além de boa durabilidade pós-colheita. A espécie *Heliconia latispatha* Benth. cv. Orange Gyro, embora não esteja entre as cultivares mais produzidas no país, possui características recomendadas comercialmente, com suas brácteas firmes e alaranjadas em espiral ao longo da raque, sem a presença de pilosidades, facilitando o manuseio e o transporte de suas inflorescências (CASTRO *et al.*, 2006).

Contudo, antes de se alcançar a fase da pós-colheita, é necessária a propagação vegetativa das plantas. No caso dos exemplares de helicônias, a propagação por via sexuada é dificultada por vários fatores, tal qual o tempo de germinação das sementes, indo de 120 dias a 3 anos de acordo com a espécie, sendo que algumas outras espécies sequer frutificam, e na conjuntura de plantio fora da região de ocorrência natural, a falta dos agentes polinizadores ideais pode afetar a fecundação das flores (CASTRO, 1995; NANNETTI, 1994).

Atualmente, as helicônias são majoritariamente propagadas através de seus rizomas, porém esse método apresenta desvantagens quanto a questões fitossanitárias, à mão-de-obra, à variabilidade genética, dentre outros. Dessa forma, outras formas de propagação, como o cultivo de tecidos *in vitro*, destacam-se como uma técnica biotecnológica que possibilita a obtenção de mudas em larga escala, livre de patógenos, durante qualquer época do ano (MOREIRA *et al.*, 2012). Necessitando de um ambiente controlado, recipiente estéril, um explante, meio de cultivo contendo nutrientes, vitaminas, agente gelificante, água e uma fonte de carbono, a formulação para obtenção de uma muda micropropagada é bastante estabelecida, porém não padronizada. Seria padronizada se todas as espécies tivessem as mesmas necessidades nutricionais e ambientais, contudo essa não é a realidade observada (SMITH, 2012; PIERIK, 1997).

Um dos meios de cultivo mais utilizados atualmente é o meio MS descrito por MURASHIGE e SKOOG (1962), possuindo altas concentrações de nitrogênio e outros macronutrientes, é uma formulação nutritiva bem estabelecida, contudo alguns de seus componentes requeridos em altas concentrações podem ter efeitos de toxicidade, ao passo que outros componentes se encontram em concentrações menores do que as necessárias para algumas espécies.

Em relação à *Heliconia latispatha*, Rodrigues *et al.* (2016) identificaram que para a indução *in vitro* de explantes, 2,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA no fotoperíodo de 12 horas foram tratamentos eficientes para a indução de brotações *in vitro*.

Para outras espécies de helicônias, como a *Heliconia rostrata* e *Heliconia bihai*, a suplementação do meio de cultivo MS com carvão ativado foi essencial para a germinação de embriões somáticos (SOUZA, 2010), enquanto para a propagação *in vitro* de *Heliconia psittacorum* o meio MS suplementado com benzilamino purina (BAP) na concentração de 10 µM é suficiente para a multiplicação das brotações, contudo para o desenvolvimento das brotações é requerido 40 µM de BAP (NATHAN *et al.*, 1992)

Assim, tendo em vista que a variedade de espécies existentes é grande, seus requisitos de fotoperíodo, intensidade luminosa, quantidade de sais minerais, vitaminas, hormônios, também são os mais variados, e se esses são fornecidos de forma inadequada em concentrações insuficientes ou mais do que necessário, podem acarretar em problemas no desenvolvimento do explante, como em espécies mais sensíveis e exigentes (SANTOS, 2015).

Considerando-se a carência de informações em relação a micropropagação, ao alongamento e enraizamento da espécie *Heliconia latispatha* Bentham cv. Orange Gyro, faz-se necessário avaliar as condições de cultivo ao qual os explantes são submetidos, por meio da modificação dessas condições de forma a investigar quais fatores afetam o desenvolvimento e como respondem a essas mudanças, morfológicamente e fisiologicamente.



## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Cultivo de plantas ornamentais

O comércio internacional de flores e plantas ornamentais movimentou mais de US\$ 21 bilhões em 2013, quando somadas as exportações de todos os países produtores e exportadores. Essas exportações envolvem principalmente países da Europa Ocidental, América do Norte e Japão, destacando-os pelas suas altas produtividade e demanda interna (IBRAFLOR, 2017). O agronegócio da floricultura é um mercado com cadeia produtiva de médio a alto valor agregado, que busca inovação e diversificação de espécies e cultivares, difundindo novas tecnologias no setor de produção e distribuição, além de ser responsável por um grande volume financeiro de transações entre diversos países (BRAINER ; OLIVEIRA, 2006).

As exportações do setor concentram-se em quatro tipos principais de produtos: bulbos (bulbos, tubérculos, rizomas, etc.), mudas (mudas de plantas ornamentais, de orquídeas, etc.), flores (flores cortadas para buquês, frescas ou secas) e folhagens (folhas, folhagens e musgos para floricultura). Entre os anos de 1999 e 2013 o valor das exportações passou de US\$ 8,77 bilhões para US\$ 21,77 bilhões, com um crescimento de 148,2% no período. Embora esse crescimento seja positivo para o setor mundial, o Brasil possuiu um consumo *per capita* de apenas R\$26,00 em 2013, enquanto em mercados mais consolidados como o da Alemanha, o consumo *per capita* de flores chegou a R\$195,00, evidenciando que, apesar desse aumento internacional das exportações, o consumidor brasileiro ainda não possui o hábito de compra, seja por motivos culturais ou financeiros (IBRAFLOR, 2017).

O agronegócio de flores e plantas ornamentais no Brasil tem crescido consideravelmente dos anos de 2012 a 2017, contando com cerca de 8 mil produtores, que cultivam uma área correspondente a 15 mil hectares, sendo responsável por 199.100 empregos diretos relativos à produção, à distribuição e ao varejo. O faturamento em 2015 foi de R\$ 6,2 bilhões, enquanto que no ano de 2016 foi de R\$ 6,7 bilhões, demonstrando o desenvolvimento do setor apesar da recente crise econômica. Com a desvalorização da moeda brasileira no mercado financeiro internacional, o custo da importação de insumos para a produção de mudas, sementes e bulbos aumentou, de forma a evidenciar a necessidade de novas e melhores alternativas para a produção de flores e plantas ornamentais no cenário brasileiro, favorecendo o desenvolvimento interno dos setores de pesquisa, desenvolvimento e inovação (IBRAFLOR, 2017).

Mesmo sendo uma área bastante promissora no campo do agronegócio nacional, ainda existe complexidade na obtenção de dados estatísticos oficiais e atuais sobre a proporção que o setor de floricultura ocupa no mercado brasileiro (JUNQUEIRA; PEETZ, 2005). Embora quando comparado à base agrária brasileira, o comércio de espécies ornamentais evidencia-se sendo de menor porte, e detém características importantes como a geração de renda e empregos, mesmo com a recente estagnação nos grandes centros comerciais. Não obstante, esse setor comercial impulsiona mercados regionais através de uma maior eficiência na produção primária e pós-colheita, buscando adaptar suas estruturas às recentes modificações tecnológicas. Essas modificações têm sido fundamentais para a redução de custos, manutenção da competitividade, atendendo principalmente à demanda interna, e empenhando-se para conquistar o mercado internacional de floricultura (ESPERANÇA, 2011).

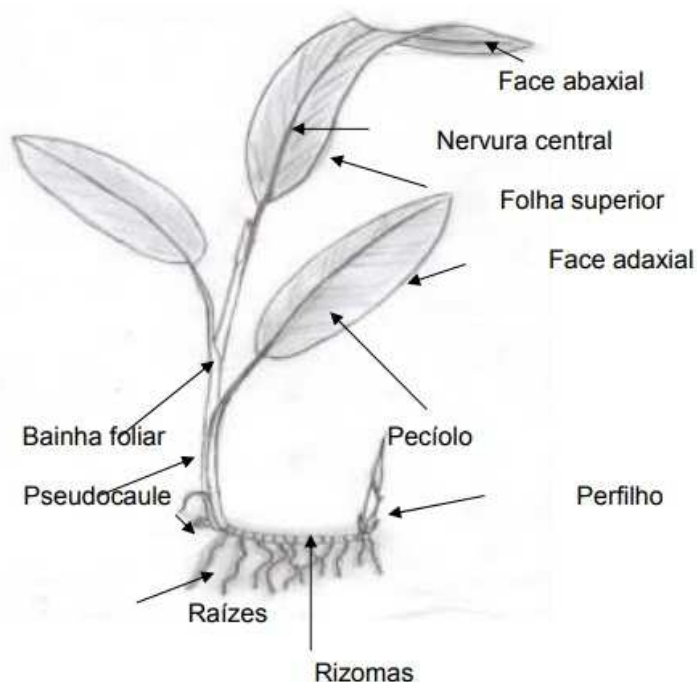
Dessa forma, o Brasil demonstra possuir grande potencial de desenvolvimento no cultivo de espécies ornamentais, não só pela capacidade de expansão de mercado e geração de renda, mas também pela alta adaptabilidade ao clima tropical de espécies importantes de famílias como *Araceae* (*Anthurium andreanum* Liden), *Bromeliaceae* (*Tillandsia cyanea*) e *Cactaceae* (*Pilosocereus azureos*) além da ordem *Zingiberales*, com enfoque para as famílias *Costaceae*, *Zingiberaceae* e *Heliconiaceae* (SANTOS *et al.*, 2007).

## 2.2 Características Botânicas da Família *Heliconiaceae*

A família *Heliconiaceae* está incluída na ordem *Zingiberales*, juntamente a outras sete famílias, nomeadamente: *Cannaceae*, *Costaceae*, *Lowiaceae*, *Maranthaceae*, *Musaceae*, *Strelitziaceae* e *Zingiberaceae* (TOMLINSON, 1962; CRONQUIST, 1981; DAHLGREN *et al.*, 1985; KRESS *et al.*, 1990a, b). Apresenta apenas um gênero, *Heliconia* L., caracterizando-se por plantas monocotiledôneas herbáceas, perenes, rizomatosas, de porte ereto, com pseudocaule composto pela sobreposição das bainhas das folhas, e variando, conforme a espécie, de 0,5 m a 10 m de altura. Os rizomas subterrâneos emitem brotações à superfície, e cada planta é composta por pseudocaule, folhas e uma única inflorescência terminal ereta ou pendente (Figura 1), com forma, tamanho e cor variando com a espécie (BERRY; KRESS, 1991). As inflorescências são na forma tirsóide (ou tirsiformes), ou seja, cada inflorescência corresponde a um cincino, sendo assim denominado quando suas flores compõem a inflorescência em planos diferentes, em lados alternados do eixo da raque (DAHLGREN *et al.*, 1985; ANDERSSON, 1998). As síndromes de polinização, caracterizadas pelo conjunto de adaptações morfológicas, sensoriais, nutricionais e comportamentais para atrair e explorar tipos específicos de polinizadores, variam de acordo com a localização da espécie de helicônia. Nas

espécies neotropicais, os cincinos são compostos por brácteas de coloração viva, enquanto nas espécies paleotropicais as brácteas são verdes, com a coloração relacionada à ornitofilia e à quiropterofilia, respectivamente (DAHLGREN *et al.*, 1985; BERRY; KRESS, 1991; ANDERSSON, 1998).

Figura 1- Aspecto morfológico do gênero *Heliconia spp*



Fonte: (ARGÔLO, 2009)

As flores são hermafroditas e seus frutos, de cor azulada a violeta quando maduros, contêm sementes rígidas que podem levar de 120 dias a três anos para germinar (MARQUES *et al.*, 2004). Sua propagação é preferível em solos areno-argilosos e profundos, com boa drenagem e pH entre 4,5 a 6,5, pois em solos muito ácidos, as plantas tornam-se amareladas e pouco desenvolvidas. São plantas de reprodução sexuada e assexuada que têm na propagação por meio de rizomas a principal forma de multiplicação com fins comerciais (PAIVA *et al.*, 1998).

A família *Heliconiaceae* é nativa de regiões tropicais que se estendem do norte da América Central até a América do Sul. É composta por cerca de 200 a 250 espécies, com 41 espécies nativas do Brasil, em duas áreas primárias de distribuição: a bacia Amazônica, com cerca de vinte e uma espécies, e a floresta atlântica costeira, com vinte espécies. Essas regiões

apresentam elevado grau de endemismo, o que aponta uma grande fragilidade do gênero com relação à conservação de germoplasma (KRESS *et al.*, 1990a).

A maioria das espécies dessa família habita regiões úmidas, mas eventualmente algumas outras são encontradas em áreas sazonalmente secas. Apesar das helicônias atingirem seu maior potencial de crescimento vegetativo nos trópicos úmidos de várzea em altitudes abaixo de 500 metros, o maior número de espécies é encontrado em habitats de chuva e nebulosidade de altitude média (800 a 1.500 metros) (KRESS *et al.*, 1990a).

### 2.2.1 *Heliconia latispatha*

A espécie *Heliconia latispatha* possui altura em torno de 1,65 a 5,94 metros, geralmente com inflorescências contendo brácteas vermelhas com uma pequena área amarela ou dourada na base, e bráctea basal com quilha verde (Figura 2), de vegetação do tipo musóide, muito semelhante às encontradas na família *Musaceae*, e folhas verde-escuro, dísticas, com longa bainha basal, pecioladas, longamente invaginantes na base, formando um pseudocaule. A sua nervação obedece a um padrão simples, com uma nervura mediana bem evidente e nervuras secundárias transversalmente paralelas, formando ângulos retos ou agudos com nervura mediana, atenuando-se em direção às bordas (RIBEIRO *et al.*, 2012). Seu habitat ideal varia entre áreas com 50% de sombra até completa exposição solar (RUNDEL *et al.*, 1998; MOSCA *et al.*, 2005).

Figura 2- Inflorescência de *Heliconia latispatha* Bentham cv. “Orange Gyro”



Fonte: Castro *et al.* (2006)

A variedade *Heliconia latispatha* Bentham cv. “Orange Gyro” utilizada no presente estudo possui flores amarelo-esverdeadas e inflorescências com brácteas alaranjadas, firmes, sem a presença de pilosidades, estando as brácteas dispostas em espiral ao longo de sua raque amarela (Figura 2). Tais características a evidenciam como uma espécie adequada a ser utilizada como flor de corte, tendo em vista a recomendação para a seleção de espécies de helicônias com inflorescências pequenas, leves e eretas, haste de menor diâmetro, sem pilosidades, de forma a facilitar o manuseio durante a colheita e o transporte, e com grande durabilidade pós-colheita de modo a preservar a qualidade do produto até o consumidor (WATSON ; SMITH, 1979; CASTRO *et al.*, 2006).

Castro *et al.* (2006), avaliando 30 genótipos de helicônias quanto à sua adequação como flor de corte, incluíram a espécie *Heliconia latispatha* entre as classificadas como moderadamente adequadas. Dentre as características, a inflorescência da referida espécie tem coloração laranja-claro, possuindo o florescimento distribuído pelos meses de verão (janeiro a março) e início do outono (abril), ocupando, portanto, um intervalo de 90 a 120 dias. Esses autores mencionam que da mesma forma que as outras espécies de helicônias classificadas como moderadamente adequadas como flores de corte, *H. latispatha* ainda é pouco cultivada e comercializada no mercado nacional.

Atividades de pesquisa têm sido desenvolvidas em diversas áreas buscando estudar a espécie *Heliconia latispatha*, sobretudo com abordagens mais voltadas à agronomia e à ecologia. Sendo uma espécie de interesse comercial, existe a necessidade de estudos mais específicos quanto a sua propagação e produção de mudas.

Foram realizadas pesquisas agronômicas relacionadas à adaptação morfofisiológica à densidade de fluxo de fótons, comparando *H. latispatha*, espécie com características de ambiente com alta densidade luminosa e lugares abertos, com outras sete espécies, demonstrando que apesar da *H. latispatha* ser uma espécie capaz de suportar altas densidades luminosas, condições de cultivo a pleno sol em locais abertos, tais como clareiras, podem induzir fotoinibição em plantas tropicais, ocorrendo a recuperação dos níveis de fotossíntese durante várias horas no período da tarde (RUNDEL *et al.*, 1998).

Ademais, buscou-se estudar a relação de espécies de helicônia com a salinidade na água de irrigação do solo, a resistência e à susceptibilidade a patógenos, demonstrando o interesse na fase de plantio das mudas. No cultivo de alguns genótipos de helicônias, dentre elas: *H. rostrata*, *H. psittacorum* “Suriname Sassy”, *H. latispatha*, *H. Red Opol* e *H. Nickeriensis*, estudou-se a interação da salinidade na água de irrigação e a resistência das

mesmas. Esses estudos concluíram que nas variáveis de crescimento (altura de planta e número de folhas) o genótipo de *Heliconia latspatha* foi maior estatisticamente que o genótipo *H. rostrata*, embora tenha sido a única espécie a não emitir inflorescências sob condições de meio salino, colocando-a na categoria de resistência moderada (SOUSA *et al*, 2011).

Identificar cultivares resistentes é algo muito buscado principalmente dentre as *Zingiberaceas*, não só devido ao interesse comercial, mas também pela busca da conservação de genótipos ainda não catalogados, ou em risco de extinção, que são afetados pela murcha, causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*. Com esse intuito, foram selecionadas para estudo as espécies: *Heliconia bihai*, *H. psittacorum* cvs. Golden Torch e Golden Torch Adrian, *H. rostrata*, *H. stricta* cvs. Capri e Fire Bird, *H. psittacorum* cvs. Sassy e Alan Carle, *H. caribea*, *H. latspatha*, *H. wagneriana* e *H. chartacea* cv. Sexy Pink. Dentre essas espécies, apenas *H. bihai*, *H. psittacorum* cvs. Golden Torch e Golden Torch Adrian, *H. rostrata*, *H. stricta* cv. Capri, *H. psittacorum* cv. Sassy e *H. caribea* foram consideradas resistentes, constatando a ausência de relação entre a resistência das espécies e a lignificação do pseudocaule como mecanismo estrutural de defesa do organismo (CASTRO *et al*, 2010).

Dentre os estudos relacionados ao campo biológico, é relevante destacar análises filogenéticas, como por exemplo, o desenvolvimento floral da *Heliconia latspatha*, a fim de compreender a evolução das flores na ordem *Zingiberales*. Essa busca de compreender a evolução filogética ocorre porque a família *Heliconiaceae* compartilha com a família *Zingiberaceae* a presença de um estaminoide antisepaloso, uma sinapomorfia que tem sido usada para relacioná-las quanto à ontogenia (origem e desenvolvimento) do estaminoide (KIRCHOFF *et al*, 2009).

Ademais, estudos relacionados a relações ecológicas entre insetos e *Heliconia latspatha* foram realizados, de forma a identificar a resistência e a forma de controle da densidade das espécies de insetos da família *Chrysomelidae*, que utilizam a helicônia como hospedeira. Embora os representantes da ordem das *Zingiberales* sejam provavelmente alimentos pobres para os insetos fitófagos em geral, não há mecanismo químico protetor desses hospedeiros que possa conferir controle da densidade sobre as populações de suas folhagens, podendo essa regulação derivar de predadores como aves, para insetos adultos, e parasitoides himenópteros para ovos e larvas. Essas características levaram os autores a concluir que o número de insetos que a helicônia comportar sem padecer poderia ser determinado pelo número que a mesma pode "esconder" ou proteger de predadores ou parasitoides (STRONG, 1977; GAGE ; STRONG, 1981).

Estudos relativos às estruturas das interações ecológicas são salientados no trabalho elaborado por Benítez-Malvido *et al* (2014), em que os autores avaliam a comunidade de invertebrados associados às *Heliconia latispatha* e *H. collinsiana* em habitats naturais e em florestas tropicais que sofreram ação antrópica, concluindo que as propriedades da rede de invertebrados associados às helicônias foram mantidas em ambos habitats, apesar das diferenças na riqueza e composição das espécies, possuindo uma ampla gama de ordens de artrópodes e outros invertebrados. Os autores mencionam que além de fornecer alimentos e habitat para a fauna associada e colonização para vários microhabitats, as helicônias poderiam ser usadas como elementos de habitat para a conservação de invertebrados em paisagens impactadas por humanos.

Além disso, outros estudos se tornam importantes por revelar que espécies já relatadas na literatura, porém no século XX e em outros países como a Costa Rica, foram encontradas no Brasil com interação de herbivoria com *Heliconia latispatha*, como as lagartas *Antichloris eriphia* e *Calligo illioneus*, devido à proximidade dos cultivos de helicônias aos cultivos de bananeiras. Essa proximidade pode ter favorecido a migração dessas espécies de lagartas, sendo o ataque de *C. illioneus* o primeiro a ser constatado no Brasil, e alertando para um cuidado maior no plantio e manutenção dessas espécies ornamentais (WATANABE, 2007).

Na área de cultura de tecidos, analisou-se a influência do fotoperíodo e de reguladores de crescimento na indução *in vitro* de explantes de *Heliconia latispatha*, concluindo que 2,5 mg L<sup>-1</sup> de 6-benzylaminopurine (BAP) com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA no fotoperíodo de 12 horas, foram tratamentos eficientes para a indução de brotações *in vitro* (RODRIGUES *et al*, 2016).

### **2.3 Propagação de plantas**

A propagação de plantas pode se dar de duas formas: sexuadamente ou assexuadamente. No método sexuado, novas plantas surgem após a fusão dos gametas parentais e desenvolvem-se a partir de embriões zigóticos contidos em sementes ou frutos. Na maioria dos casos, as mudas geradas serão diferentes umas das outras, apresentando variabilidade genética produzida durante a formação do embrião. Contudo, no método assexuado, as características de qualquer planta individual selecionada para propagação (denominada planta matriz ou planta de estoque) são geralmente perpetuadas devido ao processo de divisão celular denominado mitose, em que as células-filhas possuem material genético igual ao da célula-mãe, gerando clones (GEORGE *et al*, 2007).

### 2.3.1 Propagação sexuada de *Helicônias*

A propagação sexuada ocorre quando a semente é utilizada como estrutura de reprodução, sendo um meio comumente utilizado para se obter novas variedades. Em *helicônias*, as sementes devem estar maduras e recém-colhidas, necessitando de luz para germinar, tendo seu cultivo em ambientes úmidos, ensolarados e quentes, com temperatura ideal variando de 25 °C a 35 °C. Entre as principais vantagens da propagação sexuada, destacam-se a possibilidade de obtenção de plantas isentas de enfermidades, a conservação de bancos de germoplasma além de se tratar de um método pouco dispendioso (LAMAS, 2004).

Para a maioria das espécies, a germinação das sementes de *helicônias* ocorre no prazo de 120 dias, mas algumas chegam a até três anos. Essas também apresentam dormência devido à restrição mecânica, pois os frutos de algumas espécies são cobertos por um pericarpo duro, impedindo a sua germinação. Consequentemente, o período para florescimento de mudas propagadas por sementes se torna muito longo, além de que nem todas as espécies frutificam, e a maioria dos cruzamentos interespecíficos é incompatível (CASTRO, 1995).

Ademais, a propagação por sementes torna-se inviável em locais em que há ausência dos polinizadores específicos, além de ser um método inadequado quando se deseja manter as características fenotípicas acarretando em plantas e flores de corte de menor valor comercial, não se obtendo uma uniformidade na produção, o que implica em adversidades como o manuseio dificultado pelo peso da inflorescência (NANNETTI, 1994).

### 2.3.2 Propagação assexuada de *Helicônias*

As mudas de plantas da família *Heliconiaceae* são convencionalmente propagadas vegetativamente através de seus rizomas. Neste procedimento, segmentos do rizoma recém-colhido são cortados em uma porção de 15 a 30 centímetros do pseudocaule na vertical e, em seguida, partes danificadas e raízes mortas são retiradas. Enquanto os próprios pseudocauls morrerão, as raízes crescerão de suas bases e novos pseudocauls se desenvolverão a partir dos brotos da base (CRILEY, 1988). As plantas matrizes devem apresentar alta produtividade, vigor e sanidade, sendo considerado um rizoma ideal aquele que apresenta no mínimo três gemas, podendo ser plantados diretamente no campo ou em sacolas plásticas, e colocados sob irrigação e sombreamento entre 30% e 60%, facilitando o enraizamento (LAMAS, 2004).

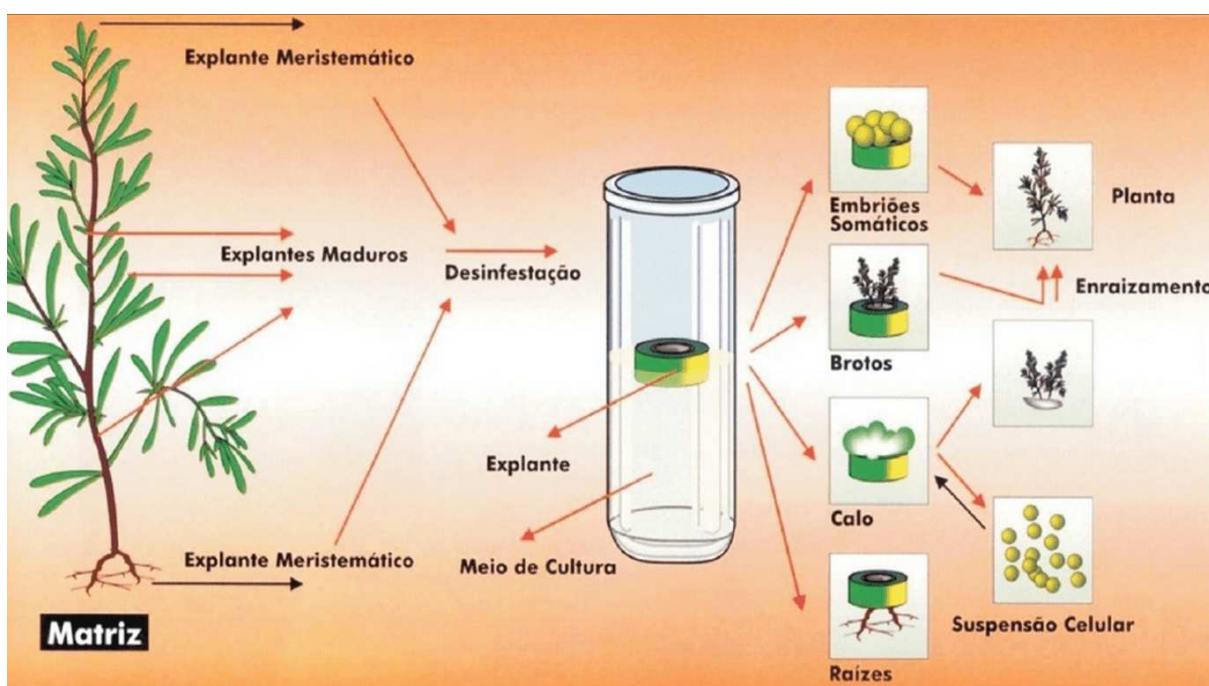
Contudo, esta prática possui desvantagens tais como o acesso a mudas ser limitado a determinadas épocas do ano (DEBIASI *et al.*, 2004), dificuldade de produção em larga escala e não possibilitar a variabilidade genética (NAKANO, 2008), além de problemas



fitossanitários, como a disseminação de doenças causadas por patógenos (vírus, fungos, bactérias e nematóides), fato que resultou na imposição de uma série de restrições para a importação de rizomas, principalmente após a identificação de cepas de *Pseudomonas solanacearum* (Smith) em plantas doentes obtidas a partir de rizomas (NATHAN *et al.*, 1992).

Outro método de propagação vegetativa é a cultura de tecidos *in vitro* (Figura 3) um conjunto de técnicas em que se utiliza pequenos fragmentos de uma planta, denominado de explantes (células, tecido ou órgão), cultivados em um meio nutritivo sob condições assépticas, e com luminosidade e temperatura controladas (SMITH, 2012; PIERIK, 1997). Como plantas cultivadas *in vitro* possuem metabolismo heterotrófico, logo elas necessitam de água, macro e micronutrientes e carboidrato, como fonte de carbono, para poderem crescer e se desenvolver (CARVALHO *et al.*, 2003).

Figura 3 - Princípio geral da cultura de tecidos vegetais.



Fonte: KERBAUY, 1997

Este método se baseia no princípio da totipotencialidade, em que uma única célula é capaz de desenvolver um organismo completo (COOPER, 2001). Teoricamente, é considerado que todas as células vegetais são capazes de responder aos estímulos e expressar totipotência, porém é possível que apenas algumas células de um explante se desenvolvam nas condições *in vitro* às quais foram expostas.

Diferenças na composição do meio de cultivo, temperatura, idade do explante, origem celular e taxas de crescimento podem explicar o comportamento de um determinado explante e não precisam representar uma característica geral das células vegetais em cultura. A capacidade de uma célula ou grupo de células de responderem a estímulos específicos é chamada de competência, enquanto que a determinação celular é o processo pelo qual a célula é direcionada a um desenvolvimento específico (TORRES *et al.*, 2000).

A cultura de tecidos tem sido uma excelente ferramenta ao longo dos anos, auxiliando e colaborando para o desenvolvimento da biotecnologia, atuando em diversas finalidades, tais quais: o crescimento de massas de células desorganizadas (calos) em ágar ou em suspensão líquida, amplamente empregadas em estudos bioquímicos e de crescimento (STREET, 1973 e 1966; BUTENKO, 1968; CAREW; STABA, 1965; PUHAN ; MARTIN, 1971; DAGLA, 2012; BHOJWANI; RAZDAN, 1986); cultura de segmentos de caules, raízes, folhas ou calos fornecendo sistemas para estudar diferenciação, morfogênese e regeneração de plantas (VASIL, I. K. ; VASIL, V., 1972; MURASHIGE, 1974; DIAS *et al.*, 2016); métodos de cultura de meristema apical que induzem à regeneração do organismo têm sido adotados para micropropagação de plantas e produção de estoques livres de vírus (QUAK, 1972; IKEUCHI *et al.*, 2016; RADHAKRISHNAN *et al.*, 2018); a cultura de anteras e pólen, fornecendo novas abordagens para a formação de plantas haplóides (KASHA, 1974; DWIVEDI *et al.*, 2015; HOVEIDA *et al.*, 2017); o isolamento e a cultura de protoplastos vegetais empregados na fusão e na hibridização de células somáticas (TEMPE, 1972; COCKING, 1972; GAMBORG *et al.*, 1974; CHALEFF ; CARLSON, 1974).

Muito além de uma técnica somente com objetivos comerciais, a cultura de tecidos oferece a possibilidade de obtenção de novos genótipos, de linhas celulares e híbridos que não poderiam ser obtidos por vias naturais devido as barreiras sexuais (CARVALHO; VIDAL, 2003), além de ser uma importante ferramenta para a produção de compostos ativos, como metabólitos secundários e moléculas modificadas por engenharia genética (ESPINOSA-LEAL *et al.*, 2018), bem como no melhoramento de diversas culturas que possuem baixa produtividade, dependência sazonal, alta suscetibilidade a doenças e baixa variação genética, como por exemplo, a de especiarias indianas (ALI; RAY, 2018).

### **2.3.3 Micropropagação de Helicônias**

A micropropagação ou propagação clonal *in vitro* é uma técnica de multiplicação rápida de plantas selecionadas utilizando o método de cultura de tecidos previamente descrito. Segundo Debergh e Zimmerman (1991), para uma micropropagação bem sucedida é necessário

seguir 5 estágios: o estágio preparatório, em que se busca cultivar as plantas matrizes selecionadas para a micropropagação em condições higiênicas, de forma a reduzir os problemas relacionados à contaminação; a escolha do explante, tendo em vista que a idade da planta matriz, a idade fisiológica do explante e seu estágio de desenvolvimento, bem como seu tamanho, podem determinar o sucesso do procedimento; o estágio de multiplicação, em que a cultura pode fornecer brotos para posterior propagação bem como o material necessário para manter o estoque, considerando também o número de subculturas, se a propagação é do tipo axilar ou adventícia, além do meio de cultivo utilizado; estágio de alongamento ou enraizamento, dependendo do objetivo da micropropagação; e a transferência para estufas ou aclimatização das mudas, sendo que a eficiência e sucesso desse estágio depende da qualidade da execução de todos os anteriores.

A técnica de micropropagação de mudas ou propagação *in vitro* tem sido desenvolvida em âmbito comercial em diversos países do mundo, tais como Holanda, França, Espanha e Japão, sendo utilizada no Brasil há aproximadamente 25 anos. A tecnologia de cultivo *in vitro* de plantas ornamentais, em especial a micropropagação, demonstra seu potencial devido à obtenção de materiais de plantio livres de doenças, bem como a superação do problema de dormência em rizomas e sementes e a obtenção de materiais de plantio para cultivar sob condições favoráveis em qualquer época do ano (SERAN, 2013). Essa técnica tem contribuído para a propagação em massa de mudas de alta qualidade genética, fitossanitária e em um curto período de tempo, conferindo a este material uma certificação de qualidade (MOREIRA *et al.*, 2012), além de possibilitar a realização de pesquisas de apoio às diferentes áreas da Biotecnologia, da Biologia, e da Agronomia, como principalmente a Genética, a Fitopatologia e a Fisiologia vegetal.

Entretanto, mesmo o custo-benefício sendo significativo, a técnica se torna onerosa pela necessidade de uma estrutura laboratorial diferenciada, mão-de-obra qualificada, equipamentos de alto custo e reagentes específicos para o preparo dos meios de cultivo que variam de acordo com a espécie e com o objetivo da micropropagação (TEIXEIRA *et al.*, 2012).

#### **2.3.3.1 Meio de Cultivo**

Os meios de cultivo utilizados para a propagação *in vitro* de plantas em geral é composto por nutrientes inorgânicos (macronutrientes e micronutrientes), fonte de C (carbono), suplementos orgânicos, vitaminas e um agente gelificante, podendo ter ou não reguladores de

crescimento (sintéticos ou fitohormônios) e outros aditivos, dependendo das necessidades de cada espécie (GAMBORG *et al.*, 1976).

Atualmente, o meio de cultivo mais utilizado em cultura de tecidos para a propagação de várias espécies vegetais é o MS (MURASHIGE ; SKOOG, 1962), embora sua concentração de nutrientes tenha sido identificada como elevada, principalmente quanto ao fornecimento de nitrogênio (COHEN, 1995). Outros diversos meios de cultura têm sido elaborados e testados ao longo dos anos, sendo a concentração de sais minerais o fator de maior variação (Tabela 1), de acordo com a espécie em questão e o propósito da cultura (cultura de meristemas, organogênese, embriogênese somática, dentre outros). Com tantas possibilidades, a escolha do meio de cultivo, bem como sua concentração mais adequada para a micropropagação da espécie alvo se faz oportuna para a obtenção de um bom desenvolvimento da cultura em condições de cultivo *in vitro* (MOREIRA *et al.*, 2012).

Tabela 1- Composição de diferentes meios de cultivo utilizados na cultura de tecidos *in vitro*.

Composição Nutricional	MS (1962)	WPM (1981) (mg/L)	SH (1972)	X (1998)
<b>Macronutrientes</b>				
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	400	0	0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0	0	300	500
KNO <sub>3</sub>	1900	0	2500	525
Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0	556	0	0
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370	370	400	375
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440	96	200	200
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	170	0	250
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0	990	0	0
<b>Micronutrientes</b>				
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27.8	27.8	15	27.8
Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	37.3	37.3	20	37.3
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	22.3	22.3	13.2	22.3
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8.6	8.6	1	8.6
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.3	6.2	5.0	6.3
KI	0.83	0	1.0	0.83
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.25	0.25	0.1	0.1
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.025	0.025	0.2	0.2
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.025	0	0.1	0.1
<b>Vitaminas</b>				
Inositol	100	100	100	100
Glycine	10	2	0	10
Thiamine.HCl	1	1	5	1
Ácido nicotínico	1	0.5	5	1
Pyridoxine.HCl	1	0.5	5	1
Sacarose (g/L)	30	30	30	30

Fonte: PALANISAMI *et al.*, (2001)

Entretanto, a maioria dos protocolos determinados para a cultura de tecidos, em especial para a micropropagação, ainda utiliza composições nutricionais definidas e estabelecidas sem considerar as necessidades nutricionais da espécie a ser cultivada, podendo

representar um fator limitante às respostas morfogênicas, ocasionando o insucesso do processo para espécies mais exigentes (SANTOS, 2015). Além disso, o meio MS apresenta em sua composição nutrientes utilizados em altas concentrações. Dentre eles, destacam-se o nitrato de amônio, antigamente utilizado como fertilizante, e atualmente tem sua compra regulada através da Portaria N° 42-COLOG, 28 de março de 2018, e o nitrato de potássio, regulado pela Portaria N° 09-D LOG, 25 de junho de 2004, acarretando na limitação da quantidade a ser adquirida pelas instituições.

Embora algumas pesquisas visem fornecer à indústria um protocolo de produção mais adequado para o cultivo de *Heliconia latispatha* como mudas micropropagadas (RODRIGUES *et al.*, 2016), ainda há muitos fatores que precisam ser determinados e melhorados. Ademais, pesquisas que investiguem condições mais adequadas de cultivo *in vitro* são economicamente relevantes, de forma a aumentar o custo-benefício para o comprador e o lucro para as empresas produtoras de plantas ornamentais através da micropropagação.

#### **2.3.3.2 Nutrição mineral**

Comumente, somente um tipo de formulação nutritiva é utilizada no cultivo *in vitro*, apesar dessa formulação não conter o fornecimento adequado de componentes minerais para os diferentes tipos de estágios do crescimento e desenvolvimento do explante. O suprimento inadequado de um elemento, seja excesso ou deficiência, pode resultar em prejuízos para o desenvolvimento vegetal e morfogênese. O excesso de nutrientes, por exemplo, pode provocar danos por salinidade, ocorrendo assim um desequilíbrio osmótico que afeta negativamente a absorção de água pelas raízes (GEORGE *et al.*, 2007). Dessa forma, os minerais parecem exercer um papel elementar na regulação da morfogênese de plantas e não somente no crescimento. O contínuo fornecimento, absorção, transporte e metabolismo dos diferentes minerais parece variar entre os estágios de desenvolvimento do tecido meristemático, organogênese, e de crescimento (RAMAGE ; WILLIAMS, 2002)

A divisão dos tipos de nutrientes não está relacionada à essencialidade, mas com a concentração requerida pelo organismo do elemento inorgânico, podendo ser macronutrientes, em que a planta necessita de uma quantidade maior, como o nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), magnésio (Mg), cálcio (Ca) e enxofre (S), e micronutrientes, demandados em menores quantidades, como o ferro (Fe), níquel (Ni), cloro (Cl), manganês (Mn), zinco (Zn), boro (B), cobre (Cu) e molibdênio (Mo) (GEORGE *et al.*, 2007).

Em condições de cultivo *ex vitro* as plantas absorvem os nutrientes inorgânicos de que necessitam do solo, enquanto que para suprir a necessidade no cultivo *in vitro*, eles são

adicionados ao meio de cultura como sais. Nos meios de cultura, os sais se dissociam em cátions e ânions. Assim, cálcio, magnésio e potássio são absorvidos pelas células vegetais como os respectivos cátions  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{K}^{2+}$ . O N é majoritariamente absorvido em forma de nitrato ( $\text{NO}^{-3}$ ), mas a captação na forma de amônia ( $\text{NH}^{+4}$ ) também ocorre. O P é absorvido como os íons fosfato  $\text{HPO}_4^{-2}$  e  $\text{H}_2\text{PO}^{-4}$ ; e o S como íon sulfato  $\text{SO}_4^{-2}$  (GEORGE *et al.*, 2007).

O nitrogênio (N) é o mineral mais abundante nas plantas, muito utilizado em fertilizantes juntamente com P e K para promover um melhor crescimento em menos tempo, e é responsável pela constituição da clorofila, de proteínas e ácidos nucleicos. Mesmo com a alta concentração de N no meio MS, esse elemento incrementa o desenvolvimento de brotos, do comprimento da raiz e nas massas fresca e seca durante o cultivo *in vitro* (WADA ; REED, 2017; AKBARI *et al.*, 2017).

Sriskandarajah (1990) analisou a influência de alguns macronutrientes, especialmente  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e  $\text{KNO}_3$  no desenvolvimento *in vitro* de raízes adventícias em cultivares de maçã. O experimento revelou uma relação de proporção inversa, de forma que quanto menor a concentração de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , maior a porcentagem de formação de raízes adventícias, enquanto altos níveis de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  induziram a formação de calos brancos nos explantes.

Além disso, embora plantas cultivadas em soluções nutritivas contendo apenas  $\text{NH}_4^{+}$  tenham níveis elevados de enzima PEP (enzima facilitadora a fixação de  $\text{CO}_2$  na fotossíntese) (ARNOZIS *et al.*, 1988), as proteínas nas folhas acumulam-se predominantemente no cloroplasto onde, na deficiência de N, a estrutura do cloroplasto é severamente afetada, acompanhada pela perda de clorofila (BARKER ; BRYSON, 2007).

O fósforo (P) é um macronutriente essencial para vários processos morfológicos, metabólicos e fisiológicos, dentre eles, destacam-se a composição dos ácidos nucleicos, fosfolipídios, ésteres de carboidratos e coenzimas, além de sua função no armazenamento e transferência de energia, sendo um componente essencial na formação do ATP (adenosina trifosfato) (GEORGE *et al.*, 2007). Em resposta à deficiência de fósforo, sinais bioquímicos são produzidos e afetam a arquitetura do sistema radicular, de forma a inibir o desenvolvimento da raiz primária e estimular o crescimento de raízes secundárias (HAM *et al.*, 2018).

Diniz *et al.* (1999) observaram que a maior absorção de fósforo ocorreu nos períodos iniciais de crescimento na micropropagação de *Musa* sp., de forma que as mudas poderiam extrair 75% do fósforo no meio de cultura no 30º dia, com a absorção cessando no 50º dia. Essa rápida absorção inicial de P também foi relatada por Ramage e Williams (2002) e, segundo esses autores, esse fenômeno indica que há alta demanda energética nos processos

iniciais de crescimento das plântulas, como o crescimento de explantes e a formação de novos brotos.

Além disso, a deficiência de nitrogênio e fósforo resulta no acúmulo de carboidratos nas folhas e está relacionado com a alta proporção de carbono nas raízes (HERMANS, 2006).

O potássio (K) é requerido em vários processos bioquímicos e fisiológicos que são responsáveis pelo crescimento e desenvolvimento da planta, contribuindo significativamente para o potencial osmótico das células, além de atuar como cofator em diversas enzimas, participar da síntese proteica e do metabolismo de carboidratos (GEORGE *et al.*, 2007).

A deficiência de potássio ocasiona consequências diversas no metabolismo da planta, de forma que nos aspectos morfológicos, a carência desse elemento resulta na perda de turgescência celular, tornando os tecidos flácidos e um aumento de suscetibilidade à seca, salinidade, dano por congelamento e ataque de fungos, além de reduzir tanto número quanto o tamanho das folhas. O número e a redução de tamanho das folhas aceleram a diminuição da taxa fotossintética por unidade de área foliar e, portanto, representam um decréscimo geral na quantidade de assimilados fotossintéticos disponíveis para o crescimento. Além disso, potássio controla a fotossíntese por meio da interceptação da luz solar. A área da superfície da folha e a interceptação da luz solar são reduzidas drasticamente quando K está abaixo do nível requerido pela planta (HASANUZZAMAN *et al.*, 2018).

O magnésio (Mg) é um cátion bivalente essencial na composição da molécula de clorofila, necessário para o funcionamento de várias enzimas como ATPases e RNA polimerases, está relacionado com a síntese orgânica e, assim como o potássio, atua no balanço eletrolítico, neutralizando ânions e ácidos orgânicos (GEORGE *et al.*, 2007).

A diminuição da atividade de enzimas envolvidas na assimilação de CO<sub>2</sub> está associada à inibição da fotossíntese sob condições deficientes em Mg, no entanto, muitos estudos mostraram que, antes de qualquer perda de atividade fotossintética, há um acúmulo de açúcar e amido em folhas deficientes em magnésio (HERMANS *et al.*, 2010; CAKMAK e KIRKBY, 2008). A supressão da concentração de clorofila e da atividade fotossintética seria consequência do acúmulo de açúcar nas folhas expostas à escassez de magnésio (HERMANS *et al.*, 2010; HERMANS; VERBRUGGEN, 2005). Consequentemente, um forte efeito inibitório sobre a capacidade fotossintética e de assimilação de CO<sub>2</sub> tem sido considerado uma resposta típica à baixa disponibilidade de magnésio.

O cálcio (Ca) está envolvido em processos estruturais e fisiológicos ligados à membrana celular, principalmente por se ligar covalentemente às pectinas, formando pectato de cálcio na lamela média, funcionando como “cimento” entre células adjacentes. Além disso,

esse elemento participa do crescimento da parte aérea e radicular. O cálcio possui diferentes funções dependendo do local onde se encontra, por exemplo, no vacúolo, presente como oxalato, fosfato, carbonato, atua na regulação do nível desses ânions. Já no citoplasma, mecanismos regulatórios são iniciados quando o cálcio se liga à proteína calmodulina, atuando como ativadora de enzimas (fosfodiesterase cíclica de nucleotídeo, ATPase de membrana e outras) (FAQUIN, 2005).

Ademais, grandes quantidades de cálcio podem ser depositadas fora do protoplasto, nos vacúolos celulares e nas paredes celulares, de forma que a calcificação acaba fortalecendo as paredes celulares das plantas, aumentando a resistência de uma planta à infecção. Esse elemento confere proteção contra os efeitos de metais pesados e transmite alguma resistência a condições excessivamente salinas e baixo pH (GEORGE *et al.*, 2007).

A deficiência desse elemento nas plantas resulta em crescimento radicular deficiente e no escurecimento e ondulação das margens das folhas apicais, frequentemente seguidas por uma cessação do crescimento e morte do ápice da parte aérea. Ferreira (2012) estudando sobre os sintomas da deficiência de macro e micronutrientes no cultivo *ex vitro* em uma variedade de milho, observou que na deficiência de cálcio houve diminuição acentuada no porte das plantas, além de necrose nas folhas mais jovens e posteriormente nas folhas mais velhas. Esse fenômeno é devido ao cálcio ser um elemento praticamente imóvel no floema e afetar primariamente as folhas mais novas da planta. Foi observado também o enverdeamento mais intenso nas folhas das plantas, devendo-se ao fato do crescimento ser mais afetado do que a síntese de clorofila, resultando em uma maior concentração desta nos tecidos.

Sabe-se também que a deficiência de cálcio interfere no processo fotossintético causando reduções na eficiência da carboxilação, capacidade fotossintética e rendimento quântico, o que pode explicar a redução da produção de biomassa das plantas afetadas (RAMALHO *et al.*, 1995)

O enxofre (S) é um macronutriente pouco disponível para a célula vegetal, de tal forma que sua absorção e homeostase são rigidamente controladas. Em meio de cultivo, o enxofre é assimilado pelas plantas na forma de sulfato ( $\text{SO}_4^{-2}$ ) pelas raízes e transportado até a parte aérea, além de possuir sua captação acoplada a assimilação do N (GEORGE *et al.*, 2007; REUVENY *et al.*, 1980).

A forma metabolicamente útil de enxofre para uma planta é o sulfeto ( $\text{S}^{-2}$ ), que provém da redução do  $\text{SO}_4^{-2}$  nos cloroplastos. Consequentemente, esse sulfeto é incorporado na cisteína (Cys), que se torna o primeiro produto de S reduzido em C/N e serve como um doador de S na célula da planta (DAVIDIAN ; KOPRIVA, 2010). O enxofre, sendo um



constituente da cisteína e da metionina e uma variedade de outros metabólitos (por exemplo, glutatona, fitoquelatinas, ferredoxina, tioredoxina) bem como formando aglomerados com ferro (Fe), desempenha um papel em processos cruciais na célula vegetal, como a biossíntese, montagem e regulação de atividade de proteínas, defesa antioxidante, tolerância a toxinas, fotossíntese e respiração. Quando as plantas são cultivadas sob condições de baixo teor de enxofre, a síntese de absorção de sulfato e cisteína (Cys) é ativada para sobrevivência (MARUYAMA-NAKASHITA *et al.*, 2004).

### 2.3.3.3 Fotoperíodo

É definido como fotoperíodo o intervalo no período de 24 horas ao qual a planta está exposta à uma determinada quantidade de luz, sendo responsável por influenciar parâmetros como crescimento vegetativo, germinação de sementes, formação e desenvolvimento de órgãos de reserva (ZAIDAN, 1987), florescimento, indução da expressão dos processos reprodutivos, de forma que na ausência do fotoperíodo adequado, algumas espécies podem continuar no estágio de crescimento vegetativo indefinidamente, levando ao gigantismo, bem como pode haver a indução do florescimento e da frutificação precocemente quando as plantas são expostas ao fotoperíodo adequado antecipadamente (TIAN *et al.*, 2018).

O fotoperiodismo pode ser definido como o conjunto de respostas às mudanças na duração diária de luz e escuridão que permitem que os organismos se adaptem às alterações sazonais em seu ambiente. Essas respostas ocorrem quando a duração do dia ou da noite é maior ou menor que um valor limite (também chamado de valor crítico) necessário para o funcionamento normal do organismo, de tal forma que as respostas fotoperiódicas exigem um mecanismo de medição de tempo, ao qual está estreitamente acoplado um sistema de fotopercepção (LUMSDEN, 2002).

Existe uma variedade de respostas à duração da incidência luminosa, sendo às relacionadas ao florescimento as de maior interesse das pesquisas encontradas na literatura (SONG *et al.*, 2015). Entretanto, os efeitos das variações do fotoperíodo não se limitam a esse parâmetro, possuindo como fotoperiodismo as alterações em reações fotossintéticas e o acúmulo de carboidratos não estruturais em folhas (LIU *et al.*, 2018).

Dentre esses carboidratos estão a sacarose e o amido, os principais produtos finais da fotossíntese. Enquanto a sacarose é a forma primária de transporte de carboidratos, o amido é uma molécula de reserva, cujo acúmulo nos cloroplastos se dá de forma temporária, de forma que no escuro, essas reservas de amido são mobilizadas como forma de suporte para a continuação da síntese de sacarose. Em muitas espécies, as plantas que crescem sob dias curtos

têm maiores taxas de acumulação e concentração de amido e uma taxa de translocação mais baixa do que aquelas cultivadas sob fotoperíodo longo. Logo, esse acúmulo permite que plantas cresçam em fotoperíodos curtos, de forma a sustentar suas necessidades metabólicas, como a respiração e a translocação, durante o período noturno. Contudo, em algumas outras espécies tem sido sugerido que o aumento do fotoperíodo pode reduzir a taxa de crescimento e a eficiência fotossintética induzindo o acúmulo de amido e açúcares solúveis (HUBER, 1984; DORAIS *et al.*, 1996).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar o efeito de diferentes concentrações de macronutrientes do meio de cultivo MS e do regime de fotoperíodo na produção de mudas micropropagadas de *Heliconia latispatha* Bentham cv. Orange Gyro por meio de análises morfológicas, histológicas e fisiológicas na fase de indução de alongamento e enraizamento *in vitro*.

#### **3.2 Objetivos específicos**

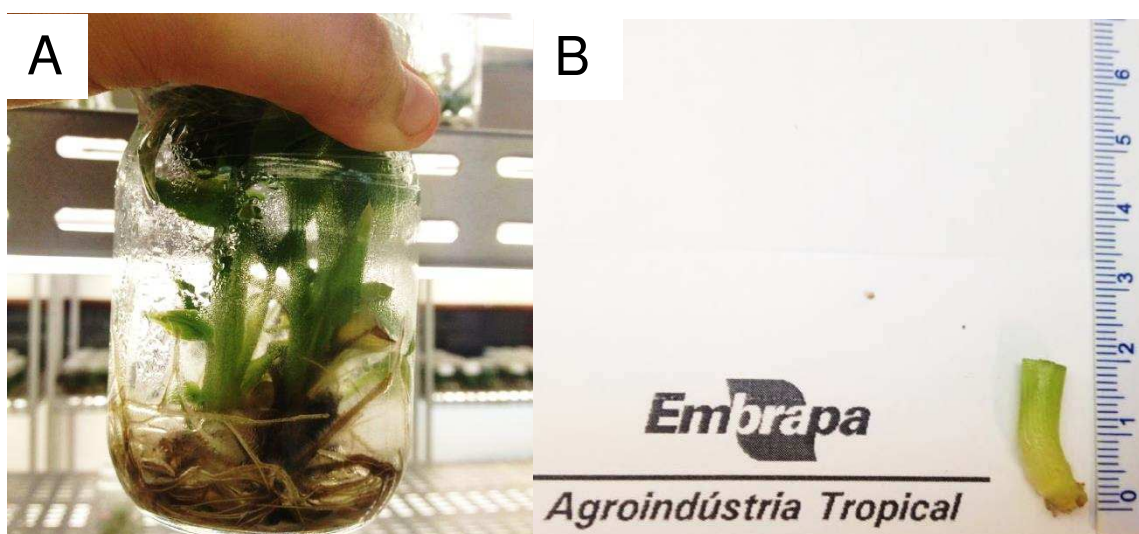
Avaliar os efeitos das concentrações de macronutrientes (25%, 50%, 75% e 100%) do meio de cultivo MS e dos fotoperíodos (12 e 16 horas de luz diária), em relação: às características morfológicas (altura da planta, número de folhas, diâmetro do pseudocaule, tamanho da maior raiz, e massas fresca e seca da muda); à espessura transversal da folha, por meio de microscopia óptica; e à quantificação do teor de clorofila nas folhas.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Material vegetal

Como fonte de explante utilizou-se mudas de *Heliconia latispatha* Bentham cv. Orange Gyro obtidas a partir da germinação prévia *in vitro* de sementes, em meio de cultivo MS suplementado com 2,5 mg L<sup>-1</sup> BAP (6-benzilaminopurina) em fotoperíodo de 16 horas diárias de incidência luminosa (Figura 4A). Foram utilizados como explantes brotações de tamanho aproximado de 2 cm, cujas folhas e raízes foram retiradas, mantendo-se intacto o meristema (Figura 4B).

Figura 4- **A:** Mudas micropropagadas de *Heliconia latispatha* Bentham cv. Orange Gyro obtidas a partir da germinação *in vitro* de sementes usadas como fonte de explantes; **B:** Explante utilizado no experimento: brotação de *Heliconia latispatha* Bentham cv. Orange Gyro com tamanho aproximado de 2 cm, sem folhas e sem raízes.



Fonte: elaborado pela autora (2018)

### 4.2 Formulações do Meio de Cultivo

A formulação dos meios de cultivo foi feita de acordo com o protocolo de preparação do meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com diferentes concentrações de macronutrientes (25%, 50%, 75% e 100%). Todos os meios testados foram suplementados com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 1,8 g L<sup>-1</sup> de Gelrite. Os meios de cultivos foram distribuídos em frascos de vidro com capacidade de 220 mL com 30 mL de meio de cultivo por frasco. Os frascos foram

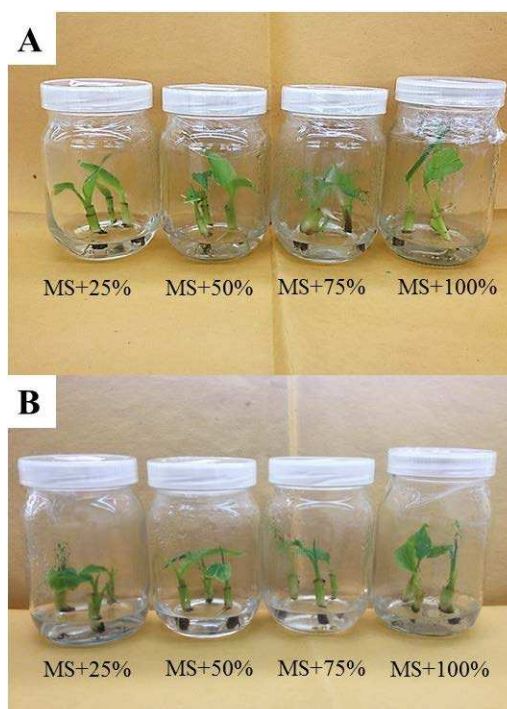
vedados com tampas de polipropileno e autoclavados a 121°C e pressão de 1 kgf cm<sup>-2</sup> por 15 min. Após a autoclavagem, os frascos contendo o meio de cultivo foram armazenados em sala a temperatura ambiente até a instalação do experimento.

#### 4.3 Delineamento experimental

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais localizado na Embrapa Agroindústria Tropical.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em esquema 4 x 2, sendo quatro concentrações de macronutrientes do meio de cultivo MS T1 (25%), T2 (50%), T3 (75%) e T4 (100%) e dois fotoperíodos (12 horas e 16 horas de luz diária), totalizando 8 tratamentos. Foram utilizadas 6 repetições (frascos) por tratamento, sendo uma unidade experimental constituída por um frasco contendo três explantes. Após a inoculação dos explantes (brotações), os frascos foram vedados com tampas de polipropileno e parafilme, sendo mantidos em duas salas de crescimento com temperatura de 24 ± 2 °C, com fotoperíodos de 16 horas e 12 horas, de acordo com o tratamento, ambas sob intensidade luminosa de 30 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> (Figura 5).

Figura 5- Brotações de *Heliconia latispatha* Benthham cv. Orange Gyro aos 15 dias de cultivo *in vitro* nos fotoperíodos de **A**) 12 horas e **B**) 16 horas, sendo T1 (25%), T2 (50%), T3 (75%) e T4 (100%) de concentrações de macronutrientes do meio de cultivo MS.



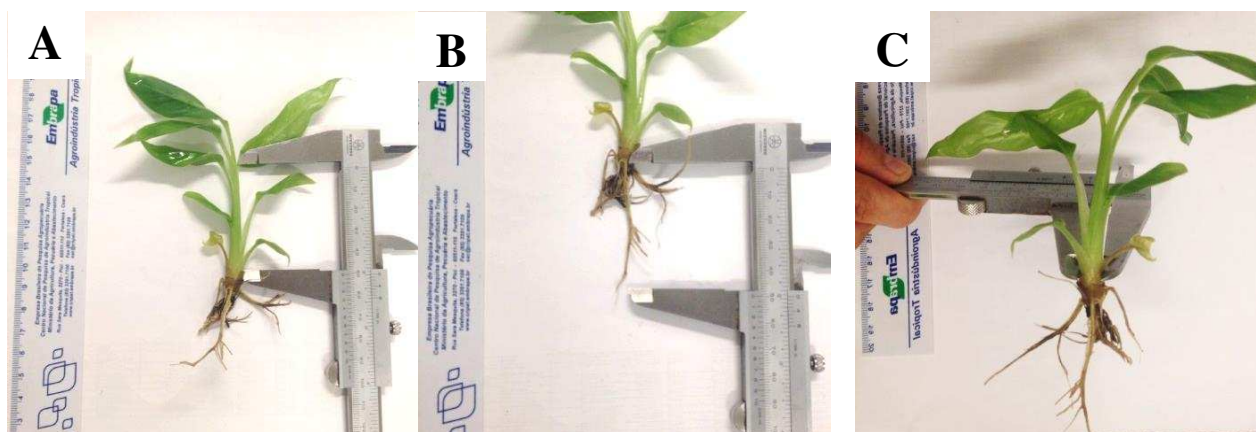
Fonte: a autora (2018)

#### 4.4 Análises morfológicas

Ao final de 35 dias de cultivo *in vitro*, as mudas foram retiradas dos frascos e lavadas com água corrente até a retirada do meio de cultivo aderido principalmente às raízes, e em seguida realizou-se as análises morfológicas através da medição da altura da muda, diâmetro do pseudocaule e tamanho da maior raiz com o auxílio de um paquímetro. O número de folhas foi avaliado pela contagem individualmente, por muda, desconsiderando-se as folhas senescentes da parte basal do pseudocaule (Figura 6).

Para a determinação da massa fresca da muda, os explantes foram pesados individualmente em uma balança de precisão. Em seguida, cada muda foi identificada e colocada em um envelope de papel kraft, e levada para secagem em estufa a 60 °C durante 5 dias. Após a secagem, cada muda foi pesada para obtenção do valor de massa seca. Os dados foram submetidos à análise de variância pelo método Two-way ANOVA com pós-teste de Tukey, com nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ) no programa GraphPad Prism 7 (San Diego, CA, EUA).

Figura 6- Análises morfológicas efetuadas em muda de *Heliconia latispatha* Bentham cv. Orange Gyro. **A)** medição da altura; **B)** medição da maior raiz; **C)** medição do diâmetro do pseudocaule.



Fonte: elaborado pela autora (2018)

## **4.5 Análises histológicas por microscopia óptica**

### **4.5.1 Inclusão do material em resina**

Para a análise histológica, foram selecionadas aleatoriamente 3 repetições (frascos) de cada tratamento e retiradas amostras de 3 mudas contidas nas repetições, totalizando 9 amostras por tratamento. Cada amostra foi representada por um quadrado de aproximadamente 0,5 cm<sup>2</sup> contendo a nervura central da folha. O método de inclusão do material em resina, para posterior corte e coloração, teve início pelo armazenamento das amostras foliares em fixador Karnovsky sem glutaraldeído (KARNOVSKY, 1964) durante 24 horas, em geladeira, seguido pela lavagem em tampão fosfato pH 6,8 durante 10 minutos por 3 vezes. Em seguida, as amostras foram lavadas com água destilada rapidamente por 3 vezes e depois desidratadas em uma série de bateria etílica (50%, 60%, 70%, 80%, 90% e 100%), com um intervalo de 1 hora entre as lavagens e troca de porcentagem etílica. Após a submissão das amostras à bateria de álcool, elas foram mantidas na solução de pré-infiltração (1:1 solução de infiltração/álcool etílico) durante 48 horas, em geladeira. Em seguida, deixou-se o material na solução de infiltração durante 48 horas, em geladeira. Posteriormente, incluiu-se o material em resina (historesina) em pequenas placas de plástico, por 24 horas, de forma que a amostra ficasse na posição perpendicular ao fundo da placa para facilitar a visualização ao microscópio da espessura foliar, até a secagem e montagem dos blocos para posterior seccionamento no micrótomo.

### **4.5.2 Seccionamento no micrótomo**

Os blocos de resina contendo a amostra foliar foram identificados seguindo a ordem: tratamento-repetição-fotoperíodo e feitos em duplicata, totalizando 18 blocos por tratamento. O corte no micrótomo (SLEE maiz CUT 5062) foi de 6 µm, sendo feitas aproximadamente 4 lâminas de cada repetição.

### **4.5.3 Coloração das lâminas contendo a amostra e análise da espessura foliar**

Para o procedimento de coloração, cada amostra foi submetida ao protocolo de reação do PAS (Periodic Acid-Schiff) para polissacarídeos neutros, como amido, glicogênio, e ácidos e radicais glicídicos de glicoproteínas, de forma a demarcar a parede celular para medição e análise (MAIA, 1979). As lâminas foram visualizadas em microscópio OLYMPUS BX41, fotografadas com câmera digital modelo OLYMPUS UC30 e foram realizadas 45

medições da espessura do material foliar de cada tratamento pelo software Cell<sup>^</sup>B. Os dados foram submetidos à análise de variância pelo método Two-way ANOVA com pós-teste de Tukey, com nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ) no software GraphPad Prism 7 (San Diego, CA, EUA).

#### 4.6 Análises quantitativas de clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila total e carotenoides

Para as análises quantitativas dos teores de clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila total e carotenoides, como amostra, foi retirada a folha mais jovem de cada explante da unidade experimental, totalizando 4 repetições por tratamento, com as análises realizadas em duplicata. Estas amostras foram submersas em 5 mL de Dimetilsulfóxido (DMSO), solvente utilizado para extração de clorofila, e mantidas em tubos de ensaio cobertos com papel alumínio, de forma a bloquear a passagem de luz e consequentemente diminuir as taxas de degradação da clorofila.

Posteriormente, as amostras foram submetidas em banho-maria, à 75°C durante três horas e trinta minutos, até completa descoloração do material foliar. Em seguida, uma alíquota de 2 mL de DMSO foi retirada de cada amostra, posta em uma cubeta de vidro de 3 cm<sup>3</sup>, onde foram feitas, colorimetricamente as leituras de absorbância (%) para as faixas de comprimentos de ondas de 665 nm, 649 nm e 480 nm, utilizando-se como o branco (controle) apenas o DMSO.

Cada amostra foliar foi acondicionada em papel kraft e seca em estufa a 65°C durante 3 dias, e sua massa seca pesada numa balança analítica. Após a obtenção dos dados, estes foram submetidos às equações 1, 2, 3 e 4 para determinar os teores de clorofilas *a* e *b*, e carotenoides em µg de clorofila por grama de folha em 5 mL de DMSO, de acordo com Wellburn (1994).

$$Ca = (12,47 \times A_{665}) - (3,62 \times A_{649}) \quad (1)$$

$$Cb = (25,06 \times A_{649}) - (6,5 \times A_{665}) \quad (2)$$

$$Ct = (7,15 \times A_{665}) + (18,71 \times A_{649}) \quad (3)$$

$$\text{Carotenoides} = ((1000 \times A_{480}) - (1,29Ca) - (53,78Cb)) / 220 \quad (4)$$

Sendo:

Ca: quantidade de clorofila *a*, em (µg/mL/g de massa seca);

Cb: quantidade de clorofila *b*, em (µg/mL/g de massa seca);

Ct: quantidade de clorofila total, em (µg/mL/g de massa seca);

e  $A_{649}$ ,  $A_{665}$  e  $A_{480}$ : absorbância indicada no comprimento de onda.



#### **4.7 Análises estatísticas**

Para o tratamento dos dados obtidos foi realizada a análise de variância de dois fatores (Two-way ANOVA), utilizada quando se tem uma variável mensurável e duas variáveis nominais (fatores). No presente estudo, as variáveis mensuráveis foram cada característica morfológica, histológica e fisiológica, e as duas variáveis nominais foram o fotoperíodo e a concentração de macronutrientes do meio de cultivo. Ademais, foi realizado o teste de Tukey, aplicado para executar comparações entre todos os possíveis pares de médias, baseando-se na diferença mínima significativa. Logo, enquanto a análise de variância rejeita ou não a hipótese de igualdade de médias populacionais de diversos grupos, o teste de Tukey determina quais grupos têm médias estatisticamente diferentes. Portanto, os dados foram submetidos à análise de variância pelo método Two-way ANOVA com pós-teste de Tukey, com nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ) no software GraphPad Prism 7 (San Diego, CA, EUA).

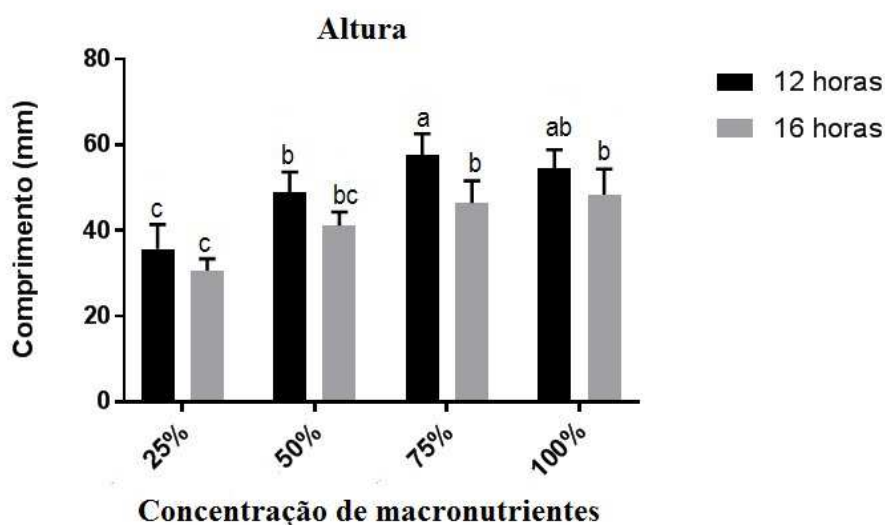
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Características morfológicas

Ao analisar a altura das mudas aos 35 dias após a implantação do experimento, observou-se que nos tratamentos de 75%-12h e 100%-12h, as médias obtidas foram as mais altas dentre todos os tratamentos, porém não houve diferença estatística significativa entre eles.

Apesar do tratamento 50%-12h necessitar de menos macronutrientes e de um menor período de incidência luminosa, sua média de altura não foi tão alta quando comparada com a do tratamento 75%-12h, indicando que provavelmente a baixa concentração desses nutrientes foi um fator limitante para o desenvolvimento das brotações. Ulisses *et al* (2010) ao testarem formulações de meios de cultivo diferentes para a propagação *in vitro* de embriões zigóticos de *Heliconia bihai*, puderam constatar que o melhor desenvolvimento ocorreu no meio de cultivo MS meia força com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, sem reguladores de crescimento, demonstrando que em outras espécies de helicônias, a diferenciação e crescimento dos brotos ocorrem de forma adequada mesmo em concentrações menores de macronutrientes. Logo, dentre todos os tratamentos, o de fotoperíodo de 12 horas com 75% de macronutrientes se evidencia como o mais indicado, com sua média estatisticamente mais alta, se desenvolvendo tão bem quanto na concentração recomendada desse meio de cultivo no fotoperíodo de 12 horas (Figura 7).

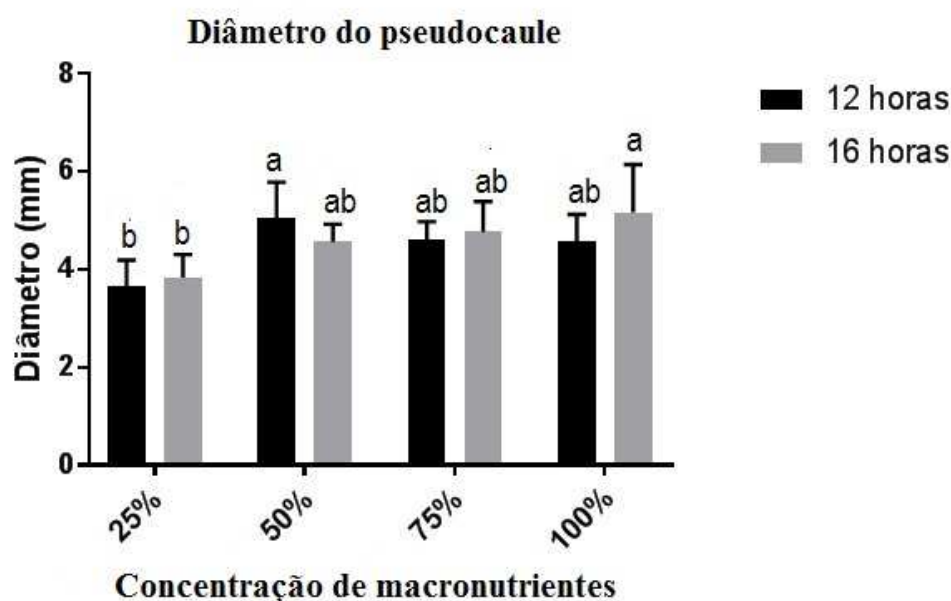
Figura 7- Média da altura das mudas micropropagadas de *Heliconia latispatha* Bentham cv. Orange Gyro em meios de cultivo contendo diferentes concentrações de macronutrientes e nos fotoperíodos de 12 e 16 horas, aos 35 dias de cultivo *in vitro*.



\*Médias com letras iguais, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey.  
Fonte: Elaborado pela autora.

Em relação ao diâmetro do pseudocaule, a maior média obtida foi a do tratamento 100%-16h, com 5,16 mm, e a segunda maior foi do tratamento 50%-12h, com 5,06 mm. Novamente, a concentração de 25%, independentemente do fotoperíodo, parece ter sido limitante para o desenvolvimento da muda. Como os tratamentos com 50% de macronutrientes não obtiveram diferenças significativas entre si, pode-se indicar o meio com 50% de macronutrientes no fotoperíodo de 12 horas como o mais recomendado, de forma a não afetar o diâmetro do pseudocaule das mudas cultivadas *in vitro* de *Heliconia latispatha* Benth. cv. Orange Gyro, embora esse parâmetro nesse tratamento não tenha sido diferente dos valores registrados para as concentrações de 75% e 100% de macronutrientes, independentemente do fotoperíodo (Figura 8).

Figura 8- Média do diâmetro do pseudocaule de mudas micropropagadas *Heliconia latispatha* Benth. cv. Orange Gyro em meios de cultivo MS contendo diferentes concentrações de macronutrientes e nos fotoperíodos de 12 e 16 horas, aos 35 dias de cultivo *in vitro*.



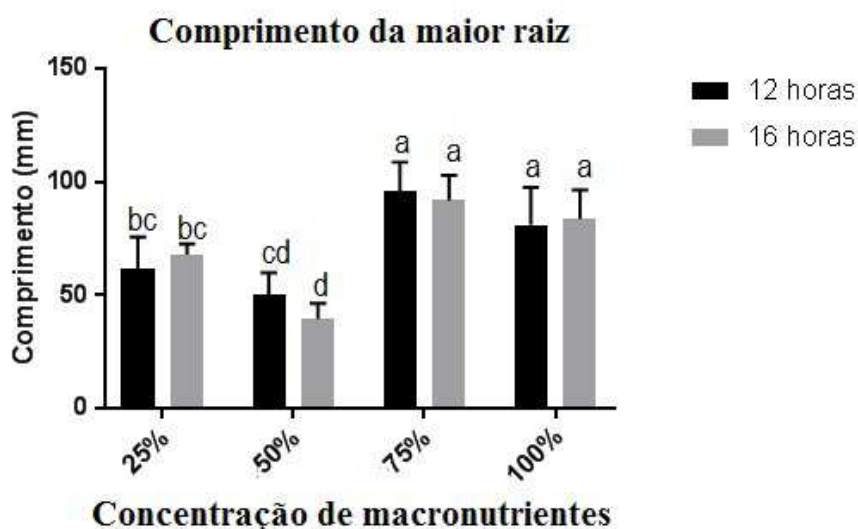
\*Médias com letras iguais, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey.

Fonte: Elaborado pela autora.

Em todas as concentrações de macronutrientes não houve diferenças estatísticas significativas quando comparadas as mesmas concentrações em fotoperíodos diferentes, de 12 e 16 horas. Os menores valores do comprimento da maior raiz foram registrados nos tratamentos contendo apenas 25% e 50% da concentração dos macronutrientes, indicando que

essas concentrações foram limitantes para o desenvolvimento das raízes. Entretanto, as concentrações maiores dos tratamentos 75%-12h, 75%-16h, 100%-12h e 100%-16h não diferiram entre si, sugerindo serem adequadas no suprimento de nutrientes às brotações (Figura 9).

Figura 9- Média do comprimento da maior raiz de mudas micropropagadas *Heliconia latispatha* Benthham cv. Orange Gyro em meios de cultivo MS contendo diferentes concentrações de macronutrientes e nos fotoperíodos de 12 e 16 horas, aos 35 dias de cultivo *in vitro*.



\*Médias com letras iguais, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey.

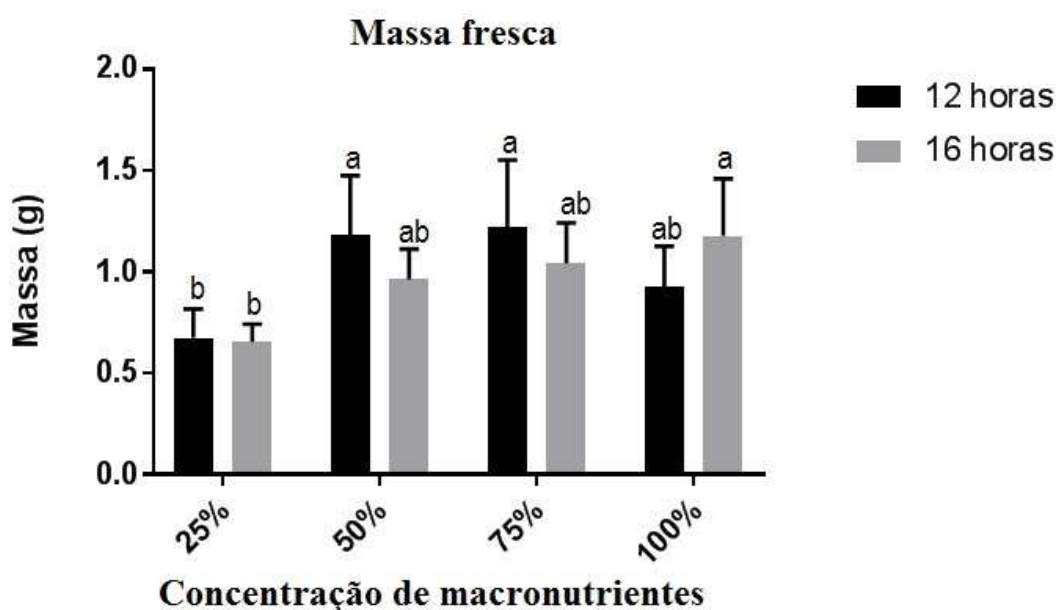
Fonte: Elaborado pela autora.

Estes resultados demonstram que o desenvolvimento radicular não foi afetado pela diferença dos fotoperíodos, entretanto, em relação as concentrações de macronutrientes, possivelmente nos meios 25% e 50%, em ambos fotoperíodos, os explantes tiveram deficiência de fósforo (P). A literatura cita que em resposta à deficiência de P, a arquitetura do sistema radicular é afetada, de forma a inibir o desenvolvimento da raiz primária e estimular o crescimento de raízes secundárias, corroborando com o presente estudo (HAM *et al*, 2018). Além disso, Diniz *et al.* (1999) constataram que a maior absorção de P ocorreu nos períodos iniciais de crescimento de *Musa spp.*, havendo um decréscimo de 75% do P no meio de cultura no 30º dia. Provavelmente nesse estudo, o P presente no meio de cultivo ao fim do 35º dia nas formulações contendo 25% e 50% de macronutrientes, já não estivesse presente em concentrações disponíveis e suficientes para o suprimento dos explantes. Consequentemente, foi observado que nas concentrações de 75% e 100%, independentemente do regime luminoso,

as brotações apresentaram os maiores valores para o comprimento da maior raiz, indicando que a partir de 75% de macronutrientes, as necessidades fisiológicas dos explantes são supridas.

A análise das massas frescas das brotações desenvolvidas contendo apenas 25% da concentração de macronutrientes do meio de cultivo MS apresentaram as menores médias, em qualquer um dos fotoperíodos utilizados. Esse comportamento sugere que esta concentração tenha sido insuficiente para o desenvolvimento adequado das mudas. Embora o tratamento 75%-12h tenha alcançado a média mais alta, com 1,22 g de massa fresca, não diferiu estatisticamente daqueles com concentrações de 50% e 100% (Figura 10).

Figura 10- Média da massa fresca de mudas micropropagadas *Heliconia latispatha* Benthham cv. Orange Gyro em meios de cultivo MS contendo diferentes concentrações de macronutrientes e nos fotoperíodos de 12 e 16 horas, aos 35 dias de cultivo *in vitro*.

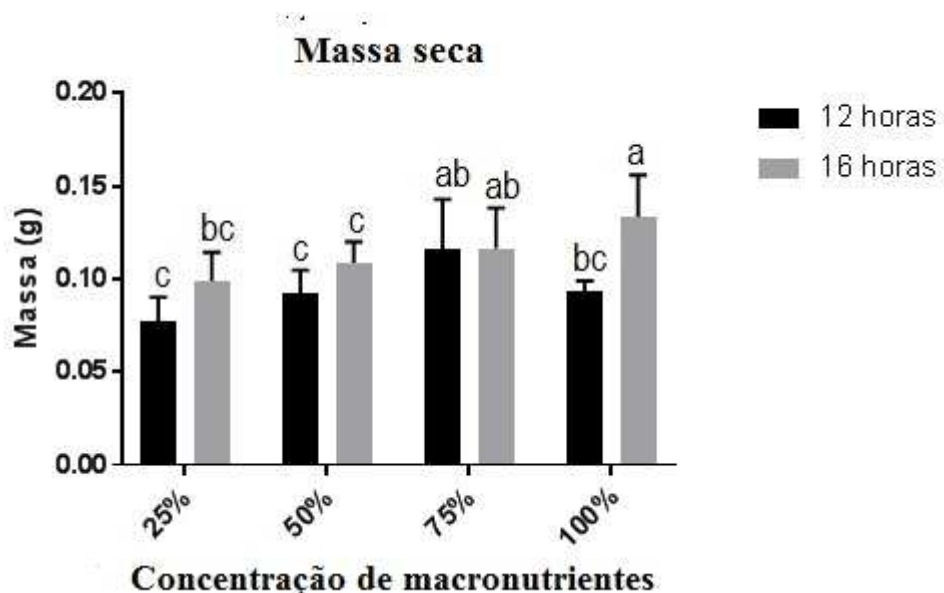


\*Médias com letras iguais, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey.

Fonte: Elaborado pela autora.

As menores médias das massas secas foram registradas nos tratamentos 25% e 50% da concentração de macronutrientes, inferindo que elas foram limitantes ao desenvolvimento adequado das mudas. Embora as brotações cultivadas no meio MS, contendo a concentração padrão, sob fotoperíodo de 16 horas, tenham alcançado as maiores massas secas, o tratamento com a concentração de 75% de macronutrientes no fotoperíodo de 12 horas demonstrou ser suficiente para o bom desenvolvimento das mudas, necessitando de menos macronutrientes e menor tempo de exposição luminosa (Figura 11)

Figura 11- Média da massa seca de mudas micropropagadas *Heliconia latispatha* Bentham cv. Orange Gyro em meios de cultivo MS contendo diferentes concentrações de macronutrientes e nos fotoperíodos de 12 e 16 horas, aos 35 dias de cultivo *in vitro*.

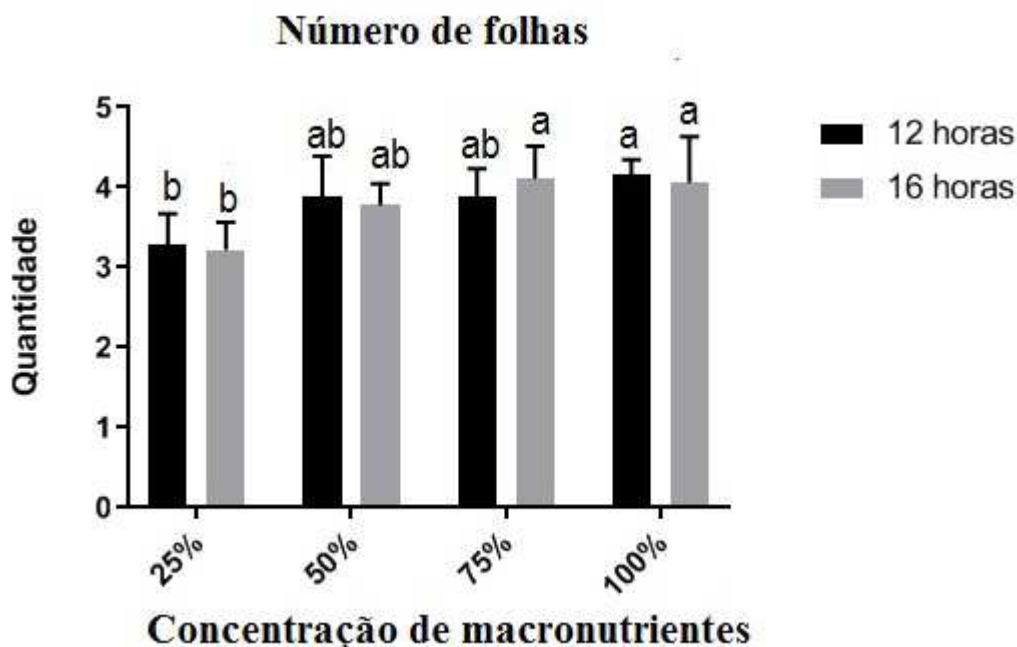


\*Médias com letras iguais, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey.

Fonte: Elaborado pela autora.

Segundo a análise realizada entre as médias do número de folhas, inferiu-se que houve diferenças estatísticas significativas entre as brotações mantidas nos meios contendo as concentrações de 25% e 100% em qualquer um dos regimes estudados. Esse comportamento provavelmente indica que a menor concentração testada não permitiu o desenvolvimento adequado das mudas também nesse parâmetro. Embora o número de folhas das mudas mantidas na concentração recomendada do meio de cultivo MS não tenha diferido estatisticamente daquelas crescidas em 50% e 75% de concentração de macronutrientes, possivelmente a partir da concentração de 50% de macronutrientes, a muda passa a produzir folhas em quantidades que não divergem do tratamento de maior média, em ambos os fotoperíodos (Figura 12).

Figura 12- Média do número de folhas de mudas micropropagadas *Heliconia latispatha* Benthham cv. Orange Gyro em meios de cultivo contendo diferentes concentrações de macronutrientes e nos fotoperíodos de 12 e 16 horas, aos 35 dias de cultivo *in vitro*.



\*Médias com letras iguais, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey.

Fonte: Elaborado pela autora.

## 5.2 Análise das concentrações de clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila total e carotenoides

A concentração de clorofila *a* nas folhas de mudas micropropagadas de *Heliconia latispatha* Benthham cv. Orange Gyro revelou após análise que nos tratamentos 25%-12h, 25%-16h, 50%-12h, 50%-16h e 100%-16h não houve diferença estatística significativa, assim como entre os tratamentos 25%-16h, 50%-12h, 50%-16h, 75%-12h, 75%-16h e 100%-12h.

Enquanto no fotoperíodo de 12 horas houve uma redução estatística significativa nos valores das concentrações de todos os pigmentos fotossintetizantes a medida em que ocorria o aumento da concentração de macronutrientes, no fotoperíodo de 16 horas não houve divergência para as médias de clorofila *b*, clorofila total e carotenoides, apenas para os valores das concentrações de clorofila *a*.

Sob condições fotoautotróficas, as plantas desenvolvem-se através do suprimento de apenas substâncias inorgânicas ou sem fornecimento de carboidratos. O termo autotrófico geralmente implica fotoautotrófico, mas não necessariamente. Quase todas as plantas

clorofiladas são fotoautotróficas quando crescem em condições *ex vitro*, onde não são fornecidos quaisquer carboidratos no solo (AITKEN-CHRISTIE *et al.*, 1995).

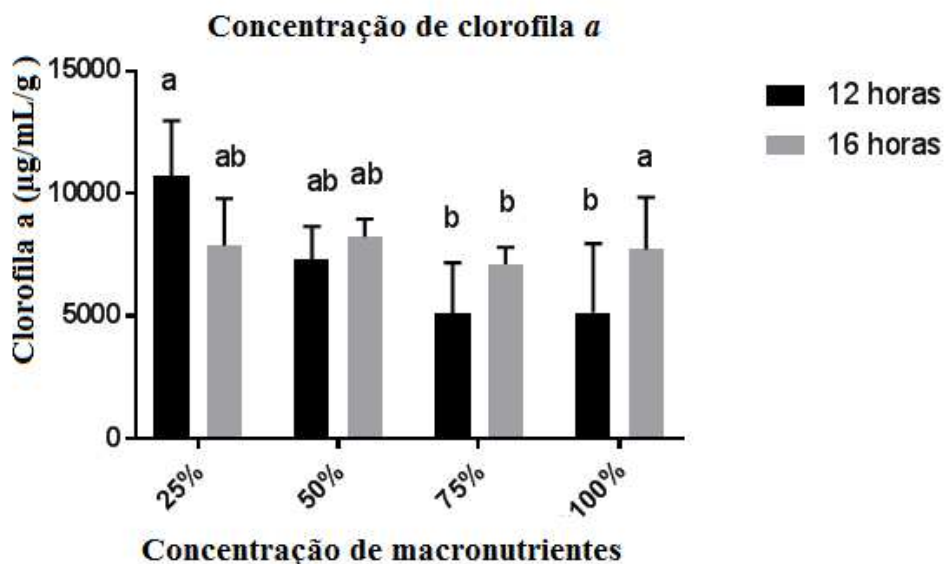
As plantas são chamadas de "heterotróficas" quando vivem com um suprimento de carboidratos como fonte de carbono, porém não são inteiramente dependentes da fotossíntese. Enquanto, que as plantas são denominadas de "fotomixotróficas" quando vivem com suprimento de CO<sub>2</sub> e carboidratos. Plantas em condições *in vitro* passam a ter comportamento heterotrófico ou mixotrófico, sendo assim determinado pela quantidade de fotossíntese efetuada pela cultura (DIGNART, 2006). Se o os níveis de CO<sub>2</sub> ou a fonte de irradiação estiver abaixo de um limite mínimo, a fotossíntese alcança seu ponto de compensação, onde a taxa de acúmulo de matéria seca é inadequada para manter a respiração. O comportamento mixotrófico normalmente é resultante de taxas inadequadas de fotossíntese ou da presença de uma fonte de carboidrato, conseqüentemente, passando de autotrófico a mixotrófico, necessitando parcialmente da sacarose no meio de cultivo e dos compostos produzidos através da fotossíntese mesmo que em pouca quantidade (AITKEN-CHRISTIE *et al.*, 1995).

Além disso, o aumento da concentração do teor dos pigmentos do cloroplasto (clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides) em períodos de pouca luz pode ser um mecanismo de aclimatização para aumentar a absorção quântica sob condições de fotoperíodo limitado. Durante a fotossíntese, os pigmentos que compõem o “complexo antena” como carotenoides, clorofila *b* e clorofila *a*, canalizam a energia luminosa e a transferem ao centro de reação (FERNÁNDEZ-MARÍN *et al.*, 2018). O aumento nas quantidades de pigmentos de cloroplasto em mudas cultivadas em fotoperíodos de curta duração podem ter maximizado as moléculas do complexo antena como um mecanismo compensatório para a fotossíntese de estado estacionário, semelhante a plantas que crescem em baixa intensidade luminosa (JO *et al.*, 2008).

Dessa forma, quando os explantes foram mantidos sob 12 horas de luz, caracterizando-se como condições de fotoperíodo inadequadas, e em uma baixa concentração de macronutrientes, esses provavelmente passaram a aumentar a taxa fotossintética, conseqüentemente aumentando as concentrações dos pigmentos fotossintetizantes como forma de compensar a baixa quantidade de horas de luz e a menor concentração de macronutrientes.



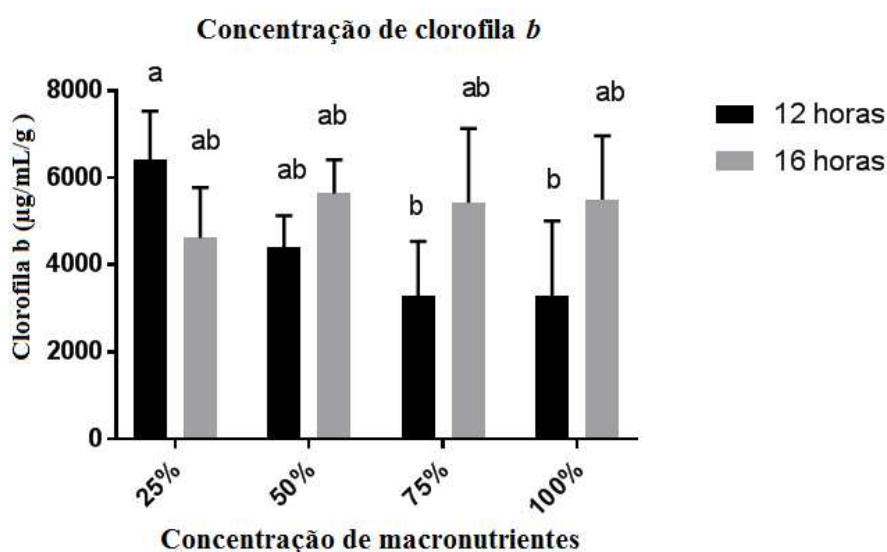
Figura 13- Médias da concentração de clorofila *a* em folhas de mudas micropropagadas *Heliconia latispatha* Bentham cv. Orange Gyro em meios de cultivo MS contendo diferentes concentrações de macronutrientes e nos fotoperíodos de 12 e 16 horas, aos 35 dias de cultivo *in vitro*.



\*Médias com letras iguais, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey.

Fonte: Elaborado pela autora.

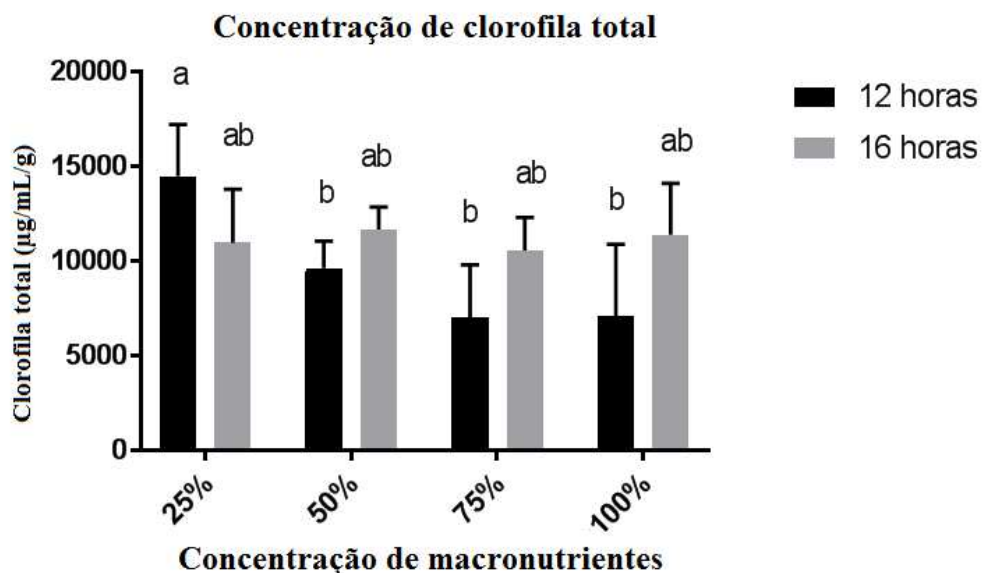
Figura 14- Médias da concentração de clorofila *b* em folhas de mudas micropropagadas *Heliconia latispatha* Bentham cv. Orange Gyro em meios de cultivo MS contendo diferentes concentrações de macronutrientes e nos fotoperíodos de 12 e 16 horas, aos 35 dias de cultivo *in vitro*.



\*Médias com letras iguais, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey.

Fonte: Elaborado pela autora.

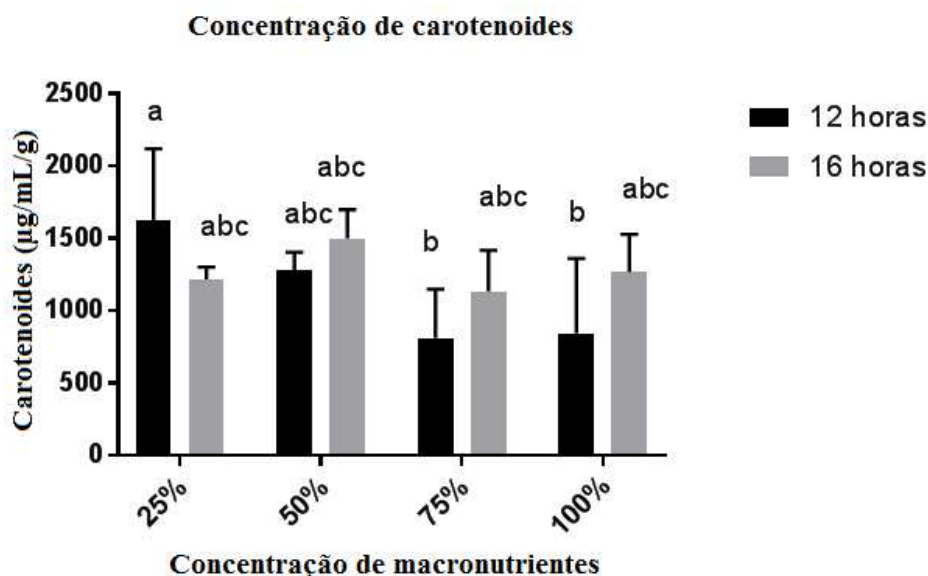
Figura 15- Médias da concentração de clorofila **total** em folhas de mudas micropropagadas *Heliconia latispatha* Bentham cv. Orange Gyro em meios de cultivo MS contendo diferentes concentrações de macronutrientes e nos fotoperíodos de 12 e 16 horas, aos 35 dias de cultivo *in vitro*.



\*Médias com letras iguais, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey.

Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 16- Médias da concentração de carotenoides em folhas de mudas micropropagadas *Heliconia latispatha* Bentham cv. Orange Gyro em meios de cultivo MS contendo diferentes concentrações de macronutrientes e nos fotoperíodos de 12 e 16 horas, aos 35 dias de cultivo *in vitro*.



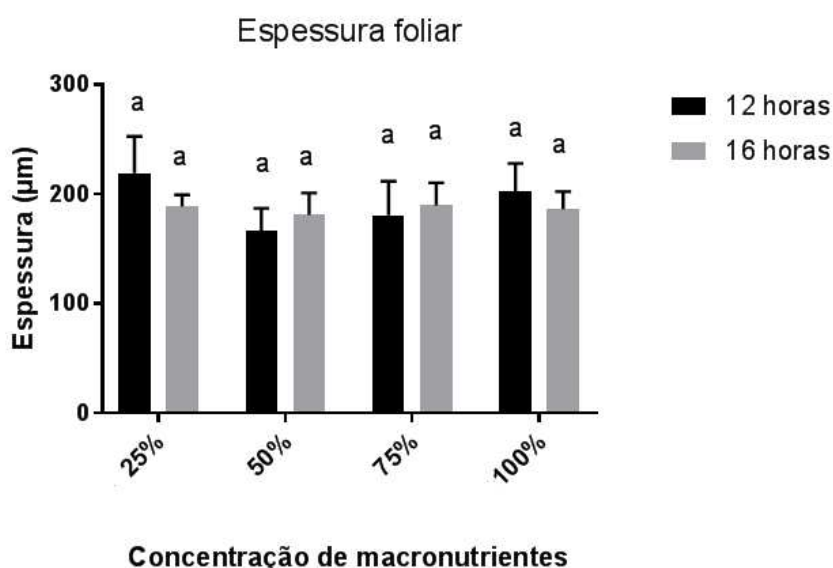
\*Médias com letras iguais, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey.

Fonte: Elaborado pela autora.

### 5.3 Análise histológica da espessura foliar

Após análise estatística das medidas da espessura transversal da folha de mudas micropropagadas de *Heliconia latispatha* Benthham cv. Orange Gyro foi observado que não houve diferença estatística significativa entre nenhum dos tratamentos (Figura 17). Caso houvesse carência de cálcio, seria esperado uma diminuição nesse parâmetro, tendo em vista que esse elemento está relacionado à processos estruturais e fisiológicos ligados à membrana celular, funcionando como “cimento” entre células adjacentes ao formar o pectato de cálcio na lamela média (FAQUIN, 2005).

Figura 17- Média da espessura foliar do corte transversal de folhas de mudas micropropagadas de *Heliconia latispatha* Benthham cv. Orange Gyro em meios de cultivo MS contendo diferentes concentrações de macronutrientes e nos fotoperíodos de 12 e 16 horas, aos 35 dias de cultivo *in vitro*.

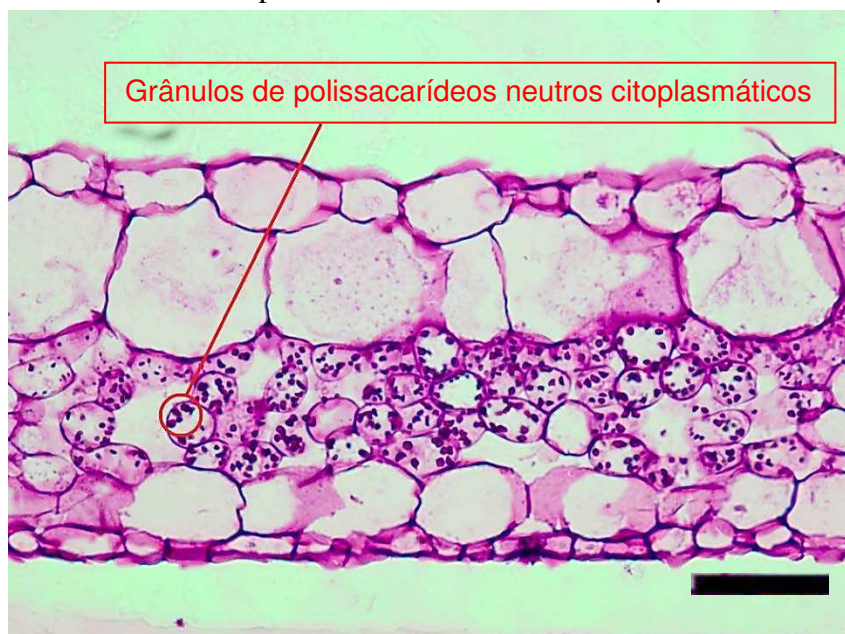


\*Médias com letras iguais, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey.

Fonte: Elaborado pela autora.

Entretanto, na análise visual da reação do PAS (Periodic Acid-Schiff), observou-se dentro das células do parênquima lacunoso (único parênquima encontrado em monocotiledônias como os representantes da família *Heliconiaceae*) de todos os tratamentos, a coloração de polissacarídeos neutros, possivelmente amido, apesar da reação do PAS também ocorrer com glicôgênio, e ácidos e radicais glicídicos de glicoproteínas (Figura 18).

Figura 18- Corte transversal da folha de muda micropropagada de *Heliconia latispatha* Bentham cv. Orange Gyro submetidos a reação do PAS, evidenciando os grânulos de polissacarídeos neutros citoplasmáticos, aos 35 dias de cultivo *in vitro* em meio MS contendo 25% de macronutrientes e fotoperíodo de 12 horas. Barra: 50  $\mu$ m



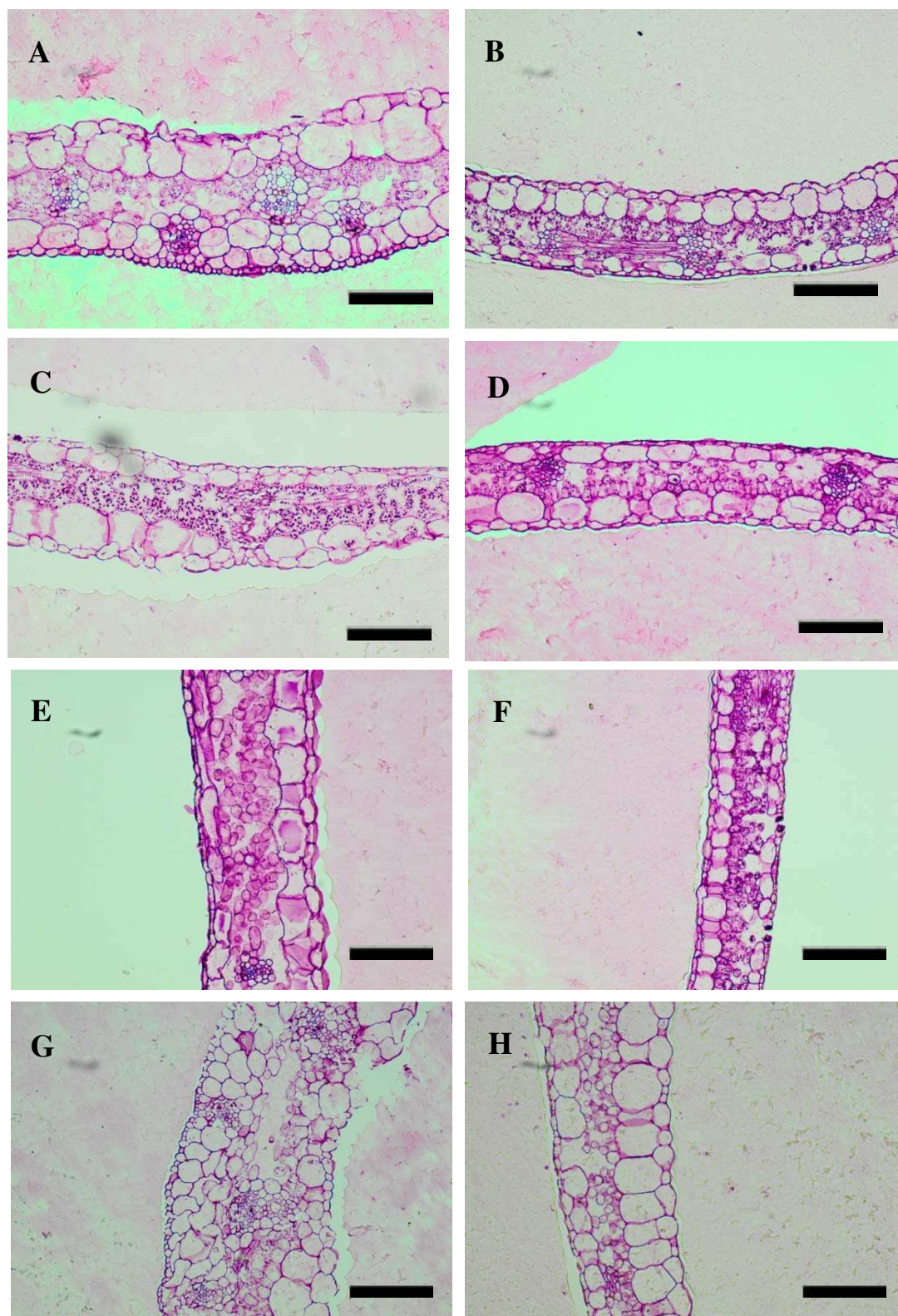
Fonte: elaborado pela autora.

Embora não tenha sido realizada a quantificação desses polissacarídeos, a literatura cita que a acumulação de carboidratos não estruturais, como o amido, é uma característica típica nas folhas de plantas com deficiência de magnésio (Mg) (FISCHER; BUSSLER, 1988; CAKMAK *et al.*, 1994) e pode ser identificada bem antes do aparecimento de sintomas de deficiência de Mg e da inibição da fotossíntese (HERMANS *et al.*, 2006; HERMANS; VERBRUGGEN, 2005).

Mesmo com o acúmulo de carboidratos tendo sido identificado em todos os tratamentos (Figuras 19 e 20), é necessária a quantificação dos teores de Mg nas folhas e dos carboidratos, para poder verificar se houve deficiência de Mg, pois o acúmulo de carboidrato também pode ser uma resposta ao fotoperíodo (LIU *et al.*, 2018), bem como a espécie estudada pode acumular carboidratos como reserva energética em suas folhas normalmente (AMARAL *et al.*, 2015).



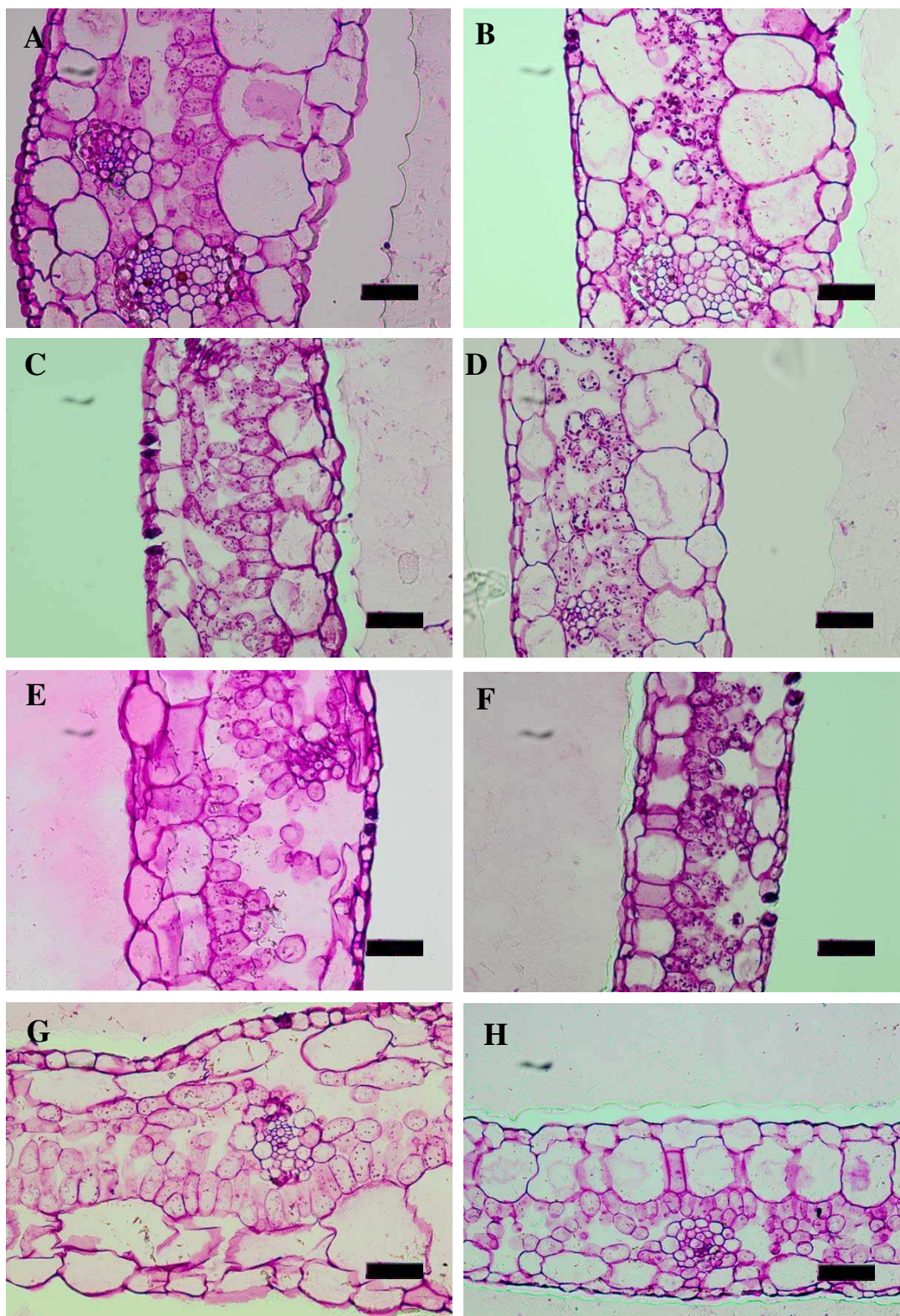
Figura 19- Corte transversal da folha de muda micropropagada de *Heliconia latispatha* Benth. Orange Gyro submetidos a reação do PAS. Fotoperíodo de 12 horas: A) 25%; C) 50%; E) 75% e G) 100%; Fotoperíodo de 16 horas: B) 25%; D) 50%; F) 75% e H) 100% de macronutrientes do meio de cultivo MS, aos 35 dias de cultivo *in vitro*. Barra: 100  $\mu$ m



Fonte: a autora (2018)



Figura 20- Corte transversal folha de muda micropropagada de *Heliconia latispatha* Benth. cv. Orange Gyro submetidos a reação do PAS. Fotoperíodo de 12 horas: A) 25%; C) 50%; E) 75% e G) 100%; Fotoperíodo de 16 horas: B) 25%; D) 50%; F) 75% e H) 100% de macronutrientes do meio de cultivo MS, aos 35 dias de cultivo *in vitro*. Barra: 50  $\mu$ m



Fonte: a autora (2018)

## 6 Conclusão

O tratamento com 75% de macronutrientes no fotoperíodo de 12 horas demonstrou ser o mais adequado ao alongamento e enraizamento de mudas micropropagadas de *Heliconia latispatha* Bentr. cv. Orange Gyro, de forma a induzir as maiores médias de altura, não comprometendo as massas fresca e seca das mudas, bem como o comprimento da maior raiz e o diâmetro do pseudocaule, ao passo que também não diminui a produção de folhas, muitas vezes obtendo resultados estatisticamente iguais ou até superiores do que o tratamento com 100% de macronutrientes em ambos fotoperíodos.

Além disso, esse tratamento não interferiu na produção de pigmentos fotossintetizantes, embora o fotoperíodo de 12 horas tenha acarretado estresse nos explantes de forma a induzir uma maior produção de clorofilas e carotenoides a medida em que a concentração de macronutrientes foi reduzida.

Entretanto, faz-se necessário um estudo de nutrição mineral da *Heliconia latispatha* mais detalhado, com a quantificação de cada macronutriente, assim como a quantificação dos carboidratos nas folhas das mudas.

## 7 Referências Bibliográficas

- AITKEN-CHRISTIE J., KOZAI T., M.A.L SMITH. **Automation and environmental control in plant tissue culture**. Springer Netherlands, ed. 1. p 574. 1995.
- AKBARI, F.; ARMINIAN, A.; KAHIRIZI, D.; *et al.* Effect of nitrogen sources on some morphological characteristics of in vitro stevia rebaudiana Bertoni. **Cellular and Molecular Biology**, v. 63, n. 2, p. 107, 2017.
- ALI M.N., RAY S.S. (2018) **Plant Tissue Culture as Potential Option in Developing Climate Resilient Spices**. In: Sharangi A. (eds) Indian Spices. Springer, Cham
- ANDERSSON, L. 1998. Heliconiaceae. Pp. 226-230. In: K. Kubitzki (ed.). **The Families and Genera of Vascular Plants. IV. Flowering Plants. Monocotyledons. Alismatanae and Commelinanae (except Gramineae)**. Springer, Berlin.
- AMARAL, G. C. *et al* . **Conservação de inflorescências de helicônias previamente adubadas com doses crescentes de nitrogênio e potássio**. **Rev. Caatinga**, Mossoró, v. 28, n. 3, p. 61-67, Sept. 2015.
- ARGÔLO, L. M.H. **Avaliação de genótipos de Helicônia spp. sob cultivo a pleno sol e cabruca**. Ilhéus, Bahia. Universidade Estadual de Santa Cruz, 2009. 76 p. (Dissertação – Mestrado em Produção Vegetal). Disponível em: <http://nbcgib.uesc.br/ppgpv/painel/paginas/uploads/2f1e8c4a73a67737cd31d11932534737.pdf>
- ARNOZIS P.A., NELEMANS J.A. e FINDENEGG G.R. 1988. **Phosphoenolpyruvate carboxylase activity in plants grown with either NO<sub>3</sub> - or NH<sub>4</sub> + as inorganic nitrogen source**. *J. Plant Physiol.* 132, 23-27.
- BARKER, A.V. e BRYSON, G.M., 2007. **Nitrogen**. In: **Handbook of Plant Nutrition**, Barker, A.V. and D.J. Pilbeam (Eds.), CRC Press, Boca Raton, ISBN-10: 9781439881972, pp 21-50.
- BERRY F; KRESS WJ. 1991. **Heliconia: an identification guide**. Washington and London: Smithsonian Institution Press. 334p
- BHOJWANI, S. S.; RAZDAN, M. K. **Plant Tissue Culture: Theory and Practice**. [s.l.]: Elsevier, 1986.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA DEFESA. EXÉRCITO BRASILEIRO, DEPARTAMENTO LOGÍSTICO. PORTARIA Nº09-D LOG, 25 DE JUNHO DE 2004. **Regulamenta os procedimentos para Licenciamento de Importação (LI) de produtos controlados pelo Exército Brasileiro e consolida as disposições regulamentares das operações de importação**. Disponível em <[http://www.dfpc.eb.mil.br/phocadownload/Portarias\\_EB\\_COLOG/Portaria%20009-DLog-25Jun04.pdf](http://www.dfpc.eb.mil.br/phocadownload/Portarias_EB_COLOG/Portaria%20009-DLog-25Jun04.pdf)> Acesso em 15 de junho de 2018.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA DEFESA. EXÉRCITO BRASILEIRO, DEPARTAMENTO LOGÍSTICO. PORTARIA Nº 42-COLOG, DE 28 E MARÇO DE 2018. **Dispõe sobre**



**procedimentos administrativos relativos às atividades com explosivos e seus acessórios e produtos que contêm nitrato de amônio.** Disponível em <<http://www.dfpc.eb.mil.br/images/PORT42.pdf>> Acesso em 15 de junho de 2018.

BUTENKO, R. G. 1968. **Plant Tissue Culture and Plant Morphogenesis.** Translated from Russian. Israel Program for Scientific Translation, Jerusalem.

CAKMAK I., HENGELER C., MARSCHNER H. **Partitioning of shoot and root dry matter and carbohydrates in bean plants suffering from phosphorus, potassium and magnesium deficiency.** Journal of Experimental Botany, Vol. 45, No. 278, pp. 1245-1250, September 1994

CAKMAK I., KIRKBY E.A. (2008) **Role of magnesium in carbon partitioning and alleviating photooxidative damage.** Physiol Plant 133:692–704

CAREW, D. P., e E. J. STABA. 1965. **Plant tissue culture; its fundamentals, application and relationship to medicinal plant studies.** Lloydia 28: 1-26.

CARVALHO, J.M.F.C. e VIDAL, M.S. **Noções de Cultivo de Tecidos Vegetais.** Embrapa Algodão. Documentos, 116. 39p. Campina Grande, 2003.

CASTRO, C. E. F. **Helicônia para exportação: aspectos técnicos da produção.** Brasília, EMBRAPA-SPI, 1995. 44p (FRUPEX 16)

CASTRO, C. E. F.; MAY, A.; GONÇALVES, C. **Espécies de helicônia como flores de corte.** Ornamental Horticulture (Ornam. Hortic.), v. 12, n. 2, 2006. Disponível em: <https://ornamentalhorticulture.emnuvens.com.br/rbho/article/view/190>. Acesso em: 28 ago. 2018.

CASTRO, N. R. *et al* . **Murcha de fusário em helicônia: fontes de resistência, método alternativo de detecção e defesa estrutural.** Summa phytopathol., Botucatu , v. 36, n. 1, p. 30-34, Mar. 2010 . Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-54052010000100005&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-54052010000100005&lng=en&nrm=iso).

CHALEFF, R. S., e P. S. CARLSON. 1974. **Somatic cell genetics of higher plants.** Ann. Rev. Genet. 8: 267-278.

CHOONG, C. W.; LIM, C. H.; XIONG, Z; *et al*. **Effect of *In Vitro* Nitrogen Nutrition to *Phalaenopsis deliciosa* Seedling Growth.** OnLine Journal of Biological Sciences, v. 16, n. 1, p. 17–25, 2016.

COCKING, E. C. 1972. **Plant cell protoplasts-- isolation and development.** Ann. Rev. Plant Physiol. 23: 29-50.

COHEN D. **The culture medium.** Acta Hort 1995; 393: 15-24.

COOPER G. M. **A célula: uma abordagem molecular.** Porto alegre: Artmed Editora, p. 712, 2001.

CRILEY, R. A. (1988). **Propagation of Tropical Cut Flowers: Strelitzia, Alpinia, and Heliconia**. Acta Horticulturae, (226), 509–518.

CRONQUIST, A. 1981. **An integrated system of classification of flowering plants**. Columbia University Press, New York, p.1157-1172.

DAGLA, H. R. **Plant tissue culture: Historical developments and applied aspects**. Resonance, v. 17, n. 8, p. 759–767, 2012.

DAHLGREN, R.M.T., CLIFFORD, H.T. e YEO, P.F. 1985. **The families of the monocotyledons**. Springer-Verlag, Berlin, p.350-358.

DAVIDIAN, J.C., KOPRIVA, S., 2010.; **Regulation of sulphate uptake and assimilation—the same or not the same?** Mol. Plant 3, 314–325.

DEBERGH, P.; ZIMMERMAN, R. H. (Orgs.); **Micropropagation: technology and application**. Dordrecht ; Boston: Kluwer Academic, 1991.

DEBIASI, C.; FELTRIN, F.; MICHELUZZI, F.C.; **Micropropagação de gengibre (*Zingiber officinale*)**. Revista Brasileira de Agrociência, v. 10, n. 1, p. 61-65, 2004.

DIAS, M. I; SOUSA, M. J.; ALVES, R. C.; *et al.* **Exploring plant tissue culture to improve the production of phenolic compounds: A review**. Industrial Crops and Products, v. 82, p. 9–22, 2016.

DIGNART, S. L.; **Luz e Sacarose na Micropropagação de *Cattleya walkeriana*: Alterações Anatômicas e Fisiológicas**. p. 140. Tese (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras. Minas Gerais. 2006.

DINIZ, J.D.N., GONÇALVES, A.N., HERNANDEZ, F.F.F., TORRES, A.C., 1999. **Absorção de macronutrientes por explantes de bananeira in vitro**. Pesqui. Agropecu. Bras. 34, 1201–1209.

DORAIS M., YELLE S. e GOSSELIN A. (1996) **Influence of extended photoperiod on photosynthate partitioning and export in tomato and pepper plants**, New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 24:1, 29-37, doi: 10.1080/01140671.1996.9513932

DWIVEDI, S. L., BRITT, A. B., TRIPATHI, L., SHARMA, S., UPADHYAYA, H. D., e ORTIZ, R. (2015). **Haploids: Constraints and opportunities in plant breeding**. Biotechnology Advances, 33(6), 812–829. doi:10.1016/j.biotechadv.2015.07.001

ESPINOSA-LEAL, C.A., PUENTE-GARZA, C.A. e GARCÍA-LARA, In vitro plant tissue culture: means for production of biological active compounds. S. Planta (2018) 248: 1. <https://doi.org/10.1007/s00425-018-2910-1>

FAQUIN, V. **Nutrição Mineral de Plantas**. Lavras: UFLA / FAEPE, 2005. p.: il. - Curso de Pós-Graduação “Lato Sensu” (Especialização) a Distância: Solos e Meio Ambiente.

FERREIRA, M. M. M.. **Sintomas de deficiência de macro e micronutrientes de plantas de milho híbrido BRS 1010**. REVISTA AGRO@MBIENTE ON-LINE, [S.l.], v. 6, n. 1, p. 74-83, maio 2012. ISSN 1982-8470.

FERNÁNDEZ-MARÍN, B., GARCÍA-PLAZAOLA, J. I., HERNÁNDEZ, A., e ESTEBAN, R. (2018). **Plant Photosynthetic Pigments: Methods and Tricks for Correct Quantification and Identification**. Advances in Plant Ecophysiology Techniques, 29–50. doi:10.1007/978-3-319-93233-0\_3

FISCHER, E. S. and BUSSLER, W. (1988), **Effects of Magnesium Deficiency on Carbohydrates in *Phaseolus vulgaris***. Z. Pflanzenernaehr. Bodenk., 151: 295-298. doi:10.1002/jpln.19881510504

GAGE, D. A.; STRONG, D. R. **The chemistry of *Helicônia imbricata* and *H. latispatha* and the slow growth of a hispine beetle herbivore**. Biochemical Systematics and Ecology, v. 9, n. 1, p. 79–82, 1981.

GAMBORG, O. L., MURASHIGE, T., THORPE, T. A., e VASIL, I. K. (1976). **Plant tissue culture media**. *In vitro*, 12(7), 473-478.

GAMBORG, O. L., F. CONSTABEL, L. FOWKE, K. N. KAO, K. OHYAMA, K. KARTHA, AND L. PELCHER. 1974. **Protoplast and cell culture methods in somatic hybridization in higher plants**. Can. J. Genet. Cytol. 16: 737-750.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. de. The Components of Plant Tissue Culture Media I: Macro- and Micro-Nutrients. *In*: GEORGE, Edwin F.; HALL, Michael A.; KLERK, Geert-Jan De (Orgs.). **Plant Propagation by Tissue Culture**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2007, p. 65–113.

HAM, B.-K., CHEN, J., YAN, Y., e LUCAS, W. J. (2018). **Insights into plant phosphate sensing and signaling**. Current Opinion in Biotechnology, 49, 1–9. doi:10.1016/j.copbio.2017.07.005

HASANUZZAMAN, M.; BHUYAN, M.; NAHAR, K.; *et al.* **Potassium: A Vital Regulator of Plant Responses and Tolerance to Abiotic Stresses**. Agronomy, v. 8, n. 3, p. 31, 2018

HAWKESFORD, M.; HORST, W.; KICHEY, T.; *et al.* Functions of Macronutrients. *In*: **Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants**. [s.l.]: Elsevier, 2012, p. 135–189. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123849052000066>>. Acesso em: 25 out. 2018.

HERMANS, C.; HAMMOND, J. P.; WHITE, P. J.; *et al.* **How do plants respond to nutrient shortage by biomass allocation?** Trends in Plant Science, v. 11, n. 12, p. 610–617, 2006.

HERMANS C., VERBRUGGEN N. (2005) **Physiological characterization of Mg deficiency in *Arabidopsis thaliana***. J Exp Bot 418:2153–2161

HERMANS C., VUYLSTEKE M., COPPENS F., CRISTESCU S. M., HARREN F. J. M., INZE´ D., VERBRUGGEN N. (2010) **Systems analysis of the responses to long-term magnesium deficiency and restoration in *Arabidopsis thaliana***. New Phytol 187:132–144

HOVEIDA, Z. S.; ABDOLLAHI, M. R.; MIRZAEI-ASL, A.; *et al.* **Production of doubled haploid plants from anther cultures of borage (*Borago officinalis* L.) by the application of chemical and physical stress.** Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), v. 130, n. 2, p. 369–378, 2017.

HUBER, S. C., RUFTY, T. W., e KERR, P. S. (1984). **Effect of Photoperiod on Photosynthate Partitioning and Diurnal Rhythms in Sucrose Phosphate Synthase Activity in Leaves of Soybean (*Glycine max* L. [Merr.]) and Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.).** Plant physiology, 75(4), 1080-4.

IKEUCHI, M.; OGAWA, Y.; IWASE, A.; *et al.* **Plant regeneration: cellular origins and molecular mechanisms.** Development, v. 143, n. 9, p. 1442–1451, 2016.

INSTITUTO BRASILEIRO DE FLORICULTURA – IBRAFLO. **O mercado de flores no Brasil.** Campinas, São Paulo, 2017, 5p.

JO, EA., TEWARI, R.K., HAHN, EJ. *et al.* **Effect of photoperiod and light intensity on in vitro propagation of *Alocasia amazonica*.** Plant Biotechnology Reports (2008) 2: 207. <https://doi.org/10.1007/s11816-008-0063-6>

KARNOVSKY, M. (1964). **A Formaldehyde-Glutaraldehyde Fixative of High Osmolality for Use in Electron Microscopy.** J Cell Biol. 27.

KASHA, K. J. 1974. **Haploids in Higher Plants.** University of Guelph, Guelph.

KIRCHOFF, B. K.; LAGOMARSINO, L. P.; NEWMAN, W. H.; *et al.* **Early floral development of *Heliconia latispatha* (Heliconiaceae), a key taxon for understanding the evolution of flower development in the Zingiberales.** American Journal of Botany, v. 96, n. 3, p. 580–593, 2009.

KRESS, W.J. 1990a. **The diversity and distribution of *Heliconia* (Heliconiaceae) in Brazil.** Acta Botanica Brasilica 4:159-167.

KRESS, W.J. 1990b. **The phylogeny and classification of the Zingiberales.** Annals of the Missouri Botanical Garden 77:698-721.

KERBAUY, G. B. **Clonagem de plantas *in vitro*.** Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, Brasília, v. 1, n. 1, p. 30-33, 1997.

KURITA, F. M. K.; TAMAKI, V. ***In vitro* growth of the bromeliad *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms with different concentrations of nitrogen.** Acta Scientiarum. Biological Sciences, v. 36, n. 3, p. 279, 2014.

LAMAS, A.M. **Floricultura Tropical: Técnicas de cultivo e pós-colheita de flores e folhagens.** Fortaleza: Instituto Frutal, 2002. 135 p.

LIU, Y., WANG, X., FANG, Y., HUANG, M., CHEN, X., ZHANG, Y., e ZHAO, H. (2018). **The effects of photoperiod and nutrition on duckweed ( *Landoltia punctata* ) growth and starch accumulation.** Industrial Crops and Products, 115, 243–249. doi:10.1016/j.indcrop.2018.02.033

LUMSDEN P.J. (2002) **Photoperiodism in Plants.** In: Kumar V. (eds) Biological Rhythms. Springer, Berlin, Heidelberg. p 181-191.

MAIA V. **Técnica histológica**, São Paulo, Atheneu. 246 p, 1979.

MARQUES, J. M.; COELHO, P. J. A.; FERREIRA, M. A.; AMARAL, Z. P. S.; TORRES, A. C.; AMORIM, J. C.; BUSO, G.S.C. **Estudo da variabilidade genética entre indivíduos de população de helicônia bihai e helicônia rostrata.** Brasília , DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ISSN 1676 – 1340; n. 69, 2004.

MARUYAMA-NAKASHITA A., NAKAMURA Y., YAMAYA T., TAKAHASHI H.; **Regulation of high-affinity sulphate transporters in plants: towards systematic analysis of sulphur signalling and regulation**, Journal of Experimental Botany, Volume 55, Issue 404, 1 August 2004, Pages 1843–1849, <https://doi.org/10.1093/jxb/erh175>

MCCOWN, B.H.; LLOYD, G. (1981). **Woody Plant Medium (WPM)—A Mineral Nutrient Formulation for Microculture of Woody Plant Species.** HortScience, 16, 453-453.

MOREIRA, R., RODRIGUES, F., MONFORT, L., PIRES, M., PASQUAL, M. **Diferentes meios de cultura no crescimento in vitro de sorvetão.** *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*. 7 (3): 409-413, 2012.

MOSCA, J. L., de QUEIROZ, M. B., ALMEIDA, A. S., CAVALCANTE, R. A., ALVES, R. E. **Helicônia: descrição, colheita e pós-colheita.** Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2005. 32 p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Documentos, 91).

MURASHIGE, T. 1974. **Plant propagation through tissue cultures.** Ann. Rev. Plant Physiol. 25: 135-166.

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

NAKANO, V. A.. **Micropropagação de espécies de helicônia, caracterização morfológica e identificação molecular de bactérias contaminantes.** 2008. Dissertação - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008. doi: 10.11606 / D.64.2008.tde-03122008-164814. Acesso em: 2018-09-23.

NANNETTI D.C. 1994. **Utilização da cultura de tecidos vegetais na micropropagação de *Helicônia* sp.** Lavras: UFLA. 106p. (Dissertação).

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

PAIVA, W. O. de. **Cultura de helicônias.** Fortaleza: EMBRAPA -CNPAT, 1998. 20 p. (EMBRAPA-CLIPAT. Circular Técnica, 2).

PALANISAMI E., CHALUVADI S. R., **Manual on vegetative and micropropagation of mangroves.** M. S. Swaminathan Research Foundation, Chennai. May 2001.

PIERIK, R. L. M. **In Vitro Culture of Higher Plants.** [s.l.]: Springer Science & Business Media, 1997.

PUHAN, Z., and S. M. MARTIN. 1971. **The industrial potential of plant cell culture.** Prog. Ind. Microbiol. 9: 13-39.

QUAK F. 1972. **Review of heat treatment and meristem tip culture as methods to obtain virus-free plants.** Proc. 10th Int. Hort. Congress 3: 12-25.

RADHAKRISHNAN, D., KAREEM, A., DURGAPRASAD, K., SREERAJ, E., SUGIMOTO, K., e PRASAD, K. (2018). **Shoot regeneration: a journey from acquisition of competence to completion.** Current Opinion in Plant Biology, 41, 23–31.

RAMAGE, C.M., WILLIAMS, R.R., 2002. **Mineral nutrition and plant morphogenesis.** In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant 38, 116–124.

REUVENY, Z.; DOUGALL, D. K.; TRINITY, P. M. **Regulatory coupling of nitrate and sulfate assimilation pathways in cultured tobacco cells.** Cell Biology. Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 77, No. 11, pp. 6670-6672, November 1980.

RIBEIRO, W. S.; BARBOSA, J.A.; COSTA, L. C. da. **Helicônias** – Brasília: Editora Kiron, 2012. 134 p.

RUNDEL, P. W.; SHARIFI, M. R.; GIBSON, A. C.; *et al.* **Structural and physiological adaptation to light environments in neotropical Heliconia (Heliconiaceae).** Journal of Tropical Ecology, v. 14, n. 06, p. 789–801, 1998.

SAEBO, A., KREKLING, T. e APPELGREN. **Light quality affects photosynthesis and leaf anatomy of birch plantlets in vitro.** M. Plant Cell Tiss Organ Cult (1995) 41: 177. <https://doi.org/10.1007/BF00051588>

SANTOS, M. A. C. **Micropropagação de *Psidium spp.*** Tese (Doutorado em Agronomia). UFPB/CCA, 2015.

SANTOS, M. H. L. C. **Fisiologia pós-colheita de sorvetão (*Zingiber spectabile* Griff.) cultivado no submédio São Francisco.** Tese (Doutorado)-Universidade Estadual Paulista Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2007.

SCHENK, R.V.; HILDEBRANDT, A.C. (1972). **Medium and Techniques for Induction and Growth of Monocotyledonous and Dicotyledonous Plant Cell Cultures.** Canadian Journal of Botany, 50, 199-204.

SERAN, T.H., 2013. **In vitro Propagation of Ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) through Direct Organogenesis: A Review.** Pakistan Journal of Biological Sciences, 16: 1826-1835.

SMITH, R. H. **Plant Tissue Culture: Techniques and Experiments**. [s.l.]: Academic Press, 2012.

SOUSA, A. E. C.; SOARES, F. A. L.; GHEYI, H. R.; *et al.* **Salinity of irrigation water in acclimatization of seedlings, development and production of helicônias**. Revista Brasileira de Agricultura Irrigada - RBAI, 2011. Disponível em: <<http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=BR2013B00084>>. Acesso em: 9 set. 2018.

SOUZA, E. H., SOARES, T. L., SOUZA, F. V. D., e SANTOS-SEREJO, J. A. (2010). Micropropagation of *Heliconia rostrata* and *Heliconia bihai* from mature zygotic embryos. Acta Horticulturae, (865), 315–320. doi:10.17660/actahortic.2010.865.43

STREET, H. E. 1973. **Plant tissue and cell culture**. Botanical Monogr. Vol. II. Blackwell Scientific Publications, London. 2.

STREET, H. E. 1966. **The nutrition and metabolism of plant tissues and organ cultures**. In: E. N. Wilmer, Ed., Cells and Tissues in Culture. Vol. 3. Academic Press, New York, pp. 553-629.

STRONG, D. R. **Insect Species Richness: Hispine Bettles of *Heliconia latispatha***. Ecology, v. 58, n. 3, p. 573–582, 1977.

TEIXEIRA, M., FERNANDES, M. T., BLUMER, A., COSTA, M. **Cultura de tecidos vegetais de plantas ornamentais**. 10º Simposio de Ensino de Graduação - UNIMEP. 2012.

TEMPE, J., Ed. 1972. **Protoplastes et Fusion de Cellules Somatiques Vegetales**. Colloq. Int. Cent. Natl. Rech. Sci., Paris. Vol. 222.

TIAN L., WANG S., SONG X., ZHANG J., LIU P., CHEN Z., CHEN Y., WU L. **Long photoperiod affects the maize transition from vegetative to reproductive stages: a proteomic comparison between photoperiod-sensitive inbred line and its recurrent parent**. Amino Acids (2018) 50:149–161 <https://doi.org/10.1007/s00726-017-2501-7>

ULISSES, C. *et al.* **In Vitro Propagation of *Heliconia bihai* (L.) L. from Zygotic Embryos**. Acta Bot. Bras., São Paulo, v. 24, n. 1, p. 184-192, Mar. 2010. Available from <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-33062010000100018&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-33062010000100018&lng=en&nrm=iso)>.

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

TORRES, A. C.; FERREIRA, A. T.; SÁ, F. G.; BUSO, J. A.; CALDAS, L. S.; NASCIMENTO, A. S.; BRÍGIDO, M. M.; ROMANO, E. **Glossário de biotecnologia vegetal**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2000. 128p.

VASIL, I. K., AND V. VASIL. 1972. **Totipotency and embryogenesis in plant cell and tissue cultures**. In Vitro 8: 117-125.

WADA, S.; REED, B.M. Trends in culture medium nitrogen requirements for in vitro shoot growth of diverse pear germplasm. **Acta Horticulturae**, n. 1155, p. 29–36, 2017.

WATANABE, M. A. **Banana tree pests attacking *Heliconia latispatha* Benth. (*Heliconiaceae*)**. Neotropical Entomology, v. 36, n. 2, p. 312–313, 2007.

WATSON, D.P. e SMITH, R.R. **Ornamental Helicônias**. Cooperative Extension Service. University of Hawai, Honolulu, Circular 428, 1979, 12p.

WELLBURN, A. R. **The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution**. Journal of Plant Physiology, v. 144, n. 3, p. 307–313, 1994.

ZAIDAN, L. B. P. **Efeitos do fotoperíodo no crescimento, floração e conteúdo de carboidratos em *hyptis brevipes* poit. (labiatae)**. 1987. 146f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Campinas.