



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

MICROPROPAGAÇÃO, RESGATE DE EMBRIÕES E
AVALIAÇÃO DO EFEITO DE MICRORGANISMOS
ENDOFÍTICOS EM HELICÔNIAS

ARLENA MARIA GUIMARÃES GATO

MANAUS-AMAZONAS

2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

ARLENA MARIA GUIMARÃES GATO

MICROPROPAGAÇÃO, RESGATE DE EMBRIÕES E
AVALIAÇÃO DO EFEITO DE MICRORGANISMOS
ENDOFÍTICOS EM HELICÔNIAS

Tese apresentada ao programa de Pós
Graduação em Biotecnologia da
Universidade Federal do Amazonas, como
requisito parcial para obtenção do título de
Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof^o. Dr. José Odair Pereira

Co-Orientador: Paulo Hercílio Viegas Rodrigues

MANAUS-AMAZONAS

2009

Ficha Catalográfica
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

<i>G261m</i>	Gato, Arlena Maria Guimarães Micropropagação, resgate de embriões e avaliação do efeito de microorganismos endofíticos em helicônias / Arlena Maria Guimarães Gato. - Manaus: UFAM, 2009. 111 f.; il. color. Tese (Doutorado em Biotecnologia) — Universidade Federal do Amazonas, 2009. Orientador: Prof. Dr. José Odair Pereira Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Hercílio Viegas Rodrigues 1. Cultivo <i>in vitro</i> 2. Genética vegetal 3. Isolados bacterianos I. Pereira, José Odair II. Rodrigues, Paulo Hercílio Viegas III. Universidade Federal do Amazonas IV. Título CDU 582.582(043.2)
--------------	--

ARLENA MARIA GUIMARÃES GATO

MICROPROPAGAÇÃO, RESGATE DE EMBRIÕES
AVALIAÇÃO DO EFEITO DE MICRORGANISMOS
ENDOFÍTICOS EM HELICÔNIAS

Tese apresentada ao programa de Pós
Graduação em Biotecnologia da Universidade
Federal do Amazonas, como requisito parcial
para obtenção do título de Doutor em
Biotecnologia

Aprovado em 10 / 12 / 2009

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Odair Pereira
Universidade Federal do Amazonas

Dr. Rudi Emerson de Lima Procópio
Centro de Biotecnologia da Amazônia

Dr. Jonny Everson Scherwinski Pereira
CENARGEN – Embrapa

Dr^a Simone da Silva
Centro de Biotecnologia da Amazônia

Dr^a Mayra Kassawara Martins
Centro de Biotecnologia da Amazônia

Aos meus filhos Diogo e Diego pela
oportunidade que me levou à busca
do crescimento moral, espiritual e
profissional.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A DEUS, pela força espiritual, pelos momentos de reflexão e por guiar sempre o meu caminho;

Aos meus familiares Mário, Diogo, Diego e Pietra pelo apoio, carinho e compreensão pela minha ausência;

Aos meus sobrinhos Marijara Fonseca Gato, Francisco Costa Gato e Sebastiana Costa Gato pelo carinho e companheirismo;

A Universidade Federal do Amazonas pela oportunidade de realização deste curso;

A Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e a todos da secretaria pelo atendimento e dedicação;

Ao Centro de Biotecnologia da Amazônia, pela oportunidade que me proporcionou e pelo apoio financeiro;

Aos Dr. Imar César de Araújo e José Augusto Cabral pelo apoio e compreensão durante a realização deste curso;

Aos Laboratórios de Cultura de Tecidos Vegetais e de Microbiologia do CBA pela oportunidade que me prestaram no desenvolvimento deste trabalho;

Aos meus orientadores Dr. José Odair Pereira e Dr. Paulo Hercílio Viegas Rodrigues, pela orientação, compreensão, confiança e ensinamentos;

Ao Dr. Rudi Emerson de Lima Procópio e a Dra Simone da Silva, pela oportunidade e auxílio nos ensinamentos científicos que contribuíram muito para que este trabalho pudesse ser concluído;

Ao Dr. Luadir Gasparotto pela sua imprescindível contribuição na elaboração deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, Claudia Gomes de Faria Flávio Ferreira Freire e Antonia Arlene Indrusiak pela amizade, carinho, apoio, presteza e auxílio no desenvolvimento deste trabalho;

Aos colegas de apoio do LCTV, Efigênia Lopes da Silva, Maria Augusta Gomes dos Santos, Maria do Socorro Souza e Vitor Rafael Pereira Marinho pelo auxílio e dedicação e amizade durante a execução deste trabalho no laboratório e na casa de vegetação;

Ao Prof. José Cardoso Neto pela amizade, apoio e orientação na análise estatística;

Ao André Edson Magarão Sechramm, pela presteza e apoio nos serviços de informática na execução deste trabalho;

Enfim a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho,

MUITO OBRIGADA.

*Quem sabe pode muito,
quem ama pode mais.*

Chico Xavier

RESUMO

Micropropagação, resgate de embriões e avaliação do efeito de microorganismos endofíticos em helicônias.

O cultivo de flores e plantas ornamentais tropicais destaca-se como importante atividade agrícola. Mas, apesar das potencialidades econômicas e de mercado dessas espécies nativas da região: helicônia, bastão, sorvetão e outras, são necessários mais estudos básicos sobre a utilização de técnicas avançadas na obtenção de material de propagação com garantia de qualidade e bom aspecto fitossanitário. O objetivo deste trabalho foi obter mudas micropropagadas a partir de ápice floral de *Heliconia rauliniana* e de resgates de embriões de *H. marginata*, identificação, inoculação dos isolados de bactérias e avaliar o efeito desses microrganismos no desenvolvimento das plantas micropropagadas. Estabelecido o processo de micropropagação das plantas foram isolados das raízes das matrizes, isolados bacterianos e, de acordo com os critérios de classificação dos níveis de atividades em fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato e produção de auxina, foram selecionados seis isolados da *Heliconia rauliniana* e oito da *Heliconia marginata*. No primeiro experimento, foram inoculados nas plantas micropropagadas de *H. rauliniana*, os isolados bacterianos B₄; B₅ (*Enterobacter*); B₈; B₁₃ (*Ralstonia*); B₁₆; B₁₈ (*Enterobacter*) e nas plantas micropropagadas de *H. marginata*, os isolados B₁; B₂; B₄; B₆ (*Enterobacter*); B₇ (*Enterobacter*); B₁₀ (*Burkholderia*); B₁₂; B₁₄ e B₁₆ e, posteriormente transferidas para caixas plásticas contendo substrato esterilizado PlantMax (Horticultura) e mantidas em casa de vegetação. Após 60 dias de inoculação foi realizada a avaliação de promoção de crescimento de raiz, selecionando-se os três isolados que apresentaram os melhores resultados por espécie: *Heliconia rauliniana*, *Enterobacteriaceae* (*Pantoea/Erwinia*), B₁₈ e B₅ *Enterobacteriaceae* (*Pantoea/Erwinia*) e B₁₃ (*Ralstonia*) e *Heliconia marginata* B₇ *Enterobacteriaceae* (*Pantoea/Erwinia*), B₆ *Enterobacteriaceae* (*Pantoea/Erwinia*) e B₁₀ *Burkholderia*. No segundo experimento foram utilizados os isolados bacterianos B₁₈ *Enterobacteriaceae* (*Pantoea/Erwinia*); B₅ *Enterobacteriaceae* (*Pantoea/Erwinia*), B₁₃ *Ralstonia* e B₆, *Enterobacteriaceae* (*Pantoea/Erwinia*), B₇, *Enterobacteriaceae* (*Pantoea/Erwinia*), B₁₀, *Burkholderia* selecionados no primeiro experimento e inoculados em 60 plantas, distribuídas em cinco tratamentos: controle, B₁₈ *Enterobacteriaceae* (*Pantoea/Erwinia*); B₅ *Enterobacteriaceae* (*Pantoea/Erwinia*) e B₁₃ *Ralstonia*, coquetel x planta e controle, B₆ *Enterobacteriaceae* (*Pantoea/Erwinia*), B₇ *Enterobacteriaceae* (*Pantoea/Erwinia*), B₁₀ (*Burkholderia*), coquetel x planta com 12 plantas por tratamento. Os resultados apresentados após 60 dias, não foram significativos a nível de 0,05 % e um coeficiente de confiança de 95 % (A NOVA) para promoção de crescimento de raiz, número de folhas, altura de planta, peso fresco e peso seco. A sobrevivência das plantas foi de 83,3 %. Para identificação dos microrganismos foi usado o sequenciamento de fragmento de aproximadamente 800 pb do gene 16S rDNA ("primer 27f). A análise das sequências via Blast mostrou três grupos de bactéria: *Burkholderia*, *Ralstonia* e *Enterobacteriaceae* (*Pantoea/Erwinia*).

Palavras-chaves: Cultivo *in vitro*, contaminação bacteriana, isolados bacterianos, promoção de crescimento.

ABSTRACT

Micropropagation of *Heliconia rauliniana* Barreiros and *Heliconia marginata* Griggier Pittier, obtained from apices and embryos rescue and the effect of endofitic microorganisms in the growth of plants.

The flowers and ornamental plants cultivation stands out as an important agronomical activity. But despite the economical and market potential of these regional native species: helicônia, bastão, sorvetão and other plants, is necessary more basic studies about the use of advanced techniques in getting propagated material with quality assurance and good phytosanitary aspect. The objective of this study was to obtain plantlets from floral apices of *Heliconia rauliniana* and embryos rescue of *H. marginata*, identifies, inoculation of bacterial isolates and evaluate the effect of these microorganisms in the development of micropropagated plants. Established the plants micropropagation process, it was isolated from matrices root, bacterial isolates and, according to the classification criteria of activity levels of nitrogen biological fixation, phosphate solubilisation and auxin production, it was selected six *Heliconia rauliniana* isolates and eight of *Heliconia marginata*. The first experiment were inoculated in *in vitro* plants of *H. rauliniana*, the B4, B5, B8, B13, B16 and B18 bacterial isolates and on *H. marginata* micropropagated plants, the B1, B2, B4, B6, B7, B10, B12, B14 and B16 isolates and, then transferred to plastic boxes containing sterilized substrate Plantmax (Horticulture) and maintained under greenhouse. After 60 days of inoculation, it was realized the evaluation of root growth promotion, selecting the three isolates that showed the best results: B18, B5 and B13 (*H. rauliniana*) and B7, B6 and B10 (*H. marginata*). In the second experiment we used the B18, B5, B13 and B6, B7, B10 selected in the first experiment and inoculated in 60 plants, distributed on five treatments: control, B18, B5 and B13, cocktail x plant and control, B6, B7, B10, cocktail x plant with 12 plants per treatment. The results presented after 60 days, don't were significant on the level of 0.05% and one good faith coefficient of 95% (ANOVA) for root growth promotion, number of leaves, plant height, fresh weight and dry weight. The plants survive was 83.3%. For microorganisms identify, it was used the analysis of the fragment about 800 bp of the 16S rDNA (Primer 27f). The sequencial analysis via Blast showed three bacterial groups: *Burkholderia*, *Ralstonia* e *Enterobacteriaceae* (*Pantoea/Erwinia*).

Keywords: *In vitro* culture, bacterial contaminants, bacterial isolates, growth promotion

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Inflorescência de <i>H. marginata</i> (Griggier) Pittier (A), <i>H. rauliniana</i> Barreiros (B).....	24
Figura 2 -	Inflorescências de <i>H. rauliniana</i> (A) <i>H. orthotricha</i> cv <i>Eclipse total</i> (B), <i>H. rostrata</i> (C) e <i>H. chartaceae</i> cv <i>Sexy Pink</i> (D).....	36
Figura 3 -	Planta matriz (A), flor (B), frutos (C) e sementes (D) de <i>Heliconia marginata</i> (Griggier) Pittier.....	38
Figura 4 -	Processo de preparação: retiradas das brácteas (A), e ápice floral (B) e introdução dos explantes (C) de <i>Heliconia rauliniana</i> <i>in vitro</i>	39
Figura 5 -	Processo de preparação: abertura do opérculo (A), resgate do embrião (B) e introdução de explantes (C) de <i>Heliconia marginata</i> <i>in vitro</i>	40
Figura 6 -	Subcultivos (A, B, C), diferenciação (D) e desdiferenciação (E, F) na multiplicação <i>in vitro</i> de <i>Heliconia rauliniana</i>	41
Figura 7 -	Estabelecimento (A, B) e multiplicação (C, D, E) <i>in vitro</i> de <i>Heliconia marginata</i>	42
Figura 8 -	Processo de Desenvolvimento do ápice floral de <i>H. rauliniana</i> <i>in vitro</i>	46
Figura 9 -	Plantas de <i>Heliconia rauliniana</i> (A) e <i>Heliconia marginata</i> (B) aclimatizadas (após 60 dias em casa de vegetação).....	50
Figura 10 -	Processo de Inoculação de isolados bacterianos em plântulas micropropagadas de <i>H. rauliniana</i>	72
Figura 11 -	Processo de Inoculação de isolados bacterianos em plântulas micropropagadas de <i>H. marginata</i>	73
Figura 12 -	Inoculação de isolados bacterianos em plântulas micropropagadas de ápice floral de <i>H. rauliniana</i>	74
Figura 13 -	Inoculação de isolados bacterianos em plântulas micropropagadas de embrião de <i>H. marginata</i>	75

Figura 14 -	Bactéria produzindo AIA (A) fixando nitrogênio (B) e solubilizando fosfato (C). Número 1 (isolado positivo) e 2 (isolado negativo).....	78
Figura 15 -	Árvore filogenética baseada na sequência de 16S rDNA dos isolados bacterianos considerando Neighbor-Joining.....	81
Figura 16 -	Avaliação das médias de enraizamento das plantas micropropagadas de <i>Heliconia rauliniana</i> inoculadas com isolados bacterianos, após 60 dias de aclimatização.....	83
Figura 17 -	Avaliação das médias de enraizamento das plantas micropropagadas de <i>Heliconia marginata</i> inoculadas com isolados bacterianos, após 60 dias de aclimatização.....	84
Figura 18 -	Número médio de folhas das plantas (A) <i>H. marginata</i> (B) <i>H. rauliniana</i> inoculadas com isolados de bactérias.....	85
Figura 19 -	Altura média das plantas (A) <i>H. marginata</i> (B) <i>H. rauliniana</i> inoculadas com isolados de bactérias.....	85
Figura 20 -	Desenvolvimento médio de raízes (A) <i>H. marginata</i> (B) e <i>H. rauliniana</i> inoculadas com isolados de bactérias.....	86
Figura 21 -	Classificação das raízes através de notas equivalentes de (0 a 10) de plantas de <i>H. rauliniana</i> e <i>H. marginata</i> após 60 dias de inoculação.....	86
Figura 22 -	Peso fresco da parte aérea das plantas micropropagadas de (A) <i>H. marginata</i> e (B) <i>H. rauliniana</i> inoculados com isolados de bactérias.....	86
Figura 23 -	Peso fresco radicular das plantas micropropagadas (A) <i>H. marginata</i> e (B) <i>H. rauliniana</i> inoculadas com isolados de bactérias.....	87
Figura 24 -	Peso seco radicular das plantas micropropagadas (A) <i>H. marginata</i> e (B) <i>H. rauliniana</i> inoculadas com isolados de bactérias.....	87
Figura 25 -	Peso total radicular das plantas (A) <i>H. marginata</i> e (B) <i>H. rauliniana</i> inoculadas com isolados de bactérias.....	87
Figura 26 -	Peso total aéreo das plantas (A) <i>H. marginata</i> e (B) <i>H. rauliniana</i> inoculadas com isolados de bactérias.....	88

Figura 27 -	Porcentagem de sobrevivência das plantas de <i>H. rauliniana</i> inoculadas com diferentes isolados bacterianos.....	90
Figura 28 -	Crescimento em altura e número de folhas de <i>H. rauliniana</i> (A, B) após 60 dias de inoculação.....	91
Figura 29 -	Porcentagem de sobrevivência das plantas de <i>H. marginata</i> inoculadas com diferentes isolados bacterianos.....	91
Figura 30 -	Crescimento em altura e número de folhas de <i>H. marginata</i> (A, B) após 60 dias de inoculação.....	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Número de ápices florais de <i>H. rauliniana</i> (1), <i>H. orthotricha</i> cv <i>Total eclipse</i> (2) <i>H. rostrata</i> (3), <i>H. chartacea</i> cv <i>Sexy pink</i> (4) introduzidos <i>in vitro</i>	37
Tabela 2 -	Contaminação, oxidação e sobrevivência de ápices florais de <i>H. rauliniana</i> (1), <i>H. rostrata</i> (2), <i>H. chartacea</i> cv <i>Sexy Pink</i> (3) <i>H. orthotricha</i> cv <i>Total eclipse</i> (4), após 30 dias de cultivo <i>in vitro</i>	47
Tabela 3 -	Percentagem de contaminação, oxidação e sobrevivência de explantes ápice floral <i>Heliconia rauliniana</i> após 30 dias de cultivo <i>in vitro</i>	48
Tabela 4 -	Percentagem de contaminação, oxidação e sobrevivência de embriões <i>Heliconia marginata</i> após 30 dias de cultivo <i>in vitro</i>	49
Tabela 5	Características do Substrato Plantamax Hortaliças Ht.....	72
Tabela 6 -	Avaliação fenotípica das bactérias endofíticas isoladas de <i>H. marginata</i> em fixar nitrogênio, solubilizar fosfato e produzir fitohormônio.....	79
Tabela 7 -	Avaliação fenotípica das bactérias endofíticas isolada de <i>H. rauliniana</i> em fixar nitrogênio, solubilizar fosfato e produzir fitohormônio.....	79
Tabela 8 -	Efeito de bactérias endofíticas selecionadas na promoção de crescimento de plantas de <i>Heliconia marginata</i> sobre altura, número de folhas e raízes.....	92
Tabela 9 -	Efeito de bactérias endofíticas selecionadas na promoção de crescimento de plantas de <i>Heliconia marginata</i> sobre o peso de matéria fresca e seca da parte aérea e da raiz.....	93
Tabela 10 -	Efeito de bactérias endofíticas selecionadas na promoção de crescimento de plantas de <i>Heliconia rauliniana</i> sobre altura, número de folhas e raízes.....	94
Tabela 11 -	Efeito de bactérias endofíticas selecionadas na promoção de crescimento de plantas de <i>Heliconia rauliniana</i> sobre o peso de matéria fresca e seca da parte aérea e da raiz.....	95

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
CAPÍTULO I.....	16
1. INTRODUÇÃO.....	17
2. OBJETIVOS.....	20
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
3.1. Aspectos Botânicos de <i>Heliconia</i>	21
3.2. Características específicas das espécies.....	23
3.2.1. <i>Heliconia marginata</i>	23
3.2.2. <i>Heliconia rauliniana</i>	23
3.3. Métodos de Propagação de <i>Helicônias</i>	24
3.3.1. Propagação sexuada.....	24
3.3.2. Propagação assexuada.....	25
3.4. Cultura de Tecidos.....	26
3.4.1. Importância do Cultivo <i>in vitro</i> na Floricultura.....	26
3.4.2. Problemas em Cultura de Tecidos Vegetais.....	27
3.4.2.1. Oxidação.....	27
3.4.2.2. Contaminação.....	28
3.4.3. Desinfestação.....	29
3.4.4. Micropropagação de <i>Helicônia</i>	30
3.4.5. Aclimatização de plantas micropropagadas de <i>Helicônia</i>	33
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
4.1. Seleção de Matrizes.....	36
4.2. Coleta de Material.....	37
4.3. Desinfestação dos Explantes.....	38
4.4. Introdução de Explantes em Meio de Cultura.....	39
4.4.1. Ápice Floral.....	39
4.4.2. Embriões.....	40
4.5. Estabelecimento e Multiplicação.....	40
4.6. Enraizamento e Aclimatização.....	42
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44

5.1. Cultura de Tecidos.....	44
5.1.1. Micropropagação de <i>Heliconia rauliniana</i>	44
5.1.2. Micropropagação de <i>Heliconia marginata</i>	48
5.2. Aclimatização.....	49
6. CONCLUSÃO.....	51
CAPÍTULO II.....	52
1. INTRODUÇÃO.....	53
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	55
2.1. Microrganismos endofíticos e sua importância.....	55
2.2. Diversidade de bactérias endofíticas.....	56
2.3. Isolamento de microorganismos.....	59
2.4. Promoção de crescimento vegetal.....	59
2.5. Fixação biológica de nitrogênio.....	61
2.6. Produção de hormônio vegetal auxina.....	62
2.7. Solubilização de Fosfato.....	63
2.8. Microrganismos endofíticos em Helicônias.....	64
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	67
3.1. Isolamento de Microorganismos.....	67
3.1.1. Amostras Vegetais.....	67
3.1.2. Isolamento Bacteriano.....	67
3.2.. Avaliação Fisiológica dos isolados.....	67
3.2.1. Teste de Fixação biológica de Nitrogênio.....	68
3.2.2. Teste de Solubilização de Fosfato.....	68
3.2.3. Teste Produção de Auxina.....	68
3.3. Extração de DNA genômico de bactérias.....	69
3.3.1. Amplificação do gene 16rRNA.....	69
3.3.2. Identificação utilizando o gene 16S rDNA.....	70
3.4. Inoculação de isolados bacterianos em mudas micropropagadas de Helicônias.....	70
3.4.1. Primeiro Experimento.....	71
3.4.2. Segundo Experimento.....	73
3.5. Análise Estatística.....	76
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	77

4.1. Frequência de isolamento de bactérias endofíticas.....	77
4.1.1. Características fenotípicas dos isolados bacterianos de <i>H. rauliniana</i> e <i>H. marginata</i>	77
4.1.2. Identificação por meio de 16S rDNA.....	80
4.2. Inoculação de isolados bacteriano em mudas micropropagadas de Helicônias	82
4.2.1. Primeiro Experimento.....	82
4.2.2. Segundo experimento.....	84
5. CONCLUSÃO.....	96
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97
7. PERSPECTIVAS.....	111

CAPÍTULO I

MICROPROPAGAÇÃO, E RESGATE DE EMBRIÕES

1. INTRODUÇÃO

O cultivo de flores e plantas tropicais no Brasil destaca-se como atividade agrícola importante economicamente. Isto se deve ao fato desta atividade apresentar maior rentabilidade por área cultivada e proporcionar rápido retorno financeiro, podendo ser praticada em pequenas áreas de agricultura familiar, fornecendo um elevado número de emprego/ha. Apresenta potencial de mercado favorável, principalmente nas regiões Norte, Nordeste e Centro Oeste pelas ótimas condições para seu desenvolvimento, por não existir risco de baixa temperatura, aliado à presença de água e condições de solo com profundidade suficiente para completar o ciclo e, conseqüentemente, o sucesso do agronegócio (LAMAS, 2004).

A floricultura tropical movimenta US\$ 400 milhões por ano e o setor corresponde a menos de 5 % das exportações brasileiras, sendo este um indicativo da ampla perspectiva de expansão, impulsionada substancialmente pela sua boa aceitação no mercado, principalmente o internacional, devido à alta durabilidade após a colheita, a resistência durante o transporte, o exotismo e alta diversidade de forma e cores das brácteas, principalmente das helicônias. Flores e folhagens tropicais têm uma excelente aceitação nos Estados Unidos e países da Europa em especial Holanda, Portugal, Espanha, França, Alemanha e Itália. O Brasil exporta para aproximadamente 30 países. O aumento da oferta, centrada em algumas variedades, além do estabelecimento de uma logística de exportação, têm possibilitado, que esses materiais, produzidos no Brasil, cheguem ao consumidor espanhol em 16 horas e, em 24 horas, ao consumidor do centro europeu (NAMESNY, 2005).

Em países desenvolvidos, as flores são artigos corriqueiros nas compras, com um consumo per capita de US\$ 137 ao ano na Alemanha e US\$ 36 nos EUA (SEBRAE, 2005). A maioria desses países apresenta limitações para o cultivo de flores tropicais devido às condições climáticas ou exiguidade do território. O consumo per capita de flores, no Brasil,

gira em torno de US\$ 4,7 por ano (SEBRAE, 2005), sendo 50 % gasto em flores de corte, 40 % em plantas envasadas e 10 % de forrações (KRAS, 2006).

No Brasil, o cultivo de flores tropicais é feito, principalmente, nos Estados do Nordeste (Pernambuco, Alagoas, Ceará, Bahia e Sergipe), Norte (Pará e Amazonas), Distrito Federal, sudeste (Rio de Janeiro e São Paulo), (JUNQUEIRA & PEETZ, 2005).

No Estado do Amazonas os pequenos agricultores constituem-se na grande maioria dos trabalhadores rurais e, exploram culturas anuais de subsistência com utilização de sistema de produção de baixa eficiência técnica e econômica, gerando um processo de descapitalização constante e crescente (MOTA, 2000)

Contrapondo-se ao cultivo dessas culturas existe o universo das flores tropicais, mais especificamente, as pertencentes à ordem Zingiberales, que são muito atrativas no mercado internacional e, dentre essas se destaca o gênero *Heliconia*, o único representante da família Heliconiaceae e com importante participação na floricultura. As helicônias atuam como plantas pioneiras no processo de regeneração da vegetação, auxiliam na recuperação de solos degradados desempenhando um importante papel nos ecossistemas tropicais, contribuindo para futuros programas de manejo que relevem a exploração sustentável e a conservação dessas espécies em longo prazo (ARRUDA *et al.*, 2008).

O Estado do Amazonas não tem tradição no cultivo de flores, mas é possível visualizar a floricultura como uma alternativa ao desenvolvimento econômico (MOTA, 2000).

Apesar da importância das potencialidades econômicas e de mercado dessas espécies tropicais, nativas da região, como a helicônia, o seu cultivo ainda é frequentemente realizado através de mudas propagadas vegetativamente. Essa forma de propagação, além de ser muito lenta, ainda pode disseminar patógenos inviabilizando a produção de mudas em quantidade e qualidade suficientes para atender a um mercado consumidor crescente e exigente. Nesse contexto, são necessários mais estudos básicos sobre a utilização de técnicas mais eficientes e,

a micropropagação é alternativa para a propagação de plantas com qualidade fitossanitária, uniformidade genética e de alta qualidade, que atenda as exigências do mercado.

No entanto, com a utilização da técnica de micropropagação destas espécies, ocorrem algumas dificuldades como a contaminação dos explantes *in vitro*, por bactérias endofíticas, problema este, que influencia no desenvolvimento destes protocolos e multiplicação das plantas.

A contaminação por microrganismos é conhecida como um dos mais sérios problemas da cultura de tecidos e, geralmente ocorre nos cinco primeiros dias após a inoculação dos explantes (SOUZA, 2007).

A proposta de realização deste trabalho foi o estudo de desenvolvimento de protocolo de mudas micropropagadas de *Heliconia marginata* e *Heliconia rauliniana*.

2. OBJETIVOS

Geral

- Estabelecer o protocolo para produção de mudas micropropagadas de *H. rauliniana* e *H. marginata*, utilizando ápice floral e resgate de embriões.

Específicos

- Estabelecer o protocolo de desinfestação;
- Estabelecer o protocolo de multiplicação;
- Estabelecer o protocolo de aclimatização.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Aspectos Botânicos da *Heliconia*

As *heliconias* são plantas herbáceas perenes cuja altura varia desde 70 cm até 10 m. Estão agrupadas na ordem Zingiberales e são conhecidas no exterior como tropicais exóticas, por suas cores, formas, tamanhos variados e grande durabilidade. Pertencem à família Heliconiaceae, composta por um único gênero, *Heliconia* L. (TURRIAGO & FLOREZ, 2004).

Existem aproximadamente 250 a 400 espécies pertencentes ao gênero *Heliconia*. São plantas de origem neotropical, com ampla distribuição na América Central e na América do Sul. Do total de espécies, 98 % são nativas da América Tropical (Kepler & Mau, 1996) sendo 30 % endêmicas do Brasil (Fraume *et al.*, 1990), interpretação endossada por Assis *et al.* (2002). Cronquist (1981) *apud* Assis (2002) classifica-as como pertencentes a:

Divisão: Magnoliophyta

Classe: Liliopsida

Subclasse Zingiberidae

Ordem Zingiberales

Subordem Heliconiineae

Família Heliconiaceae

Gênero *Heliconia*.

O gênero *Heliconia* é constituído por plantas herbáceas rizomatosas, de caule ereto, conforme a espécie, e com folhas de vários tamanhos. O pseudocaule é formado pela justaposição dos pecíolos ou pelas lâminas das folhas, o qual pode ter de 0,7 m a 10 m de comprimento, dependendo da espécie. Do rizoma subterrâneo, se desenvolvem as gemas florais e os novos pseudocauls usados para propagação. As folhas das *heliconias*, geralmente verdes, possuem pecíolo e limbo que podem apresentar cerosidade na face abaxial. As

helicônias são classificadas, quanto à disposição das folhas na planta, como: musóides (folhas verticais em relação ao pseudocaule, pecíolos longos, ocorrendo na maioria das espécies); zingiberóides (folhas dispostas horizontalmente, pecíolos curtos) e canóides (pecíolo curto ou de médio comprimento, com posição oblíqua à haste) e lembram as espécies do gênero *Canna* (BERRY & KRESS, 1991).

A inflorescência é terminal, ereta ou pendente, constituída de brácteas arranjadas disticamente ou em espiral. Cada bráctea contém um cincino com muitas flores (cimeira unípara, no qual os eixos perpendiculares ao eixo principal são dispostos num mesmo plano, alternadamente). As brácteas, estruturas da planta que lhe dão valor comercial, são folhas modificadas com coloração, tamanho, formato, disposição, textura, número e outros detalhes que variam muito, sendo estas características utilizadas na classificação. As brácteas se unem por meio da ráquis e podem estar dispostas em um plano ou em mais de um, devido à torção da ráquis, ficando com forma espiralada. A classificação da helicônia baseia-se no tipo de inflorescência: 1. Inflorescência em um único plano; 2. Inflorescência ereta em mais de um plano; 3. Inflorescência pendente em único plano; 4. Inflorescência pendente em mais de um plano (BERRY & KRESS, 1991).

As flores de helicônias são hermafroditas, com cores variando de amarelo a branco, (Berry & Kress, 1991). O perianto é composto de três sépalas externas e três pétalas internas, as quais apresentam diferentes graus de fusão, formando um tubo aberto de comprimento variado, dependendo da espécie. As flores apresentam seis estames, cinco férteis e um modificado em estaminóide estéril (Criley, 1995). O tamanho, forma e inserção dos estames são características utilizadas para identificação das espécies. As anteras ficam localizadas acima ou no nível final do perianto. O pólen fica maduro durante o dia, na maioria das espécies. O estilete acompanha a curvatura do perianto e o ovário é ínfero, trilocular, com placentação basal, com um óvulo por lóculo (SIMÃO *et al.*, 2006).

Os frutos de helicônias são drupas, indeiscentes com endocarpo lignificado e coloração azul escura quando maduro (Simão & Scatena, 2004; Simão *et al.*, 2006), medem de 2 a 3 cm e são muito apreciados por pássaros (BERRY & KRESS, 1991).

3.2. Características específicas das espécies estudadas neste trabalho

3.2.1. *Heliconia marginata* Griggier Pittier

Esta espécie é de hábito musóide, atinge de 2,0 a 4,0 m de altura, apresenta folhas eretas, com pecíolos de 45 a 90 cm, (Kress *et al.*, 2004). A inflorescência é pendente em mais de um plano, formada de 5 a 15 brácteas espiraladas de cores vermelha e amarela (Fig. 1 a). Esta que espécie foi descrita por Pittier, (1926) citado por “Andersson 1985 b”, ocorre naturalmente no Panamá, Venezuela, Costa Rica, Colômbia, Peru, Brasil, Guiana Francesa e Suriname , geralmente usada como flor de corte e pode ser cultivada desde o pleno sol até 50 % de sombreamento.(Castro *et al.*, 2007). Estas plantas são típicas de margens dos rios, encontradas no Rio Solimões, no município de Benjamim Constant no Amazonas. São também encontradas nas margens do baixo Juruá (ARRUDA *et al.*, 2008).

3.2.2. *Heliconia rauliniana* Barreiros

Espécie de hábito musóide, atinge de 3,0 a 4,5 m. de altura. A inflorescência é pendente em mais de um plano, constituída de 10 a 15 brácteas espiraladas de cores vermelho com as bordas das brácteas verdes amarelos (Fig 1 b). Foi descrita por Barreiros, (1974) como sendo um híbrido resultante do cruzamento *H. marginata* X *H. bihai* e ocorre naturalmente na Venezuela e Brasil (Castro *et al.*, 2007). A *H. rauliniana*, conhecida como caetê-papagaio, é típica da Venezuela, mas foi catalogada no Brasil e, geralmente usada como flor de corte, e pode ser cultivada em pleno sol e até 80% de sombreamento (Berry & Kress, 1991).

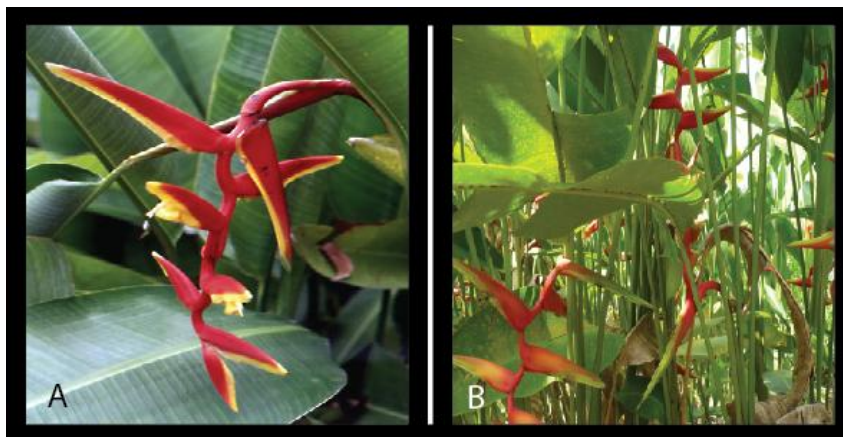


Figura 1: Inflorescências de *Heliconia marginata* (A) e de *H. rauliniana* (B)

3.3. Métodos de Propagação de Helicônias

As helicônias são plantas geófitas, as quais se perpetuam sexuada (sementes) assexuadamente, através de rizoma, (BERRY & KRESS, 1991).

3.3.1. Propagação Sexuada

As sementes variam em tamanho e forma, conforme a espécie, sendo que a maioria é triangular, com dois lados achatados. Devem também estar maduras e frescas, e precisam de luz para germinar, fotoblástica positiva (Marques, 2004). Cada fruto normalmente contém três sementes que podem estar envolvidas por um endocarpo bastante duro, que dificulta a germinação das mesmas (Kress *et al.*, 2004). Essa limitação pode ser contornada pela utilização da técnica de resgate de embriões zigóticos, que propicia uma propagação rápida, recuperação de plantas livres de vírus, conservação de germoplasma como semente botânica e a superação da dormência de sementes (TORRES, 2005).

O período de germinação é bastante variado, ocorrendo na maioria das espécies num prazo de 120 dias, podendo levar até três anos em algumas espécies (Marques, 2004), pois dependem da maturação, do estado fisiológico do embrião e das condições do habitat das espécies. As sementes de helicônias necessitam de altas temperaturas para germinar e a condição ideal é semeá-las em ambiente úmido, ensolarado e quente 25⁰C a 35⁰C (KRESS *et*

al., 2004).

O período de germinação de sementes de *H. velloziana* Emygd, constatado por Simão & Scatena (2004), ocorreu entre quatro e seis meses, provavelmente pelo embrião indiferenciado e o endocarpo pétreo. A germinação é hipógea e a plântula do tipo criptocotiledonar. Nakano (2008) observou também que as duas primeiras estruturas foliares nas plântulas são escamiformes e as raízes adventícias são mais conspícuas do que a raiz primária.

3.3.2. Propagação assexuada

Na propagação assexuada, ou por via vegetativa, ocorre a divisão do rizoma e emissão de brotações à superfície, podendo ser solitárias ou agregadas (Mosca. 2004). Este o método de propagação mais tradicional e utilizado no cultivo de helicônias Este método de propagação apresenta variabilidade genética baixa, porém pode ser um disseminador de patógenos. Para minimizar esse risco são necessários alguns cuidados no procedimento de desinfestação, de ferramentas e rizomas, com inseticidas ou solução de hipoclorito de sódio na concentração de 0,8% (ROCHA, 2007).

Os rizomas são caules especializados que crescem horizontalmente, tanto acima como abaixo da superfície do solo. As helicônias apresentam um rizoma do tipo "ramificado". Recomenda-se uma porção de rizoma medindo no mínimo de 10 a 12,5 cm (constituída de três a cinco pseudocauls) com 20 a 30 cm de comprimento e gemas basais associadas e livres de partículas de solo (Kress, 2004). Dependendo da época do ano podem ser plantados diretamente no campo ou no viveiro em embalagens plásticas sob irrigação e sombreamento entre 30 e 60 %, o que facilita o enraizamento (Lamas, 2004). Neste processo de propagação, as plantas matrizes devem apresentar características como, elevada produtividade, vigor e sanidade (ROCHA, 2007; NAKANO, 2008).

3.4. Cultura de Tecidos

A cultura de tecidos de plantas é uma alternativa para a propagação de plantas com qualidade fitossanitária e uniformidade genética, além da possibilidade de produção em larga escala, contribuindo para as exportações de plantas ornamentais. Esta técnica é extremamente importante na propagação para o cultivo de helicônia, substituindo a propagação convencional.

3.4.1. Importância do Cultivo *in vitro* na floricultura

O cultivo *in vitro* viabiliza a clonagem de várias espécies, permitindo a formação de indivíduos teoricamente idênticos a partir de células, órgãos ou pequenos fragmentos de uma planta matriz. É um procedimento de importância prática na agricultura, com especial enfoque na produção de plantas em larga escala isenta de patógenos, conservação de germoplasma, bem como na pesquisa básica, com enfoque principalmente em citologia e fisiologia celular (TORRES, 2005).

As técnicas destinadas à multiplicação de plantas *in vitro*, constituem-se em uma importante descoberta em termos de desenvolvimento biotecnológico, representando uma importante alternativa na solução dos problemas relacionada ao cultivo de helicônias fora do seu ambiente natural (SILVA, 2005).

A micropropagação apresenta-se como alternativa viável para a produção de mudas de helicônias em larga escala e com qualidade genética e fitossanitária, utilizando-se de várias técnicas, como multiplicação de gemas axilares de rizomas, regeneração de plantas, através da organogênese direta, e indução de calos em explantes retirados da base de plântulas (SANTOS *et al.* 2006).

Após levantamento bibliográfico relacionado a trabalhos com desenvolvimento de protocolos de heliconia, observou-se que somente a partir de 1990 foram iniciados trabalhos

com ápice caulinar e resgate de embriões.

A cultura *in vitro* de embriões, também pode constituir uma interessante aplicação da cultura de tecidos no cultivo de helicônias. Existem mecanismos que impedem os cruzamentos entre espécies deste gênero, o que constitui uma barreira para trabalhos de melhoramento. É possível, com a cultura *in vitro*, resgatar embriões oriundos de cruzamentos híbridos, além de possibilitar a regeneração de plantas híbridas, esta técnica é utilizada também para reduzir o ciclo fenológico da planta. (TORRES, 2005).

3.4.2. Problemas em Cultura de Tecidos Vegetais

3.4.2.1. Oxidação

A oxidação representa um sério problema, especialmente durante a fase de estabelecimento da cultura *in vitro*. Alloufa *et al.*, (2002), trabalhando com cultura *in vitro* de bananeira, objetivando evitar a oxidação, testaram a ação do ácido ascórbico, ácido cítrico e carvão ativado, e observaram que o ácido ascórbico foi o mais efetivo, reduzindo os níveis de oxidação.

A oxidação ocorre em função da liberação de compostos fenólicos *in vitro*, precursores da síntese de lignina, pelo tecido injuriado. Esse acúmulo de polifenóis e produtos de oxidação, como melanina, suberina, lignina, em torno de superfície exisada modificam a composição do meio de cultivo, causando o escurecimento e dificultam a absorção de metabólitos (Andrade *et al.*, 2000). Segundo Sato *et al* (2001) os compostos fenólicos são oxidados pelas enzimas polifenases, produzindo substâncias tóxicas, como a cutina e a calose, inibindo o crescimento dos explantes, podendo causar sua morte,. Isso pode ser minimizado através de determinados procedimentos como, redução dos danos mecânicos e químicos ao explante, remoção de substâncias fenólicas, cultivo em meio líquido e utilização de materiais juvenis (TEIXEIRA, 2005).

3.4.2.2. Contaminação

A contaminação por microrganismos (bactérias e fungos) é um dos mais sérios problemas da cultura de tecidos e, geralmente ocorre nos cinco primeiros dias após a inoculação dos explantes (SOUZA, 2007).

Para o desenvolvimento de novos protocolos de micropropagação, de forma geral, a presença de microrganismos tem sido obstáculo para o uso desta técnica com fins científicos e comerciais. Visando superar o problema de contaminação por endofíticos, experimentos com a utilização de antibióticos em meio de cultura têm sido muito discutidos e o êxito em sua aplicação varia de acordo com os critérios e métodos para o desenvolvimento de um protocolo que atenda os programas de propagação.

Nannetti (1994), Atehortua (1997) e Dias & Rodrigues (2001) encontraram grande dificuldade em estabelecer explantes de *heliconia in vitro* devido à contaminação bacteriana. Nannetti (1994) utilizando o antibiótico Claforam no meio de cultura conseguiu durante o período de 10 dias, 0 % de contaminação, pois em resultados preliminares durante o mesmo período houve 100 % de contaminação bacteriana e nenhum desenvolvimento do explante.

No estabelecimento *in vitro* de *H. stricta*, *H. marginata* e *psitacorum*, Guamantica (1998) enfrentou dificuldades nos estabelecimentos desses explantes devido ao alto grau de contaminação aliado a alta percentagem de oxidação. Na ausência de reguladores de crescimento não apresentaram desenvolvimento morfogênético. Para o desenvolvimento de brotações, 3,0 mg/L⁻¹ de 6- Benzilaminopurina (BAP) apresentou melhor resultado (3,26) e para o enraizamento, o ácido indol butírico (AIB) mostrou-se maior eficiência para promover o maior número e o maior desenvolvimento de raízes (6,19 mm).

A oxidação fenólica pode dificultar o estabelecimento inicial do cultivo *in vitro*, pois algumas enzimas oxidam os fenóis formando quinonas, as quais são responsáveis pela coloração marrom das culturas, além de causarem a inibição do crescimento e a morte dos

explantes em grande número de espécies. A oxidação fenólica é altamente dependente do genótipo e do tipo de explante utilizado. Explantes jovens, em geral, oxidam menos que os mais velhos (TEIXEIRA, 2005).

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

3.4.3. Desinfestação

O processo de desinfestação é o primeiro passo para o estabelecimento de propagação *in vitro* e consiste na eliminação dos microrganismos superficiais do explante, a fim de se evitar contaminações prejudiciais na introdução e manipulação *in vitro* do material (SOUZA *et al.*, 2006).

Um dos principais fatores limitantes encontrados na micropropagação de espécies de helicônias é a contaminação bacteriana dos explantes durante o cultivo *in vitro*. Esta observação está relacionada com estudos de Grattapaglia e Machado (1988) quando cita que a obtenção de tecido descontaminado é uma das etapas mais difíceis da micropropagação.

No estudo realizado por Nathan *et al.*, (1992), o protocolo de desinfestação adotado para *H. psittacorum* foi a lavagem das gemas axilares em água corrente por 15 minutos, imersão em etanol 80 % durante 30 segundos e em solução de NaOCl (0,8 %) por 15 minutos sob agitação contínua e duas lavagens com água destilada, durante 5 minutos, apresentou 33% de contaminação.

Nannetti (1994), antes da introdução de gemas de *Heliconia* sp em meio de cultura, procedeu a desinfestação das mesmas através a imersão em solução de ácido cítrico (200 mg.L^{-1}) durante a operação, a seguir em etanol (95 %) durante 2 minutos e posteriormente em soluções de NaOCl (0,8 %), pH 6, durante 15 minutos com três lavagens em água destilada esterilizada.

Para desinfestar explantes de diferentes tamanhos de ápice caulinar de helicônia, Marulanda & Isaza (2004) utilizaram diferentes concentrações de hipoclorito de sódio e álcool (70 %) em diferentes tempos de exposição. O meio de cultivo MS foi suplementado com 6-BAP (6-benzylaminopurina) (2 mg.L^{-1}), AIB ($0,1 \text{ mg.L}^{-1}$) e o antibiótico Cefatoxima ($0,2 \text{ g.L}^{-1}$), obtendo bons resultados quanto ao crescimento e desenvolvimento dos explantes.

Rodrigues (2005) conseguiu estabelecer ápices caulinares de *H. rauliniana* utilizando apenas solução de NaOCl (30 %, produto comercial, 2,5 % cloro ativo) e Tween-80 (0,1 %) durante 20 minutos e três lavagens com água destilada esterilizada. Esta mesma metodologia foi utilizada por Nakano (2008) na desinfestação de explantes de *H. bihai* cv. Peach Pink, *H. oortotricha* L. Anderss. cv. Total Eclipse e *H. ortotricha* cv. Candy.

3.4.4. Micropropagação de Helicônia

Em micropropagação de *Heliconia* sp. foi determinada uma metodologia básica, por Nannetti (1994) comparando a ação de benzilaminopurina-BAP ($0,0 \text{ mg.L}^{-1}$; $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$; $5,0 \text{ mg.L}^{-1}$; $10,0 \text{ mg.L}^{-1}$) e thidiazuron-TDZ ($0,025 \text{ mg.L}^{-1}$; $0,500 \text{ mg.L}^{-1}$; $1,000 \text{ mg.L}^{-1}$) em meio MS - meio de cultura básico segundo Murashige & Soog (1962). O maior número de brotos nos explantes ocorreu em meio contendo $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP e entre os tratamentos com TDZ a maior ocorreu na concentração $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$. Em um segundo experimento, os explantes de *Heliconia* sp, foram cultivados em meio MS, acrescido de $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$ TDZ e após, 2, 4, 8, 16, 32 dias foram transferidos para meio MS sem regulador crescimento. Após 60 dias,

registrou-se a máxima de produção (2,21 brotos) em oito dias de exposição ao TDZ. Em um terceiro experimento conduzido, os explantes foram imersos em solução de 0,25 mg.L⁻¹ de TDZ por 5, 10, 20, 40, 80 minutos e cultivados em meio MS, constando-se o maior número, e tamanho de brotos com 80 minutos de imersão. Dando continuidade, a autora testou diferentes concentrações de nitrogênio (840 mg.L⁻¹; 551,60 mg.L⁻¹; 407,40 mg.L⁻¹; 335,44 mg.L⁻¹; 263 mg.L⁻¹) e cálcio (880 mg.L⁻¹, 448 mg.L⁻¹, 220 mg.L⁻¹, 110 mg.L⁻¹ e 0,00 mg/L), combinados fatorialmente com 2,5 mg.L⁻¹ de BAP e 0,25 mg.L⁻¹ de TDZ. A adição de 840 mg.L⁻¹ NH₄NO₃ propiciou o maior número de brotos (1,83) no meio de cultura com BAP e entre os meios com TDZ a concentração de 335,44 mg.L⁻¹ de NH₄NO₃ favoreceu a brotação 5,08 e o aumento do tamanho dos brotos (4,9 mm). O acréscimo de 880 mg.L⁻¹ de CaCl₂2H₂O acarretou maior brotação, tanto nos tratamentos com BAP (10,2), como TDZ (1,28). Entretanto, o tamanho dos brotos foi superior nas concentrações de 220 mg.L⁻¹ e 840 mg.L⁻¹ nos meios com TDZ e BAP (12,2 mg.L⁻¹ e 9,5 mg.L⁻¹), respectivamente (10,0 mm e 10,0 mm).

Gemas terminais e axilares de *H. psitacorum*, em meio de cultivo de MS com 9,0 mg.L⁻¹ de BAP e com adição de 2,25 mg.L⁻¹ de BAP apresentaram bons resultados na multiplicação de brotos *in vitro* (Guamantica, 1998). Em um segundo experimento, com a mesma espécie, a autora utilizou explantes menores de ápices meristemáticos menores que 1 mm, cultivados em meio MS na presença de 0,1mg.L⁻¹ de 2,4-D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético). Nas concentrações de 0,4 a 0,8 mg.L⁻¹ de 2,4-D houve indução de calos morfogenéticos. Quando cultivados em meio básico, os calos produziram corpos no protocormo, que facilitou o desenvolvimento das plantas.

Trabalhando com embriões provenientes de frutos maduros de *H. rostrata*, excisados e inoculados em meio de cultura contendo os sais básicos MS, vitaminas e sacarose (0; 1; 2 e 3%), Torres (2005), demonstrou que a adição de sacarose foi essencial para o

desenvolvimento dos embriões. Em meio desprovido de sacarose os embriões morreram no meio de cultivo, enquanto que concentrações de 1 %, 2 % e 3 % (p/v) de sacarose favoreceram o desenvolvimento dos embriões. Concluindo que a adição da sacarose ao meio básico foi essencial para o crescimento e desenvolvimento dos embriões de *H. rostrata* e que a concentração ótima de sacarose que proporcionou o maior número de plântulas foi de 3 %.

Embriões, de *H. rostrata*, cultivados em seis tratamentos: meio de cultivo MS com metade da força iônica (1/2 MS) com 15, 30 e 45 g. L⁻¹ de sacarose e MS completo com 15, 30 e 45g. L⁻¹ de sacarose, Melo *et al.*, 2005, observaram que 40 dias após o cultivo, o melhor desenvolvimento da parte aérea e do sistema radicular dos embriões foi daqueles cultivados no MS com metade da força iônica acrescido de 30g.L⁻¹ de sacarose.

Gomes *et al.* (2005), estudando embriões extraídos das sementes de frutos maduros de *H. bihai* e *H. latisphata*, cultivados em meio de cultivo MS acrescido de cinco concentrações de BAP (0; 1,0 mg.L⁻¹; 2,0 mg.L⁻¹; 3,0mg.L⁻¹ e 4,0 mg.L⁻¹), observaram que as maiores taxas de germinação foram para *H. bihai* (33 % no meio MS + 1,0 mg.L⁻¹ de BAP) e para *H. latisphata* (40 % no meio MS + 4,0 mg.L⁻¹ de BAP). Os autores sugeriram que novas técnicas deveriam ser testadas, devido à grande variação nas taxas de germinação *in vitro* dos embriões extraídos manualmente.

O estudo desenvolvido por Aguiar *et al.* (2004), mostra que os meios de cultivo mais adequados para o desenvolvimento de embriões de *H. psittacorum* e *H. bihai* foram 2,8 mg. L⁻¹ de giberelina (AG₃) e 2,5 mg. L⁻¹ de cinetina (CIN), respectivamente.

Silva (2005), estudando a propagação *in vitro* de embriões zigóticos de *Heliconia spp*, em diferentes combinações entre auxina e citocininas para indução de calos embriogênicos, constatou que o melhor índice de multiplicação e desenvolvimento das gemas ocorreu em meio MS com a metade da concentração de sais, utilizando a sacarose como fonte de carboidrato, acrescido de 2,5 m.L⁻¹ de BAP, cultivado durante 45 dias.

Ápices caulinares e florais em três estádios de desenvolvimento da inflorescência (brácteas fechadas, metade das brácteas abertas e todas as brácteas abertas) foram inoculados em MS acrescido de 2 g.L⁻¹ de Phytigel, 30 g.L⁻¹ de sacarose, 10 mL.L⁻¹ vitamina Morel (Morel & Wetmore, 1951), 3,5 mL.L⁻¹ de BAP, sob pH 5,8. Após cinco dias, todos os ápices caulinares apresentaram contaminação, enquanto que os ápices florais de brácteas semi-abertas e abertas somente apresentaram contaminação somente dez dias após e em um terço dos ápices florais fechados (Dias & Rodrigues, 2001). Dando continuidade ao experimento, foram isoladas as colônias de bactérias dos meios de cultura e identificadas com teste bioquímico, onde foi observada a presença de *Pseudomonas sp* nos ápices florais *Pseudomonas sp* e *Klebsiella sp* nos ápices caulinares. Estes resultados foram confirmados por (NAKANO, 2008).

Em estudos para padronizar um protocolo de assepsia para micropropagação de *H. bihai* cv Peach pink, *H. ortotricha* cv Total Eclipse e *H. ortotricha* cv Candy cane nos quais compararam o vigor dos explantes relacionado ao aumento do número médio de brotos, constataram-se os melhores resultados nos tratamentos MS 50 % + 0,10 mg.L⁻¹ ANA, MS 50% + 0,25mg.L⁻¹ ANA, MS 100% + 0,10 mg.L⁻¹ ANA e MS 100% + 0,10 mg.L⁻¹ IBA que proporcionaram um número médio de 2,8; 2,7; 3,0 e 3,3 brotos por explante matriz, respectivamente, ao final de 12 semanas (NAKANO, 2008).

3.4.5. Aclimatização de plantas micropropagadas de Helicônia

A aclimatização de plantas oriundas de cultura de tecidos consiste em retirá-las das condições *in vitro* e transplantá-las para recipientes com substrato adequado, em casa-de-vegetação, objetivando prepará-las para a mudança de ambiente que deverão enfrentar quando forem transferidas para o local definitivo. Algumas das mudanças fisiológicas sofridas pelas plantas durante a aclimatização são as suscetibilidades ao estresse hídrico, pois há um

aumento na taxa de transpiração, devido à diminuição da umidade relativa e aumento da intensidade luminosa; a passagem para um estado autotrófico realizando fotossíntese; o sistema radicular se adapta para incrementar rapidamente a absorção de sais sendo que a planta fica vulnerável à ação dos agentes patogênicos, pois é transferida de um ambiente asséptico para o natural.

Na aclimatização, devem ser garantidos a manutenção mecânica do sistema radicular, a estabilidade da planta, o suprimento de água e nutrientes e as trocas gasosas entre as raízes e o ar atmosférico.

A escolha de substratos e recipientes, assim como o manejo correto da irrigação, é um dos principais problemas técnicos que muitos produtores têm enfrentado durante a aclimatização de plantas micropropagadas. Além do mais, as pesquisas nessa etapa da micropropagação ainda são escassas e as informações técnicas sobre cultivo são raras ou muitas vezes inexistentes. Esta escassez de informações pode levar à baixa qualidade e/ou a ausência de padronização dos produtos obtidos, prejudicando a sua comercialização nos mercados interno e, principalmente, externo (ROCHA, 2007).

A determinação de substratos alternativos, que sejam viáveis para a aclimatização é de grande relevância, pois o aproveitamento de resíduos da agroindústria em práticas agrícolas representa a solução de problemas sociais e ambientais (SILVEIRA *et al.*, 2002).

A crescente utilização de compostos orgânicos como substrato durante esta fase reflete a necessidade de práticas agrícolas sustentáveis que minimizem o impacto ambiental. Porém, é importante que se avaliem os substratos adequados ao desenvolvimento de cada cultura (SCHMITZ *et al.*, 2002).

Santos *et al.* (2004) avaliando a eficiência de três substratos orgânicos (casca de arroz carbonizada, pó de casca de coco seco e verde) e de dois adubos (Vitasolo® e húmus de minhoca) para a aclimatização de plântulas de *H. psittacorum* verificaram que a casca de

arroz carbonizada foi mais eficiente que os demais substratos e que o húmus de minhoca foi mais eficiente que o produto comercial Vitasolo®.

Rodrigues *et al.* (2005) avaliaram a aclimatização de mudas micropropagadas de *H. bihai* em diferentes substratos (areia lavada, vermiculita (textura média) e PlantMax^(R) sob os níveis de sombreamento 0, 30, 40, 50, 60, 70, e 80 %. As mudas apresentaram melhor desempenho nos substratos areia lavada e PlantMax^(R) Horticultura sob as condições de sombreamento a partir de 50 %, em especial 70 % e 80 %.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Seleção de Matrizes

Para realizar este trabalho foram utilizados, como explantes, a inflorescência (ponteiro) ou ápice floral da bráctea principal e embriões zigóticos. Para o ápice floral foi realizado um pré-experimento utilizando-se explantes (ponteiro) de quatro espécies de helicônia: *H. rauliniana*, *H. rostrata*, *H. chartaceae* cv *Sexy pink* e *H. orthotricha* cv *Total eclipse*, objetivando selecionar a espécie que melhor resultado apresentasse. Neste pré-experimento foram utilizados 105 explantes por espécie, distribuídos em 6 tratamentos mais o controle, utilizando-se inflorescência em três fases de desenvolvimento. Atribuiu-se T₁ para todas as brácteas fechadas, T₂ para duas brácteas abertas e T₃ para quatro brácteas abertas (Fig.2 A; B; C e D). As brácteas foram levadas ao laboratório para a execução da assepsia na solução de hipoclorito de sódio (30%) + de água (70%), por 20 minutos. Em seguida, as brácteas foram lavadas em água esterilizada por três vezes. Após esse processo foram feitos os cortes para a retirada dos ápices florais e imergidos no álcool 70% por ± 1 minuto e introduzidos em meio de cultivo de MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) (Tabela 1).



Figura 2 – Inflorescências de *H. rauliniana* (A), *H. orthotricha* cv Eclipse total (B), *H. rostrata* (C) e *H. chartaceae* cv *Sexy Pink* (D).

Tabela 1 - Número de ápices florais de *H. rauliniana* (1), *H. orthotricha* cv *Total eclipse* (2) *H. rostrata* (3), *H. chartacea* cv *Sexy pink* (4) introduzidos *in vitro*

TRATAMENTOS	1			2			3			4		
	T ₁	T ₂	T ₃	T ₁	T ₂	T ₃	T ₁	T ₂	T ₃	T ₁	T ₂	T ₃
Controle	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
1,0 mg/L BAP	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
1,0mg/L BAP + 0,05mg/L IBA	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
3,0 mg/L BAP	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
3,0 mg/L BAP + 0,05mg/L IBA	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
5,0 mg/L BAP	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
5,0 mg/L BAP + 0,05mg/L IBA	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Total (Explantos)	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35

*T₁= Todas as Brácteas Fechadas; *T₂= Duas Brácteas Abertas; *T₃= Quatro Brácteas Abertas

Após os resultados do pré-experimento, foi iniciado o trabalho para o desenvolvimento de protocolos para micropropagação, utilizando-se duas espécies: *H. rauliniana*, de área de plantio do produtor da Tucandeira Flores Tropicais da Amazônia situada na KM 63 da BR-174, município de Manaus. A outra espécie trabalhada foi a *H. marginata*, coletada às margens do Alto Solimões, no município de Benjamin Constant que após a limpeza e tratamento dos rizomas foi plantada em vaso na casa de vegetação do Centro de Biotecnologia da Amazônia-CBA e, posteriormente, plantada em área de jardim deste centro.

4.2. Coleta de Material

a) Ápices Florais

O material utilizado para o estabelecimento *in vitro* constituiu-se da bráctea apical da inflorescências da espécie *H. rauliniana* selecionando-se 35 brácteas apicais para cada fase de desenvolvimento da inflorescência sendo T1 com todas as brácteas fechadas, T2 com duas abertas e T3 com quatro abertas.

b) Embriões

O material utilizado foram os frutos maduros de *H. marginata*, os quais deram origem as sementes e posteriormente o resgate de embriões (Fig. 3 A, B, C e D).



Figura 3 - Planta matriz (A), flor (B), frutos (C) e sementes (D) de *Heliconia marginata* (Gringgier) Pittier

4.3. Desinfestação dos explantes

a) Ápices Florais

No laboratório, foram retiradas as brácteas das inflorescências coletadas. A assepsia consistiu-se em lavagem das brácteas em água corrente e detergente neutro, com o auxílio de uma esponja. Após a limpeza, as brácteas florais foram colocadas em uma bandeja de plástico contendo 800 ml de água e três gotas de detergente. Em seguida foram lavadas com água destilada esterilizada e levadas para câmara de fluxo laminar, onde ocorreu o processo de retirada dos ápices, até atingirem o tamanho que variou de 9 a 12 mm. Os ápices florais foram imersos em solução de água e um produto de hipoclorito de sódio (com 2,5 % de cloro ativo), na proporção de 2:1, contendo 0,1 % de Tween 80, por aproximadamente 30 minutos. Após o tratamento asséptico, os ápices foram lavados com água destilada esterilizada por 4 vezes.

b) Embriões

As sementes, após serem retiradas dos frutos, foram lavadas em água corrente com o auxílio de uma esponja com detergentes neutros e colocados em frascos de 200 ml contendo 100 ml de água e três gotas de detergente neutro, por 4 horas. Em seguida, o material foi

lavado enxaguado e levado à câmara de fluxo laminar e imerso em solução de água e hipoclorito de sódio (2,5 % de cloro ativo), na proporção de 2:1, contendo 0,1 % de Tween 80, por aproximadamente 30 minutos. Após o tratamento asséptico, as sementes foram enxaguadas em água destilada esterilizada por 4 vezes.

4.4. Introdução de Explantes em Meio de Cultura

O processo de introdução dos explantes *in vitro*, foi realizado em câmara de fluxo laminar, sob condições assépticas, utilizando-se de bisturi e pinça devidamente flambada.

4.4.1. Ápice Floral

Após a assepsia, foram feitos os cortes isolando os ápices florais constituídos de uma ou duas brácteas, envolvendo o meristema e um segmento de ráquis de 2,0 cm. Os cento e cinco ápices florais foram introduzidos em meio de cultura de MS (Murashige & Skoog, 1962), semissólido (2,0 g.L⁻¹ de phytigel), com sacarose (30 g.L⁻¹), sem reguladores de crescimento, acrescido de 300 mg.L⁻¹ de antibiótico, Cefotaxima (após a autoclavagem do meio de cultura), pH ajustado para 5,8 e incubados na BOD sob à temperatura de 26 °C (Fig.4 A, B, C).

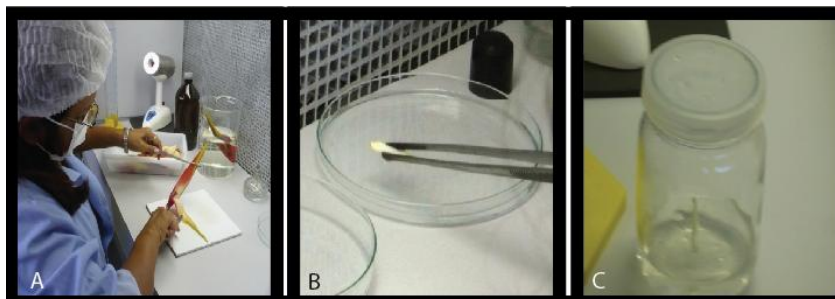


Figura 4 - Processo de preparação: retiradas das brácteas (A), e ápice floral (B) e introdução dos explantes (C) de *Heliconia rauliniana* *in vitro*

4.4.2 Embriões

Os embriões foram extraídos, conforme a metodologia de Torres (2005), com a compressão da semente (Fig. 5A e 5B), utilizando a parte mediana de uma pinça e forçando mecanicamente a expulsão do embrião pela micrópila. Após a retirada dos embriões, estes foram introduzidos em dois meios de cultura: 1^o MS acrescido de BAP ($3,0 \text{ mg.L}^{-1}$) + antibiótico Cefotaxima (300 mg.L^{-1}) e o 2^o MS + Ácido Giberélico ($0,1 \text{ mg.L}^{-1}$) + antibiótico Cefotaxima, (300 mg.L^{-1}), ambos contendo 30 g.L^{-1} de sacarose, $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de phytigel e pH ajustado a 5,8 (Fig. 5C). Após a inoculação, os explantes foram incubados em BOD sob a temperatura de 26°C permanecendo no escuro por 30 dias. A avaliação dos explantes quanto ao nível de contaminação e desenvolvimento destes foi realizada aos 30 dias.

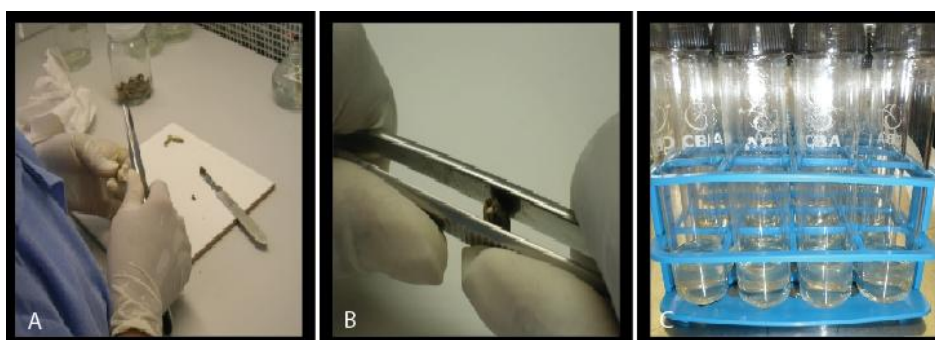


Figura 5 - Processo de preparação: abertura do opérculo (A), resgate do embrião (B) e introdução de explantes (C) de *Heliconia marginata* in vitro

4.5. Estabelecimento e Multiplicação

a) Ápices florais

Após a incubação dos explantes na BOD por 30 dias, o estabelecimento e o primeiro subcultivo, os explantes foram transferidos para um novo meio de cultura, com a mesma composição sem reguladores de crescimento (Fig. 6A, 6B, 6C e 6D). Nos subcultivos subsequentes, a partir do segundo subcultivo, o meio de cultivo utilizado foi o MS suplementado com os reguladores de crescimento BAP ($3,0 \text{ mg.L}^{-1}$; $3,5 \text{ mg.L}^{-1}$ e $4,0 \text{ mg.L}^{-1}$)

e IBA ($0,1 \text{ mg.L}^{-1}$), (Fig.6 E, F). Estes foram mantidas em sala de crescimento a $24 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 2.000 lux e fotoperíodo de 16 horas. Os subcultivos foram realizados a cada quatro semanas, nas mesmas condições de temperatura e fotoperíodo citados anteriormente. Nos intervalos dos sucessivos subcultivos, os ápices florais foram avaliados quanto à ocorrência de contaminações, oxidação dos tecidos e desenvolvimento de brotações. Os subcultivos foram realizados até o 9º, início da fase de enraizamento.

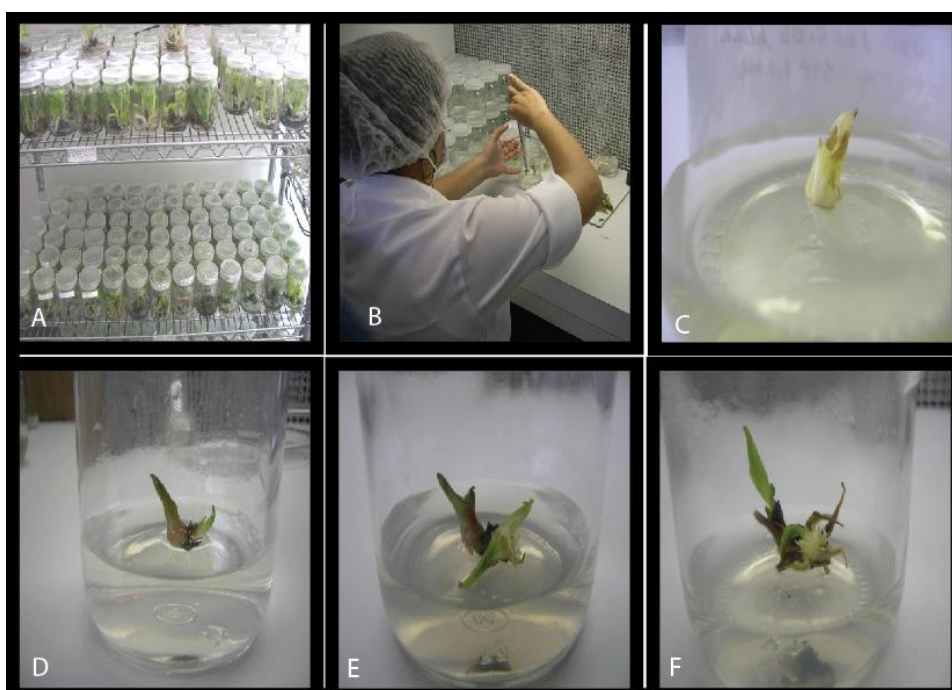


Figura 6 – Subcultivos (A, B e C), diferenciação (D) e dediferenciação (E e F) na multiplicação *in vitro* de *Heliconia rauliniana*

b) Embrião

Após trinta dias de incubação em BOD foi realizada a avaliação quanto ao nível de contaminação e desenvolvimento destes explantes (Fig.7A e 7B) e transferidos para um novo meio de cultura de MS suplementado com BAP ($3,0 \text{ mg.L}^{-1}$; $3,5 \text{ mg.L}^{-1}$ e $4,0 \text{ mg.L}^{-1}$) e IBA ($0,1 \text{ mg.L}^{-1}$). As culturas foram mantidas em sala de crescimento a $24 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 2.000 lux e fotoperíodo de 16 horas. Os subcultivos foram realizados a cada quatro semanas (Fig.7C), nas mesmas condições de temperatura e fotoperíodo citados anteriormente (Fig. D). Nos

intervalos dos sucessivos subcultivos, os explantes foram avaliados quanto a ocorrência de contaminação, oxidação dos tecidos e desenvolvimento de brotação. Os subcultivos foram realizados até o 9º subcultivo, início da fase de enraizamento (Fig. 7E)



Figura 7 - Estabelecimento (A e B) e multiplicação (C, D e E) *in vitro* de *Heliconia marginata*

4.6. Enraizamento e Aclimatização

a) Enraizamento

Após o 9º subcultivo, as plântulas foram retiradas dos frascos, lavadas em água corrente para eliminar o excesso do meio de cultivo e transferidas para 3 bandejas plásticas contendo cada uma 48 células, totalizando 144 plântulas por espécie. O substrato utilizado foi o PLANTMAX (Horticultura) esterilizado, e levadas à casa de vegetação para o enraizamento. O período para a avaliação foi ao mesmo tempo em que ocorreu à aclimatização (60 dias). Esse mesmo processo ocorreu para ambas às espécies trabalhadas: tanto para as plântulas originadas de *H. rauliniana*, como para as plântulas de *H. marginata*.

b) Aclimatização

O processo de preparo para aclimatização das plântulas ocorreu ao mesmo tempo com a fase de enraizamento. As mesmas plântulas foram utilizadas nas duas fases, enraizamento e aclimatização, é a fase final da micropropagação.

As plântulas foram lavadas, á casa de vegetação em bandejas de plásticos de 48 células, contendo substrato esterilizado PlantMax (Horticultura), com sombreamento de 70 %

e sistema de nebulização. Após oito dias as plântulas foram transferidas para casa de vegetação permanecendo até os 60 dias. O parâmetro avaliado foi à taxa de sobrevivência.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Cultura de Tecidos

Nos estabelecimentos preliminares das culturas *in vitro* das espécies de helicônias estudadas neste trabalho quando se utilizou explantes de ápices caulinares, os procedimentos mostraram-se inadequados, os índices de oxidação e contaminação bacteriana foram observados 100%. Desta forma buscaram-se novas alternativas, utilizando embriões segundo metodologia utilizada por Torres (2005) e inflorescência (ponteiros) ou ápice floral da bráctea apical.

5.1.1. Micropropagação de *Heliconia rauliniana*

Após a introdução e estabelecimento dos explantes *in vitro* das espécies utilizadas no pré-experimento observou-se que a contaminação e oxidação tiveram sua fase crítica nos primeiros 30 dias (Tab. 2) e, somente os explantes originados de inflorescência na fase T1 da espécie *H. rauliniana* (Fig.8 A e 8B) apresentou sobrevivência em 5,7 % (Tab. 3). Estes resultados comprovam a dificuldade relatada por Nanneti (1994); Guamantica (1998); Rodrigues (2005); Santos (2005) e Nakano (2008). Outro resultado importante a ser observado foi quanto à fase da utilização das brácteas. Os explantes originados das brácteas totalmente fechadas apresentaram o menor índice de contaminação quando comparadas com as demais fases (8,6%). É evidente que a contaminação por microrganismos endofíticos é um dos maiores obstáculos no processo de desenvolvimento de protocolo para as espécies de heliconia como afirma Souza (2007). Embora muitos estudos estejam sendo realizados, como os de Albuquerque (2006), utilizando-se diferentes concentrações do óleo essencial de *Lippia gracilis* identificados no controle da ação de microrganismos no meio de cultura de alguns híbridos de Helicônia.

Observando estes resultados também pode ser verificado alto índice de oxidação em

todas as fases utilizadas das brácteas (T_1 , T_2 , T_3), confirmando a preocupação de Alloufa *et al.* (2002); Sato *et al.* (2001); Teixeira (2005), quanto ao problema de oxidação na micropropagação. Os resultados apresentados neste trabalho observam-se a necessidade de novos testes serem realizados na busca de melhor solução quanto à desinfestação de explntes dessa espécie, como por exemplo, outros tipos de antibióticos, combinações entre eles, modificações no meio de cultivo e outros.

O processo de multiplicação ocorreu a partir do segundo subcultivo (Fig. 8C) com dois explantes que resultou na obtenção de 362 plântulas no 9^o subcultivo, durante esse período de multiplicação o índice de contaminação foi de 6,2%.

A melhor combinação avaliada no processo de multiplicação foi o meio de MS combinado com BAP ($3,0 \text{ m.L}^{-1}$), IBA ($0,1 \text{ mg.L}^{-1}$), que resultou na reversão do ápice floral em ápice vegetativo e posterior formação de brotações. A partir do terceiro subcultivo (16 semanas após a introdução *in vitro*) foi possível observar a rediferenciação do meristema floral em vegetativo, com o lançamento da primeira folha por entre a bráctea, ainda com fragmentos dos verticilos florais (Fig.8D). Após 24 semanas observou-se o ápice vegetativo com as estruturas masculinas e femininas desenvolvidas (Fig. 8E a 8G). Ao final de 28 semanas da introdução ou sexto subcultivos, iniciaram-se as primeiras brotações, originadas do ápice vegetativo regenerado, e também a ausência dos verticilos florais (Fig. 8H).

Estes resultados indicam que, provavelmente, outras combinações com vitaminas, sais e reguladores de crescimento devem ser avaliadas para a viabilização plena dessa técnica.

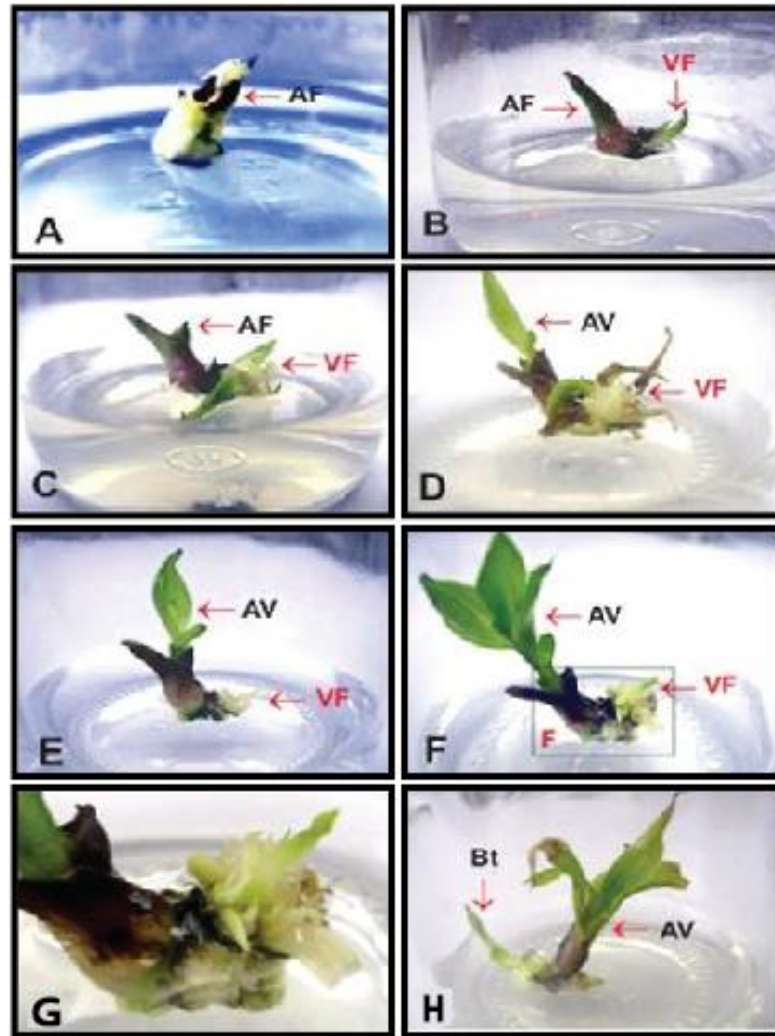


Figura 8 – Desenvolvimento do ápice floral de *H. rauliniana* *in vitro* após 4 (A), 8 (B) e 12 (C) semanas de inoculação; ápice vegetativo, originado de ápice floral, após 16 (D), 20 (E) e 24(F) semanas de inoculação; detalhe das estruturas dos verticilos florais (G) e ápice vegetativo com início das brotações após 28 semanas da inoculação (H). AF (ápice floral); AV (ápice vegetativo); VF (verticilos florais); Bt (brotações).

Tabela 2 – Contaminação, oxidação e sobrevivência de ápices florais de *H. rauliniana* (1), *H. rostrata* (2), *H. chartacea* cv47 *Sexy Pink* (3) *H. orthotricha* cv *Total eclipse* (4), após 30 dias de cultivo *in vitro*.

Tratamentos	1									2									3									4								
	T1			T2			T3			T1			T2			T3			T1			T2			T3			T1			T2			T3		
	C	O	S	C	O	S	C	O	S	C	O	S	C	O	S	C	O	S	C	O	S	C	O	S	C	O	S	C	O	S	C	O	S	C	O	S
Controle	1	4	0	2	3	0	4	1	0	4	1	0	3	2	0	3	2	0	0	3	0	1	3	0	2	3	0	1	4	0	3	3	0	4	0	0
1,0mg/L BAP	1	4	0	2	3	0	5	0	0	5	0	0	3	2	0	3	2	0	1	6	0	1	5	0	2	3	0	1	4	0	3	1	0	5	1	0
1,0mg/L BAP + 0,05mg/L IBA	0	5	0	2	3	0	4	1	0	4	1	0	3		0	2	3	0	0	5	0	0	5	0	3	2	0	0	5	0	3	2	0	5	0	0
3,0mg/L BAP	0	5	0	1	4	0	4	1	0	4	1	0	4	1	0	3	2	0	0	5	0	0	5	0	3	2	0	1	4	0	3	2	0	5	0	0
3,0mg/L BAP + 0,05mg/L IBA + 300 mg.L⁻¹ CEF.	0	3	*2	1	4	0	4	1	0	4	1	0	5	0	0	5	0	0	0	5	0	0	5	0	4	1	0	2	3	0	2	3	0	4	1	0
5,0mg/L BAP	0	5	0	2	3	0	4	1	0	4	1	0	2	3	0	5	0	0	0	5	0	1	4	0	2	3	0	1	4	0	3	2	0	4	1	0
5,0mg/L BAP + 0,05mg/L IBA	1	4	0	2	3	0	3	2	0	3	2	0	2	3	0	3	2	0	0	5	0	0	5	0	3	2	0	1	4	0	2	3	0	3	2	0
Total	3	30	2	12	23	0	28	7	0	28	7	0	22	13	0	24	11	0	1	34	0	3	32	0	19	16	0	7	28	0	19	16	0	30	5	0

*Dois (2) explantes sobreviveram (5,7% de sobrevivência)

C=Contaminados; O=Oxidados; S=Sobrevivência; CEF=cefotaxima

T₁= Todas as brácteas fechadas;

T₂=Duas brácteas abertas;

T₃=Quatro brácteas abertas

Tabela 3 - Percentagem de contaminação, oxidação e sobrevivência de explantes ápice floral *Heliconia rauliniana* após 30 dias de cultivo *in vitro*

Espécie	Explantes (ápice floral)	Tratamento	Contaminação (%)	Oxidação (%)	Sobrevivência (%)
<i>H. rauliniana</i>	35 (T ₁)	MS+BAP(3, 0 mg.L ⁻¹ + Cef (300mg.L ⁻¹)	8,6	85,7	5,7
	35 (T ₂)	MS+BAP(3, 0 mg.L ⁻¹ + Cef (300mg.L ⁻¹)	34,3	65,7	0,0
	35 (T ₃)	MS+BAP(3, 0 mg.L ⁻¹ + Cef (300mg.L ⁻¹)	80,0	20,0	0,0
	105/3		122,9/3	171,4/3	5,7/3
Média			40,1	57,1	1,9

T₁= Todas as brácteas fechadas; T₂=Duas brácteas abertas; T₃=Quatro brácteas abertas

5.1.2. Micropropagação de *Heliconia marginata*

Os resultados obtidos quanto ao estabelecimento de embriões da *H. marginata*, apresentaram sobrevivência de 70,0 % quando introduzidos em meio de MS suplementado com BAP (3,5 mg.L⁻¹) + antibiótico Cefotaxima (300 mg.L⁻¹) e 76,7 %, em meio de MS + AG₃ (0,1 mg.L⁻¹) + Cefotaxima (300 mg.L⁻¹) (Tab.4), confirmando os resultados obtidos por Aguiar *et al* (2004). Quanto aos explantes introduzidos em meio de MS sem adição de antibiótico, a contaminação foi de 90 % e 10 % oxidação, não tendo sido observado sobrevivência. Isto permite supor que esses microrganismos são endógenos e, sugere-se que mais estudo venha a ser realizados quanto ao processo de desinfestação e de identificação desses microrganismos. A identificação torna-se necessária, para aplicação de melhor estratégia de estabelecimento *in vitro* dessas espécies de interesse econômico, que vai desde a escolha do tipo mais viável de explante até a melhor combinação de antibióticos e, ou uso de técnica mais apropriada no controle dos endofíticos.

Quanto à multiplicação, a brotação ocorreu a partir do terceiro subcultivo, obtendo-se a média de três brotações por explantes e, até o 10º subcultivo o número de 1206 plântulas,

com percentual médio de contaminação durante todo o processo de 10,9 %. O meio de cultivo que melhores resultados apresentaram foram o meio de MS suplementado com diferentes concentrações de BAP ($3,0 \text{ mg.L}^{-1}$; $3,5 \text{ mg.L}^{-1}$ e $4,0 \text{ mg.L}^{-1}$) + IBA (0,1 mg).

Tabela 4 - Percentagem de contaminação, oxidação e sobrevivência de embriões *Heliconia marginata* após 30 dias de cultivo *in vitro*

Espécie	Explantes (embrião)	Tratamento	Contaminação (%)	Oxidação (%)	Sobrevivência (%)
<i>H. marginata</i>	30	MS+BAP($3,5 \text{ mg.L}^{-1}$) + Cef(300 mg.L^{-1})	23,3	6,7	70,0
	30	MS+AG ₃ ($0,1 \text{ mg.L}^{-1}$) + Cef(300 mg.L^{-1})	10,0	13,3	76,7
	30	MS	90,0	10,0	0,0

5.2. Aclimatização

Os resultados apresentados, após 60 dias em casa de vegetação com sombreamento de 70%, sob sistema de irrigação por nebulização e aspersão foram 67 % e 86 % de sobrevivência das plantas de *H. rauliniana* e *H. marginata* respectivamente. Estes resultados estão de acordo com os relatados por Rodrigues, (2005) sobre aclimatização de *H. bihai* e Santos *et al*, (2004) na aclimatização de helicônias psitacorum. Estes resultados nos permitem inferir de que a aclimatização de plântulas micropropagadas não está diretamente relacionada somente com o tipo de substrato, mas, também dependem de outros fatores, como sombreamento, temperatura, suprimento de água, nutrientes e as trocas gasosas entre as raízes e o ar atmosférico.

As plantas resultados desse trabalho mostraram-se adaptadas, apresentando visivelmente crescimento na altura, diâmetro e número de folhas (Fig.9A e 9B).

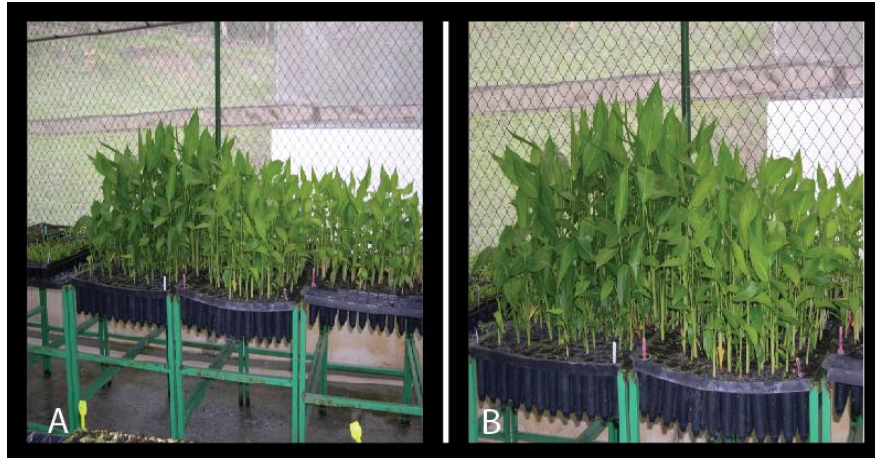


Figura 9 - Plantas de *Heliconia rauliniana* (A) e *Heliconia marginata* (B) aclimatizadas (após 60 dias em casa de vegetação)

6. CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos pelo presente trabalho permitem concluir que:

1. Para o estabelecimento *in vitro* da espécie *H. rauliniana* houve dificuldade devido o alto grau de contaminação aliado à alta percentagem de oxidação;
2. Independente do tipo de meio utilizado, os explantes que apresentaram índice de sobrevivência foram os ápices florais de *H. rauliniana* originados da inflorescência com todas as brácteas fechadas;
3. A multiplicação de explantes do ápice floral que apresentou melhores resultados foi em meio de cultivo MS + 3,0 mg.L⁻¹ de BAP + 300 mg.L⁻¹ de Cefotaxima que resultou na reversão do ápice em ápice vegetativo e posterior formação de brotações;
4. Para os explantes provenientes de resgate de embriões de *H. marginata*, o índice de sobrevivência mais elevado ocorreu em meio de cultivo MS + MS+AG₃(0,1mg.L⁻¹ + Cefotaxima (300 mg.L⁻¹);
5. A contaminação dos explantes de resgate de embriões da *H. marginata* aliada ao processo de oxidação sem a utilização do antibiótico cefotaxima comprometeu a sobrevivência em 100%
6. Para as duas espécies, independentemente dos tipos de explantes a serem utilizados, torna-se indispensável à utilização de antibiótico para o controle de contaminação;
7. Para a multiplicação dos explantes de *H. marginata* originados de resgate de embriões, os melhores resultados apresentados foram em meio de MS suplementado com BAP (3,0 mg.L⁻¹; 3,5 mg.L⁻¹ e 4,0 mg.L⁻¹) + IBA (0,1 mg);
8. A aclimatização, tanto de *H. rauliniana* como de *H. marginata*, o substrato Plant Max[®] Horticultura aliado ao controle de sombreamento e irrigação proporcionou uma taxa de sobrevivência de 67 % e 86% respectivamente.

CAPÍTULO II

EFEITO DE MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS NO
CRESCIMENTO DAS PLANTAS.

1. INTRODUÇÃO

A biodiversidade vegetal em países de clima tropical e subtropical como o Brasil é grande e os microrganismos representam umas das fontes de recursos naturais, podendo ser utilizados para o entendimento da natureza de vários processos vitais e problemas relacionados à saúde e à produção industrial.

Apesar da importância dos microrganismos, o número de grupos microbianos conhecidos e descritos representa apenas uma pequena fração da diversidade microbiana encontrada na natureza. Um grande número de fatores pode ser apontado para a dificuldade no cultivo de microrganismo, entre eles o pouco conhecimento sobre seus requisitos nutricionais e a biologia de organismos presentes em diferentes amostras ambientais. Em condições tropicais, muito pouco tem sido pesquisado sobre endofíticos, ficando evidente a importância desses estudos em nosso meio, o que justifica a necessidade do desenvolvimento de trabalhos em nossas condições (AZEVEDO, 1992).

Microrganismos endofíticos, geralmente fungos e bactérias, vivem sistematicamente no interior das plantas, sem causar dano a seus hospedeiros. Apesar de devidamente comprovada a existência da microbiota endofítica, pouco se sabe sobre sua identidade, diversidade e níveis populacionais nos diferentes tecidos. As bactérias endofíticas provavelmente desenvolveram íntima relação com sua planta hospedeira através de processos coevolucionários e podem influenciar a fisiologia da planta de alguma forma ainda não elucidada (MISAGHI & DONNDELINGER 1990 *apud* PROCÓPIO, 2004).

O estudo dos microrganismos endofíticos é de grande importância devido à falta de informações para a elucidação da base biológica das interações endófitos-plantas e, também por serem potencialmente vantajosos em diversos aspectos, tais como: controle de pragas; controle de fito patógenos; produção de metabólitos de interesse farmacológico; promoção de crescimento vegetal e como vetores para a introdução de genes em plantas hospedeiras.

Estes microrganismos são capazes de produzir alterações fisiológicas e muitos outros efeitos nos vegetais que os albergam, como por exemplo, alguns efeitos de fungos *Acremonium sp* em gramíneas quanto ao controle biológico de lepidóptero; *Xylaria spp* quanto aos efeitos fisiológico nas plantas como quedas de folhas; *Taxomyces andreanne*, como a produção de fármacos, o taxol, originado da planta *Taxus brevifolia*

Entretanto, poucos estudos foram feitos em relação aos endófitos em plantas hospedeiras tropicais, entre essas podemos citar os trabalhos com: Palmeiras (RODRIGUES & SAMUELS, 1990); (RODRIGUES, 1994; RODRIGUES, 1996; *Stylosanthes sp.* (PEREIRA *et al*, 1993); *Musa sp.* (PEREIRA, 1993); *Citrus sp.* (GLIENKE, 1995, ARAÚJO, 1996); milho (PAMPHILE, 1997; CERIGIOLI, 2005).

O objetivo deste estudo foi o isolamento, à identificação e avaliação dos efeitos dessas bactérias endofíticas na promoção de crescimento das mudas micropropagadas de *Heliconia rauliniana* e *Heliconia marginata*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Microrganismos endofíticos e sua importância

Os microrganismos endofíticos habitam o interior das plantas e são encontrados em folhas, ramos, raízes e sementes, sem causar doenças às plantas e sem produzir estruturas externas visíveis (Azevedo *et al.*, 2000). A comunidade endofítica é constituída principalmente por fungos e bactérias. Apesar de devidamente comprovada a existência da microbiota endofítica, pouco se sabe sobre sua identidade, diversidade e níveis populacionais nos diferentes tecidos. As bactérias endofíticas provavelmente desenvolveram íntima relação com sua planta hospedeira através de processos coevolucionários e podem influenciar a fisiologia da planta de alguma forma ainda não elucidada (MISAGHI & DONNDELINGER 1990 *apud* PROCÓPIO, 2004).

Provavelmente todas as plantas possuem microrganismos endofíticos. Uma mesma planta pode albergar vários deles incluindo fungos e bactérias. Em geral, existem espécies bastante frequentes em um determinado hospedeiro. São chamadas de espécies dominantes, em contraposição a outras mais raras que são as secundárias (AZEVEDO, 1998).

Ultimamente tem-se investido em pesquisas, objetivando disponibilizar fontes alternativas de nutrientes às plantas, e em metodologias alternativas de controle de patógenos, com enfoque no uso de microrganismos endofíticos (KUSS *et al.*, 2007; BARROSO & NAHAS, 2008; RYAN *et al.*, 2008; LUCON *et al.*, 2009).

Bactérias endofíticas (BE) são aquelas que podem ser isoladas e extraídas do interior das plantas, sem causar aparentemente dano a seus hospedeiros, ou seja, prejuízo visível à mesma. Desde 1940 foram publicados vários relatos sobre BE nativas em sementes, óvulos, tubérculos, raízes, caules, folhas e frutos (Hallmann *et al.*, 1997). Tem havido crescente interesse nos estudos sobre a ocorrência, o potencial de colonização e a utilização de bactérias endofíticas para promoção de crescimento e controle biológico de doenças de plantas

(Hallmann *et al.*, 1997; Amorim & Melo, 2002; Shiomi *et al.*, 2008). Pesquisas indicam que as bactérias endofíticas normalmente ocorrem na rizosfera, e têm maior eficiência do que bactérias colonizadoras da rizosfera na promoção do crescimento, absorção de água e na supressão de microrganismos deletérios, em razão de se encontrarem no interior do sistema radicular (AMORIM & MELO, 2002; SANTOS *et al.*, 2005).

O estudo dos microrganismos endofíticos é de grande importância devido à falta de informações para a elucidação da base biológica das interações endófito-planta, e também por serem potencialmente vantajosos em diversos aspectos, tais como: 1) controle biológico de pragas; 2) controle de fitopatógenos; 3) produção de metabólitos de interesse farmacológico; 4) promoção de crescimento vegetal; 5) vetores para introdução de genes em plantas hospedeiras; 6) fixação biológica; 7) vantagens econômicas como a produção de produtos biológicos evitando o uso de produtos agroquímicos (CERIGIOLI, 2005).

2.2. Diversidade de bactéria endofíticas

Os microrganismos geram, somente pela sua utilização em processos biotecnológicos, bilhões de dólares por ano, embora a biodiversidade seja a base genética da biotecnologia para o desenvolvimento de processos e produtos de interesse econômico e ou social, a preservação da diversidade microbiana é pouco considerada (BULL *et al.*, 2000),

Há muito anos a diversidade genética e metabólica dos microrganismos tem sido explorados para utilização nos diversos segmentos da indústria, como na agroindústria, microrganismos são utilizados para diversos fins: aumento de fertilidade do solo (mineralização e solubilização de nutrientes); controle biológico de insetos e patógenos (*Bacillus thuringiensis*), promoção de crescimento em plantas; produção de antibióticos, hormônios, aumento da disponibilidade dos nutrientes; fixação biológica de nitrogênio (Melo 2002). O estudo da diversidade microbiana é de grande importância, pois pode indicar

perturbações no ambiente, podendo inclusive ser utilizado como indicador de qualidade do solo (JOHNSON *et al.*, 2003).

A diversidade biológica é definida como a variabilidade entre organismos vivos, geralmente atribuídos à diversidade de espécies. No entanto, ela pode ser medida em vários níveis taxonômicos (família, gênero, intra espécie etc.) ou ainda, em termos de determinadas características genéticas ou fenotípicas (morfológicas, bioquímicas, fenológicas, simbióticas), (MOREIRA & SIQUEIRA, 2000).

Os gêneros mais comumente isolados incluem: *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Pseudomonas* e *Xanthomonas* (Hallmann *et al.*, 1997). Zinniel *et al.*, (2002) identificaram pela primeira vez a natureza endofítica da bactéria *Microbacterium testaceum* em várias plantas hospedeiras.

O número de espécies de bactérias endofíticas isoladas de uma determinada planta está diretamente associado à parte do hospedeiro que é utilizada no isolamento. Lambe *et al.*, (1996) relataram que as populações bacterianas são maiores nas raízes diminuindo no caule e folhas.

Diferenças nas flutuações populacionais de bactérias endofíticas têm sido associadas ao genótipo das plantas, às condições ambientais e aos seus locais de origem. Mocali *et al.*, (2003) observaram que as bactérias do grupo *Bacillus* e do gênero *Curtobacterium* foram mais freqüentes em raízes de olmo nos meses mais quentes, enquanto *Pseudomonas* sp foi mais isolada nos meses frios.

A evolução das metodologias de biologia molecular aplicadas ao estudo do meio ambiente tem contribuído significativamente para um grande avanço do conhecimento sobre a diversidade microbiana e, conseqüentemente a aplicação destas metodologias no estudo da diversidade de bactérias, tem permitido a descoberta de um número extenso de novas linhas evolutivas nesse grupo. De acordo com Hugenholtz e Pace, (1996), Hugenholtz *et al.*, (1998),

métodos independentes de cultivo tendem a completar os métodos baseados em isolamento e cultivo para a realização de levantamentos e comparações da composição, diversidade e estrutura de comunidades microbianas.

Resultados de estudos dependentes e independentes de isolamento e cultivo, baseados em amplificação e sequenciamento de fragmentos dos genes 16S rRNA demonstram que a diversidade de microrganismos em amostras ambientais é ampla (HEAD & SAUNDERS, 1998; HUNTER-CEVERA, 1998).

Dentre as técnicas mais utilizadas para aplicação baseada em ácidos nucleicos são: mapa de restrição, hibridização DNA-DNA ou DNA-RNA; sequências de subunidades do rRNA; RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*); ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*); RISA (*Ribosomal Intergenic Spacer Analysis*) DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) (Elsas *et al* 1998; Ranjaro *et al*, 2000) *apud* Procópio (2004) e comparação de sequências nucleotídicas de seus genomas.

Atualmente as ferramentas de biologia molecular têm sido utilizadas para dar suporte às técnicas básicas de microbiologia, visando aprofundar o conhecimento taxonômico sobre os microrganismos. A diversidade microbiana de bactéria é estudada com base na sequência de DNA do gene 16S ribossomal, para os fungos a região ITS, utilizando a PCR "*Polymerase Chain Reaction*". Estes produtos de amplificação podem ser caracterizados por técnicas moleculares tais como: ARDRA, RFLP, RAPD, RISA, DGGE/TGGE e SSCP para obtenção de um perfil de comunidade microbiana (Ziller, 2004) citado por BOA SORTE (2009).

Os benefícios científicos esperados a partir de um melhor entendimento sobre a diversidade microbiana são extensos. Entre eles estão a compreensão das funções exercidas pelas comunidades microbianas nos ambientes e o conhecimento de suas interações com outros da biodiversidade, como por exemplo, as plantas. Neste aspecto, várias pesquisas têm explorado a diversidade de bactérias associadas às plantas, obtendo-se novas informações

para o conhecimento de mecanismos envolvido na interação bactéria-planta (CERIGIOLI, 2005).

2.3. Isolamento de microrganismos

Embora os microrganismos endofíticos possam ser encontrados em sementes, mas sua penetração ocorre também por aberturas naturais ou artificiais, como: estômatos, região de emissão de raízes secundárias, ferimentos causados por instrumentos agrícolas, microferimentos nas raízes ocasionados pelo atrito destas com as partículas do solo. Após a penetração estas bactérias e fungos se disseminam de maneira sistêmica para diversas partes da planta, habitando de forma ativa o apoplasto, vasos condutores e em alguns casos ocorre à colonização intracelular (HALLMANN *et al*, 1997).

Os microrganismos endofíticos convivem com os epifíticos e patogênicos, então o isolamento dos mesmos deve ocorrer a partir do interior de tecidos e órgãos saudáveis, evitando assim os microrganismos patogênicos. Dessa forma a desinfecção deve ser feita da superfície do fragmento da planta eliminando-se os microrganismos epifíticos. No entanto, existe uma série de procedimentos utilizados para o isolamento de endofíticos (Araújo *et al*, 2002). Mas, os autores mencionam ainda que, a quantificação das espécies e gêneros de microrganismos isolados é um procedimento auxiliar na distinção entre endófitos e não endófitos.

2.4. Promoção de crescimento vegetal

Microrganismos endofíticos têm apresentado a capacidade de estimular o crescimento das plantas por mecanismos diretos (fixação de nitrogênio, e ou produção de fitohormônios) e por mecanismos indiretos (antagonismo contra patógenos ou resistência a drogas). O mecanismo de promoção de crescimento vegetal por bactérias é um processo complexo que

pode ser influenciado por diversos fatores bióticos e abióticos (BLOEMBERG & LUGTENBERG, 2001).

Gomes *et al* (2003) avaliaram isolados bacterianos epifíticos e endofíticos obtidos de plantas saudáveis de alface, para promoção de crescimento de mudas e plantas, respectivamente em estufa e campo de cultivo orgânico. Os mecanismos de ação de Bactérias Promotoras de Crescimento das Plantas (BPCP) analisados foram produção de ácido indol acético, ácido cianídrico, solubilização de fosfatos e alterações dos teores foliares dos macronutrientes, N, P, K, Ca e Mg. Em estufa, as mudas apresentaram aumento significativo em relação à testemunha para matéria fresca das raízes (MFR), parte aérea (MFPA) e Total (MFT) quando utilizou o isolado C116 e para MFR e MFT com o isolado C25. No campo, não houve promoção no crescimento nas plantas das cultivares Verdinha e Verônica, tratadas com C25 e C116 separadamente ou misturadas. Os mecanismos de ação analisados foram verificados apenas elevação significativa ($P=0,05$) do teor foliar de N pelo isolado C25.

Vários trabalhos, abordando a forma de ocorrência de bactérias endofíticas, empregando métodos e técnicas mais aperfeiçoadas de estudo e análise foram realizados, como de Jacobs *et al.* (1985), onde os autores enumeraram, localizaram e caracterizaram bactérias endofíticas de raízes de beterraba açucareira utilizando técnicas imunológicas e microscopia eletrônica de varredura e, desta forma, verificando um aumento na população de bactérias nas regiões centrais e periféricas da raiz. Os autores sugeriram que as regiões de maior ocorrência constituem uma rota de colonização das bactérias. Os mesmos autores relataram ainda a ocorrência de um grande número de diferentes espécies dentre elas: *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Corynebacterium sp*, *Erwinia herbicola* e bactérias não patogênicas estabelecendo uma relação simbiótica intracelular em raiz de plantas de beterraba.

2.5. Fixação biológica de nitrogênio

O nitrogênio é de importância fundamental para todos os seres vivos e pode ser tão limitante quanto à água para o crescimento e produtividade das plantas. Existem três formas para tornar o nitrogênio disponível para as plantas; descargas elétricas, fabricação de fertilizante mineral e fixação biológica de nitrogênio atmosférico, esta é o processo mais eficiente do ponto de vista econômico e ecológico (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

A fixação biológica de N_2 é um processo complexo que requer a expressão de um conjunto de genes denominados genes nif (*nitrogen fixation*), os quais codificam proteínas envolvidas diretamente neste processo. O N_2 atmosférico é pouco reativo, somente algumas espécies de microrganismos procarióticos possuem o complexo enzimático, chamado nitrogenase, necessário para transformá-lo em amônia, que é subsequentemente assimilada em aminoácidos e proteínas (Neves e Rumjanek, 1998, *apud* Cirigioli, 2005), a qual se constitui o principal suprimento de nitrogênio nos sistemas vivos. A fixação é processada a uma enzima, graças a essa enzima conhecida como nitrogenase, a qual é capaz de promover a reação de quebra dos átomos de nitrogênio à temperatura ambiente e pressão normal, utilizando energia de processo foto e quimiossintéticos, ou obtida a partir de carboidratos e armazenada sob forma de ATP (Santos *et al*, 2008). E, o primeiro produto da fixação simbiótica do N_2 é amônia (NH_3) que, em contato com o substrato aquoso do citoplasma das bactérias, converte-se, rapidamente, em íon amônio (NH_4). Estudos relacionados com FBN (fixação biológica de nitrogênio) têm sido realizados também na busca de solução para problemas tais como aumento da eficiência de nodulação em milho (ALEXANDER & ZUBERER, 1988).

Bactérias diazotróficas têm a habilidade em converter nitrogênio atmosférico em amônia, que pode ser utilizada pela planta e sobreviver em ambientes deficientes em nitrogênio, podendo enriquecer seletivamente a rizosfera, local em que habitam como organismos de vida livres ou associados assimbioticamente a plantas. No caso de

Azospirillum, têm sido observadas respostas positivas a inoculação em plantas, inclusive quando cultivadas com altos níveis de nitrogênio, indicando que respostas da planta não são apenas devido ao N₂ fixado, mas pela produção de outras substâncias (DOBBLAERE *et al.*, 2003).

Knauth *et al.*, (2005) detectaram muitas diferenças quanto a fixação de nitrogênio entre cultivares de arroz ao avaliar a expressão da enzima chave da FBN, a nitrogenase. Esta pode ser uma explicação para as variações verificadas, já que os isolados foram obtidos de diversas cultivares de arroz. Contrapondo-se as afirmações acima, Mantelin & Touraine, (2004) consideram que a fixação ativa de nitrogênio pelas bactérias não implica em transferência do N fixado para planta, e Han & New (1998) verificaram em seus experimentos que a FBN em meio de cultura não se relacionou com alta fixação de nitrogênio em campo.

2.6. Produção do hormônio vegetal auxina

A maioria das bactérias presentes no solo é capaz de produzir ácido indolacético (AIA) podendo essa ser uma estratégia para a detoxificação do excesso de triptofano liberado pelas raízes na rizosfera, aminoácido que pode ser deletério às células bacterianas.

A produção de reguladores químicos vegetais é um mecanismo de interação bactéria-planta, sendo influenciado por vários fatores como o genótipo do hospedeiro e do próprio microrganismo. A produção de AIA que aparentemente não funciona como hormônio em células bacterianas, pode ter evoluído devido a sua importância na relação bactéria-planta (PATTEN e GLICCK, 2002).

Em *Azospirillum*, o principal fitormônio produzido é uma auxina (AIA). Como em outras espécies capazes da síntese de auxina, o isolamento de mutantes naturais impossibilitados na capacidade de produzir auxina, reforçam a existência de várias vias biossintéticas na produção de AIA, além de ser potencialmente um gene de relevância nas

funções celulares. Sua capacidade de sintetizá-lo pode ser inclusive por uma via independente de triptofano, muito comum aos vegetais e não em microrganismos (PRINSEN *et al.*, 1993).

A detecção de auxinas pode ser realizada quantitativamente por uma reação colorimétrica específica e sensível, utilizando-se o reagente de Salkowski ou por um método mais preciso, pela cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC ou CLAE) (Crozier *et al.*, 1988). Já a detecção qualitativa pode ser realizada em membrana de nitrocelulose, utilizando também o reagente de Salkowski.

2.7. Solubilização de fosfato

O fósforo é o segundo nutriente essencial ao desenvolvimento vegetal, ficando atrás apenas do nitrogênio. No entanto, apesar dos teores de fósforo (P) no solo serem relativamente elevados (400 a 1.200 mg/kg de solo), a concentração de P solúvel, disponível para assimilação pelas raízes vegetais é muito baixa, normalmente 1 mg/kg de solo ou menos (Oliveira, *et al.*, 2003). A principal fonte de P para o solo são minerais primários. Em segundo lugar vem a matéria orgânica, que pode constituir 30 a 50 % do P do solo, este P orgânico é sintetizado principalmente por microrganismos e plantas. Diferentes bactérias dos gêneros: *Pseudomonas*, *Bacillus*, e *Rhizobium* como principais e outros como *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Aereobacter*, *Flavobacterium* e *Erwinia*. A solubilização de P também está relacionada a fatores ambientais como níveis nutricionais e interação com outros organismos do ambiente.

O principal mecanismo de ação na solubilização de P mineral é através dos ácidos orgânicos sintetizados por microrganismos, enquanto que, a solubilização de fosfatos orgânicos, também chamada de mineralização, ocorre a partir de restos vegetais e animais contendo elevados teores de compostos fosfatados e as principais moléculas fornecedoras de P através da mineralização são os ácidos nucleicos, fosfolipídios e açúcares fosfatados,

facilmente degradados, e o ácido fítico, polifosfatos e fosfonatos que são mineralizados mais lentamente. Esta mineralização é promovida por enzimas chamadas fosfatases ou fosfohidrolases. Numerosas espécies saprofíticas realizam a decomposição da matéria orgânica do solo, que liberam o radical ortofosfato da estrutura de carbono da molécula, por processos de respiração e sob forte influência de fatores ambientais. As principais moléculas fornecedoras de P através da mineralização são os ácidos nucleicos, fosfolipídeos e açúcares fosfatados, facilmente degradados, e o ácido fítico, polifosfatos e fosfonatos que são mineralizados mais lentamente. Esta mineralização é promovida por enzimas chamadas fosfatases, ou fosfohidrolases, classificadas em ácidas ou alcalinas de acordo com o pH ótimo de atividade (PEDRINHO, 2009).

Portanto, a capacidade das bactérias endofíticas em solubilizar fosfato inorgânico tem sido alvo de grande interesse por parte dos microbiologistas agrícolas, por esta característica apresentar um grande potencial para promoção de crescimento vegetal.

2.8. Microrganismos Endofíticos em Helicônias

As bactérias endofíticas são capazes de penetrar na planta via sementes, aberturas naturais, ferimentos e ativamente através da produção de enzimas. No entanto, antes de penetrar precisam colonizar a superfície da planta, o que acontece na sequência adsorção (interação fraca), aderência (interação forte) e colonização epifítica, que precede a penetração. Nesta fase epifítica, os isolados bacterianos competem por nutrientes e espaço com organismos nativos, tais como outras bactérias, fungos fitopatogênicos e micorrízicos (MARIANO, 2001 *apud* ASSIS, 2002).

Bactérias endofíticas podem ainda ser detectadas e identificadas nos tecidos de plantas pela hibridização do ácido nucleico *in situ* e auto-radiografia, microscopias eletrônicas de varredura e transmissão (Assis, 2002), microscopia de epifluorescência (Shishido *et al.*, 1999)

e pelo método de coloração *in situ* com 2,3,5, bicloreto de trifenil tetrazólio (ASSIS, 2002).

O estabelecimento de explantes de helicônia tem sido dificultado devido às frequentes contaminações bacterianas (Atehortua *et al.*, 1999 *apud* Santos *et al.*, 2005). A ocorrência de bactérias durante a micropropagação de helicônia já foi registrada por Nannetti (1994) e Atehortua *et al.* (1997) constituindo-se problema importante para o cultivo *in vitro* dessa espécie ornamental.

É possível que a ocorrência de contaminação bacteriana na micropropagação de helicônia seja de natureza endofítica, pois, em geral, as condições de cultivo *in vitro* de tecidos vegetais favorecem o crescimento de bactérias que normalmente habitam tecidos internos sem causarem sintomas de doenças. Essas bactérias podem se multiplicar lentamente e não serem detectadas até atingirem uma concentração maior, ou permanecerem viáveis sem se multiplicarem devido à limitação de nutrientes. Dessa forma, elas são subcultivadas e transferidas para a progênie das plantas micropropagadas, agindo como fonte de contaminação macroscópica se alterações ambientais ou fisiológicas as favorecerem (SANTOS 2005).

Na inoculação de explantes contaminados, principalmente por bactérias, Khalid *et al.* (2004), Santos *et al.* (2005) relatam que pode haver competição pelos nutrientes do meio de cultura.

Trabalhando com explantes de *H. rauliniana*, Rodrigues (2005) identificou a presença de dois gêneros de bactérias, a *Pseudomonas* e *Klebsiella*, confirmando os relatos de Atehortua (1997) e Dias & Rodrigues (2001) sobre os microrganismos observados no trabalho com *H. bihai*. Em um segundo experimento, testou os antimicrobianos cloranfenicol, cefotaxima e a associação cloranfenicol e cefotaxima em doses 50, 150, 250, e 500 mg.L⁻¹ em meio MS, suplementado com 3,5 mg.L⁻¹ de BAP, como forma de controle das bactérias endofíticas encontradas em *H. rauliniana*. Após 50 dias de avaliação, constatou que

cefotaxima aplicada isoladamente, na dose de 500 mg.L^{-1} , foi a forma mais eficiente de controle dos endofíticos para esta espécie de helicônia. O cloranfenicol, apesar do controle efetivo dos endofíticos, apresentou-se inadequado ao cultivo *in vitro*, sendo citotóxico aos explantes.

Os antibióticos amicacina, ampicilina, ceftriaxona sódica, garamicina e rifamicina em quatro diferentes concentrações foram utilizados por Souza (2005), objetivando controlar microrganismo endofíticos no estabelecimento *in vitro* de meristema apical de *H. rostrata*. Estes antibióticos não foram eficientes no controle de contaminação, além de exercerem efeito fitotóxico inibindo seu desenvolvimento ou oxidando todos os explantes, como ocorreu com o antibiótico rifamicina.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Isolamento de Microrganismos

3.1.1. Amostras vegetais

O material vegetal utilizado no presente trabalho foi coletado de plantas matrizes de *H. marginata* no Centro de Biotecnologia da Amazônia – CBA e *H. rauliniana* no Sítio Tucandeira situado no KM 63 da BR-174 (Amazonas), área de produção de flores tropicais. Para cada isolamento foram utilizadas as raízes das plantas de cada tratamento.

3.1.2. Isolamento bacteriano

Após a coleta, as raízes foram lavadas em água corrente e desinfestadas superficialmente por meio da imersão em álcool 70 % por 2 min., em hipoclorito (2 % de cloro ativo) por 3 min., novamente em álcool 70 % por 1 min e água destilada autolavada. Os fragmentos foram transferidos para placas de Petri contendo meio TSA (triptona 15 g, peptona de soja 5 g, NaCl 5 g, 100 ml de água destilada e ágar 15 g; pH 7,0) suplementado com 50 µg.mL⁻¹ de fungicida ciclohexamida, e incubadas à 28 °C. Para avaliar a desinfestação foi semeada uma alíquota da água. A frequência de isolamento (FI) foi obtida por meio da fórmula $FI = B / F$ onde: F é o número de fragmentos inoculados e B o número de fragmentos infectados.

3.2. Avaliação fisiológica dos isolados

A partir das bactérias obtidas das espécies estudadas de *H. rauliniana* e *H. marginata*, foram realizados testes para avaliar a capacidade fisiológica em fixar nitrogênio, solubilizar fosfato e produzir auxinas, permitindo inferir de que forma este isolado promove o crescimento de plântulas de *Heliconia*.

3.2.1. Teste de fixação biológica de nitrogênio

Para o teste de fixação biológica de nitrogênio foi utilizado o meio NFb (5,0g de ácido málico, 0,5g K_2HPO_4 ; 0,2g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; solução de micronutrientes 0,04g, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 1,2g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 1,4g H_3BO_3 , 1 g $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 1,175 $MnSO_4 \cdot H_2O$ e 1000 ml água; 2ml; azul de bromotimol (solução 0,5% em 0,2N KOH) 2 ml; FeEDTA (solução 1,64 %) 4 mL; solução de vitaminas (10 mg biotina; 20 mg piridoxol-HCl; água 100ml) 1ml; 4,5 g KOH; 1000 ml água; 1,8g Agar; pH 6,8) (Dobereiner *et al.*, 1995), e observada a formação de uma zona de crescimento próxima à superfície do meio de cultura.

3.2.2. Teste de solubilização de fosfato

Para o teste de solubilização de fosfato foi utilizado o meio NBRI P (10,0 g de glicose, 5,0 g $Ca_3(PO_4)_2$, 0,1g $(NH_4)_2SO_4$, 5,0 g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 0,25 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,2g KCl, 1000 ml água destilada, pH, 7,0) (Nautiyal, 1999), e avaliada a formação de um halo ao redor da colônia após 72 horas.

3.2.3. Teste de produção de auxina

Para o teste de produção de auxina, a bactéria foi inoculada em meio TS 10 % contendo triptofano (1,5 g triptona, 0,5 g peptona de soja, 1 g triptofano, NaCl, 8 g; água destilada, 1000 ml; pH, 7,0) com a realização da leituras 2 horas após a coloração, com reagente de Salkowski ($0.5M FeCl_3$, $2 mL^{-1}$; $35 mL^{-1}$ Ácido perclórico, $63 mL^{-1}$ água destilada) (GLICKMANN & DESSAUX, 1995).

Após a realização dos testes e classificação quanto aos níveis de fixação biológica de nitrogênio, produção de auxina e solubilização de fosfato, foram selecionados os isolados bacterianos para a inoculação nas plantas micropropagadas originadas de ápices florais de *H. rauliniana* e de embriões de *H. marginata*.

3.3. Extração de DNA genômico de bactérias

Os isolados foram inoculados em 5 ml de LB e incubados por 18 horas a 28⁰C. Após esse período, cada cultura bacteriana foi colocada em tubos de 1,5 ml, centrifugada por 5 min a 9700 g, e em seguida o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi ressuspensionado em 500 µl de TE (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1mM EDTA pH 8,0) e centrifugado. O sobrenadante foi descartado e novamente ressuspensionado em 500 µl de TE sendo adicionados 30 µl de SDS 10%, mais 0,5 g de sílica com agitação no “bead beating” (Biospec products) por 30 seg. Após a agitação foram adicionados 500 µl de fenol saturado, homogeneizado e centrifugado (9700 g por 10 min). A fase superior foi transferida para um novo tubo e acrescido de 6 µl de RNase (RNase 10 mg/ml em 10mM Tris-HCl pH 8,0; 15mM NaCl) sendo incubado por 30 min a 37⁰C. A esta suspensão foram adicionados 200 µl de fenol e 200 µl clorofórmio, a solução foi homogeneizada por inversão e posteriormente centrifugada a 9700 g por 5 min. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionado 0,1 volume de NaCl 5M e 0,6 volume de isopropanol, incubado por 5 min a temperatura ambiente e em seguida centrifugado por 10 min a 9700 g. O sobrenadante foi descartado, o DNA foi lavado com 400 µl de etanol 70% e centrifugado por 2 min a 9700 g. O sobrenadante foi removido, o DNA foi seco a 37⁰C, ressuspensionado em 50 µl de água Milli-Q autoclavada e estocado a -20⁰C.

3.3.1. Amplificação do gene 16S rRNA.

As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 50µL, contendo 5 µL (10 ng) de DNA molde; 0,2 µM do primer 27f (5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e do primer 1378r (5'-CGGTGTGTACAAGGCCCGGAACG- 3'); 200µM de cada dNTP (Gibco BRL); 3,75 mM de MgCl; 0,5 U de Taq DNA polimerase (Gibco BRL). Em todos os experimentos foi adicionada uma reação sem DNA como controle negativo. Foi utilizado termociclador (Gene AMP PCR System 9700) programado para gerar uma desnaturação inicial de 4 min a

94°C, 2 ciclos a 94°C, 1 min a 60°C, 1 min a 72°C, 2 min; mais 2 ciclos a 94°C, 1 min; 59°C, 1 min; 72°C; 2 min; mais dois ciclos a 94°C, 1 min, 58°C, 1 min; 72°C, 2 min; mais dois ciclos a 94°C, 1 min; 57°C, 1 min; 72°C, 2 min; mais 2 ciclos a 94°C, 1 min; 56°C, 1 min; 72°C, 2 min; mais 20 ciclos a 94°C, 1 min; 55°C, 1 min; 72°C, 2 min e uma extensão final de 10 min a 72°C. Foram utilizados 5 µL da reação para a observação em gel de agarose (1,0%) de um fragmento de aproximadamente 1350 pb.

3.3.2. Identificação utilizando o gene 16S rDNA

As identificações foram realizadas seqüenciando o fragmento 27-600 (primer 27f) do gene 16S rRNA de 38 isolados. Para isso, após amplificação (item 2.2.4.) os produtos de PCR foram purificados com o Kit GFX PCR (Amersham Pharmacia Biotech). As amostras foram enviadas para o Centro de Estudos do Genoma Humano, onde foram seqüenciadas no seqüenciador ABI 3730. Após o recebimento das seqüências, as mesmas foram analisadas por meio de BLASTn contra a base de dados (GenBank), e submetidas ao programa **MEGA 4** (Tamura, Dudley, Nei, and Kumar 2007) onde foi observada a relação filogenética dos isolados com espécies já descritas, permitindo a construção de árvores filogenéticas.

3.4. Inoculação de isolados bacterianos em mudas propagadas de *Helicônias*

Foram realizados dois experimentos: No primeiro, os isolados utilizados foram selecionados de acordo com a seguinte classificação: isolado com maior produção de auxina; com maior nível de fixação de nitrogênio; e solubilização de fosfato, *in vitro*. No segundo experimento, os isolados utilizados foram os três que apresentaram melhores resultados no primeiro experimento, quanto ao enraizamento das plântulas micropropagadas de *H. rauliniana* originadas de ápice floral e *H. marginata* de embriões cultivadas *in vitro*. As

plântulas foram inoculadas por contato com suspensão bacteriana 10^4 UFC (unidade formadora de colônia), por 1 hora.

3.4.1. Primeiro Experimento

a) Inoculação em plântulas micropropagadas a partir de ápice floral

As plântulas micropropagadas foram retiradas dos frascos de cultura e lavadas em água corrente para a retirada do meio de cultivo. Após a lavagem, foi realizada a mensuração da altura das plântulas, critério atribuído para selecioná-las em tamanhos iguais. Em seguida, para cada isolado bacteriano, foi adicionado 200 mL de água destilada e autoclavada mais 1 mL^{-1} de solução do isolado, em Becker de 1000 mL e a solução foi homogeneizada sob leve agitação. A partir desta etapa foi realizada a inoculação com os isolados bacterianos que apresentaram maior atividade em fixar nitrogênio, produzir auxina e solubilizar fosfato (B4; B5; B8; B13; B16; B18); coquetel (suspensão de todos os isolados ao mesmo tempo) e o controle (sem inoculação com os isolados), permanecendo as plântulas na solução por 30 minutos. Após a imersão, foram plantadas em caixas de plásticos forradas com tecido não tecido (TNT) e o substrato foi irrigado com o resto da suspensão bacteriana (Fig. 10). O substrato utilizado foi o Plantimax Hortaliças Ht. (Tab.5). Foram utilizadas neste experimento 147 plântulas distribuídas em sete tratamentos com três repetições num total de 21 plantas por tratamento. Este experimento foi instalado em Casa de Vegetação do CBA sob sistema de nebulização para o enraizamento e aclimatização.

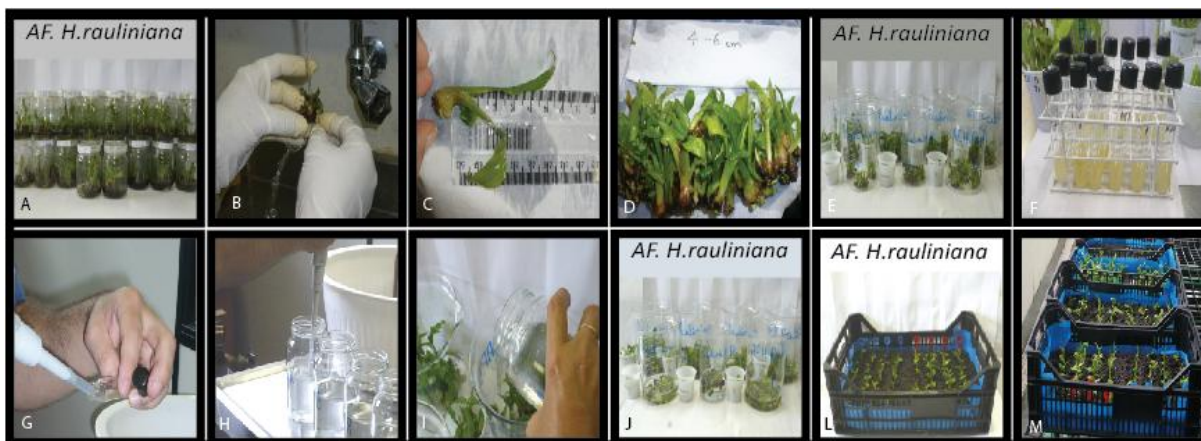


Figura 10 - Processo de Inoculação de isolados bacterianos em plântulas micropropagadas de *Heliconia rauliniana*: plantas micropropagadas (A); retirada do excesso do meio de cultura (B); medição das plantas (C); plantas selecionadas com a mesma altura (D); plantas no bequer separadas por tratamento (E); tubos de ensaio contendo os isolados bacterianos (F); retirada da solução dos isolados (G, H); adição de água na solução dos isolados (I); plantas imergidas na solução por 30 minutos (J) e plantio das plantas em caixas de plásticos no substrato plantimax (L; M).

Tabela 5 – Características do Substrato Plantamax Hortaliças Ht.

Características	PxHT	PxHA	PxT	PxF1
Umidade (%)	50	5,8	150	1,7
Capacidade de Retenção de Água – CRA (%)	150	150	150	150
Potencial Hidrogeniônico-pH	5,8 ($\pm 0,5$)	5,8 ($\pm 0,5$)	5,8 ($\pm 0,5$)	5,8 ($\pm 0,5$)
Condutividade Elétrica – CE (Ms/)	1,7 ($\pm 0,3$)	1,3 ($\pm 0,3$)	1,3 ($\pm 0,5$)	0,7 ($\pm 0,3$)

Fonte: [www.eucatex.com. br/Eucatex/descrição](http://www.eucatex.com.br/Eucatex/descrição)

b) Inoculação em plântulas micropropagadas a partir de embriões

Para a inoculação das plantas micropropagadas originadas de embriões da espécie *H. marginata* foi utilizada a mesma metodologia empregada em plântulas micropropagadas de ápice floral da espécie *H. rauliniana*. Os isolados utilizados foram B₁; B₂; B₄; B₆; B₇; B₁₀; B₁₂; B₁₄; B₁₆, coquetel (suspensão de todas as bactérias ao mesmo tempo) e o controle, permanecendo as plântulas na solução por 30 minutos (Fig. 11). Após a imersão, foram plantadas em caixas plásticas forradas com tecido não tecido (TNT) contendo o substrato Plantimax Hortaliças Ht, o mesmo utilizado anteriormente (Tab.5). Foram utilizadas 231 plântulas distribuídas em 10 tratamentos juntamente com o controle, com três repetições, num total de 21 plantas por tratamento. Este experimento foi instalado em casa de vegetação do

CBA sob sistema de nebulização para o enraizamento e aclimatização das mudas micropropagadas de embriões de *H. marginata*.

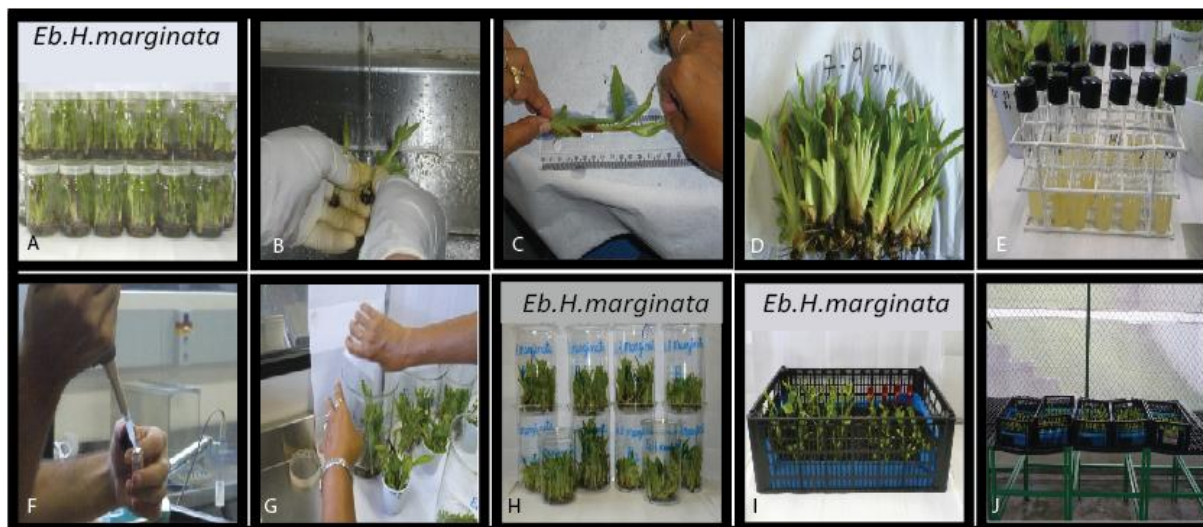


Figura 11 - Processo de inoculação de isolados bacterianos em plântulas micropropagadas de *Heliconia marginata*: plantas micropropagadas (A); retirada do excesso do meio de cultura (B); medição das plantas (C); plantas selecionadas com a mesma altura (D); tubos de ensaio contendo os isolados bacterianos (E); retirada da solução dos isolados (F); adição de água na solução dos isolados (G); plantas imersas na solução por 30 minutos (H) e plantio das plantas em caixas de plásticos no substrato plantimax (I; J).

c) Avaliação das plantas inoculadas

As avaliações das plantas inoculadas foram realizadas após 60 dias em casa de vegetação. As plantas foram transportadas ao laboratório, retiradas das bandejas e lavadas para a retirada do excesso de substrato. O parâmetro avaliado foi crescimento de raízes através de atribuição de notas, variando de zero (0) a dez (10), de acordo com a seguinte classificação: tamanho e quantidades de raízes emitidas.

3.4.2. Segundo Experimento

a) Inoculação em plântulas micropropagadas a partir de ápice floral

Os isolados bacterianos utilizados neste experimento foram os três que melhores resultados apresentaram no primeiro experimento, promovendo crescimento de raízes. Neste experimento todas as plântulas estavam com 5 cm de altura (Fig. 12), a quantidade de solução bacteriana utilizada foi o dobro do primeiro (2,0 ml), as plantas permaneceram imersas na

solução por uma hora. E, os isolados bacterianos testados foram B₅; B₁₃; B₁₈; coquetel (suspensão contendo os isolados bacterianos testados) e o controle, utilizando-se a mesma metodologia do primeiro experimento. Este experimento foi composto por 60 plântulas distribuídas em cinco tratamentos com 12 plântulas por tratamento, instalado em casa de vegetação do CBA sob sistema de nebulização para o enraizamento e aclimatização durante sessenta dias.

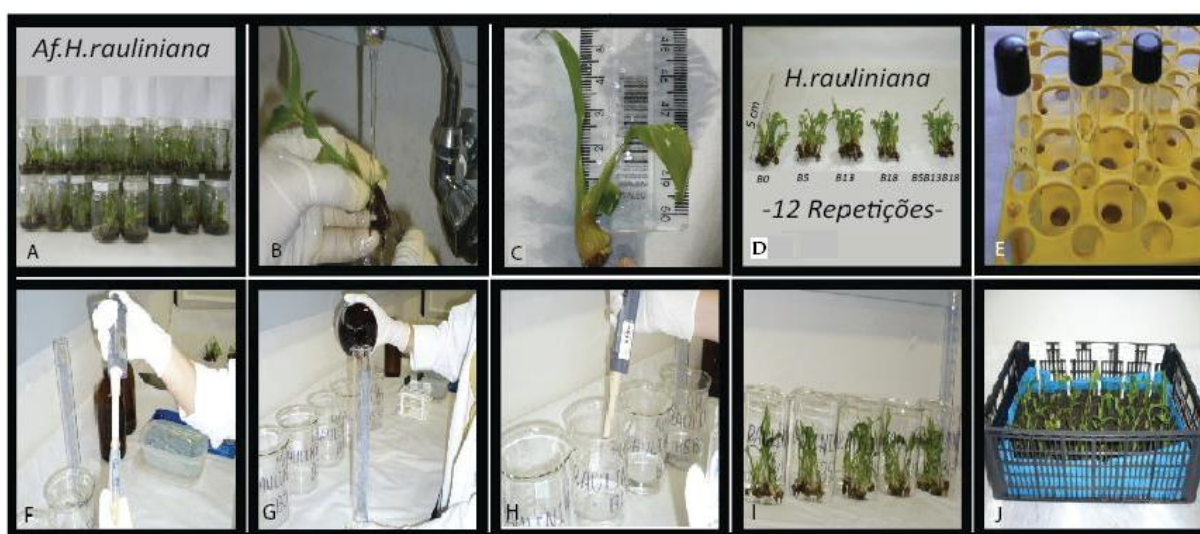


Figura 12 - Inoculação de isolados bacterianos em plântulas micropropagadas de ápice floral de *Heliconia rauliniana*: plantas micropropagadas (A); retirada do excesso do meio de cultura (B); plantas separadas por tratamento/repetições (C); medição das plantas (D); tubos de ensaio contendo os isolados bacterianos (E); retirada da solução dos isolados (F); adição e agitação de água na solução dos isolados (G; H); plantas imersas na solução por 30 minutos (I) plantio das plantas em caixas de plásticos no substrato plantimax (J).

b) Inoculação em plântulas micropropagadas a partir de embriões

Os três isolados bacterianos utilizados neste experimento foram os que melhores resultados apresentaram no primeiro experimento, como promotor de crescimento de raízes. Neste experimento todas as plântulas estavam com a mesma altura (5 cm de altura). Os isolados bacterianos testados foram B₆; B₇; B₁₀; coquetel (suspensão de todas as bactérias ao mesmo tempo) e o controle utilizando-se a mesma metodologia do primeiro experimento (Fig. 13). Este experimento foi composto por 60 plântulas distribuídas em cinco tratamentos com doze plântulas por tratamento e instalado em casa de vegetação do CBA sob sistema de

nebulização para o enraizamento e aclimatização durante 60 dias.

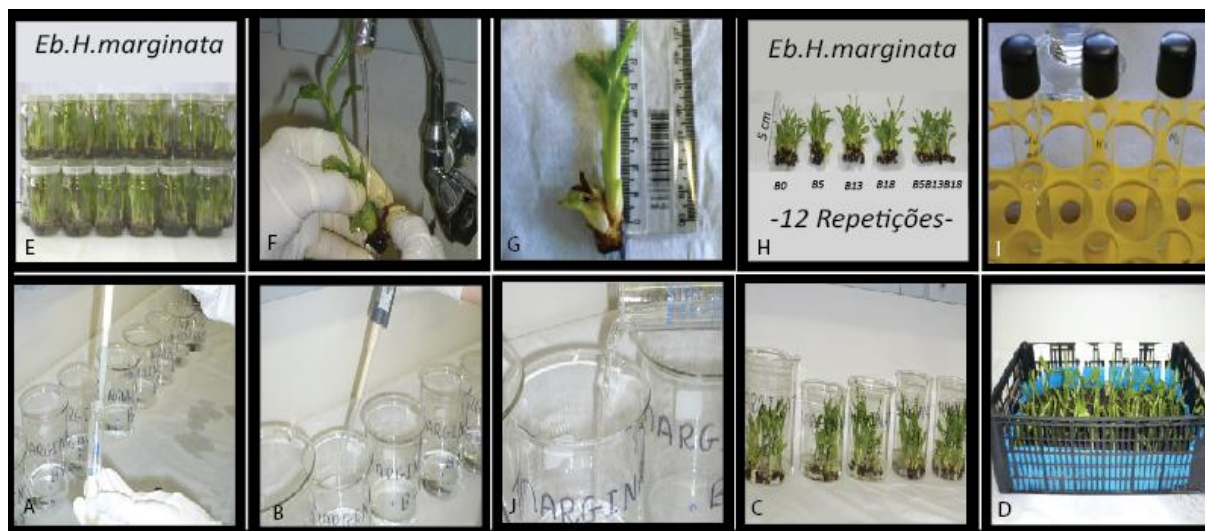


Figura 13 - Inoculação de isolados bacterianos em plântulas micropropagadas de embrião de *Heliconia marginata*: plantas micropropagadas (A); retirada do excesso do meio de cultura (B); medição das plantas (C); plantas selecionadas com a mesma altura (D); plantas no bequer separadas por tratamento (E); tubos de ensaio contendo os isolados bacterianos (F); retirada da solução dos isolados (G, H); adição de água na solução dos isolados (I); plantas imergidas na solução por 30 minutos (J) plantio das plantas em caixas de plásticos no substrato plantimax.

c) Avaliação da promoção de crescimento das plantas inoculadas

Após 60 dias em casa de vegetação, as plantas foram coletadas e transportadas ao laboratório, lavadas em água corrente retirando-se o excesso do substrato. A avaliação da promoção de crescimento foi realizada mediante a mensuração dos seguintes parâmetros: altura das plantas, números de folhas, classificação das raízes atribuindo-se notas, variando de zero (0) a dez (10), da seguinte maneira: 0= sem raiz; 1= raiz de 1,0 cm; 2= raiz com 2,0 cm; 3= raiz com 2,5 cm; 4= raiz com 3,0 cm; 5= raiz com 3,5 cm; 6= raiz com 4,0 cm; 7= raiz com 4,5 cm; 8= raiz com 6,0; 9= raiz com 7,5 cm e 10= raiz com mais de 8,0 cm e a comparação do peso seco das raízes e parte aérea das plantas tratadas e o controle.

3.5. Análise Estatística

A partir dos dados coletados e armazenados em um banco de dados, utilizou-se para análise o software estatístico MINITAB 15. Inicialmente foram realizados os procedimentos de análises descritivas padrões. A comparação entre mais de duas médias (variáveis quantitativas), foi realizada utilizando-se a Análise de Variância (ANOVA) ou nos casos em que os pré-supostos necessários não foram estabelecidos foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Para todas as análises foi fixado um limite de significância igual a 0.05 e um coeficiente de confiança de 95% (Tab.8, 9, 10 e 11)

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Frequência de isolamento de bactérias endofíticas

O conhecimento da estrutura populacional das bactérias endofíticas é fundamental para o entendimento das interações planta-endófito e como são influenciadas pelo ambiente. O nicho ecológico ocupado por bactérias endofíticas é um ambiente dinâmico, no qual muitos fatores podem afetar a estrutura e a diversidade da população bacteriana que coloniza a planta. Foi observado por meio do isolamento que os fragmentos tanto de *H. marginata*, como os de *H. rauliniana* apresentaram bactérias endofíticas, com uma frequência de 100% de microrganismos endofíticos nos fragmentos das plantas.

Na maioria das espécies vegetais os microrganismos endofíticos ainda não foram estudados, identificados e classificados. Mas, como cita Pinto (2003) que em todas as espécies de plantas já estudadas foi encontrada a presença de microrganismos endofíticos sugerindo uma íntima relação entre os endófitos e as plantas, o que evidencia a co-evolução dos microrganismos com seus hospedeiros, apresentando uma íntima relação mutualística, através da qual os endófitos recebem nutrientes e proteção da planta hospedeira. Além de que, as suas propriedades ainda pouco conhecidas, mas, potencialmente de interesse aplicado, como afirma Downing *et al* (2000), que estes microrganismos endofíticos podem ser utilizados como vetores para a introdução de características de interesse biotecnológico na planta.

4.1.1. Características fenotípicas dos isolados bacterianos de *H. marginata* e *H. rauliniana*

Bactérias endofíticas exibem potencial biotecnológico como agentes de promoção de crescimento, principalmente por disponibilizar compostos para a planta. A promoção de crescimento é um evento dependente da interação entre a bactéria promotora de crescimento, a comunidade microbiana associada ao hospedeiro e o genótipo da planta. Bactérias

endofíticas podem promover o crescimento de duas formas: disponibilizando nutrientes para a planta ou inibindo microrganismos fitopatogênicos. Estudos têm sido realizados com o objetivo de se obter o máximo de promoção de crescimento aliado ao controle de doenças.

Devido à necessidade de nitrogênio e fósforo para o crescimento das plantas, torna-se importante a utilização de bactérias. Além disso, é importante o entendimento da interação bactéria-planta na produção da auxina AIA, bem como o conhecimento da diversidade das bactérias endofíticas associadas às espécies de *H. marginata* e *H. rauliniana*. Na identificação vários isolados endofíticos, apresentaram características relacionadas à promoção de crescimento vegetal como, produção de AIA (Fig. 14A), capacidade de fixação de nitrogênio (Fig. 14B) e de solubilização de fósforo (Fig. 14C), com exceção do isolado B₁₃ (*Ralstonia* sp) o que pode ser visto na (Tab. 6 e 7), onde 72,2% dos isolados fixa nitrogênio, 58,3% solubiliza fósforo e 50,0% produz AIA.

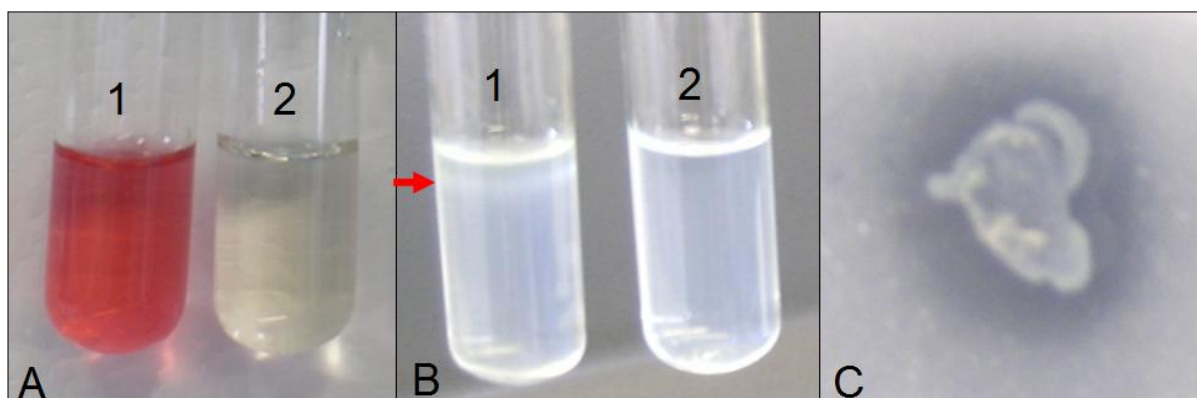


Figura 14. Bactéria produzindo AIA (A), fixando nitrogênio (B) e solubilizando fósforo (C). 1 isolado positivo e 2 controle negativo.

Tabela 6. Avaliação fenotípica das bactérias endofíticas isoladas de *H. marginata* em fixar nitrogênio, solubilizar fosfato e produzir fitohormônio.

Características	Isolados								
	B ₁	B ₂	B ₃	B ₄	B ₅	B ₆	B ₇	B ₈	B ₉
F. B. Nitrogênio	2	0	1	1	2	2	3	3	0
S. Fosfato	2	0	1	1	0	2	2	0	1
P. Auxina	2	0	0	1	0	1	1	0	2
	B ₁₀	B ₁₁	B ₁₂	B ₁₃	B ₁₄	B ₁₅	B ₁₆	B ₁₇	B ₁₈
F. B. Nitrogênio	2	1	2	0	2	0	1	2	2
S. Fosfato	3	0	3	0	1	0	1	0	0
P. Auxina	2	0	1	0	2	0	0	0	0

Valores atribuídos: 0 ausência de atividade, 1 pouca atividade, 2 média atividade, e 3 alta atividade, comparado ao controle positivo de *Pantoea agglomerans* que produz 10ug/ml.

Tabela 7. Avaliação fenotípica das bactérias endofíticas isolada de *H. rauliniana* em fixar nitrogênio, solubilizar fosfato e produzir fitohormônio.

Características	Isolados								
	B ₁	B ₂	B ₃	B ₄	B ₅	B ₆	B ₇	B ₈	B ₉
F. B. Nitrogênio	0	2	1	2	2	1	0	1	1
S. Fosfato	0	2	1	1	1	0	0	1	1
P. Auxina	1	0	0	1	1	0	1	1	0
	B ₁₀	B ₁₁	B ₁₂	B ₁₃	B ₁₄	B ₁₅	B ₁₆	B ₁₇	B ₁₈
F. B. Nitrogênio	0	3	1	0	0	0	1	1	2
S. Fosfato	1	0	1	0	0	0	1	1	1
P. Auxina	3	0	0	0	1	1	2	0	1

Valores atribuídos: 0 ausência de atividade, 1 pouca atividade, 2 média atividade, e 3 alta atividade comparado ao controle positivo de *Pantoea agglomerans* que produz 10ug/ml.

Estudos têm mostrado que vários gêneros de bactérias endofíticas (*Pantoea*, *Bacillus*, *Enterococcus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*) isolados de diferentes culturas são capazes de produzir fitohormônio, solubilizar fosfato e fixar nitrogênio (Kuklinsky-Sobral *et al.*, 2004, Peng *et al.*, 2009 e Wong & Caballero, 2009) que auxilia no desenvolvimento das plantas.

4.1.2. Identificação Por Meio do 16S rDNA

Atualmente, os genes rRNAs podem ser considerados uma das mais importantes moléculas para o estudo de filogenia e ecologia microbiana, pois permitem uma avaliação da biodiversidade microbiana em diferentes nichos ecológicos (Heyndrickx *et al.*, 1996; Louws *et al.*, 1999). Também, por meio de análises das seqüências pode ser realizada a identificação de microrganismos no nível de gênero e possivelmente de espécie, como também pode permitir correlações entre o genótipo e o ambiente estudado (CHÈNEBY *et al.*, 2000).

Neste trabalho foi seqüenciado um fragmento de aproximadamente 800 pb do 16S rDNA ("primer" 27f) de 6 isolados, provenientes de *H. marginata* e *H. rauliniana*. A análise das seqüências via BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) mostrou a existência de pelo menos 3 grupos de bactérias que pode ser visto na Figura 14, dois gêneros bem definidos (*Burkholderia* e *Ralstonia*) e um terceiro grupo formado pela família *Enterobacteriaceae*, que estão presentes em diversas espécies de plantas como endofíticas, tais como citrus (Araújo *et al.*, 2001) soja (Kuklinsky-Sobral *et al.*, 2005), videira (Bulgari *et al.*, 2009) e eucalipto (PROCÓPIO *et al.*, 2009).

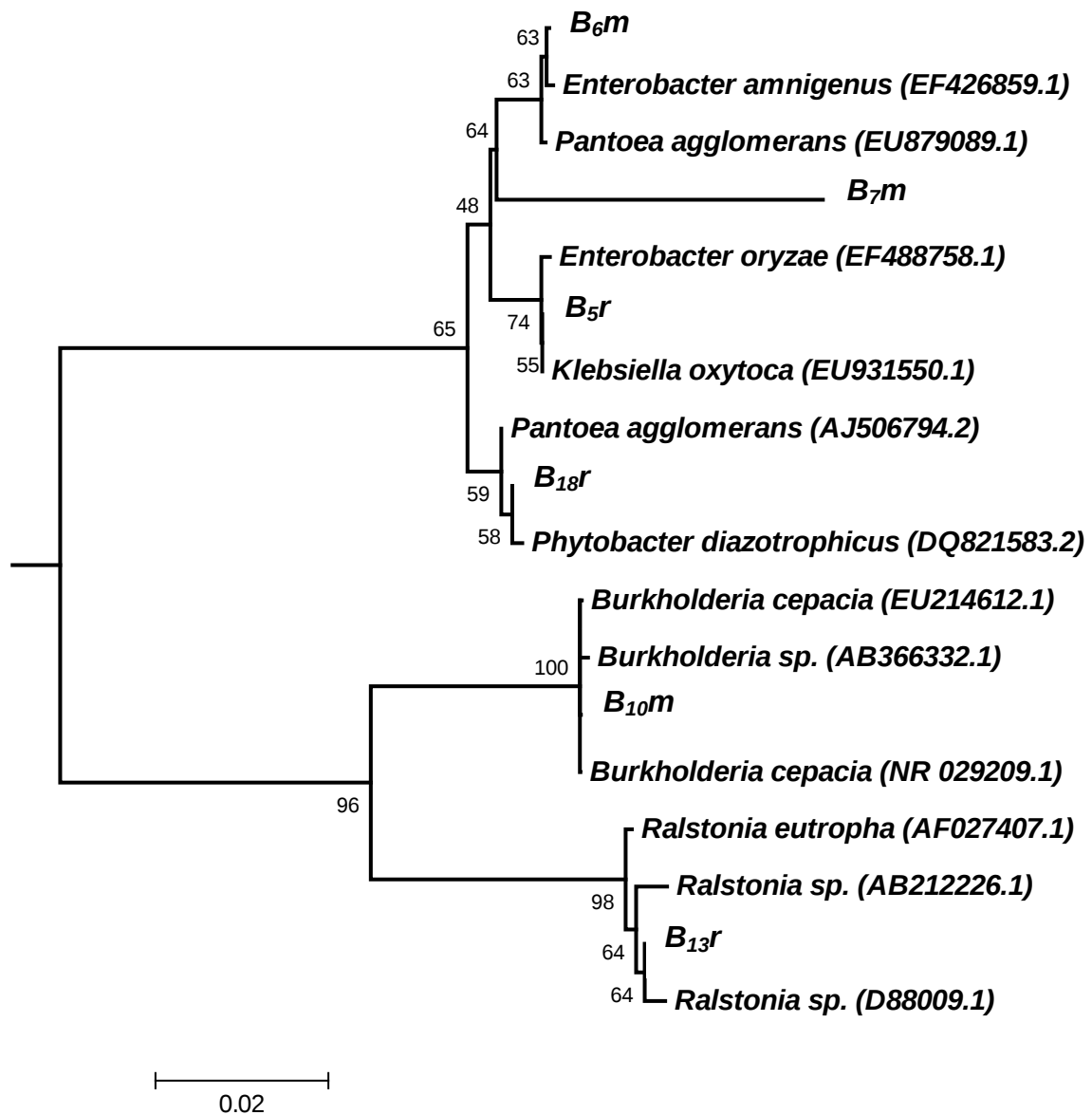


Figura 15. Árvore filogenética baseada na sequência de 16S rDNA dos isolados bacterianos considerando Neighbor-Joining.

Nos últimos anos, isolados endofíticos de *Burkholderia* estão recebendo maior interesse para sua utilização na promoção de crescimento de plantas (Wong & Caballero, 2009) e controle biológico de pragas (Sharifi-Tehrani *et al.*, 2007), Mendes *et al.*, (2007) observou que as bactérias pertencentes ao gênero *Burkholderia* são os endófitos mais freqüentes em cana de açúcar. Baseado na filogenia do 16S rDNA os isolados endofíticos (*B_{6m}*, *B_{7m}*, *B_{5r}* e *B_{18r}*) apesar de pertencerem a família *Enterobacteriaceae* apresentam uma

alta diversidade como pode ser verificado na árvore filogenética, característica deste grupo de endófitos, que pode colonizar diferentes ambientes. Vários gêneros da família Enterobacteriaceae (*Klebsiella*, *Enterobacter*, e *Citrobacter*) encontrados na rizosfera são capazes de fixar nitrogênio (Kennedy *et al.*, 2004), *Klebsiella* são comumente encontradas como endófitos e são capazes também de produzir fitohormônio para planta hospedeira (Dong *et al.*, 2003), o gênero *Pantoea* é um dos mais importantes endófitos de plantas capazes de fixar nitrogênio solubilizar fosfato e produzir fitohormônio (Kuklinsky-Sobral *et al.*, 2004). Apesar de o gênero *Ralstonia* estar sempre associado aos fitopatógenos (Xu *et al.*, 2009), algumas linhagens foram encontradas como endofíticas em soja (Kuklinsky-Sobral *et al.*, 2005) e banana (THOMAS *et al.*, 2008).

4.2. Inoculação de isolados bacterianos em mudas propagadas de Helicônias

4.2.1. Primeiro experimento

Os resultados da inoculação dos isolados bacterianos nas plântulas micropropagadas de helicônias, após 60 dias podem ser observados nas (Fig. 16 e 17). Observou-se que os resultados apresentados pelas plantas quanto ao crescimento das raízes de helicônias quando comparadas com as plantas não tratadas, o crescimento foi maior em ambas as espécies na *H. marginata* os isolados B₆, B₇ e B₁₀ foram os que apresentaram melhores resultados, já na espécie *H. rauliniana*, os isolado que apresentaram os melhores resultados foram B₅, B₁₃ e B₁₈. De forma semelhante, Assis (2002) obteve crescimento de mudas de *Heliconia*. Os isolados utilizados neste experimento foram selecionados de acordo com a capacidade das atividades destes em fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato e produção de auxina. Com exceção do isolado B₁₃ (*Ralstonia sp*) proveniente da *H. rauliniana* que durante o processo de avaliação fisiológica não apresentou capacidade de atividade, não ocorrendo o mesmo, quando inoculado na planta. Isso vem confirmar que essas bactérias podem se

multiplicar lentamente e não serem detectadas até atingirem uma densidade maior, ou permanecerem viáveis sem se multiplicarem devido à limitação de nutrientes (Santos *et al*, 2005). A habilidade de sintetizar fitormônios é amplamente distribuída entre bactérias associadas à planta. O fitormônio mais ativo em plantas é o ácido-3-indol-acético (AIA). Estima-se que aproximadamente 80 % das rizobactérias podem produzir esse regulador de crescimento. Em bactérias como *Azospirillum* spp., a produção de auxina, que é quantitativamente abundante, é fator responsável ao desenvolvimento das raízes e, conseqüentemente, pelo maior crescimento da planta (STEENHOUDT & VAMDERLEYDEN, 2000).

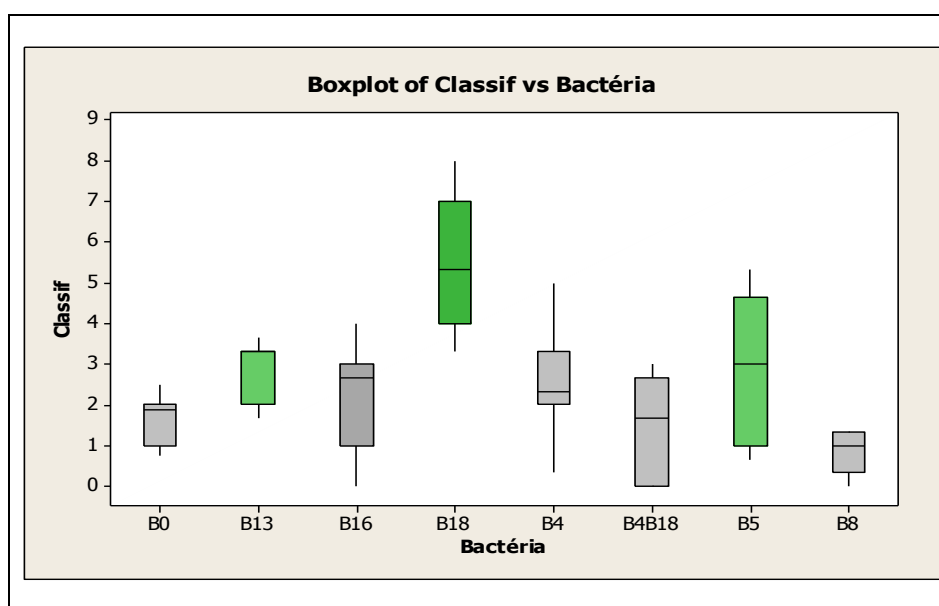


Figura 16 – Avaliação das médias de enraizamento das plantas micropropagadas de *Heliconia rauliniana* inoculadas com isolados bacterianos, após 60 dias de aclimatização

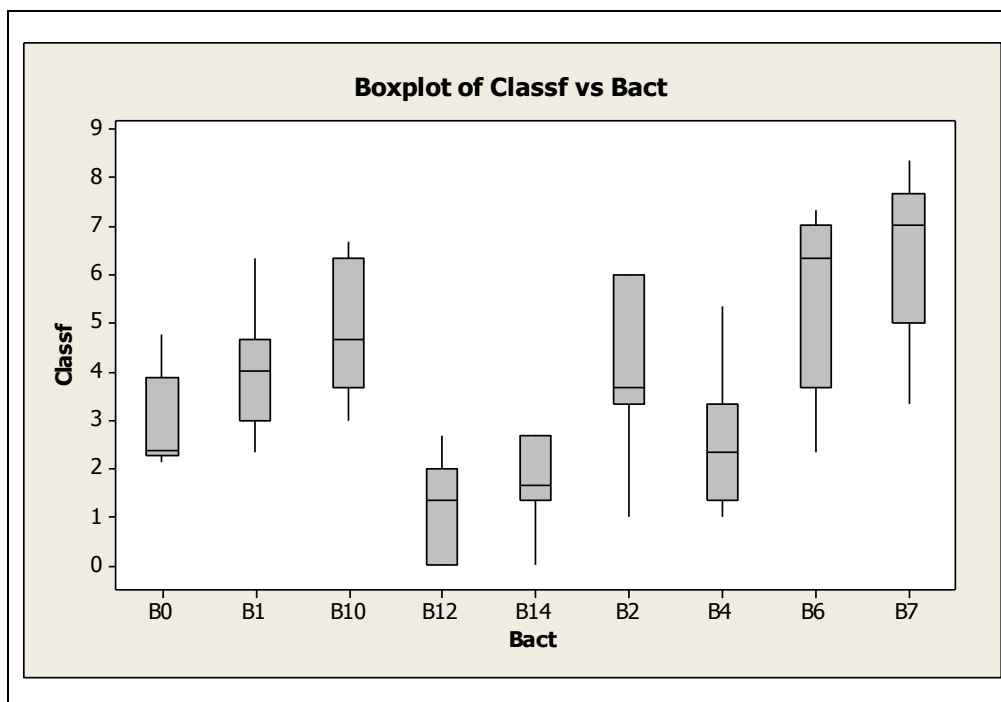


Figura 17 – Avaliação das médias de enraizamento das plantas micropropagadas de *Heliconia marginata* inoculadas com isolados bacterianos, após 60 dias de aclimatização.

4.2.2. Segundo Experimento

Avaliação do potencial de promoção de crescimento de mudas de helicônia por isolados de bactérias endofíticas

Nos testes realizados com os três isolados de *H. marginata* (B₆, B₇ e B₁₀) e os três isolados de *H. rauliniana* (B₅, B₁₃ e B₁₈), os isolados endofíticos B₆ e B₁₃ foram os que apresentaram melhores resultados (Tab. 7; Tab.8; Tab. 9 e Tab. 10) para os seguintes fatores: número médio de folhas (Fig. 18), altura média (Fig. 19), desenvolvimento médio de raízes (Fig. 20 e Fig.21), peso fresco da parte aérea (Fig. 22), peso fresco radicular (Fig. 23), peso seco radicular (Fig. 24), peso total radicular (Fig. 25), e peso total das partes aéreas (Fig. 26). Diversas pesquisas demonstram a capacidade de bactérias do solo, mais especificamente da rizosfera, na promoção de crescimento de plantas (Ashrafuzzaman *et al.*, 2009). Entretanto, o conhecimento do genótipo da planta e do microrganismo envolvido na promoção é de extrema importância. Neste aspecto, bactérias endofíticas dos gêneros *Acetobacter*, *Acinetobacter*, *Actinomyces*, *Agrobacterium*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Cutrtobacterim*, *Pantoea*,

Pseudomonas e *Xanthomonas* entre outras têm sido freqüentemente utilizadas. O isolado B₆ de *H. marginata* pertencente ao gênero *Pantoea* tem sido citado na literatura como uma bactéria promissora para utilização na promoção de crescimento de planta (Selvakumar *et al.*, 2008, e Muhammad *et al.*, 2008). O isolado B₁₃ de *H. rauliniana* pertencente ao gênero *Ralstonia*, apesar de não fixar nitrogênio, não solubilizar fosfato, nem produzir fitohormônio, e estar sempre associado a doenças de plantas apresentou excelentes resultados. Talvez outra característica desta bactéria, capaz de promover o crescimento da planta não esta sendo avaliada (como a produção de sideróforo).

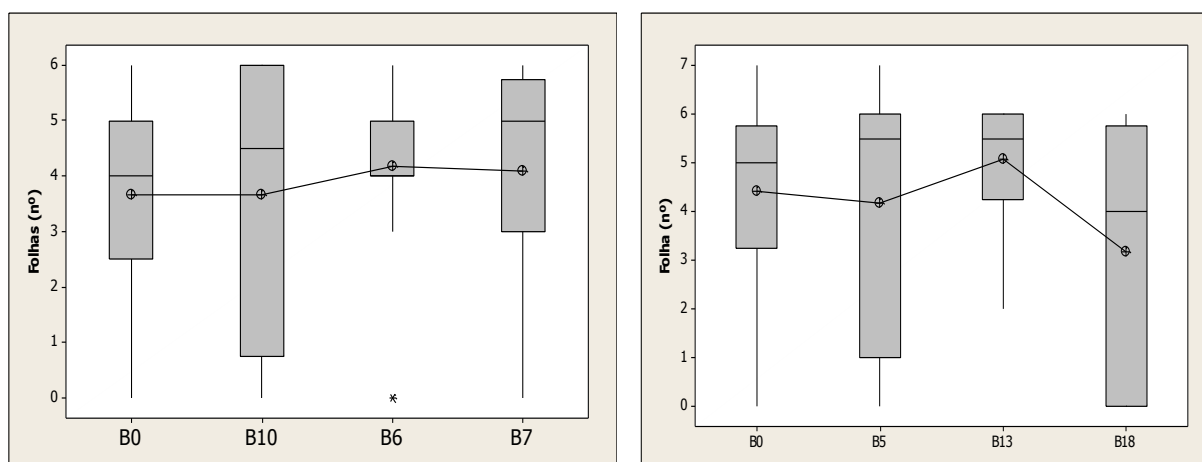


Figura 18 - Número médio de folhas das plantas de (A) *H. marginata* e (B) *H. rauliniana*, inoculadas com isolados de bactérias

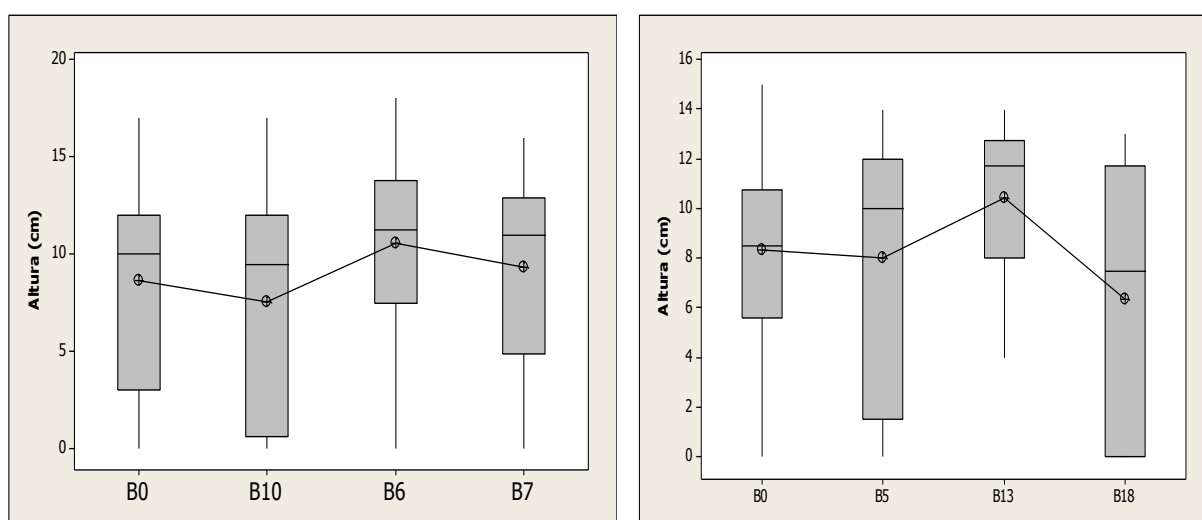


Figura 19 - Altura média das plantas de (A) *H. marginata* e (B) *H. rauliniana* inoculadas com isolados de bactérias

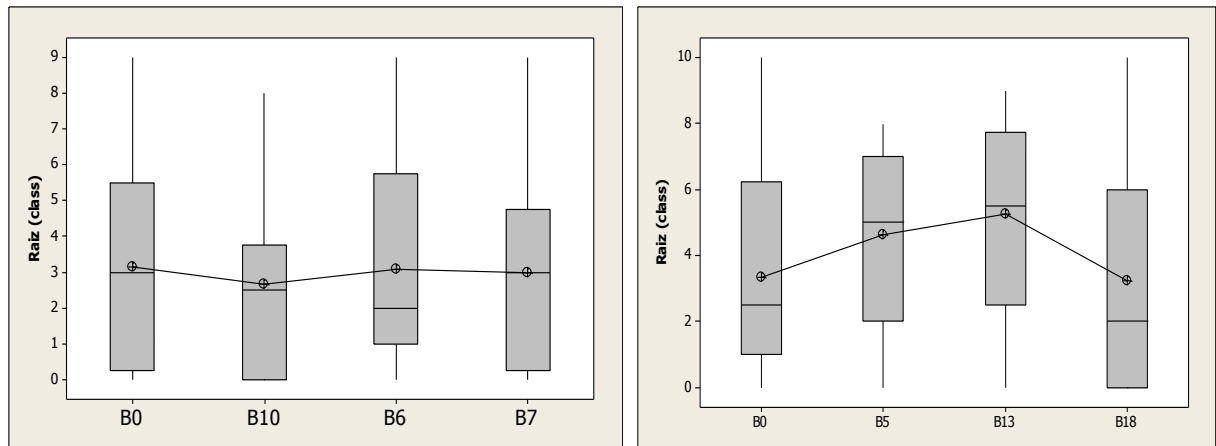


Figura 20 - Desenvolvimento médio de raízes de (A) *H. marginata* e (B) *H. rauliniana* inoculadas com isolados de bactérias

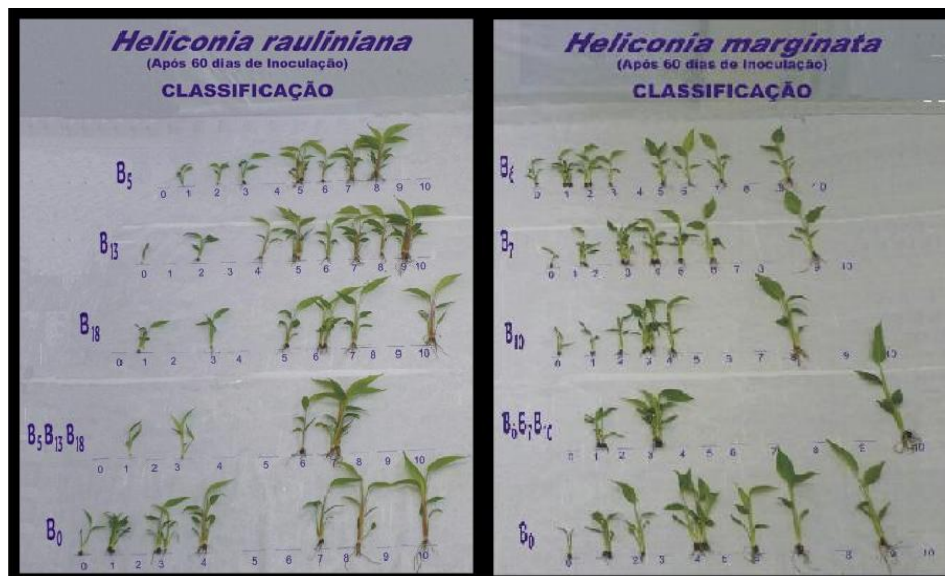


Figura 21 - Classificação das raízes através de notas equivalentes de (0 a 10) de plantas de *Heliconia rauliniana* e *Heliconia marginata*, após 60 dias de inoculação

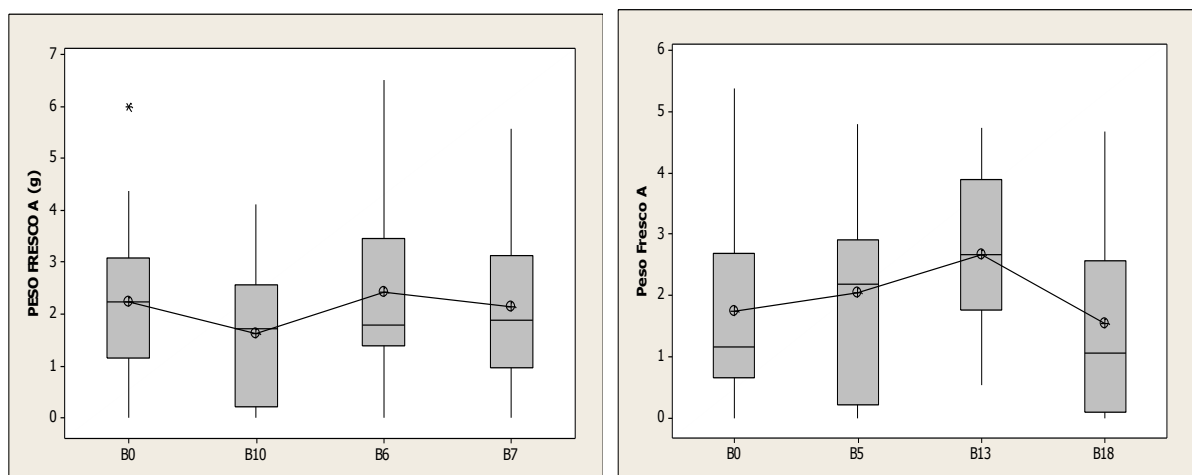


Figura 22 - Peso fresco da parte aérea das plantas micropropagadas de (A) *H. marginata* e (B) *H. rauliniana* inoculadas com isolados de bactérias

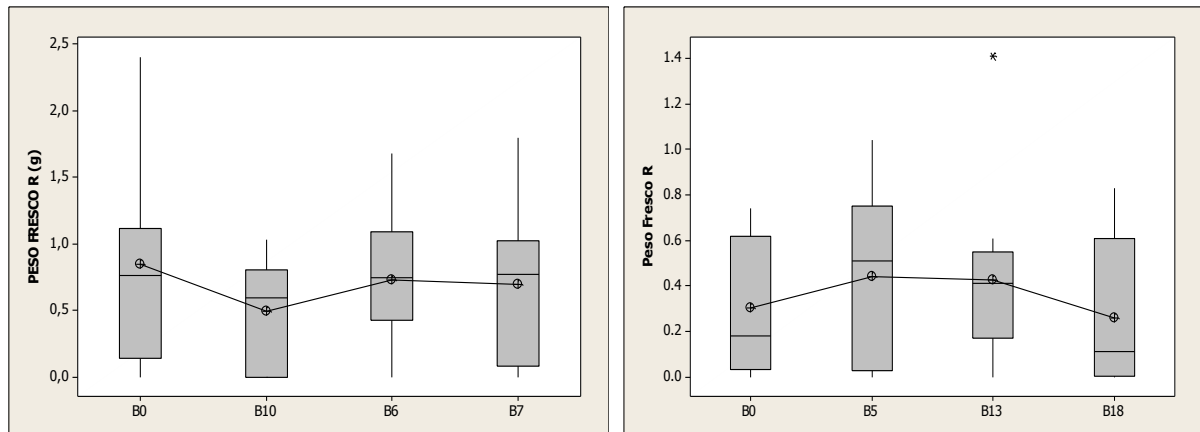


Figura 23 - Peso fresco radicular das plantas micropropagadas de (A) *H. marginata* e (B) *H. rauliniana* inoculados com isolados bactérias

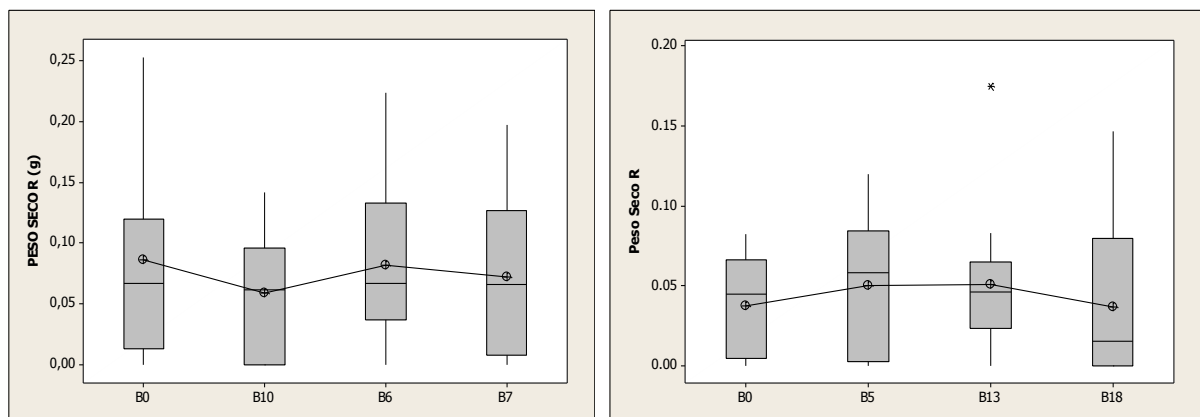


Figura 24 - Peso seco radicular das plantas micropropagadas de (A) *H. marginata* e (B) *H. rauliniana* inoculadas com isolados de bactérias

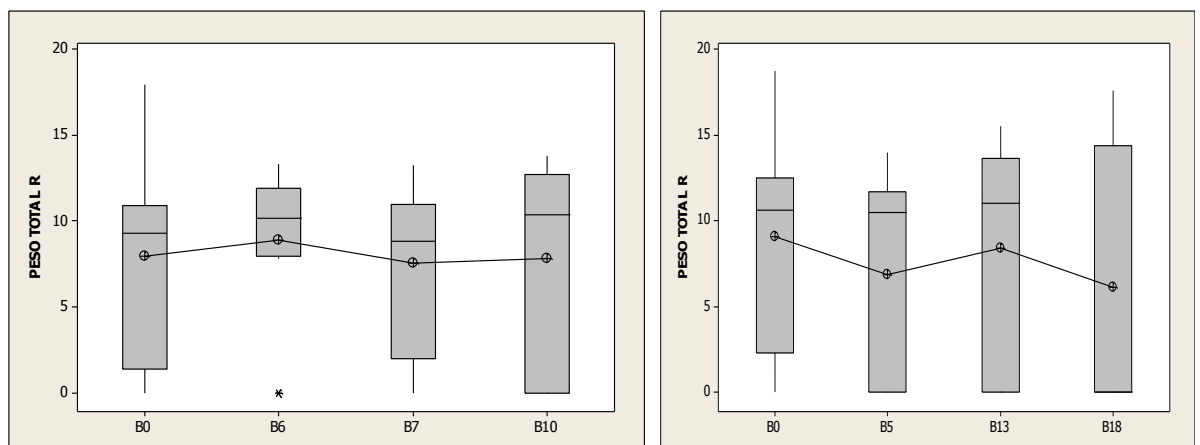


Figura 25 – Peso total radicular das plantas de (A) *H. marginata* e (B) *H. rauliniana* inoculadas com isolados de bactérias

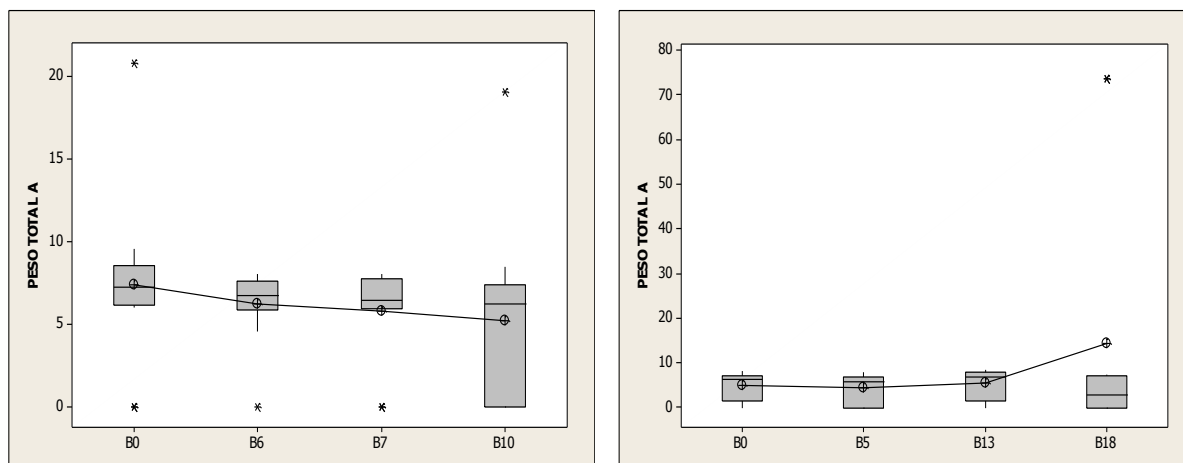


Figura 26 – Peso total aéreo das plantas de (A) *H. marginata* e (B) *H. rauliniana* inoculadas com isolados de bactérias

Silveira *et al* (2004) isolou bactérias epifíticas e endofíticas de plantas de pepino saudáveis e avaliaram em três bioensaios, o efeito destes na promoção de crescimento de plântulas em casa de vegetação. No primeiro foram testados 93 isolados; no segundo, 32 isolados e no terceiro, oito isolados de pepino e mais 10 isolados provenientes de outras culturas. As sementes de pepino foram bacterizadas, semeadas em substrato orgânico contido em bandejas de isopor e analisadas dez dias após a semeadura quanto às matérias secas da parte aérea (MSPA), raiz (MSR) e total (MST). Dos três bioensaios os isolados epifíticos PEP52, PEP8, PEP82, PEP91 e C22 foram selecionados por aumentarem significativamente a MSR e MST das plântulas. Após o teste de compatibilidade *in vitro*, esses cinco isolados, testados separadamente e em misturas, mostraram-se eficientes no aumento do índice de MSPA, MSR e MST das plântulas de pepino, sem diferirem significativamente entre si. Os isolados PEP18 (*Bacillus amyloliquefaciens*) e PEP91 (*Enterobacter cloacae*) destacaram-se com índices de aumentos respectivamente de 55% e 39,5 % (MSPA), 42,9 e 37,5 % (MSR) e 41,6 e 34,0 % (MST), respectivamente. A produção do ácido indol acético, ácido cianídrico, solubilização de fosfatos e alteração nos teores foliares dos macronutrientes N, P, K, Ca e Mg, foram avaliados como possíveis mecanismos de ação desses dois isolados, porém com resultados negativos (SILVEIRA *et al*, 2004).

A utilização de bactérias de promoção de crescimento apesar de bem estabelecidas como produtos biológicos para controle biológico de doenças e pragas, o uso de BPCP na produção de mudas micropropagadas ainda está em fase inicial. Os efeitos benéficos das BPCP sobre as mudas micropropagadas são principalmente, aumento de área foliar, diâmetro de pseudocaule, número de folhas e matéria seca, com conseqüente redução do tempo de aclimatização e maior sobrevivência das mudas após o transplante (MARIANO, 2004).

Mello *et al* (2002) avaliaram a eficiência de 19 isolados bacterianos na promoção de crescimento de mudas micropropagadas de abacaxizeiro cv. Pérola utilizando diferentes métodos de bacterização. As variáveis alturas da planta, número de folhas, área foliar, pesos da matéria seca da parte aérea e do sistema radicular foram avaliadas 30 dias após o transplantio. Entre os métodos testados, a imersão do sistema radicular e a infestação do substrato + imersão do sistema radicular foram os mais eficientes, sendo escolhido o método da imersão do sistema radicular, pela maior praticidade. Não foi registrada a produção de AIA, HCN ou solubilização de fosfatos, nas condições experimentais utilizadas. O nitrogênio foi o único macronutriente cujo teor diferiu significativamente entre as mudas bacterizadas e testemunhas. Os resultados demonstraram que misturas dos isolados C210, ENF16, RAB9 e ENF10, aplicadas através da imersão do sistema radicular, promoveram o aumento de biomassa de mudas de abacaxizeiro micropropagadas, reduzindo a fase de aclimatização.

Com relação ao índice de sobrevivência das plantas após 60 dias da inoculação e aclimatizadas em casa de vegetação o que melhor resultado apresentou para *H. rauliniana* foi o isolado B₁₃ seguido do B₅ e B₁₈ (Fig.27 e Fig.28) e para *H. marginata* foi B₆ seguido do B₇ e B₁₀ (Fig.29 e Fig. 30).

Visando a promoção de crescimento de plantas de helicônia, (Assis 2002) testou 50 bactérias isoladas de folhas e sementes de plantas sadias de helicônia em casa de vegetação. Para a seleção preliminar, antes do plantio foram depositados 100 mL da suspensão bacteriana

($A_{580} = 0,7$) por vaso. Após quatro meses as mudas foram avaliadas quanto ao diâmetro do pseudocaule (DPC), matéria seca da parte superior - folhas e pseudocaule (MSS), matéria seca da parte inferior – rizoma e raiz (MSI) e altura do pseudocaule (AP). Os três isolados mais eficientes HPS6, HPF14 e HNF15 foram identificados como *Bacillus pumilus*, *B. thuringiensis* subvar. *kurstakii* e *B. cereus*, respectivamente, testados quanto à compatibilidade e utilizados em misturas. A mistura dos isolados compatíveis HPS6 e HNF15 promoveu aumentos significativos de DPC, MSS, MSI, AP e AF. Não foi constatada a produção o do ácido indol acético, ácido cianídrico ou solubilização de fosfatos. O fósforo foi o único macronutriente cujo teor aumentou significativamente entre as mudas cultivadas em substrato tratado. Os mutantes resistentes a rifampicina e ácido nalidíxico obtidos apresentaram colonização epifítica e endofítica em raízes de helicônia onde sobreviveram até 120 dias.

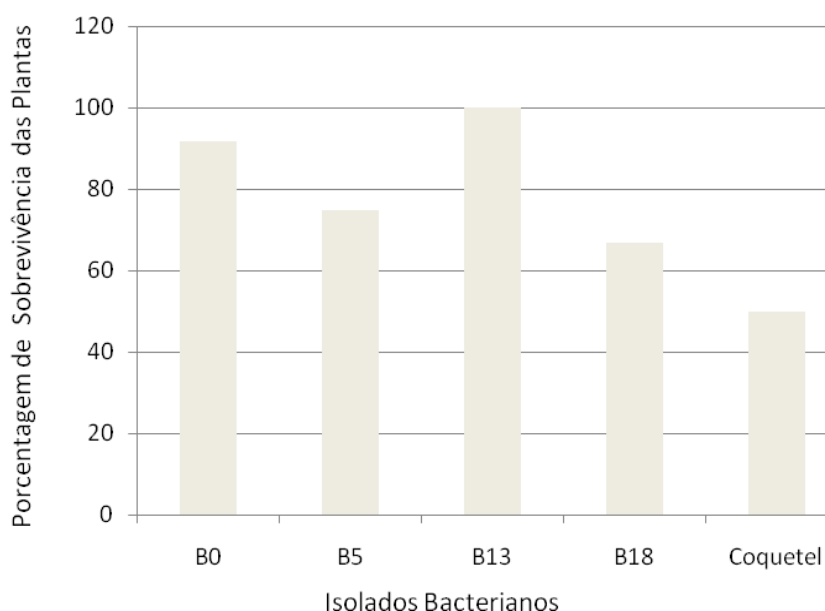


Figura 27 - Porcentagem de sobrevivência das plantas de *Heliconia rauliniana* inoculadas com diferentes isolados bacterianos

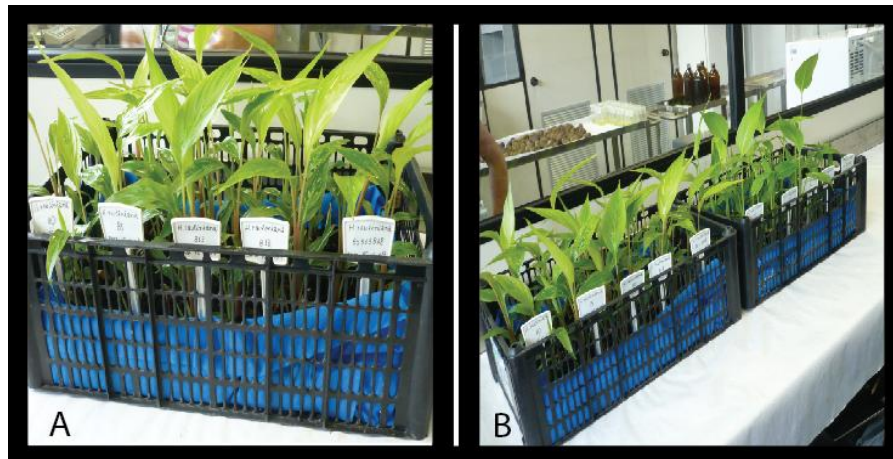


Figura 28 - Crescimento em altura e número de folhas de *Heliconia rauliniana* (A, B) após 60 dias de inoculação.

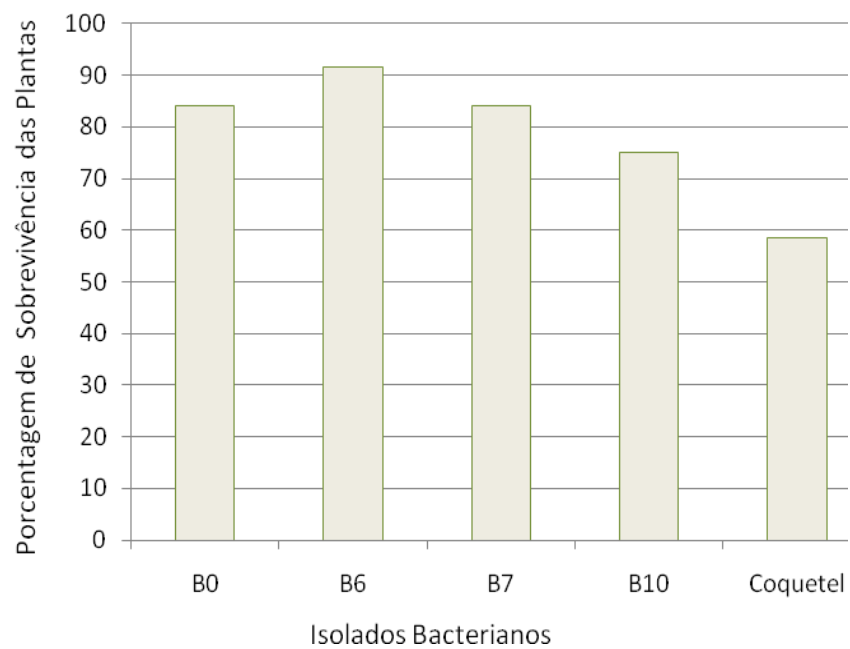


Figura 29 - Porcentagem de sobrevivência das plantas de *Heliconia marginata* inoculadas com diferentes isolados bacterianos



Figura 30 - Crescimento em altura e número de folhas de *Heliconia marginata* (A, B) após 60 dias de inoculação.

Tabela 8 - Efeito de bactérias endofíticas selecionadas na promoção de crescimento de plantas de *Heliconia marginata* sobre altura, número de folhas e raízes.

Variáveis	N	Media	Desvio-Padrão	Mediana	p-valor
Folhas					
B0 (Controle)	12	3,67	1,97	4,00	0, 876**
B6 (<i>Enterobacter</i>)	12	4,17	1,59	4,00	
B7 (<i>Enterobacter</i>)	12	4,08	2,15	5,00	
B10 (<i>Burkholderia</i>)	12	3,67	2,46	4,50	
Altura					
B0 (Controle)	12	8,67	5,85	10,00	0, 675*
B6 (<i>Enterobacter</i>)	12	10,58	4,67	11,25	
B7 (<i>Enterobacter</i>)	12	9,33	5,45	11,00	
B10 (<i>Burkholderia</i>)	12	7,58	6,06	9,50	
Raiz					
B0 (Controle)	12	3,17	3,01	3,00	0, 952**
B6 (<i>Enterobacter</i>)	12	3,08	2,97	2,00	
B7 (<i>Enterobacter</i>)	12	3,00	2,80	3,00	
B10 (<i>Burkholderia</i>)	12	2,67	2,87	2,50	

*(ANOVA) Teste F **Teste de Kruskal- Wallis

Tabela 9 - Efeito de bactérias endofíticas selecionadas na promoção de crescimento de plantas de *Heliconia marginata* sobre o peso de matéria fresca e seca da parte aérea e da raiz.

Variáveis	n	Media	Desvio-Padrão	Mediana	p-valor
PESO FRESCO A					
B0 (Controle)	12	2,24	1,73	2,25	0, 651
B6 (<i>Enterobacter</i>)	12	2,44	1,69	1,81	
B7 (<i>Enterobacter</i>)	12	2,14	1,68	1,89	
B10 (<i>Burkholderia</i>)	12	1,62	1,35	1,72	
PESO FRESCO R					
B0 (Controle)	12	0,85	0,74	0,76	0, 481
B6 (<i>Enterobacter</i>)	12	0,73	0,50	0,75	
B7 (<i>Enterobacter</i>)	12	0,70	0,55	0,77	
B10 (<i>Burkholderia</i>)	12	0,49	0,39	0,60	
PESO SECO A					
B0 (Controle)	12	0,20	0,16	0,18	0, 304
B6 (<i>Enterobacter</i>)	12	0,17	0,14	0,13	
B7 (<i>Enterobacter</i>)	12	0,15	0,14	0,13	
B10 (<i>Burkholderia</i>)	12	0,09	0,09	0,09	
PESO SECO R					
B0 (Controle)	12	0,09	0,08	0,07	0, 726
B6 (<i>Enterobacter</i>)	12	0,08	0,07	0,07	
B7 (<i>Enterobacter</i>)	12	0,07	0,06	0,07	
B10 (<i>Burkholderia</i>)	12	0,06	0,05	0,06	

(ANOVA) Teste F

Tabela 10 - Efeito de bactérias endofíticas selecionadas na promoção de crescimento de plantas de *Heliconia rauliniana* sobre altura, número de folhas e raízes

Variáveis	N	Media	Desvio-Padrão	Mediana	p-valor
Folhas					
B0 (Controle)	12	4,42	1,83	5,00	0,308**
B5 (<i>Enterobacter</i>)	12	4,17	2,66	5,50	
B13(<i>Ralstonia sp</i>)	12	5,08	1,24	5,50	
B18 (<i>Pantoea</i>)	12	3,17	2,59	4,00	
Altura					
B0 (Controle)	12	8,33	4,15	8,50	0,241**
B5 (<i>Enterobacter</i>)	12	8,00	5,21	10,00	
B13(<i>Ralstonia sp</i>)	12	10,42	3,35	11,75	
B18 (<i>Pantoea</i>)	12	6,38	5,41	7,50	
Raiz					
B0 (Controle)	12	3,33	3,31	2,50	0,343*
B5 (<i>Enterobacter</i>)	11	4,64	2,98	5,00	
B13(<i>Ralstonia sp</i>)	12	5,25	3,02	5,50	
B18 (<i>Pantoea</i>)	12	3,25	3,44	2,00	

*(ANOVA) Teste F **Teste de Kruskal-Wallis

Tabela 11 - Efeito de bactérias endofíticas selecionadas na promoção de crescimento de plantas de *Heliconia rauliniana* sobre o peso de matéria fresca e seca da parte aérea e da raiz.

Variáveis	N	Media	Desvio-Padrão	Mediana	p-valor
PESO FRESCO A					
B0 (Controle)	12	1,75	1,58	1,17	0,304*
B5 (<i>Enterobacter</i>)	12	2,05	1,63	2,20	
B13(<i>Ralstonia sp</i>)	12	2,68	1,39	2,68	
B18 (<i>Pantoea</i>)	12	1,54	1,53	1,06	
PESO FRESCO R					
B0 (Controle)	12	0,31	0,31	0,18	0,683**
B5 (<i>Enterobacter</i>)	12	0,44	0,38	0,51	
B13(<i>Ralstonia sp</i>)	12	0,43	0,37	0,41	
B18 (<i>Pantoea</i>)	12	0,26	0,32	0,11	
PESO SECO A					
B0 (Controle)	12	0,12	0,12	0,08	0,791**
B5 (<i>Enterobacter</i>)	12	0,13	0,10	0,15	
B13(<i>Ralstonia sp</i>)	12	0,17	0,13	0,15	
B18 (<i>Pantoea</i>)	12	0,22	0,28	0,12	
PESO SECO R					
B0 (Controle)	12	0,04	0,03	0,05	0,681**
B5 (<i>Enterobacter</i>)	12	0,05	0,04	0,06	
B13(<i>Ralstonia sp</i>)	12	0,05	0,05	0,05	
B18 (<i>Pantoea</i>)	12	0,04	0,05	0,02	

*(ANOVA) Teste F **Teste de Kruskal-Wallis

5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo permitiram concluir que:

1. Na avaliação fisiológica dos isolados o isolado B₁₃ (*Ralstonia* sp) não apresentou nenhuma atividade quanto a fixação biológica de nitrogênio, produção de auxina e solubilização de fosfato;
2. Para todas as variáveis analisadas (médias de número de folhas, média da altura de plantas, desenvolvimento das raízes das plantas, peso fresco, peso seco e peso total da parte aérea e radicular das plantas), as plantas que melhores resultados apresentaram foram àquelas inoculadas com os isolados B₆ (*Pantoea/Erwinia*) e B₁₃ (*Ralstonia* sp);
3. Quanto ao índice de sobrevivência, após 60 dias de inoculação e aclimatização, os melhores resultados foram obtidos com as plantas de *H. rauliniana* inoculadas com o isolado B₁₃(*Ralstonia* sp) e plantas de *H. marginata* inoculadas com o isolado B₆(*Pantoea/Erwinia*);
4. Dos seis isolados originados das espécies de *H. rauliniana* e *H. marginata*, a análise das sequencias via BLASTn mostrou a existência de 3 grupos, a *Burkholderia*, *Ralstonia* e a *Pantoea/Erwinia*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMORIM, E. P. da R.; MELO I. S. Ação antagônica de rizobactérias contra *Phytophthora parasitica* e *P. citrophthora* e seu efeito no desenvolvimento de plântulas de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, SP, v. 24, n. 2, p. 565-568, ago. 2002.

AGUIAR, R. P.; BARROS, L. M.; SANTOS, M. R. A. *et al.* Cultura de embriões e multiplicação in vitro de *Heliconia psittacorum* e *H. bihai*. In: Encontro de Iniciação Científica da Embrapa Agroindústria Tropic, 2., 2003, Fortaleza. **Resumos...** Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2004. 13 p.

ALBUQUERQUE, C. C.; CÂMRA, T. R.; MARIANO, R. de L. R. *et al.* Antimicrobial Action of the Essential Oil of *Lippia garcilis* Schauer. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 49, n. 4, p. 527-585, jul. 2006.

ALEXANDER, D. B.; ZUBERER, D. A. Impact of soil environmental factors on rates of N₂-fixation associated with roots of intact maize and sorghum plants. **Plant and Soil**, Texas, v.110, p. 303-315, 1988.

ALLOUFA, M. A. I. ; MACEDO, C. E. de ; BARROSO, P. A. V. *et al.* Avaliação de dois agentes antioxidantes no estabelecimento in vitro de inflorescências de bananeira (*Musa* spp), **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 5, p. 1092-1096, set./out. 2001.

ANDERSSON, L. Musaceae. In: Harling, G. ; Sparre, B.(eds). **Flora of Ecuador**, Goteborg, v.22, p.1-86, 1985b.

Araújo, W. L. **Isolamento, Identificação e Caracterização Genética de Bactérias Endofíticas de Porta-Enxertos de Citros**. 1966. 111f. Dissertação (Mestrado, ESALQ. Piracicaba-SP, 1966.

ANDRADE, M. W.; LUZ, J. M. Q.; LACERDA, A. S. Micropropagação da aroeira (*Myracrodunon urundeuva* Fr. All.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n.1, p.174-180, jan./mar., 2000.

ARAUJO, W. L.; MARCO, J.; MACCHERONI JR., W. *et al.* Diversity of endophytic bacterial populations and theirs interactions with in citrus *Xylella fastidiosa* plants. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 4906-4914, 2000

ARAUJO, W. L.; MARCO, J.; MACCHERONI JR., W. *et al.* Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. **Can. J. Microbiol.**, Canadá, v. 47, n. 3, p. 229-236, 2001.

ARAUJO, W. L.; MARCO, J.; MACCHERONI JR., W. *et al.* Diversity of endophytic bacterial population and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, p. 4906-4914, 2002.

ARRUDA, Rafael *et al.* Helicônias da Reserva Extrativista do Baixo Juruá: potencial econômico para comunidades amazônicas. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 38, n. 4, p. 61-616, dez. 2008.

ASHRAFUZZAMAN, M.; FARED, A. H.; BRASIL, M. R. Efficiency of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) for the enhancement of rice growth-promoting. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 7, p. 1247-1252, 2009.

ASSIS, S. M. P. *Heliconia psittacorum* L.f.: doenças, pragas e promoção de crescimento. 2002. 192f. Tese (Doutorado em Botânica) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2002.

ATEHORTUA, L. Helicônias: A new challenge for the Colombia floriculture industry. **Biotechnology and Development Monitor**, v.31, p.20-21, 1997.

ATEHORTUA, L.; URREA, A.L.; GEL, U. *et al.* Heliconia Tissue Culture. **Bulletin Heliconia Society International**, Honolulu, v. 9, n. 4, p. 16-17, 1999.

AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI, W. ; ARAÚJO, W. L.; PEREIRA, J. O. . Endophytic microorganisms: A review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic journal of Biotechnology**, Valdivia, v. 3, n. 2, p. 40-65, 2000.

AZEVEDO, J. L. **Microrganismos Endofíticos**. In: I. S. Melo; J. L. Azevedo. (org.). Ecologia Microbiana. Jaguariuna: EMBRAPA-CNPMA, 1998, v. 1, p. 117-137.

AZEVEDO, J. L. **Microrganismos endofíticos**: Análise molecular de sua variabilidade e interações com o hospedeiro ao nível molecular. Piracicaba: Ecologia Microbiana, 1992. 26p.

BARREIROS, H.S. Espécies críticas de *Heliconia* (Heliconiaceae). III. Com duas espécies brasileiras sendo uma nova. **Bradea**, Rio de Janeiro, v.1, n.46., p. 459-464, 1974.

BARROSO, C.B.; NAHAS, E. Solubilização do fosfato de ferro em meio de cultura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, p. 529-535, abr. 2008.

BECKING, J.H. Identification of the endophyte of *Dryas* and *Rubus* (ROSACEAE), **Plant and Soil**, Texas, v. 78, p. 105-28, 1984.

BERRY, F.; KRESS, W. **Helicônia**: an identification guide. Washington: Smithsonian Institution, 1991. 334p.

BLOEMBERG, G. V.; LUGTENBERG, B. J. J. Molecular basis of plant growth promotion and bicontrol by rhizobacteria. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 4, p. 343-350, aug. 2001.

BOA SORTE, P. M. F.; OLIVEIRA, A. L. M.; SILVA, J. F.; BALDANI, J. Estudo da Transmissibilidade de Bactérias Diazotróficas Endofíticas Inoculadas em cana-de-açúcar Crescidas sob condições de campo. In: Fertbio, 2006, Bonito-MS. Reunião Brasileira de Fertilidade do Solo, 27. , 2006, Bonito-MS. **Resumos...** Bonito-MS: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo e Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2009.

BULGARI, D.; CASATI, P.; BRUSETTI, L. *et al.* Endophytic bacterial diversity in grapevine (*Vitis vinifera* L.) leaves described by 16S rRNA gene sequence analysis and length heterogeneity-PCR. **J. Microbiol.**, v. 47, n. 4, p. 393-401, aug. 2009.

BULL, T. A.; WARD, A. C.; GOODFELLOW, M. Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. **Microbiology Molecular Bioogy Review**, v.64, n. 3, p. 573-606, sept. 2000.

CASTRO, Alberto Ferreira. **Helicônia para exportação**: aspectos técnicos da produção. FRUPEX: 16. Brasília: Embrapa-SPI. 1995. 44p.

CASTRO, C. E. F.; MAY, A.; GONÇALVES, C. Atualização da nomenclatura de espécies do gênero *Heliconia* (Heliconiaceae). **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v.13, n.1, p. 38-62, 2007.

CERIGIOLI, M. M. **Diversidade de bactérias endofíticas de raízes de milho (*Zea mays* L) e potencial para promoção de Crescimento**. 2005. 132 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas: genética e evolução) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2005.

CHENEY, D.; PHILIPPOT, L.; HARTMAN, A. *et al.* 16S rDNA analysis for characterisation of denitrifying bacteria isolated from three agricultural soils. **FEMS Microbiol. Ecol.**, Malden- USA, v. 34, 121–128, dec. 2000.

CRILEY, R. A. Propagation of Zingiberaceae and Heliconiaceae. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v.1, n.1, p.14-22, 1995.

CRONQUIST, A. **An integrad system of classification of flowing plants**. New York: Colombia University Press, 1981. 1262 p.

CROZIER, A.; ARRUDA, P.; JASMIM, J. M. *et al.* Ganalysis of índole-3 acetic acid and related índoles in culturow médium from *Azospirillum lipoferum* and. *Azospirillum brasiliense*. **Applied and Environment Microbiology**, v.54, p.2833-2837, 1988.

DIAS, M. A. S.; RODRIGUES, P. H. V. Fontes de explantes e contaminantes isolados em cultivo *in vitro* de *Heliconia bihai* (heliconiaceae). **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 7, p. 165-167, 2001.

DOBBLAERE, S.; VADERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizospere. **Critical Reviews in Plant Science**, v. 22, p.107-149, marc. /abr. 2003.

DOBEREINER, J.; BALDANI, V. L..D.; BALDANI, J. J. Como isolar e identificar bactérias diazotrópicas de plantas não leguminosas. Brasília. EMBRAPA-SPI; Itaguaí, RJ: EMBRAPA-CNPAB, 1995.

DONG, Y.; INIGUEZ, A.L.; AHAMER, B.M.M.; TRIPLETT, E.W. Kinetics and strain specificity of rhizosphere and endophytic colonization by enteric bacteria on seedlings of *Medicago truncatula*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p.1783-1790, 2003.

DOWNING, K. J.; LESLIE, G.; THOM-SON, J. A. Biocontrol of the sugar- cane borer *Eldana saccharina* by expression of the *Bacillus thuringiensis* cry1Ac7 and *Serratia marcescens* chiA gene in sugarcane-associated bacteria. **Appliedand Environmental Microbiology**, v. 66, n. 7, 2804-2810, jul. 2000.

FRAUME, M. R.; ALVAREZ, M. L. M.; GALLEG0, A. J. H. Monteleon relicto de selva andina Tropical de Manizales. **Colômbia Agronomia**, v. 4, p. 24-36, 1990.

GLIENKE, C. **Variabilidade Genética no fungo endofítico *Guignardia citricarpa* Kiely detectada por RAPD**. 1995. 115 f. Dissertação (Mestrado em Genética) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1995.

GOMES, Andréa M.A. Isolamento, seleção de bactérias e efeito de *Bacillus spp.* na produção de mudas orgânicas de alface. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 21. n. 4, out. /dez. 2003.

GOMES, L.; GRETHA, A. **Estabelecimento de Protocolo de *Heliconia* a partir da cultura de Embriões *In Vitro***. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2003.

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

GUAMANTICA, E. G. C. **Micropropagação *in vitro* de três espécies de helicônia através de cultura de meristema**. 1998. 77 f. Dissertação (Mestrado em Fitotécnica) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1998.

HALLMANN, J. *et al.* Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, P. 895-914, 1997.

HAN, S. O.; NEW, P. B. Variation in nitrogen fixing ability among natural isolates of *Azospirillum*. **Microbial Ecology**, v.36, p.193-201, 1998.

HEAD, I. M.; SAUDERS, J. R.; PICKUP, R. W. Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganism. **Microbial Ecology**, v. 35, p.1-21, 1998.

HEYDRICK, N. R.; HERMAN, L. Molecular Detection and Typing of Foodborne Bacterial Pathogens: a review. **Applied Microbiology**, v. 2, 193-238, 1996.

HIGLEY, P.; ISHIMARU, C. A.; ARUNAKUMARI, A.; BARLETTA, R. G.; VIDAVER, A. K. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 5, p. 2198-2208, may. 2002.

HUGENHOLTZ, P.; GOEBEL, B. M.; PACE, N. R. Impact of culture independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 18, p. 4765-4774, sept. 1998.

HUGENHOLTZ, P.; PACE, N.R. Identifying microbial diversity in the natural environment: a molecular phylogenetic approach. **Trends in Biotechnology**, v.14, n. 6, p.190-197, jun. 1996.

HUNTER-CEVERA, J. C. The value of microbial diversity. **Current Opinion in Microbiology**, v.1, n. 3, p.278-285, jun. 1998.

LAMAS, DA M. A. FLORICULTURA. Curso de técnicas de cultivo de floricultura tropical. Tabatinga: SEBRAE/AM, 56P. 2004.

JACOBS, M.J.; BUGBBEE, W. M.; GABMELSON, D.A. Enumeration, location and characterization of entophytic bacteria within sugar but roots. **Canadian Journal Of Botany**, Canadá, v.63, n. 7, p. 1262-12655, 1985.

JOHNSON, M. J.; LEE, K. Y.; SCOW, K.M. DNA fingerprinting reveals links among agricultural cropp, soil properties, and the composition of soil microbial communities. **Geoderma**, Amsterdam, v. 114, n. 3-4, p.279-303, june 2003.

JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, M. da S. **Perfil da cadeia Produtiva de Flores e Plantas Ornamentais do Distrito Federal**. Brasília: SEBRAE, 2005. Disponível em: < <http://www.emater.df.gov.br/sites/200/229/00002302.pdf> >. Acesso em: 22 jan. 2009.

KENNEDY, I.R.; CHOUDHURY, A.T.M.A.; KECSKES, M.L. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 36, p. 1229-1244, 2004.

KEPLER, A. K.; MAU, J. R. **Exotic tropicals of Hawaii**: heliconias, gingers, anthuriums and decorative foliage. 15. ed. Hawaii: Mutual Publishing, 1996. p. 47-48.

KHALID, A.; ARSHAD, M.; ZAHIR, Z. A. Screening plant growth-promoting rhizobacteria improving growth and yield of wheat. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, n. 3, p. 473-480, 2004.

KNAUTH, S.; HUREK, T.; BRAR, D.; REINHOLD-HUREK, B. Influence of different *Oryza* cultivars on expression of nifH gene pools in rot of rice. **Enviromental Microbiology**, v. 7, n. 11, p.1725-1733, nov. 2005.
KRAS, J. Horticulture in Brazil. **Flora Culture Internacional**, Batavia, v.16, n.3, p. 48, 2006.

KRESS, J. W; BETANCUR, J. ; ECHEVERRY, B. **Classificação preliminar de lãs espécies de Heliconia presentes na Colômbia**: “*Heliconia marginata* (Griggs) Pittier”. Bogotá-Colombia: Llamadas de La selva colombiana, 2004. p. 52- 156.

KUKLINSKY-SOBRAL, J.; ARAUJO, W.L.; MENDES, R. *et al.* Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 6, p. 1244-1251, 2004

KUKLINSKY-SOBRAL, J.; ARAÚJO, W. L.; MENDES, R. *et al.* Plant and Soil Isolation and characterization of endophytic bacteria from soybean (*Glycine max*) grown in soil treated with glyphosate herbicide. **Plant and Soil**, Texas, v. 237, n. 1-2, p. 91-99, 2005

KUSS, A.V.; KUSS, V.V.; LOVATO, T.; FLÔRES, M. L. Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético in vitro por bactérias diazotróficas endofíticas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, p.1459-1465, out. 2007.

LAMB, T. G.; TONKYN, D. W.; KLUEPFEL, D. A. Movement of *Pseudomonas aureofaciens* from the rhizosphere to aerial plant tissue. **Canadian journal of Microbiology**, v. 42, n. 1111, p.1112-1120, 1996.

LOUWS, F.; RADEMAKER, J. L. W.; BRUIJN, F. J. The three Ds of PCR-Based genomic analysis of phytobacteria: Diversity Detection and Disease Diagnosis. **Ann. Rev. Phytopathol**, v. 37, p. 81-125, sept. 1999.

LUCON, C. M. M.; KOIKE, C. M.; ISHIKAWA, A. I. *et al.* Bioprospecção de isolados de *Trichoderma* spp. para o controle de *Rhizoctonia solani* na produção de mudas de pepino. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 3, p.225-232, mar. 2009.

MANTELIN, S.; TOURAINÉ, B. Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 394, p. 27-34, 2004.

MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B.; ASSIS, S. M. P. *et al.* Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. **Anais da Academia Pernambucana de Ciências Agronômicas**, Recife, v. 1, p.89-111, 2004.

MARIANO, R.L.R.; ASSIS, S.M.P.; SILVEIRA, E.B.; GOMES, A.M.A. Mecanismos de ação de bactérias promotoras de crescimento. In: MARIANO, R.L.R. (Coord.). **Manual de práticas em fitobacteriologia**. Recife: Editora Universitária, 2000. p. 139-151.

MARQUES, J. . M. Estudos da variabilidade genética entre indivíduos de populações de *Heliconia bihai* e *Heliconia rostrata*. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF, n. 69, p. 15, out. 2004.

MARULANDA, M. L.; V. ISAZA, L. Estabelecimento *in vitro* de Heliconias com fines de producción massiva. **Scientia et Technica**, ano 10, n. 26, p. 0122-1701, 2004.

MELLO, M. R. F.; MARIANO, R. I. R; MENEZES, M. *et al.* Seleção de bactérias e métodos de bacterização para promoção de crescimento em mudas de abacaxizeiro micropropagadas. **Summa Phytopathologica**, v. 28, n. 3, p. 222-228, 2002.

MELO, G. M. *et al.* Avaliação do Desenvolvimento *in vitro* Embriões Zigótenos de *Heliconia rostrata* Ruiz e Pavan em diferentes meios sintéticos. REUNIÃO NORDESTINA DE BOTÂNICA, 29., 2005, Fortaleza. **Resumos...** Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, n. 98, 2005. p. 23.

MENDES, R; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; ARAUJO, W. L. *et al.* Diversity of cultivated endophytic bacteria from sugarcane: genetic and biochemical characterization of *burkholderia cepacia* complex isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 22, p. 7259-7267, 2007.

MISAGHI, I. J; DONNDELINGER, C. R. Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants. **Phytopathology**, v. 89, p. 808-811, 1990.

MOCALI, S.; BERTELLI, E.; DI CELLO, F. *et al.* Fluctuation of bacteria isolated from elm tissues during different seasons and from different plant organs. **Research in Microbiology**, v.154, p.105-114, 2003.

MOREIRA, F. M. Fixação biológica de Nitrogênio Atmosférico. In MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. (Eds) **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. Lavras: UFLA, 2006. p. 449 – 476,

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2002. 625p.

MOSCA, J. L. **Produção integrada de flores tropicais Heliconiaceae**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2004. Folder

MOTA, T. M. S. **Produção de flores e plantas ornamentais**: uma alternativa agrícola para a melhoria do nível de renda do pequeno agricultor. 2000. 76 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2000.

MUHAMMAD, L. A.; KANE, C. S. E.; KOUHILA, M. *et al.* Thin layer modelling of *Gelidium sesquipedale* solar drying process. **Energy Conversion and Management**, v. 49, n. 5, p. 940-946, 2008.

MURASHIGE T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **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. 81f. Dissertação (Mestrado em Ciências: biologia na agricultura e no ambiente) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba-SP, 2008.

NAMESNY, A. Comércio ornamental: Brasil y El mercado mundial. **Horticultura Internacional**, Valência, n.47, p.12-26, 2005.

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

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

NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Ecologia das bactérias diazotróficas nos solos tropicais. In: MELO I. S.; AZEVEDO, J. L. **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. p. 15-60.

OLIVEIRA, A. L.; URQUIAGA, S.; BALDANI, J. I. **Processos e mecanismos envolvidos na influência de microrganismos sobre o crescimento vegetal**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2003. 40 p.

PAMPHILE, J. A. **Variabilidade, transformação genética e transposons em linhagens endofíticas de *Fusarium moniliforme* isoladas de milho (*Zea mays* L.).** 1997. 197f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 1997.

PATTEN, C. L.; GLICK, B. R. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p.3795-3801, 2002.

PEDRINHO, Eliamar Aparecida Nascimbem. Isolamento e caracterização de bactérias promotoras de crescimento em milho (*Zea mays*). 2009, 74f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal, 2009.
PENG, G.; ZHANG, W.; LUO, H.; XIE, H. *et al.* College of Resources and Environment, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, PR China. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 59, 2646, oct. 2009.

PEREIRA, J. O, AZEVEDO, J. L, PETRINI, O. Endophytic fungi of stylosanthes: a preliminary study. **Mycologia**, v. 85, p. 362-364, 1993.

PINTO, L. D. **Atividade antimicrobiana e caracterização molecular de microrganismos endofíticos isolados de folhas de *Lancharpus gnellemisnus* (Tul) malne (rabo de macaco)**. 2003. 66f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2003.

PRINSEN, E.; COSTACURTA, A.; MICHIELS, K. *et al.* *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid biosynthesis: evidence for a non-tryptophan dependent pathway. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 6, p. 609-615, 1993.

PROCÓPIO, R. E. L. **Diversidade bacteriana endofítica de *Eucalyptus* spp e avaliação do seu potencial biotecnológico**. 2004. 101f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

PROCÓPIO, R. E.; ARAÚJO, W. L.; MACCHERONI JR., W.; AZEVEDO, J. L. Characterization of an endophytic bacterial community associated with *Eucalyptus* spp. **Genetic and Molecular Research**, v. 24; n. 8, p.1408-22, 2009.

RANJARD, L.; POLY, F.; NAZARET, S. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. **Research in Microbiology**, v. 151, p. 167-177, 2000.

ROCHA, E. L. J. Aclimatização de mudas micropropagadas de *Heliconia* sob diferentes lâminas de Irrigação, tipos e volumes de substrato. 2007. 73f. Dissertação (Mestrado em Irrigação e Drenagem) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

RODRIGUES, K. F. The foliar fungal endophytes of the Amazonian palm *Euterpe oleracea*. **Mycologia**, v. 86, p. 376-385. 1994.

RODRIGUES, K. F., DIAS-FILHO, M. B. Fungal endophytes in the tropical grasses *Brachiaria brizantha* cv Marandu and *B. humidicola*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 31, n.12, p. 905-909, 1996

RODRIGUES, K. F.; SAMUELS, G. J. Preliminary study of endophytic fungi in a tropical palm. **Mycol Res.**, v. 94, n. 35, p. 827-830, 1990

RODRIGUES, P. H. V. Acclimatization of micropropagated *Heliconia bihai* (Heliconiaceae) plants Aclimatização de mudas micropropagadas de *Heliconia bihai* (Heliconiaceae). **Sci. Agric.**, Piracicaba, v. 62. n. 1, 2005.

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

RYAN, R.P.; GERMAINE, K.; FRANKS, A. Bacterial endophytes: recent developments and applications. **FEMS Microbiology Letters**, v. 278, p.1-9, 2008.

SANTOS, A. C.; BUENO, A. F.; BUENO, R. C. D. F.; VIEIRA, S. S. **Chemical controle of White grup *Kiogenys fuscus* (Blanchard 1851) (Coleoptera: Mellonthidae) in confields.** Piracicaba: ESALQ/USP, 2008.

SANTOS, M. H. L. C.; MARIANO, R. de L. R.; CAMARA, T. R.; ANDRADE, A. G. de; WILLADINO, L.; LIMA, G. P. P. Bactérias promotoras de crescimento no desenvolvimento de *Heliconia psittacorum* L. f. **Hoehnea**, v.32, p.1-8, 2005.

SANTOS, M. R. A. dos TIMBÓ, A. L. O.; CARVALHO, A. C. P. P.; MORAIS, J. P. S. Estudos de adubos e substratos orgânicos no desenvolvimento de mudas micropropagadas de helicônia. **Horticultura brasileira**, Brasília, v. 24, n.3, p. 273 – 278 jul./set. 2006.

SANTOS, M. R. A.; TIMBÓ, A. L. O.; CARVALHO, A. C. P. P.; MORAIS, J. P. S. Avaliação de Substratos e Adubos orgânicos na aclimatização de *Heliconia psitacorum*. **Revista PAB.**, v.39. n.10, p. 1049- 1051, 2004.

SATO, A.Y.; DIAS, H. C. T.; ANDRADE, L. A. Micropropagação de *Celtis* sp: controle da contaminação e oxidação. **Cerne**, Lavras, v. 7, n.2, p.117-123, 2001.

SCHMITZ, J. A. K.; SOUZA, P. V. D.; KAMPF, A. N.. Propriedades químicas e físicas de substratos de origem mineral e orgânica para o cultivo de mudas em recipientes. **Ciência Rural**, v.32, p.937- 944 2002.

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

SELVAKUMAR, G.; KUNDU, S.; GUPTA, A.D.; SHOUCHE, Y.S.; GUPTA, H.S. Isolation and characterization of nonrhizobial plant growth promoting bacteria from nodules of kudzu (*Pueraria thunbergiana*) and their effect on wheat seedling growth. **Currnt Microbiology**, v.56, p.134-139, 2008.

SHARIFI-TEHRANI A, AHMADZADEH M, SARANI S, FARZANEH M. Powder formulation of *Burkholderia cepacia* for control of rape seed damping-off caused by

Rhizoctonia solani. Department of Plant Protection, University of Tehran, Karaj, Iran. **Commun Agric Appl Biol Sci.** , v. 72, n. 2, p.129-36, 2007.

SHIOMI, H. F.; MELO I. S.; MINHONI, M. T. A. Seleção de bactérias endofíticas com ação antagonica a fitopatógenos. **Scientia Agraria**, v. 9, p.535-538, 2008.

SHISHIDO, M.; BREUL, C.; CHANWAY, C.P. Endophytic colonization of spruce by plant growth-promoting rizobacteria. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 29, p.191-196, 1999.

SILVA, C. U. C. Cultivo in vitro de espécies de Helicônia (Heliconia Spp) mediante embriogênese somática e embriões zigóticos. 2005. 86f. Tese (Doutorado em Botânica) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2005.

SILVEIRA, E. B. *et al.* Bacterização de sementes e desenvolvimento de mudas de pepino. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 2, abr./jun. 2004.

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

SIMÃO, D. G.; SCATENA, V. L.. Morphology and anatomy of the bracts in Heliconia (Heliconiaceae), occurring in the São Paulo State, Brazil. **Acta. Bot. Brasileira**, v. 18, n. 2, p.1-12, 2004.

SIMÃO, D. G.; SCATENA, V. L.; BOUMAN, F. Developmental anatomy and morphology of the ovule and seed of Heliconia (Heliconiaceae, Zingiberales). **Plant Biology**, Stuttgart, v.8, n.1, p.143-154, jan. 2006.

SOUZA, A. S.; LEDO, C. A.S; SILVEIRA, D. G. *et al.* **Introdução à micropropagação de plantas**. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2006, 152p.

SOUZA, E. H. **Ação de Antibióticos no Estabelecimento *in vitro* de Heliconia rostrata**. Salvador: Univ. Federal da Bahia; FABES, 2005.

SOUZA, G. C.; CLEMENTE, P. L.; ISAAC, W. L. R. *et al.* Contaminação Microbiana na Propagação in vitro de *Cttleya walkeriana* e Schum burkiacrispa. **Revista Brasileira de Biociências**, c. 5, p. 405 -407 2007. Suplemento.

SOUZA, G. C.; CLEMENTE, P. L.; ISAAC, W. L. R. *et al.* Contaminação Microbiana na Propagação in vitro de *Citella walkeriana* e *Schum burkiacrispa*. **Revista Brasileira de Biociências**, c. 5, p.405-407, 2007. Suplemento.

STEENHOUDT, O.; VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum*, a freeliving nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiology Review**, v. 24, p. 487-506, 2000.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M. *et al.* Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 24, p. 1596-1599, 2007.

TEIXEIRA, J. B. **Limitações ao processo de cultivo in vitro de espécies lenhosas**. Brasília: Embrapa- Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005.

THOMAS, P.; SWARNA, G. K.; ROY, P. K. *et al.* Identification of culturable and originally non-culturable endophytic bacteria isolated from shoot tip cultures of banana cv. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Grand Naine, v. 93, n. 1, p. 55-63, 2008.

TORRES, A. C. **Produção de Mudanças de Helicônia Rostrata livre de doenças via cultivo de embriões**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2005. p. 12.

TURRIAGO, KAREN; FLOREZ, VICTOR. J. R. **Heliconias flores exóticas de Colômbia**. Floricultura Andino, Portal da Colombia, 2006. p.1–8. Disponível em:<
http://www.encolombia.com/economia/floriculturaandina_helionias.htm> Acesso em: 20 dez. 2006.

WONG-VILLARREAL, A.; CABALLERO-MELLADO, J. Rapid identification of nitrogen-fixing and legume-nodulating *Burkholderia* species based on PCR 16S rRNA species-specific oligonucleotides. **Syst Appl Microbiology**, v. 33, n. 1, p. 35-43, 28 nov.2009.

XU, J; PAN, Z. C.; PRIOR, P. *et al.* Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* strains from China Source. **European Journal of Plant Pathology**, v. 125, n. 4, p. 641-653, 2009

ZILLER, S. R., ZENNI, R. D.; G. NETO, J. Invasões biológicas: Introdução, Impactos e espécies exóticas invasoras no Brasil. In: LABORATÓRIO NEOTROPICAL DE CONTROLE BIOLÓGICO DE PLANTAS, UFPR. **Princípios e Rudimentos do Controle Biológico de Plantas**. Curitiba: UFPR, 2004. Coletânea Curitiba.

ZINNIEL, D.K.; LAMBRECHT, N.; HARRIS, B. *et al.* Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p. 2198-2208, 2002

7. PERSPECTIVAS

Após a avaliação dos resultados deste trabalho e, considerando a importância da continuidade em busca de melhorar e ou a consolidar as respostas à comunidade produtora oferecendo mudas com qualidade genética e bom aspecto fitossanitário sugerimos:

1. Estudos mais detalhados sobre desinfestação, utilizando vários tipos de explantes, diferentes meios de cultivo, antibióticos e antioxidantes;
2. Identificados os microrganismos, estudos mais detalhados quanto a sua especificidade na busca de antibióticos eficientes e específicos para estes tipos de microrganismos;
3. Estudos mais detalhados, principalmente em relação à bactéria *Ralstonia*, devido a sua importância agrônômica.