

**JAQUELINE FIGUEREDO DE OLIVEIRA**

**VIABILIDADE POLÍNICA E PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE *Etilingera*  
*elator* (Jack) R.M. Smith**

**RIO LARGO  
ALAGOAS-BRASIL  
2007**

**JAQUELINE FIGUEREDO DE OLIVEIRA**

**VIABILIDADE POLÍNICA E PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE *Etilingera*  
*elator* (Jack) R.M. Smith**

**CURSO DE MESTRADO EM PRODUÇÃO VEGETAL**

Centro de Ciências Agrárias

Universidade Federal de Alagoas

**RIO LARGO, ESTADO DE ALAGOAS**

**ABRIL DE 2007**

**JAQUELINE FIGUEREDO DE OLIVEIRA**

**VIABILIDADE POLÍNICA E PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE *Etilingera*  
*elator* (Jack) R.M. Smith**

Dissertação apresentada à coordenação do Curso de Mestrado em Agronomia (Produção Vegetal), do Centro de Ciências Agrárias, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre, pela Universidade Federal de Alagoas.

**Orientação: Prof. Dr. Eurico Eduardo Pinto de Lemos  
Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Leila de Paula Rezende**

**RIO LARGO, ESTADO DE ALAGOAS**

**ABRIL DE 2007**

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**  
**Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale**

O48v Oliveira, Jaqueline Figueredo de.  
Viabilidade polínica e propagação *in vitro* de *Etilingera elatior* (Jack) R. M. Smith / Jaqueline Figueredo Oliveira. – Rio Largo, 2007.  
72 f. : il. tabs., grafs.

Orientador: Eurico Eduardo Pinto de Lemos.

Co-Orientadora: Leila de Paula Rezende.

Dissertação (mestrado em Agronomia : Produção Vegetal) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Ciências Agrárias. Rio Largo, 2007.

Inclui bibliografia.

1. Flores – tropicais. 2. *Etilingera elatior*. 3. Plantas – Propagação *in vitro*.  
4. Tecidos vegetais – Cultura e meios de cultura. 5. Zingiberaceae. I. Título.

CDU: 635.9:581.81

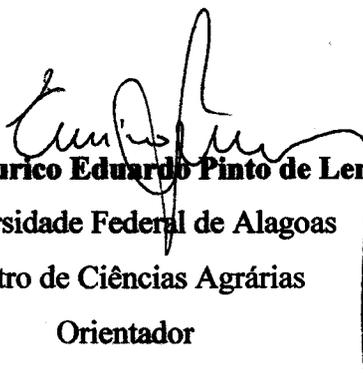
**VIABILIDADE POLÍNICA E PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE *Etilingera***

***elator* (Jack) R.M. Smith**

**JAQUELINE FIGUEREDO DE OLIVEIRA**

**(Matrícula 2005M21D010S-0)**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre pelo curso de mestrado em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal da Universidade Federal de Alagoas, pela banca examinadora formada pelos seguintes professores:



**Prof. Dr. Eurico Eduardo Pinto de Lemos**

Universidade Federal de Alagoas

Centro de Ciências Agrárias

Orientador



**Prof. Dr. Leila de Paula Rezende**

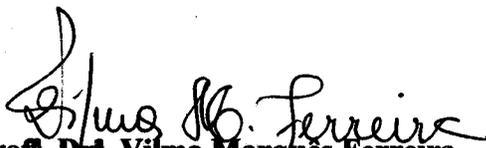
Universidade Federal de Alagoas

Centro de Ciências Agrárias

Co-Orientadora

**Prof. Dr. Denis Medeiros dos Santos**

EMBRAPA-Tabuleiros Costeiros



**Prof. Dr. Vilma Marquês Ferreira**

Centro de Ciências Agrárias

Universidade Federal de Alagoas

Rio Largo, Estado de Alagoas, BRASIL, 20 de Abril de 2007

Á

*Maria Figueiredo de Oliveira*

*Vicente Barbosa de Oliveira,*

*meus pais,*

*pelo apoio e incentivo,*

**DEDICO**

A

*Mário Leandro da Costa Júnior,*

*meu esposo,*

*sempre presente e carinhoso,*

**OFEREÇO**

## AGRADECIMENTOS

*A Deus, por sempre iluminar meus caminhos e me destinar forças nos momentos mais difíceis de minha trajetória.*

*À Universidade Federal de Alagoas (UFAL), pela oportunidade da obtenção de mais um título.*

*À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.*

*Ao Prof. Eurico Eduardo Pinto de Lemos, pelo apoio e ensinamentos ao longo do curso.*

*À Prof<sup>a</sup>. Leila de Paula Rezende, pela amizade, dedicação e sugestões oferecidas.*

*À coordenação do curso de mestrado em Produção Vegetal, na pessoa da Prof<sup>a</sup>. Edna Peixoto da Rocha Amorim pelo auxílio e incentivo transmitidos.*

*À professora Vilma Marques Ferreira e ao Prof. Geraldo Veríssimo Souza Barbosa, pelo apoio nos ajustes estatísticos.*

*Ao Prof. Antonio Maria C. Rocha, pelas sugestões oferecidas durante o estudo da viabilidade polínica.*

*Ao corpo docente pelos conhecimentos transmitidos ao longo da jornada.*

*Aos companheiros de Curso pela amizade e agradável convívio.*

*A colega Celene de Albuquerque, pela convivência agradável por todo o período.*

*Aos funcionários, estagiários e bolsistas do Laboratório de Biotecnologia Vegetal (BIOVEG), pela ajuda concedida durante a condução do trabalho.*

*Aos membros da banca examinadora, que se dispuseram a participar da avaliação desse trabalho.*

*As produtoras de Flores Tropicais: Lizete Monteiro e Eleuza Tenório, pela doação de frutos e das flores de bastão do imperador necessárias para esse estudo.*

*Ao secretário da coordenação, Geraldo Lima, pela ajuda constante.*

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b>	<b>vi</b>
<b>LISTA DE SIGLAS</b>	<b>ix</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>xii</b>
<b>CAPÍTULO I</b>	<b>1</b>
<b>1 RESUMO GERAL</b>	<b>1</b>
<b>2 ABSTRACT GENERAL</b>	<b>2</b>
<b>3 INTRODUÇÃO GERAL</b>	<b>3</b>
<b>4 REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>6</b>
<b>4.1 HISTÓRICO</b>	<b>6</b>
<b>4.2 CLASSIFICAÇÃO BOTÂNICA E DESCRIÇÃO</b>	<b>6</b>
<b>4.3 INFLORESCÊNCIA</b>	<b>7</b>
<b>4.4 FRUTO</b>	<b>8</b>
<b>4.5 GRÃO DE PÓLEN</b>	<b>8</b>
<b>4.6 ASPECTOS ECONÔMICOS E DE CULTIVO</b>	<b>9</b>
<b>4.7 PROPAGAÇÃO DE BASTÃO DO IMPERADOR</b>	<b>13</b>
<b>4.8 CULTURA DE TECIDOS</b>	<b>13</b>
<b>4.8.1 Histórico</b>	<b>13</b>
<b>4.8.2 Micropropagação de plantas</b>	<b>15</b>
<b>4.8.3 Micropropagação de bastão do imperador</b>	<b>16</b>
<b>4.8.4 Reguladores de crescimento</b>	<b>17</b>
<b>4.8.5 Cultura de embriões</b>	<b>18</b>
<b>5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>20</b>
<b>CAPÍTULO II</b>	<b>25</b>
<b>RESUMO</b>	<b>26</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>27</b>
<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>28</b>
<b>METODOLOGIA</b>	<b>29</b>
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>30</b>
<b>CONCLUSÕES</b>	<b>33</b>
<b>AGRADECIMENTOS</b>	<b>33</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>34</b>

<b>CAPÍTULO III</b>	<b>36</b>
<b>RESUMO</b>	<b>37</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>38</b>
<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>39</b>
<b>METODOLOGIA</b>	<b>41</b>
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>44</b>
<b>CONCLUSÕES</b>	<b>52</b>
<b>AGRADECIMENTOS</b>	<b>52</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>53</b>
<b>CAPÍTULO IV</b>	<b>56</b>
<b>RESUMO</b>	<b>57</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>58</b>
<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>59</b>
<b>METODOLOGIA</b>	<b>61</b>
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>63</b>
<b>CONCLUSÕES</b>	<b>69</b>
<b>AGRADECIMENTOS</b>	<b>69</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>70</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>73</b>

## LISTA DE SIGLAS

<b>ANA</b>	Àcido naftaleno acético
<b>AFLORAL</b>	Associação dos produtores de flores e plantas ornamentais e tropicais de Alagoas
<b>BAP</b>	6-Benzilaminopurina
<b>BIOVEG</b>	Laboratório de Biotecnologia Vegetal
<b>CECA</b>	Centro de Ciências Agrárias
<b>CIN</b>	Cinetina
<b>IBRAFLOR</b>	Instituto Brasileiro de Floricultura
<b>MS</b>	Murashige & Skoog
<b>SEBRAE</b>	Serviço Brasileiro de Apoio às Pequenas Empresas
<b>UFAL</b>	Universidade Federal de Alagoas
<b>2,4-D</b>	2,4-diclorofenoxiacético
<b>IBA</b>	Àcido Indolbutírico
<b>CV.</b>	Cultivar
<b>TDZ</b>	Tidiazuron

## LISTA DE FIGURAS

<b>CAPÍTULO I</b>	<b>1</b>
<b>Figura 1.</b> A - Inflorescência de bastão do imperador, B – Corte longitudinal de uma inflorescência; C – Inflorescência fechada e em processo de abertura; D – Flores protegidas pelas escamas.	<b>7</b>
<b>Figura 2.</b> Frutos de bastão do imperador cv. Red Torch.	<b>8</b>
<b>CAPÍTULO II</b>	<b>25</b>
<b>Figura 1.</b> Grãos de pólen de bastão do imperador corados (viáveis) e não corados (não viáveis) por lugol.	<b>30</b>
<b>CAPÍTULO III</b>	<b>36</b>
<b>Figura 1:</b> Efeito das concentrações (0,1,2 e 3 mg.L <sup>-1</sup> ) de BAP, na formação de calos isolados de <i>Etilingera elatior</i> cv. Red Torch, aos 60 dias de cultivo <i>in vitro</i> .	<b>44</b>
<b>Figura 2.</b> Embriões em desenvolvimento com estrutura calosa esbranquiçada, parte aérea e raiz, provenientes de meio MS, suplementado com 0 mg.L <sup>-1</sup> (A), 1 mg.L <sup>-1</sup> (B), 2 mg.L <sup>-1</sup> (C) e 3 mg.L <sup>-1</sup> (D) .	<b>46</b>
<b>Figura 3:</b> Número médio (A) e comprimento médio (B) das brotações de <i>Etilingera elatior</i> cv. Red Torch emitidos por explantes iniciais aos 30, 60 e 90 dias de cultivo <i>in vitro</i> nos diferentes tratamentos. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (5%).	<b>49</b>
<b>Figura 4:</b> Efeito da adição de fitorreguladores no número médio das raízes de <i>Etilingera elatior</i> cv. Red Torch, ao longo de 90 dias de cultivo <i>in vitro</i> .	<b>50</b>
<b>Figura 5:</b> Efeito da adição de fitorreguladores no comprimento médio das raízes (cm) de <i>Etilingera elatior</i> cv. Red Torch, ao longo de 90 dias de cultivo <i>in vitro</i> .	<b>51</b>
<b>CAPÍTULO IV</b>	<b>56</b>
<b>Figura 1:</b> Efeito de diferentes concentrações de BAP no comprimento médio das brotações (cm) de <i>Etilingera elatior</i> cv. Red Torch aos 90 dias de cultivo.	<b>65</b>
<b>Figura 2:</b> Número médio (A) e comprimento médio (B) das brotações de <i>Etilingera elatior</i> cv. Red Torch emitidos por explantes iniciais aos 30, 60 e 90 dias de cultivo <i>in vitro</i> nos diferentes tratamentos. Médias seguidas da mesma letra dentro dos tratamentos não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (5%).	<b>66</b>
<b>Figura 3:</b> Efeito de diferentes concentrações de BAP no número médio das raízes de <i>Etilingera elatior</i> cv. Red Torch, aos 90 dias de cultivo.	<b>67</b>
<b>Figura 4:</b> Efeito de diferentes concentrações de BAP no comprimento médio das raízes (cm) de <i>Etilingera elatior</i> cv. Red Torch, aos 90 dias de cultivo.	<b>67</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>CAPÍTULO II</b>	<b>25</b>
<b>Tabela 1.</b> Números de grãos de pólen corados e não corados nas cultivares Red Torch, Pink Torch e Porcelana de bastão do imperador.	<b>31</b>
<b>Tabela 2.</b> Números de grãos de pólen corados e não corados em relação à altura da haste da inflorescência de bastão do imperador.	<b>31</b>
<b>Tabela 3.</b> Números de grãos de pólen corados e não corados em flores e botões de bastão do imperador.	<b>32</b>
<b>CAPÍTULO III</b>	<b>36</b>
<b>Tabela 1:</b> Efeito da adição de reguladores de crescimento no número e comprimento médio das brotações (cm) e na taxa de multiplicação de <i>Etilingera elatior</i> cv. Red Torch, aos 90 dias de cultivo <i>in vitro</i> .	<b>47</b>
<b>CAPÍTULO IV</b>	<b>56</b>
<b>Tabela 1:</b> Efeito do BAP, no número e comprimento médio das brotações (cm) e na taxa de multiplicação de <i>Etilingera elatior</i> cv. Red torch, aos 90 dias de cultivo <i>in vitro</i> .	<b>64</b>

## CAPITULO I

### 1 RESUMO GERAL

O bastão do imperador (*Etilingera elatior* (Jack) R.M. Smith) é uma planta tropical herbácea, rizomatosa e perene, que possui inflorescências belas e vistosas em diferentes tonalidades, possuindo um grande apelo ornamental. A criação de novas cultivares de bastão do imperador necessita de cruzamentos intervarietais, pela formação de frutos e sementes viáveis, os quais são raros nessa sp. Um outro problema considerável para o seu cultivo está na produção de mudas, que quando feita convencionalmente por divisão de touceiras, acarreta elevados custos e problemas fitossanitários. Este trabalho objetivou avaliar a viabilidade dos grãos de pólen de inflorescências dos cultivares Red Torch, Pink Torch e Porcelana para a utilização em futuros cruzamentos intervarietais e avaliar o potencial micropropagativo do bastão do imperador. A viabilidade de grãos de pólen de inflorescências curtas, médias, e longas e em flores abertas e fechadas foi medida, corando-se os grãos com uma solução de lugol e visualizado-os em microscópio estereoscópico. Para o desenvolvimento de um protocolo para a micropropagação dessa espécie, testaram-se os efeitos da adição de 6-benzilaminopurina isolada em diferentes concentrações (1, 2 e 3 mg.L<sup>-1</sup>) na germinação de embriões e micropropagação de explantes *in vitro*, ou combinada com cinetina e ácido naftaleno acético na multiplicação *in vitro* dos explantes. A percentagem de grãos de pólen corados ficou acima de 99%, indicando que estes, independente do tipo de flor, do comprimento da haste da inflorescência e do cultivar, apresentam alta viabilidade polínica. Plantas oriundas de sementes produziram a maior média no número de brotos (7,86/mês) em meio de cultura Murashige e Skoog (MS) enriquecido com 3 mg.L<sup>-1</sup> BAP. Na ausência de fitormônios os explantes apresentaram maior comprimento médio das brotações, maior quantidade e comprimento das raízes. A aclimatação dos explantes em casa de vegetação apresentou taxa de pegamento superior a 80%, e aos 60 dias estavam prontas para serem transferidas para o campo.

**Palavras-chave:** cultura de tecidos, zingiberaceae, flores tropicais.

## 2 GENERAL ABSTRACT

The *Etilingera elatior* is a tropical perennial and rhizomatous herbaceous plant that possesses beautiful flowers with different colors and a great ornamental appeal. To produce new cultivars it is necessary crossings between existing varieties which are rare for this species. Among the difficulties found to grow *Etilingera elatior* is the acquisition of quality seedlings with appropriate sanitary standards to supply the demand of the producers. Another considerable problem is the seedlings production that, usually made by bunch division, brings high costs and disease problems. This work aimed to evaluate the viability of the pollen grains in flowers of the Red Torch, Pink Torch and Porcelain cultivars to be used in a future breeding program to create new commercial types of the *Etilingera elatior*, and developing a protocol for multiplication *in vitro* of *Etilingera elatior* cv. Red Torch. Therefore, it was carried out an study to check the viability of the pollen grains in open and closed flowers of small, medium and tall stick flowers. The pollen grains were stained in a lugol solution and observed on a stereoscopic microscope. The micropropagation potential was evaluated by testing the effects of 6-benzilaminopurine alone in different concentrations (1, 2 e 3 mg.L<sup>-1</sup>) the germination of zygotic embryos and the micropropagation of the explants from *in vitro* germinated seeds, or combined to kinetin or naphtalenacetic acid in the *in vitro* multiplication of the explants. The percentage of stained pollen grains above 99%, showed that no effect of the cultivars, size of the sticks flowers or aperture of the flowers was observed, indicating that pollen viability is not the cause of the low fruit formation in this species. The largest number of sprouts (7,86) was obtained in a MS medium culture enriched with 3 mg.L<sup>-1</sup> BAP. In the absence of hormones the explants showed the highest sprouts length, roots number and length. The acclimatization of the explantes at a glasshouse presented a satisfactory rate (>80%) of plant set, and after 60 days they were ready to be transported to the field.

**Index terms:** tissue culture, Zingiberaceae, tropical flowers

### 3 INTRODUÇÃO GERAL

A floricultura, em seu sentido amplo, abrange o cultivo de flores e plantas ornamentais para os mais variados fins e formas de apresentação, incluindo desde o cultivo de flores e folhas para o corte até a produção de sementes, bulbos e mudas arbóreas de grande porte destinadas à recomposição ambiental e paisagismo (COSTA & CAIXETA FILHO, 2002).

As plantas tropicais e exóticas constituem uma das maiores riquezas da nossa flora. Exuberantes, coloridas, com formas inusitadas, elas são apreciadas nos mercados nacional e internacional também por sua durabilidade e pela capacidade de, mesmo sozinhas, gerar composições surpreendentes (CASTRO, 2006).

O mercado mundial de flores e plantas ornamentais está hoje em plena ascensão, no Brasil e no mundo, por destacar-se como um agronegócio gerador de renda, fixador de mão-de-obra no campo e adequado como cultura alternativa para pequenos produtores (LINS & COELHO, 2004).

Alguns países desenvolvidos, apesar de apresentarem elevado consumo *per capita*, possuem limitações para o cultivo de flores tropicais, devido às condições climáticas desfavoráveis ou limitação territorial. Tais, fatores estimulam a produção destas flores no Brasil, especialmente nas regiões Norte e Nordeste (LOGES et al., 2005).

O Nordeste brasileiro possui notórias vantagens comparativas para especializar-se, cada vez mais, na produção de flores, tais como: proximidade dos mercados europeu e americano, micro-climas privilegiados, grande disponibilidade de terra, água, energia e mão-de-obra. No tocante às tecnologias agrônômicas, o Nordeste possui ainda infra-estrutura rodoviária e portuária e canais de distribuição, resultando em custo de produção que possibilita a região competir com vantagens no mercado mundial (CASTRO et al., 2005; COSTA & CAIXETA FILHO, 2002).

O Estado de Alagoas, com sua vocação agrícola apresenta grande potencial para a floricultura tropical. Apesar do mercado alagoano de flores ter crescido nos últimos anos, ainda existem alguns entraves na produção: inexistência de um mercado atacadista; escoamento da produção; ausência de uma pesquisa de mercado; falta de apoio de pesquisas nos assuntos relativos a pragas e doenças, mudas qualificadas, indução floral entre outros (<http://www.sebrae.com.br>).

No presente trabalho deu-se importância ao estudo de *Etilingera elatior* (Jack) R.M. Smith, denominada bastão do imperador, que apresenta vistosas inflorescências de grande

durabilidade e apelo comercial nas cores vermelha, branca, rosa entre outras. É uma planta originária da Malásia e vem sendo cultivada há muitos anos principalmente na região da Mata úmida do Nordeste, com destaque para os estados de Pernambuco e Alagoas que já exportam suas flores para outros países e estados brasileiros (BEZERRA & LOGES, 2005).

Observações feitas por produtores em campo dão conta de uma baixíssima produção de frutos e sementes nessa espécie. Acredita-se que a inexistência de frutos nas inflorescências de bastão do imperador seja devido à inviabilidade dos grãos de pólen. O êxito em qualquer programa de melhoramento vegetal e a criação de novas cultivares passa, necessariamente, pela capacidade de se produzir cruzamentos entre plantas relacionadas e compatíveis que originem sementes com embriões viáveis para a formação de novas plantas. Em um mercado ávido por novos produtos como a floricultura, a descoberta de caminhos para destravar a criação de novas cultivares é tarefa árdua e inclui estudos minuciosos de biologia floral das espécies com dificuldade de propagação sexuada como é o caso de *Etilingera elatior* (TOMBOLATO, 2001).

As mudas de bastão do imperador, normalmente, são obtidas vegetativamente, pelo processo de divisão de touceiras ou por seccionamento de rizomas (LAMAS, 2002). Convencionalmente, os produtores propagam suas próprias mudas. Porém, esta prática acarreta vários problemas fitossanitários, dentre eles a disseminação de agentes causais de doenças a cada ciclo da cultura, que são transmitidas entre plantios sucessivos.

Para estes casos, onde existe um risco elevado de se multiplicar doenças por propágulos contaminados, tem sido sugerida a utilização da técnica de micropropagação de plantas. Esta tecnologia tem sido comercialmente utilizada para se propagar de forma rápida uma determinada planta ou genótipo, que apresente características agrônômicas desejáveis além de recuperar plantas livres de pragas e doenças (WILLADINO & CÂMARA, 2006). Além disso, outras espécies da família Zingiberaceae (a mesma do bastão do imperador) têm sido beneficiadas com a micropropagação, permitindo a superação de barreiras genéticas à germinação de sementes (HU & FERREIRA, 1998; MELLO et al., 2000). Todavia, para a espécie *Etilingera elatior* não há, na literatura corrente, um protocolo estabelecido que permita a sua micropropagação comercial.

Considerando a importância desta espécie para os produtores de flores tropicais do estado de Alagoas, este trabalho teve como objetivo geral estudar a viabilidade dos grãos de pólen em inflorescências de três cultivares de bastão do Imperador (Red Torch, Pink Torch e Porcelana), para contribuir em futuros programas de melhoramento, e o desenvolvimento de um protocolo de

micropropagação de *Etilingera elatior* para a produção de mudas de alta qualidade genética e livres de pragas e doenças.

## 4 REVISÃO DA LITERATURA

### 4.1 HISTÓRICO

Originárias da Malásia, muitas espécies do gênero *Etilingera elatior* (Jack) R.M. Smith foram coletadas em Sabah, região oeste daquele país. Por conta de vários obstáculos como o difícil acesso, intensidade das chuvas e hostilidade de grupos étnicos que eram conhecidos como caçadores de cabeças, não foram realizadas muitas coletas botânicas na região até 1930 (BEZERRA & LOGES, 2005).

O bastão do imperador teve durante alguns anos uma taxonomia complicada e confusa, recebendo algumas designações genéricas como: *Alpinia*, *Phaeomonium*, *Nicolaia* e *Elattaria*. Mas, em 1980, Rosemary Margaret Smith do Royal Botanic Gardens of Edinburgh determinou que esta planta pertence ao gênero *Etilingera*. Este gênero foi primeiramente descrito em 1792 por Paul Dietrich Giseke. Desde então Axel Dalberg Poulsen do National Herbarium da Holanda, tem estudado este gênero e cita que existem mais de 70 espécies e muitas delas, espalhadas da Índia às Ilhas do Pacífico, ainda não estão descritas (KILLERPLANTS, 2003).

### 4.2 CLASSIFICAÇÃO BOTÂNICA E DESCRIÇÃO

*Etilingera elatior* (Jack) R.M. Smith, denominada bastão do imperador, flor da redenção, gengibre de tocha ou flor de cera, pertence à família Zingiberaceae (LAMAS, 2002).

O gênero *Etilingera* inclui várias espécies, geralmente com inflorescências belas e vistosas em diferentes tonalidades, variando do vermelho escuro ao branco, como na variedade Branca do Sabah que é quase totalmente branca. Há outras espécies de formato diferenciado que se assemelha a uma tulipa nas cores vermelha, indo até ao chocolate escuro (quase negro), cuja folhagem é diferenciada com uma coloração bronze, podendo chegar ao chocolate (LAMAS, 2005).

A espécie *Etilingera elatior* é uma planta herbácea, rizomatosa, ereta, entouceirada, robusta, florífera e perene, que pode atingir de 3 a 6m de altura, cujas folhas estão dispostas em espiral (LAMAS, 2002), sendo as hastes foliares frondosas e sempre verdes (KILLERPLANTS,

2003). Cultivada isoladamente, em grupos ou renques, sendo adaptada em locais úmidos, e solos férteis. Espécie muito sensível ao frio, sendo indicada para os trópicos (LORENZI & SOUZA, 2001). Nas condições do Nordeste brasileiro são lançadas inflorescências durante todo o ano, embora o pico de floração ocorra nos meses mais quentes (LAMAS, 2002).

#### 4.3 INFLORESCÊNCIA

As inflorescências têm a aparência de uma tocha ou bastão, por esta razão a denominação de gengibre de tocha ou bastão do imperador. As inflorescências grandes são sustentadas por hastes grossas, de cerca de 1,0-1,5 cm de diâmetro, de forma cônica-piramidal, com escamas verdes e cerosas, com flores também vermelhas com lábio amarelo e brácteas de cores variadas (LORENZI & SOUZA, 2001) (Figura 1 A, B e C). As flores individuais surgem entre as escamas, acima das brácteas cerosas (Figura 1 D).



**Figura 1.** A - Inflorescência de bastão do imperador, B – Corte longitudinal de uma inflorescência; C – Inflorescência fechada e em processo de abertura; D – Flores protegidas pelas escamas.

As flores são zigomorfas ou bilaterais, envoltas por escamas (brácteas modificadas) possuindo uma pétala diferenciada. O ovário é ínfero, tricarpelar ou trilocular, sendo que algumas flores possuem ovário atrofiado. (SCHULTZ, 1968).

#### 4.4 FRUTO

Os raros frutos do bastão do imperador são, na verdade pseudofrutos, sincárpicos, indeiscentes, provenientes de ovários ínferos. Os receptáculos têm grande desenvolvimento, mas os pericarpos são secos. Cada fruto possui vários lóculos dispostos em dois ou mais camadas (VIDAL, 1995).



**Figura 2.** Frutos de bastão do imperador cv. Red Torch.

#### 4.5 GRÃOS DE PÓLEN

O grão de pólen, de uma forma geral, é definido como micrósporo maduro produzido nas anteras ou ainda, como a célula reprodutiva masculina que contém a metade do número de cromossomos da espécie, capaz de fertilizar a oosfera, dando origem ao zigoto. (BORÉN & VIEIRA, 2005). As anteras são expansões dilatadas do estame, constituídas por duas tecas, cada uma com dois sacos polínicos longitudinais ou microsporângios, onde são produzidos os grãos de pólen (MARCOS FILHO, 2005).

O grão de pólen maduro encontra-se rodeado por uma fina camada de celulose, a intina, e por fora desta há uma outra camada, a exina, composta principalmente de esporopolenina, substância que confere grande resistência ao grão de pólen (BELTRATI, 1994).

Na superfície do grão de pólen podem ocorrer áreas delimitadas em que a exina encontra-se delgada ou então ausente. Através dessas aberturas emerge o tubo polínico, no momento da germinação (BELTRATI, 1994).

Os grãos de pólen contêm proteínas, lipídios, aminoácidos livres, vitaminas e pequenas quantidades de auxinas e giberelinas; estes dois fitormônios estimulam o desenvolvimento das paredes do ovário e a formação do fruto. Em função de sua grande diversidade morfológica, os grãos de pólen têm grande importância para fins taxonômicos e investigações paleontológicas, pois são encontrados em perfeitas condições de conservação nas diversas camadas geológicas, devido à natureza das substâncias da exina (MARCOS FILHO, 2005).

O estudo da viabilidade do grão de pólen é de primordial importância em trabalhos de melhoramento genético, podendo também ser utilizado para diagnosticar fatores envolvidos na formação de flores e embriões. A relação entre o pólen e o estigma depende da viabilidade dos grãos, da receptividade estigmática e das alterações genéticas entre as partes (BUENO & CAVALCANTE, 2001).

A viabilidade dos grãos de pólen pode ser alterada com a variação da umidade e temperatura do ambiente. Também varia de acordo com a espécie, a exemplo de algumas gramíneas que podem apresentar viabilidade de minutos ou horas, enquanto que grãos de pólen de outras espécies podem permanecer viáveis por vários anos se armazenados adequadamente (BUENO & CAVALCANTE, 2001). Para estudo da viabilidade do grão de pólen em diversas culturas tem sido utilizado o método de coloração com corantes, tais como lugol e solução de Alexander.

#### **4.6 ASPECTOS ECONÔMICOS E DE CULTIVO**

Devido à beleza de sua inflorescência, o bastão do imperador tem sido comercializado como flor de corte, com grande aceitação tanto no mercado nacional como internacional, e para utilização na ornamentação de jardins, praças e bosques (CASTRO, 1998). As flores e brotos,

também são comestíveis e fazem parte da culinária de diversos países asiáticos, onde são fatiados finamente e somados a vários pratos, dando um sabor picante pungente, diferente do gengibre comercial (LAMAS, 2005).

A demanda interna e externa pelo bastão do imperador, como flor de corte, tem sido crescente e a cada dia se sedimenta no mercado internacional em função do aumento da área de produção nos países da América Central e da América do Sul, proporcionando uma maior oferta do produto e sua maior divulgação (CASTRO, 1995).

O mercado mundial de flores vem apresentando crescimento desde a década de 90, tornando-se um dos grandes segmentos econômicos do agronegócio. O comércio internacional de plantas ornamentais alcança um valor aproximado de três bilhões de dólares anuais, dos quais, considerável parcela se deve à comercialização de espécies de origem tropical (LOGES et al., 2003).

Os principais mercados produtores estão localizados nos seguintes países: Filipinas, Tailândia, Jamaica, Havaí, Costa Rica e Equador, salientando que nos dois primeiros, o bastão do imperador é também considerado hortaliça e usado na alimentação humana (LAMAS, 2002)

Os principais mercados importadores são: América do Norte (Estados Unidos, Canadá), Europa (Holanda, Alemanha, Dinamarca, Bélgica, França) e Japão (LAMAS, 2002).

A floricultura tropical em Alagoas teve um crescimento da ordem de 520%, nos últimos 10 anos e atualmente é desenvolvida por 97 famílias em 25 municípios, em uma área total de 156 hectares (CASTRO et al., 2005).

Conforme levantamento realizado em 2006 pelo SEBRAE-AL, cerca de 30% dos produtores de Alagoas fazem parte de alguma cooperativa e 90% fazem parte de alguma associação. Destes, apenas 53% comercializam por meio de associação. A AFLORAL (Associação dos produtores de flores e plantas ornamentais e tropicais de Alagoas) é a principal entidade que agrega floricultores no Estado. Ela foi fundada em 1996 e atualmente conta com 40 associados e produz, anualmente, cerca de 90 mil hastes de flores (<http://www.sebrae.com.br>).

Em relação ao mercado externo, a AFLORAL remete cerca de 450 quilos/semana de flores para Londres, e já iniciou conversações para consolidar contratos de exportação para Portugal, Holanda, Itália e Grécia (<http://www.investmentosalagoas.al.gov.br>).

A potencialidade natural da zona da mata alagoana para o cultivo de flores tropicais e o apoio governamental, abre a perspectiva do crescimento dessa atividade no estado, oferecendo

mais uma alternativa de agronegócio na região de tradicional monocultura de cana-de-açúcar (CASTRO et al., 2005).

Em Alagoas, as condições do clima permitem o cultivo durante todo o ano sem a necessidade de investimentos em insumos muito onerosos, resultando em custos de produção que possibilitam a região competir, com vantagens no mercado mundial. Na zona da mata alagoana os municípios que cultivam flores tropicais são de clima quente e úmido, com precipitação pluvial anual variando de 1.600 a 1.800 mm. A umidade relativa varia de 70 a 95% e a temperatura média anual é de 24 °C. Estas condições favorecem a floricultura tropical permitindo o cultivo durante o ano todo, utilizando-se a irrigação nos meses de menor precipitação (CASTRO et al., 2005).

A qualidade das hastes florais depende diretamente dos tratos culturais recebidos em campo e, sobretudo, da colheita e dos tratos recebidos pelas inflorescências na pós-colheita. Recomenda-se que as inflorescências sejam colhidas nos horários de temperaturas mais amenas e o transporte do campo para o galpão de beneficiamento deve ser rápido, para evitar a desidratação das hastes. Em seguida, as hastes são submetidas à lavagem em água corrente e, após secar, embaladas (LOGES et al., 2005).

O bastão do imperador tem sido cultivado como flor de corte, mas é explorado também no paisagismo. As inflorescências são cônicas, formadas em hastes que surgem diretamente dos rizomas e podem atingir até 2 m de altura. As hastes vegetativas apresentam folhagens grandes e vistosas, com coloração que varia de verde a marrom-avermelhada, com porte de 3 a 6 m de altura (BEZERRA & LOGES, 2005).

O bastão pode ser cultivado a sol pleno ou em áreas pouco sombreadas. Contudo, são plantas exigentes em temperatura elevada e constante para estimular o florescimento. Nessas condições, as plantas crescem vigorosamente e formam touceiras com muita rapidez. Depois do plantio da muda, o bastão do imperador irá florescer em cerca de um ano e meio a dois anos (LAMAS, 2002). A planta tem boa adaptação a solos úmidos e ricos em matéria orgânica. O espaçamento de plantio entre as mudas deve ser no mínimo de 2,50 m entre fileiras e 1,50 m entre plantas, uma vez que formam touceiras enormes tanto em altura como em extensão (LAMAS, 2005).

A cultivar Porcelana tem se mostrado muito resistente ao manuseio e possui uma longevidade na pós-colheita de quinze a dezoito dias, além de ter uma produtividade excepcional (LAMAS, 2005).

No Nordeste do Brasil, são cultivadas comercialmente quatro variedades de bastão do imperador: uma de inflorescência com brácteas vermelhas (cultivar Red Torch); duas de brácteas rosadas (cultivares Pink Torch e Porcelana); e uma de brácteas rubras, em formato de tulipa (Tulipa Negra) (LAMAS, 2005).

A oferta do produto atualmente se dá durante todo o ano, mas o pico de oferta ocorre entre os meses de novembro a fevereiro. Sabe-se, no entanto que não existe ainda, no Brasil, um padrão único de comercialização para flores tropicais de corte tropical. Os padrões adotados são adaptações de outras espécies. Estudos têm sido realizados visando aprimorar e/ou adequar técnicas de colheita e pós-colheita para a obtenção de um produto mais uniforme e competitivo no setor da floricultura (LAMAS, 2002).

Para descrição do estágio de desenvolvimento das inflorescências de bastão do imperador foi desenvolvida por Loges et al. (2003) uma escala de notas, sendo: 1 – surgimento da haste floral; 2 – transformação em botão (cheio); 3 – botão abrindo; 4 – botão semi-aberto; 5 – ponto de corte; 6 – abertura total. Esta escala permite identificar o ponto de colheita do bastão do imperador.

O Instituto Brasileiro de Floricultura (IBRAFLOR), juntamente com produtores, vem desenvolvendo um padrão de qualidade específico para flores tropicais, porém ainda não concluído. Na ausência deste, alguns produtores realizam sua própria padronização baseada no ponto de abertura das inflorescências, comprimento e diâmetro da haste, aspectos fitossanitários, turgidez, coloração, durabilidade das inflorescências e outras exigências de mercado. Para o bastão do imperador tem se adotado o seguinte padrão de qualidade: Tipo A: inflorescência em botão grande ou com brácteas semi-abertas, ausência de manchas ou desidratação nas brácteas, haste com diâmetro acima de 1 cm; Tipo B: brácteas totalmente expandidas, sinais leves de danos mecânicos, haste com diâmetro inferior a 1 cm (LOGES et al., 2005).

## **4.7 PROPAGAÇÃO DE BASTÃO DO IMPERADOR**

O bastão do imperador pode ser multiplicado tanto por meio de sementes como por divisão de rizomas. Essa espécie tem uma bem-sucedida relação de troca com seus agentes polinizadores (beija-flores, morcegos, pássaros, insetos) e dispersores de sementes (LAMAS, 2002).

O método de propagação por divisão de rizomas é o mais utilizado. Os rizomas são caules especializados que crescem horizontalmente, tanto acima como abaixo da superfície do solo. Para a propagação, recomenda-se uma porção de rizoma medindo no mínimo de 10 cm, constituída de três a cinco pseudocaulis (cortados com 20 a 30 cm de comprimento), com gemas basais associadas e livres de partículas de solo (LAMAS, 2002).

Antes de transplantar, os rizomas devem receber outros cuidados fitossanitários, tais como a aplicação de inseticidas e fungicidas, que visam o controle de fungos, insetos e nematóides (CASTRO, 2006).

Um método prático para a propagação consiste na colocação do rizoma já desinfestado em sacos plásticos escuros, fechados e protegidos do sol, colocando-se papel umedecido no interior da embalagem. Mantém-se por um período de duas a três semanas, quando se inicia o desenvolvimento das raízes. Quando estas já se encontram bem expandidas, pode-se proceder o plantio (CASTRO, 2006).

## **4.8 CULTURA DE TECIDOS**

### **4.8.1 Histórico**

Segundo González (1998) a cultura de tecidos é um conjunto de técnicas que permitem o cultivo de órgãos, tecidos, células e protoplastos em condições assépticas, utilizando meios nutritivos artificiais.

A cultura de tecidos de plantas pertence aos domínios da ciência da morfogênese. Esta expressão utilizada para designar a cultura *in vitro* de células, tecidos e órgãos de plantas. É uma abordagem biotecnológica que permite o desenvolvimento de protocolos de laboratório para

regenerar plantas intactas e férteis e, desse modo, controlar o processo da morfogênese (GALLO & CROCOMO, 1995).

A cultura de tecidos teve seu início no século XX, por volta de 1902, quando G. Haberlandt iniciou experimentos, ao cultivar células isoladas de plantas, que segundo o princípio da totipotência celular, que é a base teórica sobre, as quais se sustentam todas as técnicas do cultivo *in vitro* (GALLO & CROCOMO, 1995; GONZÁLEZ, 1998). No entanto, nenhum sucesso foi obtido em seus experimentos, em virtude da falta de hormônios no meio de cultura, compostos até então desconhecidos (TORRES et al., 1998). Provavelmente, ele não conhecia o ácido indol acético, descoberto por Salkowski, em 1885, o que poderia ter contribuído para um ainda maior sucesso em seu pioneirismo. Entretanto, foi Haberlandt o primeiro botânico a perceber a possibilidade de isolar essas células e, através de alterações na sua nutrição e nas condições ambientais, reconstituir as etapas de crescimento, desenvolvimento e diferenciação que ocorrem numa planta intacta (GALLO & CROCOMO, 1995).

Hannig em 1904, trabalhando com crucíferas foi quem cultivou, pela primeira vez embriões imaturos *in vitro*. Ele observou a necessidade de suplementação do meio com sacarose para germinação dos embriões, bem como mostrou o efeito de diferentes fontes de nitrogênio (TORRES et al., 1998).

A aplicação prática da cultura de tecidos teve início quando Morel & Martin em 1952, recuperaram plantas de Dália livres de vírus do mosaico, por meio da cultura de ápices caulinares (TORRES et al., 1998).

Murashige & Skoog (1962) observaram que, ao adicionar extrato de folhas de fumo ao meio de cultura de calo, o crescimento deste tecido era de 4 a 5 vezes maior quando comparado com o calo mantido em meio de White. Esse foi o ponto de partida para a elaboração do meio MS, atualmente o mais utilizado em trabalhos de cultura de tecidos (TORRES et al., 1998).

A partir da década de 70, foram feitas inúmeras outras descobertas, como: plantas livres de viroses e viróides, microenxertia, hibridação somática entre protoplastos e transformação genética de plantas (TORRES et al., 1998).

Com os avanços alcançados pela regeneração de plantas *in vitro* se desenvolveu toda uma indústria de micropropagação, que teve início nos países desenvolvidos e atualmente vem se expandindo pelo resto do mundo (GONZÁLEZ, 1998).

#### 4.8.2 Micropropagação de plantas

A propagação vegetativa *in vitro* é também denominada de micropropagação, devido ao tamanho dos propágulos utilizados (TORRES et al., 1998). Debergh & Read (1991), definiram a micropropagação de plantas como a propagação fidedigna de um genótipo selecionado usando técnicas de cultivo *in vitro*. Gallo & Crocomo (1995), afirmam que a micropropagação é uma cultura asséptica de meristemas e pontas apicais, gemas adventícias, axilares e laterais.

As técnicas de cultura de tecidos têm sido utilizadas em muitos países para a obtenção de material isento de doenças (GALLO & CROCOMO, 1995). Esta técnica vem prestando enorme contribuição aos estudos de histologia, embriogênese, genética e melhoramento, bem como na produção de metabólitos secundários e na obtenção de plantas resistentes a fatores adversos do ambiente e a pragas e doenças (TORRES et al., 1998).

Entre as inúmeras vantagens da micropropagação, destacam-se a manutenção do genótipo e do fenótipo de híbridos, mutação ou variantes genéticas selecionadas, e o excelente estado fitossanitário das plantas obtidas (TORRES & CALDAS, 1990). Além da grande importância prática e potencial nas áreas agrícola, florestal, floricultura, horticultura, rapidez de produção, bem como na pesquisa básica. No cultivo de orquídeas, por exemplo, leva-se cerca de dois anos para a obtenção de uma boa muda utilizando-se os métodos convencionais enquanto que, através do cultivo *in vitro* de meristemas, é possível a produção de centenas de mudas nesse mesmo período de tempo (WILLADINO & CÂMARA, 2006).

Segundo Hartmann et al. (1997), o sucesso da micropropagação está inteiramente relacionado com a divisão das fases de desenvolvimento da cultura em estágios, sendo cada fase representada por modificações no meio de cultura e controle das condições ambientais. Para a maioria das espécies foram desenvolvidos quatro estágios padrões para o sistema de micropropagação: estabelecimento, multiplicação, formação de raízes e aclimatização.

Diversos explantes podem ser utilizados para iniciar a propagação *in vitro* de uma planta, porém durante a escolha devem ser considerados aspectos relacionados com o nível de diferenciação dos tecidos e com a finalidade de micropropagação (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

A fase de multiplicação é considerada a mais importante e longa no processo de micropropagação (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). De acordo com Pérez (1998), o

objetivo da multiplicação é a produção de um maior número possível de propágulos a partir dos explantes estabelecidos *in vitro*.

A etapa de enraizamento caracteriza-se pela formação de raízes adventícias nas partes aéreas provenientes da multiplicação. O enraizamento é uma etapa que pode ser realizada *in vitro* ou *in vivo*. No primeiro sistema, as raízes são regeneradas em condições assépticas e a planta obtida é posteriormente transplantada para o substrato. No segundo sistema, as partes aéreas são manipuladas como microestacas e todo o processo de enraizamento se dá no substrato (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

A aclimatização é considerada a última fase do processo de propagação *in vitro*. As plantas serão transferidas da condição *in vitro* para a condição *in vivo* em estufa ou casa de vegetação. Essa passagem é crítica e representa, em alguns casos, um fator limitante do processo de micropropagação, uma vez que esta fase envolve a mudança das plantas de uma condição heterotrófica, na qual necessita de um suprimento de energia (sacarose no meio), para um estado autotrófico, no qual precisa realizar fotossíntese para sobreviver (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998; HARTMANN et al., 1997).

O manejo adequado que promova a adaptação das plantas jovens é de extrema importância para garantir uma percentagem mínima de perda durante a fase de aclimatização. As instalações utilizadas para tal processo devem controlar a umidade relativa e a luminosidade (PEÑALVER et al., 1998).

Os objetivos da utilização do cultivo *in vitro* de tecidos vegetais são numerosos e diferentes: As principais possibilidades de aplicação de tais cultivos são: a) estudos básicos da fisiologia, genética, bioquímica e ciências afins; b) obtenção de plantas livres de vírus e outros patógenos; c) conservação e intercâmbio de germoplasma; d) bioconversão e produção de compostos úteis; e) propagação de plantas e f) aumento da variabilidade genética (FERREIRA, 2001).

#### **4.8.3 Micropropagação de bastão do imperador**

Recentemente, diversas técnicas de biotecnologia têm sido utilizadas em trabalhos de melhoramento com flores tropicais, podendo-se destacar a micropropagação *in vitro* e o resgate

de embriões em espécies da família Heliconiaceae e Zingiberiaceae (RODRIGUES, 2005; TORRES et al., 2005). Ainda não se conhecem trabalhos relacionados à micropropagação de *Etilingera elatior* na literatura corrente indexada.

#### 4.8.4 Reguladores de crescimento

De acordo com Hinojosa (2000), denomina-se regulador de crescimento uma substância sintética que compartilha com os hormônios a maioria de suas características. São normalmente adicionados ao meio de cultura para promover e regular o crescimento das plantas *in vitro* (GEORGE, 1993). A composição e concentração de hormônios no meio são fatores determinantes no padrão de desenvolvimento da maioria dos sistemas de cultura de tecidos (CALDAS et al., 1998).

A adição de fitorreguladores tem o objetivo principal de suprir as possíveis deficiências dos teores endógenos de hormônios nos explantes que se encontram isolados das regiões produtoras na planta. Simultaneamente, estas substâncias estimulam nos explantes certas respostas como alongamento ou multiplicação da parte aérea (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

As auxinas e as citocininas são as classes de reguladores de crescimento mais utilizadas na cultura de tecidos. A formação de raiz, parte aérea e calo em cultura de tecidos é regulada pela disponibilidade e interação dessas duas classes de reguladores (CALDAS et al., 1998).

As auxinas e as citocininas interagem, direcionando a diferenciação celular e morfogênese. Os trabalhos de Skoog & Miller, na década de 1950, demonstraram que, em calos de fumo, a formação de parte aérea podia ser induzida utilizando níveis relativamente baixos de auxinas e um nível alto de citocinina no meio de crescimento. Desde então, essa interação tem sido usada no controle da diferenciação celular e da organogênese em tecidos e órgãos de cultura (GALLO & CROCOMO, 1995).

Na etapa de indução de calos e de raízes, as auxinas, basicamente, promovem a divisão celular. Assim, para induzir calos podem ser usados: 2,4-D, ANA, TDZ. Este último não deixa de ter sua particularidade, porque também pode ter um efeito N<sup>6</sup> – citocinina, isto é, induzir brotações. Para indução de raízes de plantas *in vitro*, ANA e AIB podem ser usados (HINOJOSA,

2000), sendo AIB, considerado a melhor auxina para indução de raízes *in vitro* (CALDAS et al., 1998).

Os reguladores auxínicos desempenham papel importante na produção agrícola. Eles interferem na biossíntese, metabolismo e translocação dos hormônios, ou podem suplementar ou substituir as auxinas quando os níveis fisiológicos estão baixos (HINOJOSA, 2000).

As citocininas promovem a expansão e divisão celular, induzem a formação de calos, aumentam o número de ramos em plantas ornamentais, controlam o alastramento de doenças na folha, têm ação contra oxidação dos ácidos graxos insaturados na molécula, entre outros benefícios (BARRUETO et al., 1997).

As citocininas têm o seu nome derivado da propriedade de promover a divisão celular. São usadas assiduamente em todas as modalidades da cultura de tecidos: organogênese, protoplastos, suspensão celular e embriogênese somática (CID, 2000).

Segundo Caldas et al. (1998), o BAP induz a formação de grandes números de brotos e alta taxa de multiplicação, enquanto Cinetina e 2ip (isopenteniladenina) permitem apenas o crescimento normal sem brotações múltiplas.

Cid (2000), afirma que as citocininas são fundamentais na etapa de regeneração dos calos ou na multibrotação de gemas axilares ou apicais de plantas lenhosas ou herbáceas. O mesmo autor enfatiza que no campo da biotecnologia, isto é, na área de comercialização de plantas *in vitro*, transformadas ou não, as citocininas são um componente essencial nos protocolos de regeneração.

#### **4.8.5 Cultura de embriões**

A terminologia ‘Cultura de embrião’ tem sido empregada para descrever os processos de crescimento e desenvolvimento do embrião zigótico *in vitro*, independente da idade, tamanho e estágio de desenvolvimento em que o embrião foi excisado, com o objetivo de se obter uma planta viável (HU & FERREIRA, 1998; GUERRA & NODARI, 2006).

O embrião é uma estrutura totipotente. Esta característica reflete a capacidade de regeneração de um organismo a partir de uma célula, tendo todas as informações necessárias para

crescer e dar origem a uma planta adulta de modo que a embriogênese pode ser visualizada ou encarada como uma preparação para o futuro sucesso da germinação (MARCOS FILHO, 2005).

Embriões zigóticos ou de sementes são frequentemente usados vantajosamente como explantes em cultura de tecidos, por exemplo, para iniciar a cultura de calo. Em cultura de embriões, entretanto, os embriões são retirados das sementes e são individualmente isolados e "germinados" *in vitro* desenvolvendo inicialmente uma planta por explante. A cultura de embriões isolados pode ajudar na produção rápida de plântulas de sementes que apresentam dormência embrionária, embrião imaturo ou mesmo que possuam restrição tegumentar ou inibidores de crescimento no tegumento (GUERRA & NODARI, 2006)

Alguns fatores afetam o sucesso da cultura de embriões, dentre eles estão: o Genótipo, que em algumas espécies o embrião cresce facilmente enquanto que em outras é muito difícil (há também diferenças entre cultivares de uma espécie); Estádio de desenvolvimento do embrião no isolamento, que é muito difícil desenvolver embrião muito pequeno *in vitro*; Condição de crescimento da planta-mãe, cultivar a planta-mãe em condições controladas resulta em um melhor desenvolvimento do endosperma, portanto melhora o crescimento do embrião isolado; Composição do meio, embriões imaturos requerem uma composição mais crítica do que embriões maduros. Em ambos (maduro e imaturo) os macro e microelementos são importantes (GUERRA & NODARI, 2006).

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARRUETO C., L. P. ; GOMES,A.C. M.; COSTA, S.B.R. da; TEIXEIRA,J.B. Micropropagation of *Miconia* sp. A woody Melastomaceae from Brazil, using thidiazuron as plant growth. Melastomaceae from Brazil, using thidiazuron as plant growth regulator. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.9, p 21-25, 1997.

BELTRATI,C.M., **Morfologia e anatomia de sementes**. Curso de Pós-graduação em ciências biológicas. Instituto de Biociências - Rio Claro, 1994.

BEZERRA, F. C.; LOGES,V.; Zingibereaceae. IN: TERAQ, D.; CARVALHO, A. C.P.P.de.; BARROSO, T.C. da S.F. (eds.) **Flores tropicais**. Brasília: Embrapa Informações Tecnológicas; 2005. 225p.

BORÉM, A.; VIEIRA, M.L. C. **Glossário de biotecnologia**. Edição 2005. Disponível em: <[http\www.conselhodeinformaçõessobrebiotecnologia.htm](http://www.conselhodeinformaçõessobrebiotecnologia.htm)> Acesso em: 17 Mar. 2005.

BUENO, D. M.; CAVALCANTE, K. L. **Estudo da viabilidade dos grãos de pólen de flores de melão (*Cucumis melo* L.)**. Fortaleza-CE, junho de 2001. Disponível em: <<http://www.ufpel.tche.br>>. Acesso em: 19 Mar. 2005.

CALDAS, L. S., HARIDASSAN, P., FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. Carlos, CALDAS, L. S., BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA/CBAB. v.1, 1998, p.87-132.

CASTRO, C. E. F. **Heliconia para exportação: Aspectos Técnicos da Produção**. Brasília, 1995. MAARA-SDR- FRUPEX/ISPI. (FRUPEX. Publicações Técnicas, 16).

CASTRO, C.E.F. **Curso: Técnicas de Cultivo de Flores Tropicais**, 1998.

CASTRO, C.E.F. **Aspectos técnicos da produção de helicônias para exportação**. Disponível em: <<http://jardimdeflores.com.br>> . Acesso em: 27 Maio, 2006.

CASTRO, C. E. F.; CARBONELL, S. A. M.; MAIA, M.S.D.; COSTA, A. F. **Floricultura**. 1 ed. Campinas, 2005, 48p. (CONSEPA, SÉRIE REUNIÕES TÉCNICAS).

CID, P.B.L. Citocinina. In: CID, P.B.L. (Ed). **Introdução aos hormônios vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. p.55-81.

COSTA, R.W. e M. CAIXETA-FILHO. **Mercado de flores e plantas ornamentais no estado de São Paulo**: avaliação da sazonalidade no Veiling Holambra. Agric. São Paulo-SP, 2002. p.31-54.

DEBERGH, P.C., READ, P.E. Micropropagation. In: DEBERGH, P.C., ZIMMERMAN, R.H. (Ed.) **Micropropagation: Technology and Application**. London: Kluwer Academic Publishers, 1991. p.1-13.

FERREIRA, M. S. Conservação *in vitro* de germoplasma de cana-de-açúcar. 74f. **Monografia** (Conclusão do curso de graduação em Agronomia) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo, 2001.

GALLO, L.A.; CROCOMO, O. J.A. A cultura de tecidos em Fitopatologia. In: BERGAMIN, A. FILHO; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Agronômica ceres, v.2. 1995. p.494-505.

GEORGE, E.F., **Plant propagation by tissue culture**. The technology. Exegetics Limited., London. 1993. 574p.

GONZÁLEZ. E. A. J. Generalidades del cultivo *in vitro*. In: Ponce, J. N.P. (ed.) **Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología**. Cuba: Instituto de biotecnología de las plantas, 1998. p. 13-24.

GRATTAPAGLIA, D., MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C., CALDAS, L. S., BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA/CBAB. v.1. 1998. p.183-260.

GUERRA, M. P.; NODARI, R.O. **Biotecnologia**. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2006.41p. (Apostila).

HARTMANN, H. T., KESTER, D. E., DAVIES, F. T. et al. **Plant propagation: principles and practices** 6 ed. New Jersey: Prentice Hall International, 1997. 770p.

HINOJOSA, G.F. Auxinas. In: CID, B.P.L. (Ed). **Introdução aos hormônios vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. p. 15-53.

HU, C. Y.; FERREIRA, A.G. Cultura de embriões. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA/CBAB. v.1, 1998, p.261-296.

KILLERPLANTS. **Plant of the week**. 09 Jan. 2003. Disponível em: <<http://www.killerplants.com>>. Acesso em: 16 Mar. 2006.

LAMAS, A.M. **Floricultura tropical**: Técnicas de cultivo. Recife: SEBRAE/PE, 2002, 88p.

LAMAS, A. M. Curso: **Agente de desenvolvimento rural**: Tecnologia de Produção e Pós-colheita. Maceió-Alagoas, junho, 2005, 76p.

LINS, S.R.O.; COELHO, R.S.B. Ocorrência de doenças em plantas ornamentais tropicais no Estado de Pernambuco. **Fitopatologia Brasileira**. Brasília, v. 29, n.3, 2004.

LOGES, V.; SOUZA, J.W.O.; PINHEIRO, P.G.L.; CASTRO, A.C. R. de; LIRA JUNIOR, M. de A. Desenvolvimento de inflorescências de *Etilingera elatior*, *Tapeinochilos ananasseae* e *Zingiber spectabilis*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS

ORNAMENTAIS, 14. CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS, 1. Lavras, 2003. **Anais...** Lavras: UFLA/FAEPE, 2003. p. 395.

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

LORENZI, H.; SOUZA, H.M. **Plantas ornamentais no Brasil**: arbustivas, herbáceas e trepadeiras. 3 ed. Nova adessa, SP: Instituto Plantarum, 2001. 1088p.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: Fealq, 2005. 495p.

MELLO, M. O.; AMARAL, A. F. C. MELO, M. Quantifying the micropropagation of *Curcuma zedoaria* Roscoe. **Scientia Agricola**. v. 57, n. 4, 2000, p.703-707. Disponível em: <<http://www.informaçõesociedade.ufpb.br/>>. Acesso em: 26 Jan. 2007.

MURASHIGE., T.; SKOOG, F. A revised médium for rapid growth and bioassays with tabacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v.15, 1962. p. 437-497.

PEÑALVER, D.A.,TERRY, F.J., RODRÍGUEZ, M.A.D. Aclimatización. In: PONCE, J.N.P. (ed.) **Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología**. Cuba: Instituto de Biotecnología de las plantas, 1998. p. 193-206.

PÉREZ, P. A. O. Introducción a la propagación masiva. In: PONCE, J.N.P. (Ed.) **Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología**. Cuba: Instituto de Biotecnología de las Plantas, 1998. p. 125-133.

RODRIGUES, P.H.V. *In vitro* establishment of *Heliconia rauliniana* (Heliconiaceae). Piracicaba. **Scientia Agrícola**. v. 62, n. 1. 2005.

SCHULTZ, A.R. **Botânica sistemática**. v. 2, Ed. Globo, São Paulo, 1968.

TOMBOLATO, A.F.C. **Melhoramento genético de plantas exóticas no Brasil**. Instituto Agronômico Campinas – SP. v. 63, n.1/2, p.49-50, jan./dez., 2001.(Apostila).

TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações de cultura de tecidos de plantas**. *Eleocarpus robustus*. Brasília, ABCTP/Embrapa-CNPH, 1990. 433p.

TORRES, A.C.; CALDAS, L. S., FERREIRA, A.T. Retrospectiva da cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L. S., BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA/CBAB. v.1, 1998. p.11-20.

TORRES, A.C., DUVAL, F.D.; RIBEIRO, D.G.; BARROS, A. F. F.; ARAGÃO, F.A.D. Efeito da sacarose, cinetina, isopentenil, adenina e zeatina no desenvolvimento de embriões de *Heliconia rostrata in vitro*. **Horticultura Brasileira**. v. 23 n.3, 2005. Disponível em: <<http://www.periodicos.capes.gov.br/>>. Acesso em: 14 out. 2006.

VIDAL, W. N. **Botânica**: organografia. 3 ed. Viçosa – MG. 1995. 114p.

WILLADINO, L.; CÂMARA, T. **Cultura de tecidos vegetais**: Cultivo *in vitro* de vegetais. Disponível em: <<http://www.ufrpe.br/>>. Acesso em: 14 Mar. 2006.

<<http://www.sebrae.com.br>> Acesso em: 28 Abril. 2006

<<http://www.sebrae.com.br>> Acesso em: 05 Jan. 2007

<<http://www.investmentosalagoas.al.gov.br>> Acesso em: 09 Jun 2006

## CAPITULO II

### **Viabilidade de Grãos de Pólen de *Etilingera elatior* (Jack) R.M. Smith Cvs. Red Torch, Pink Torch e Porcelana<sup>1</sup>**

### **Viability of Grains of Pollen of *Etilingera elatior* (Jack) R.M. Smith Cvs. Red Torch, Pink Torch and Porcelain<sup>1</sup>**

<sup>2</sup>JAQUELINE FIGUEREDO DE OLIVEIRA; <sup>3</sup>EURICO EDUARDO PINTO DE LEMOS;

<sup>3</sup>LEILA DE PAULA REZENDE

---

<sup>1</sup>Trabalho de dissertação do primeiro autor; <sup>2</sup>Aluna do curso de Mestrado em Produção Vegetal/UFAL (Bolsista CAPES), [jaquelinefigueredo@hotmail.com](mailto:jaquelinefigueredo@hotmail.com); <sup>3</sup>Professores do centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas, [eepl@uol.com.br](mailto:eepl@uol.com.br); [leilarezende02@hotmail.com](mailto:leilarezende02@hotmail.com)

## RESUMO

O bastão do imperador (*Etilingera elatior*) é uma planta tropical herbácea, rizomatosa e perene, que possui inflorescências belas e vistosas em diferentes tonalidades, possuindo um grande apelo ornamental. Este trabalho objetivou avaliar a viabilidade dos grãos de pólen de inflorescências das cultivares Red Torch, Pink Torch e Porcelana para a utilização em futuros cruzamentos intervarietais e criação de novos tipos comerciais de bastão do imperador, pois acredita-se que a inexistência de frutos nestas inflorescências seja devida à inviabilidade dos grãos de pólen. Para tanto, foram estudadas os grãos de pólen de inflorescências curtas, médias e longas e em flores abertas e fechadas. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3x3x2 com 6 repetições. Os grãos de pólen foram corados com uma solução de lugol e em seguida visualizados e contados utilizando-se um microscópio estereoscópico. Não houve diferenças significativas entre as variedades, posições das hastes ou estágio de abertura das flores em relação ao número de grãos viáveis. A percentagem grãos corados ficou acima de 99%, indicando que os grãos de pólen de bastão do imperador, independente do tipo de flor, do comprimento da haste da inflorescência e do cultivar, apresentam uma alta viabilidade polínica.

**Palavras-chave:** flor tropical, bastão do imperador, melhoramento.

**ABSTRACT**

The *Etilingera elatior* is a perennial herbaceous tropical plant that possesses beautiful flowers with different colors and a great ornamental appeal. This work aimed to evaluate the viability of the pollen grains in flowers of the cultivars Red Torch, Pink Torch and Porcelain to be used in a future breeding program to create new commercial types of the *Etilingera elatior*. It is common to believe that the inexistence of fruits and seeds in their flowers is due to the non viability of the pollen grains. Therefore, it was carried out an study to check the viability of the pollen grains in open and closed flowers of small, medium and tall sticks. The experimental design was entirely randomized, in factorial outline (3x3x2) with 6 replicates. The pollen grains were stained in a lugol solution and observed and counted on a stereoscopic microscope. The results showed no significant differences among the varieties, size of the sticks or aperture of the flowers in relation to the number of viable pollen grains. The percentage of red-stained grains was greater than 99%, indicating that the pollen grains of the *Etilingera elatior*, independent of the flower type, size of the stick and cultivated variety, show high pollinic viability.

**Index terms:** fruit set, tropical flower, breeding

## INTRODUÇÃO

Alagoas é um dos estados brasileiros que vêm se destacando no cultivo de flores tropicais de corte. As flores tropicais apresentam características favoráveis à comercialização por sua beleza, exotismo, diversidade de cores e formas, resistência ao transporte, durabilidade pós-colheita, sendo apontadas como um grande potencial estratégico de crescimento no mercado internacional (LAMAS, 2005).

A qualidade das flores de corte, quanto aos aspectos de durabilidade, coloração, tamanho, turgidez, entre outros, está relacionada com o processo de produção, incluindo a obtenção das mudas, até a etapa final da comercialização. Por isso, flores com boa qualidade, conseqüentemente, são resultados de mão-de-obra capacitada e do manejo correto tanto no cultivo como na colheita e nos tratamentos pós-colheita (LOGES et al., 2005).

O êxito em qualquer programa de melhoramento vegetal e a criação de novas cultivares passa, necessariamente, pela capacidade de se produzir cruzamentos entre plantas relacionadas e compatíveis que originem sementes com embriões viáveis para a formação de novas plantas. Em um mercado ávido por novos produtos, como a floricultura, a descoberta de caminhos para destravar a criação de novas cultivares é tarefa árdua e inclui estudos minuciosos de biologia floral das espécies com dificuldade de propagação sexuada como é o caso de *Etilingera elatior* (TOMBOLATO, 2001).

Observações feitas por produtores em campo apontam para uma baixíssima produção de frutos e sementes nessa espécie. Acredita-se que a escassez de frutos em bastão do imperador seja devido à inviabilidade dos grãos de pólen. Este trabalho se propôs a estudar a viabilidade dos grãos de pólen em inflorescências de três cultivares de bastão do Imperador (Red Torch, Pink Torch e Porcelana) para contribuir em futuros programas de melhoramento da espécie.

## METODOLOGIA

O experimento foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia Vegetal (BIOVEG) do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas – CECA/UFAL, em Rio Largo Estado de Alagoas.

Inflorescências de bastão do imperador (*Etilingera elatior*) das cultivares Red Torch, Pink Torch e Porcelana, provenientes da Chácara Nina Flor, localizada no município de Rio Largo Estado de Alagoas, foram coletadas, selecionadas e classificadas de acordo com o seu comprimento. Assim, hastes que apresentavam comprimento inferior a 0,8 m foram consideradas curtas entre 0,8 e 1 m, médias e acima de 1 m, longas.

As inflorescências escolhidas apresentavam as brácteas externas e algumas flores da base abertas, ou seja, no estágio de desenvolvimento  $\geq 6$  (inflorescência com abertura total) conforme classificação de Loges et al. (2005). Em seguida, as inflorescências foram colocadas em bandejas contendo um pouco de água e cobertas com sacolas plásticas para evitar a desidratação das inflorescências.

Para cada comprimento de haste das três cultivares foram colhidas 2 inflorescências. De cada inflorescência foram retiradas aleatoriamente 3 flores abertas e 3 flores fechadas (botões), totalizando 6 flores abertas e 6 flores fechadas.

Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial 3x3x2, num total 18 tratamentos, com 6 repetições.

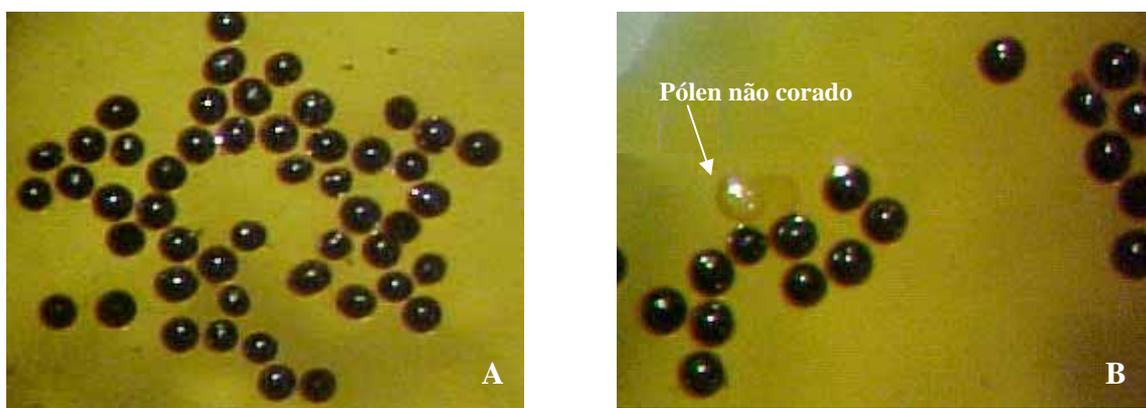
As flores selecionadas foram cortadas longitudinalmente para expor as anteras, de onde foram extraídos os grãos de pólen, com o auxílio de uma espátula, os quais foram colocados sobre uma lâmina, com auxílio de um pincel, e em seguida corados em solução de lugol (iodo 1g + iodeto de potássio 1g + água destilada 100 mL).

A avaliação da viabilidade foi realizada pela contagem dos grãos de pólen corados ou não, em microscópio estereoscópico, em dois campos de observação. Os dados obtidos foram submetidos ao teste de  $\chi^2$  (qui quadrado) para avaliar a hipótese de que a viabilidade dos grãos de pólen é a mesma em todos os tratamentos.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de viabilidade polínica pelo teste de coloração baseia-se no fato de que se o núcleo do grão de pólen possui integridade protoplasmática e, portanto, todo o seu conteúdo preservado, ele reage com o corante (lugol) apresentando cor marrom. Por outro lado, o grão de pólen não viável, no qual não há protoplasma íntegro, não reage com o lugol e, portanto, não cora, permitindo assim uma correlação entre coloração e viabilidade (SCOTT et al., 2002).

Na Figura 1 estão apresentados dois campos de observação, onde no campo A todos os grãos de pólen estão corados (marrons), e, portanto viáveis, e no B apenas um grão de pólen não foi corado, sendo considerado não viável.



**Figura 1.** Grãos de pólen de bastão do imperador corados (viáveis) e não corados (não viáveis) por lugol.

A viabilidade de grãos de pólen nos cultivares de bastão do imperador estudadas podem ser observadas na Tabela 1. Houve diferenças significativas do número de grãos corados e não corados entre os cultivares, sendo que dos 56.837 grãos de pólen analisados, 34,91%, 28,02%, 37,06% foram respectivamente das cultivares Red Torch, Pink Torch e Porcelana.

**Tabela 1.** Números de grãos de pólen corados e não corados nas cultivares Red Torch, Pink Torch e Porcelana de bastão do imperador.

Cultivares	Número de grãos de pólen		Total	$\chi^2$
	Corados	Não Corados		
<b>Red Torch</b>	19.716 (99,35%)	128 (0,65%)	19.844 (34,91%)	19,20760
<b>Pink Torch</b>	15.777 (99,05%)	151 (0,95%)	15.928 (28,02%)	
<b>Porcelana</b>	20.943 (99,42%)	122 (0,58%)	21.065 (37,06%)	
<b>Total</b>	56.436 (99,29%)	401 (0,71%)	56.837 (100%)	

O comprimento da haste não influenciou significativamente no número de grãos de pólen corados e não corados. O número de grãos de pólen corados nas três alturas de haste foi superior a 99% (Tabela 2). Do total de grãos de polens analisados, 31,83% foram das inflorescências de hastes curtas, 36,32% das inflorescências de hastes médias e 31,84% das inflorescências de hastes longas.

**Tabela 2.** Números de grãos de pólen corados e não corados em relação à altura da haste da inflorescência de bastão do imperador.

Altura da haste da inflorescência	Número de grãos de pólen		Total	$\chi^2$
	Corados	Não-Corados		
<b>Baixa</b>	17960 (99,26%)	133(0,74%)	18093(31,83%)	2,185970
<b>Média</b>	20491 (99,25%)	154 (0,75%)	20645 (36,32%)	
<b>Alta</b>	17985 (99,37%)	114(0,63%)	18099 (31,84%)	
<b>Total</b>	56.436 (99,29%)	401 (0,71%)	56.837 (100%)	

Foram analisados 30.726 grãos de pólen em flores abertas e 26.111 em botões (flores fechadas), ou seja, 54,06% e 45,94% , respectivamente. Verificou-se que não houve diferença significativa no número de grãos corados e não corados entre as flores abertas ou fechadas (Tabela 3).

**Tabela 3.** Números de grãos de pólen corados e não corados em flores e botões de bastão do imperador.

Tipo de flor	Número de grãos de pólen		Total	$\chi^2$
	Corados	Não-Corados		
<b>Flor</b>	30501 (99,27%)	225 (0,73%)	30726 (54,06%)	0,6832896
<b>Botão</b>	25935 (99,33%)	176 (0,67%)	26111 (45,94%)	
<b>Total</b>	56.436 (99,29%)	401 (0,71%)	56.837 (100%)	

Do total de 56.837 grãos de pólen, 99,29% foram viáveis (corados) e 0,71%, não viáveis (não corados). Os resultados obtidos neste trabalho indicam que os grãos de pólen de bastão do imperador, independente do tipo de flor, do comprimento da haste floral e da cultivar, apresentam alta viabilidade polínica.

Identificar as razões da baixa produção de frutos e sementes de algumas plantas ornamentais tem sido também motivo de pesquisas de outros autores tais como, Souza et al. (2003), Belo et al. (2003) e Fonseca et al. (2003), que utilizando o mesmo método detectaram altos índices de viabilidade polínica (acima de 90%) para *Heliconia psittacorum*, *Passiflora suberosa* e *Passiflora morifolia*, respectivamente.

## **CONCLUSÕES**

Em função destes resultados pode-se concluir que o baixo índice de formação de frutos de bastão do imperador não está relacionado à viabilidade polínica. Outros fatores podem estar envolvidos na formação desses frutos, tais como, a capacidade do grão de pólen em emitir o tubo polínico, a receptividade estigmática e o desenvolvimento do ovário. Serão necessários ainda novos estudos para se definir as causas do problema e criar estratégias para contorná-lo.

## **AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem a CAPES, pela concessão bolsa à primeira autora, e à produtora de flores tropicais Sra. Eleuza Tenório pela doação das flores de bastão necessárias para esse estudo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BELO, G. O.; SOUZA, M.M.; FONSECA, J.W.S.; ROZA, F.A.; VIANA, A.J.C. CRUZ, T.V. SOPRANI Jr., G.G.; SILVEIRA, A.; PEREIRA, N.E. Germinação *in vitro* e viabilidade polínica em *Passiflora suberosa* para sua utilização como genitor em produção de híbrido ornamental. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 14. CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS, 1. Lavras, 2003. **Anais...** Lavras: UFLA/FAEPE, 2003. p. 395.

FONSECA, J.W.S.; BELO, G.O.; SOUZA, M.M.; ROZA, F.A.; VIANA, A.J.C. CRUZ, T.V. SOPRANI Jr., G.G.; SILVEIRA, A.; PEREIRA, N.E. Avaliação de polinização *in vivo*, viabilidade polínica e receptividade do estigma em *Passiflora morifolia* para sua utilização como genitor em produção de híbrido ornamental. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 14. CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS, 1. Lavras, 2003. **Anais...** Lavras: UFLA/FAEPE, 2003. p. 395.

LAMAS, A. M. Curso: **Agente de desenvolvimento rural**: Tecnologia de Produção e Pós-colheita. Maceió-Alagoas, junho, 2005, p.76.

LOGES, V., TEIXEIRA, M. do C. F., CASTRO, A.C. R. de. Harvest and postharvest of tropical flowers in Pernambuco State. **Horticultura Brasileira**, v.23, n.3, p.699-702, 2005.

SCOTT, M.D.S., BENTO, M.M. PIEROZZI, N.I., ARAGÃO, W., SCARANARI, C. Análise de viabilidade do pólen para auxiliar o programa de produção de híbridos de coqueiro (*Cocos nucifera* L.) In: CONGRESSO NACIONAL DE FRUTICULTURA, 17. Belém, 2002. **Anais...**

SOUZA, M.M.; CONCEIÇÃO B. P.S.; SANTOS, C.B.L.F.; PEREIRA, N.E. Estudo do comportamento meiótico e pós-meiótico, e da viabilidade polínica em helecônia ornamental (*Heliconia psittacorum*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 14. CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS, 1. Lavras, 2003. **Anais...** Lavras: UFLA/FAEPE, 2003. p. 395.

TOMBOLATO, A.F.C. **Melhoramento genético de plantas exóticas no Brasil.** Instituto Agrônomo Campinas – SP. v. 63, n.1/2, p.49-50, jan./dez., 2001.(Apostila).

### **CAPITULO III**

**Germinação de Embriões e Multiplicação *in vitro* de *Etilingera elatior* (Jack) R.M. Smith<sup>1</sup>**

**Germination of Embryos and *in vitro* Multiplication of *Etilingera elatior* (Jack) R.M. Smith <sup>1</sup>**

<sup>2</sup>JAQUELINE FIGUEREDO DE OLIVEIRA; <sup>3</sup>EURICO EDUARDO PINTO DE LEMOS;

<sup>3</sup>LEILA DE PAULA REZENDE

---

<sup>1</sup> Parte da dissertação de mestrado da primeira autora; <sup>2</sup>Aluna do curso de Mestrado em Produção Vegetal/UFAL (Bolsista CAPES), [jaquelinefigueredo@hotmail.com](mailto:jaquelinefigueredo@hotmail.com); <sup>3</sup>Professores do centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas, [eepl@uol.com.br](mailto:eepl@uol.com.br); [leilarezende02@hotmail.com](mailto:leilarezende02@hotmail.com)

## RESUMO

*Etilingera elatior* (Jack) R.M. Smith (Zingiberaceae) é uma planta tropical florífera herbácea, rizomatosa, ereta, entouceirada, robusta, e perene. Seu cultivo tem sido crescente nos últimos anos no Brasil juntamente com outras flores tropicais. Dentre as dificuldades encontradas para o crescimento dessa atividade destaca-se aquisição de mudas com qualidade fitossanitária adequada para suprir a demanda dos produtores. Com o objetivo de desenvolver um protocolo para multiplicação *in vitro* de *Etilingera elatior* (Jack) R.M. Smith, testou-se os efeitos da adição da citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) em meio de cultura de Murashige e Skoog na germinação de embriões e micropropagação dos explantes *in vitro*. Foram ainda estudados os efeitos da adição das citocininas 6-benzilaminopurina e cinetina e da auxina ácido naftaleno acético na multiplicação *in vitro* dos explantes. As plântulas individualizadas com cerca de 2 cm foram cultivadas no meio de cultura básico descrito por Murashige e Skoog (MS), enriquecido com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e 1 mg.L<sup>-1</sup> BAP (Benzilaminopurina) mais um dos seguintes tratamentos: 1) 1 mg.L<sup>-1</sup> ANA (Ácido naftalenoacético); 2) 2 mg.L<sup>-1</sup> ANA 3) 1 mg.L<sup>-1</sup> CIN (Cinetina); 4) 2 mg.L<sup>-1</sup> CIN. Os resultados mostraram que houve maior percentagem de formação de calos (30 %) em embriões excisados quando postos em meio de cultura com 2 mg.L<sup>-1</sup> de BAP. Após 90 dias de cultivo, o maior número médio de brotos (4,4) foi obtido com 1 mg.L<sup>-1</sup> BAP+2 mg.L<sup>-1</sup> CIN e a maior altura média dos brotos foi obtida na concentração de 1 mg.L<sup>-1</sup> BAP+2 mg.L<sup>-1</sup> ANA. O maior número e comprimento médio das raízes foram obtidos com 1 mg.L<sup>-1</sup> BAP+2 mg.L<sup>-1</sup> ANA. Durante a aclimação das plântulas em casa de vegetação obteve-se uma taxa de pegamento superior a 80%, as quais estavam prontas para serem transferidas para o campo aos 60 dias.

**Palavras-chave:** cultura de tecidos, Zingiberaceae, propagação.

**ABSTRACT**

*Etilingera elatior* (Jack) R.M. Smith (Zingiberaceae) is a tropical flowering herbaceous plant, that possesses rhizomatous stems and has an erect, vigorous, bunchy and perennial growth habit. This crop has been growing in the last few years in Brazil together with other tropical flowers. Among the difficulties found to grow *Etilingera elatior* is the acquisition of quality seedlings with appropriate sanitary standards to supply the demand of the producers. With the objective of developing a protocol for multiplication *in vitro* of *Etilingera elatior*, there were tested the effects of the cytokinin 6-benzilaminopurine (BAP) in the germination of zygotic embryos and the micropropagation of their explants. There were also studied the effects of the cytokinins 6-benzilaminopurine and kinetin (KIN) and the auxin naphtalenacetic acid (NAA) in the *in vitro* multiplication of the explants. *In vitro* plants with about 2 cm long were cultivated in a basic Murashige and Skoog medium culture, enriched with 30 g.L<sup>-1</sup> of sucrose and 1 mg.L<sup>-1</sup> BAP plus one of the following treatments: 1) 1 mg.L<sup>-1</sup> ANA ; 2) 2 mg.L<sup>-1</sup> NAA 3) 1 mg.L<sup>-1</sup> KIN; 4) 2 mg.L<sup>-1</sup> KIN. The results showed that there was a considerable percentage of calluses formation (30%) in excised embryos when placed to germinate in a medium culture with 2 mg.L<sup>-1</sup> of BAP. After 90 days of cultivation, the highest number of sprouts produced on the explants (4,4) was obtained in a medium with 1 mg.L<sup>-1</sup> BAP + 2 mg.L<sup>-1</sup> KIN and the highest mean height of the sprouts was obtained in 1 mg.L<sup>-1</sup> BAP + 2 mg.L<sup>-1</sup> NAA. The largest number and mean length of the roots were achieved with 1 mg.L<sup>-1</sup> BAP + 2 mg.L<sup>-1</sup> NAA. The acclimatization rate of the explants in a glasshouse was superior to 80%, and the seedlings were ready to be transferred to the field after 60 days.

**Index terms:** tissue culture, Zingiberaceae, tropical flower.

## INTRODUÇÃO

O mercado mundial de flores vem apresentando crescimento significativo a partir da década de 90, tornando-se um segmento econômico de grande importância no agronegócio global com um valor aproximado de três bilhões de dólares anuais dos quais considerável parcela se deve à comercialização de espécies de origem tropical (LOGES et al., 2003).

No Brasil, a produção de flores tropicais tem crescido significativamente, especialmente na região Nordeste. Nesta região, pequenos e médios produtores possuem vantagens competitivas devido às condições ambientais ideais para o cultivo das mais belas espécies (RODRIGUES, 2005).

Em Alagoas, as espécies de flores tropicais cultivadas pertencem principalmente às famílias Musaceae, Heliconiaceae e Zingiberaceae (CHAGAS, 2000; CASTRO, 1995). Entre as Zingiberaceae, destaca-se a espécie *Etilingera elatior* (Jack) R.M. Smith, denominada “bastão do imperador”, com os tipos vermelho, rosa e porcelana. (CHAGAS, 2000).

Devido à sua beleza e a durabilidade na pós-colheita, o bastão do imperador tem sido comercializado como flor de corte, com grande aceitação tanto no mercado nacional como internacional, sendo utilizada também em arranjos paisagísticos de jardins, praças e bosques (CASTRO, 1998).

Recentemente, diversas técnicas de biotecnologia têm sido utilizadas em trabalhos de melhoramento e clonagem de espécies de flores tropicais, podendo-se destacar a cultura de tecidos com suas técnicas de micropropagação e resgate de embriões de sementes em cruzamentos entre espécies incompatíveis (DUVAL, 2004; RODRIGUES, 2005; TORRES et al., 2005). Todavia, até o presente momento, não foram descritos trabalhos enfocando experiências em cultura de tecidos com a espécie *Etilingera elatior*.

As mudas de bastão do imperador são obtidas vegetativamente pelo processo de divisão de touceiras ou por seccionamento de rizomas (LAMAS, 2002). Tais métodos de propagação além de restringirem o número de mudas disponíveis para novos produtores podem ocasionar a disseminação de pragas e doenças, levando ao acúmulo de agentes patogênicos que são transmitidos entre plantios sucessivos. Para resolver esse problema, tem sido sugerida a utilização da técnica de cultura de meristemas e outros tecidos das plantas, entre os quais estão os embriões zigóticos obtidos de sementes antes ou após a sua maturação. Esta técnica tem mostrado ser uma

forma rápida de multiplicar uma determinada espécie autógama com características agronômicas desejáveis, recuperando plantas livres de pragas e doenças e já tem se mostrado uma opção viável para algumas espécies da família Zingiberaceae (MELLO et al., 2000; WILLADINO & CÂMARA, 2006).

O objetivo desse trabalho foi desenvolver um protocolo de regeneração de plantas de *Etilingera elatior* cv. Red Torch, através do cultivo de embriões maduros e avaliar a multiplicação e enraizamento *in vitro* dos explantes sob diferentes concentrações das citocininas 6-benzilaminopurina e cinetina e da auxina ácido naftaleno acético como opção para utilização em sistemas de propagação massal, visando à produção de plantas livres de pragas e doenças.

## METODOLOGIA

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia Vegetal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas, em Rio Largo Estado de Alagoas.

**Obtenção das sementes:** Frutos maduros de *Etlingera elatior* cv. Red Torch, provenientes de plantio comercial na Fazenda Monteiro no município de Messias, Alagoas, foram mergulhados em solução de hipoclorito de sódio a 0,2% por 30 minutos e em seguida lavados com água corrente por 1 minuto.

As sementes foram retiradas dos frutos e despulpadas em uma peneira, sob água corrente, até a retirada total da mucilagem, e levadas para a câmara de fluxo laminar onde se realizou a desinfestação de acordo com a seguinte seqüência: 1) Imersão em 1L de água destilada com 3 gotas de detergente comum por 10 minutos; 2) Imersão por 10 minutos em fungicida tiofanato metílico (Cercobim 700 PM) a 2 g.L<sup>-1</sup>; 3) Imersão por 1 minuto em álcool 70% (v/v); 4) Imersão por 30 minutos em solução de hipoclorito de sódio a 0,6%, juntamente com 2 gotas do detergente Tween 80. Ao final de cada etapa, as sementes receberam três enxágües em água estéril.

**Germinação de embriões zigóticos isolados:** Sementes de *Etlingera elatior* cv. Red Torch foram utilizadas para extração dos embriões, com auxílio de microscópio estereoscópico, pinças e bisturis, os quais foram introduzidos em tubos-de-ensaio contendo 10 mL de meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962) acrescido de 30 mg.L<sup>-1</sup> de sacarose, e diferentes concentrações de BAP (0; 1; 2 e 3 mg.L<sup>-1</sup>), com pH ajustado para 5,8 e gelificado com 2,5 g.L<sup>-1</sup> de “Phytigel” (Gelrite), previamente autoclavado por 20 minutos, a 121°C.

Os embriões foram cultivados sob condições de escuro por 15 dias e após este tempo foram mantidos em sala de crescimento, sob intensidade luminosa de cerca de 50 µmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>, proveniente de lâmpadas frias. O fotoperíodo utilizado de 16 horas e à temperatura foi ajustada para 25± 2°C.

Após 60 dias de cultivo, os embriões isolados que germinaram e se desenvolveram foram transferidos para o mesmo meio de cultura MS sem reguladores de crescimento, e mantidos sob as mesmas condições anteriores da sala de crescimento.

O experimento foi organizado em delineamento experimental inteiramente casualizado, com 5 repetições e 4 embriões por parcela. A cada 15 dias, durante 60 dias, avaliou-se a porcentagem de germinação de embriões e a presença de calos.

**Germinação de sementes *in vitro*:** Sementes de *Etlingera elatior* cv. Red Torch foram postas para germinar em papel de filtro umedecido dentro de placas de Petri esterilizadas em autoclave. Este ensaio foi constituído de 10 placas cada uma contendo 10 sementes. Após 60 dias avaliou-se a porcentagem de germinação das sementes.

As sementes germinadas nas placas foram transferidas para frascos contendo 30 mL do meio de cultura MS, utilizado anteriormente para os embriões, enriquecido com 3 mg.L<sup>-1</sup> de BAP. A cada período de 30 dias, os explantes eram repicados até a obtenção de uma quantidade suficiente para o início do experimento de multiplicação.

**Experimento de multiplicação:** As plântulas individualizadas com cerca de 2 cm, foram cultivadas no meio de cultura MS, enriquecido com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e 1 mg.L<sup>-1</sup> BAP (Benzilaminopurina) mais um dos seguintes tratamentos: 1) 1 mg.L<sup>-1</sup> ANA (Ácido naftalenoacético); 2) 2 mg.L<sup>-1</sup> ANA 3) 1 mg.L<sup>-1</sup> CIN (Cinetina); 4) 2 mg.L<sup>-1</sup> CIN.

As avaliações foram feitas quinzenalmente por 90 dias, contando-se o número de brotos e de raízes/explantes e medindo-se o comprimento dos mesmos. As variáveis comprimento de brotos e de raiz foram medidas com ajuda de uma régua. O meio de cultura foi renovado a cada 30 dias.

Os experimentos foram conduzidos em delineamento experimental inteiramente casualizado com 4 tratamentos e 5 repetições, sendo cada parcela representada por cinco vidros com uma planta cada. Utilizou-se frascos de vidro (250ml) contendo cerca de 30 mL de meio. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Foi utilizado o programa estatístico SISVAR-Sistema de análise de variância para dados balanceados.

Todas as fases do presente estudo, com exceção dos primeiros 15 dias da fase escura dos embriões isolados, foram conduzidas em câmara de crescimento sob intensidade luminosa de cerca de 50 µmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>, proveniente de lâmpadas frias Philips TDL. O fotoperíodo utilizado de 16 horas e a temperatura foi ajustada para 25± 2°C.

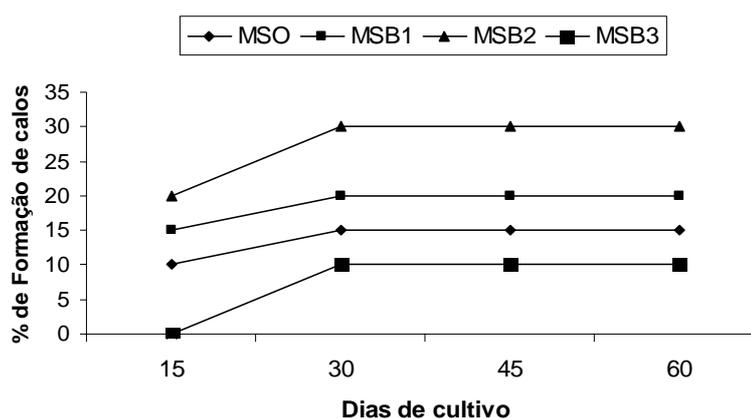
Para a aclimatização do material, foram selecionadas microplantas, com cerca de 3 cm, enraizadas *in vitro*, as quais tiveram suas raízes lavadas em água corrente para a completa

remoção do meio de cultura aderido. Em seguida foram plantadas em copos descartáveis com capacidade para 200 mL, contendo uma mistura de pó de fibra de coco + terra de encosta + torta de filtro nas proporções de 1:2:1. Os copos com as plantas foram mantidos em bandejas envolvidas com sacolas plásticas durante 15 dias para formar uma câmara úmida. Após esse período, os copos com as plântulas foram levados para um telado com 70% de sombreamento e irrigados diariamente por microaspersão. Após 30 dias da retirada das plantas dos frascos, avaliou-se a porcentagem de plantas vivas e a altura das plantas.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

**Germinação de embriões zigóticos isolados:** O início da germinação dos embriões ocorreu aos 15 dias para os tratamentos com até 2 mg.L<sup>-1</sup> de BAP. O tempo necessário para a germinação máxima dos embriões foi de 30 dias, não havendo embriões germinados após esse período em todos os tratamentos. Após 15 dias de inoculação *in vitro* dos embriões, observou-se a formação de um calo esbranquiçado de consistência esponjosa ao longo do eixo de todos embriões que germinaram. A presença dos calos nos embriões parece estar associada ao crescimento dos mesmos uma vez que os embriões que não germinaram não apresentaram nenhum tipo de resposta morfogênica ou qualquer tipo de calo na superfície.

Duval (2004), cultivando embriões de *Heliconia rostrata* em meio básico de MS observou que a ausência de reguladores de crescimento juntamente com a adição de sacarose foram fundamentais para a germinação dos embriões. Contrariamente, nesse trabalho, a adição de BAP até a concentração de 2 mg.L<sup>-1</sup> em meio com 3% de sacarose, favoreceu a germinação dos embriões de *Etilingera elatior* em relação à testemunha sem BAP. Todavia, o aumento da concentração de BAP para 3 mg.L<sup>-1</sup> no mesmo meio básico desfavoreceu a germinação dos embriões (Figura 1).

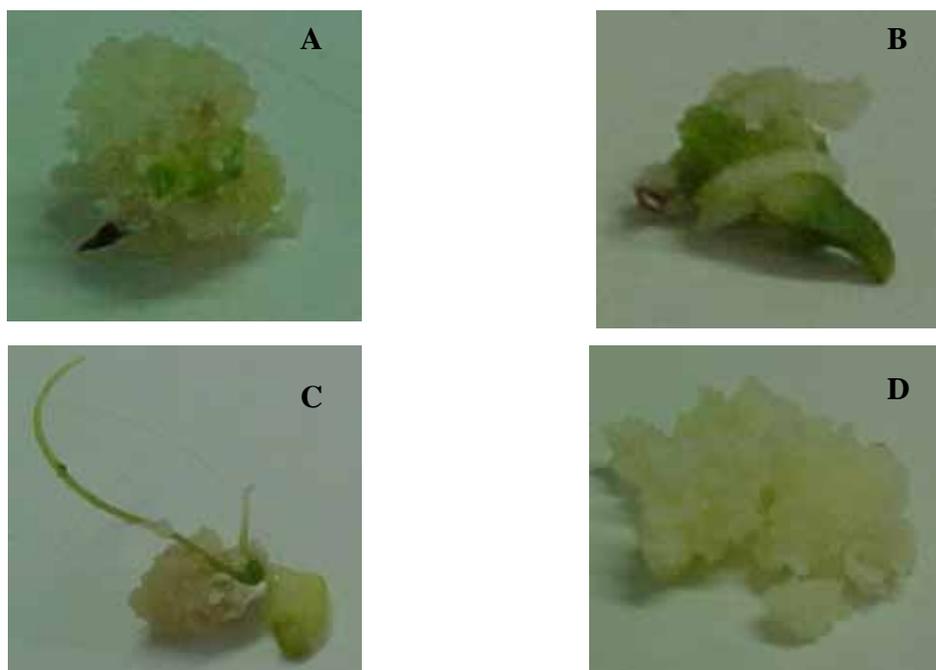


**Figura 1:** Efeito das concentrações (0,1,2 e 3 mg.L<sup>-1</sup>) de BAP, na formação de calos isolados de *Etilingera elatior* cv. Red Torch, aos 60 dias de cultivo *in vitro*.

A baixa porcentagem de germinação dos embriões pode ser devido ao estágio de maturação da semente que no caso de *Etilingera elatior* carece de maiores estudos. De acordo com Hu & Ferreira (1998), quanto mais jovens os embriões, mais difícil é o cultivo *in vitro*, devido ao seu pequeno tamanho e danos durante a excisão e, mais complexos são suas exigências nutricionais. Rhagavan (1980) descreve que embriões em fase inicial de desenvolvimento são heterotróficos e, muitas vezes, as condições ideais de nutrição são desconhecidas.

Aos 45 dias após a inoculação dos embriões isolados observou-se distintamente o crescimento da raiz e da parte aérea nos tratamentos com até 2 mg.L<sup>-1</sup> de BAP (Figura 2 A, B, C). No meio suplementado com 3 mg.L<sup>-1</sup> de BAP (Figura 2 D) houve crescimento da massa esponjosa esbranquiçada (calos) até os 60 dias, após este período iniciou-se o escurecimento e posteriormente morte do calo e do embrião, o que não ocorreu com os demais tratamentos que embora tenham produzido diferentes quantidades da massa calosa não levaram os embriões à morte.

A resposta de tecidos vegetais à produção de calos pode ocorrer de diversas maneiras, sendo estimulada ou não pela presença de reguladores de crescimento como auxinas e citocininas (GEORGE, 1993). Nesse caso, o simples fato dos embriões retornarem o crescimento do eixo embrionário estimulou também a formação de calos independentemente do meio ter ou não a presença de BAP. É possível que o isolamento de embriões tenha desencadeado um descontrole morfo-genético do crescimento na superfície do eixo embrionário no contato com o meio rico em nutrientes sem prejuízo para o crescimento dos meristemas da parte aérea e da raiz. A osmolaridade do meio também influencia o desenvolvimento de embriões isolados e, é possível que, neste caso, a mesma necessitasse de ajustes (HU & FERREIRA, 1998).



**Figura 2.** Embriões em desenvolvimento com estrutura calosa esbranquiçada, parte aérea e raiz, provenientes de meio MS, suplementado com  $0 \text{ mg.L}^{-1}$  (A),  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  (B),  $2 \text{ mg.L}^{-1}$  (C) e  $3 \text{ mg.L}^{-1}$  (D).

**Germinação de sementes *in vitro*:** A introdução *in vitro* das sementes de *Etilingera elatior*, em placas de Petri, proporcionou a obtenção de explantes viáveis. A taxa de germinação das sementes foi de apenas 8%, aos 60 dias após a introdução. Essa taxa foi significativamente menor do que aquelas obtidas com embriões retirados das sementes e postos para germinar em meio de cultura MS, com e sem BAP, que atingiram até 30% em  $2 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP. Esse fato pode estar relacionado à possibilidade das sementes apresentarem dormência física, pois quando maduras, elas possuem um tegumento bastante duro e impermeável. Outra possibilidade seria a presença, ainda não confirmada, de inibidores de germinação nos tecidos que revestem o embrião da semente conforme constatado em várias espécies (HU & FERREIRA, 1998).

**Experimento de multiplicação:** Os tratamentos apresentaram diferenças significativas em resposta às diferentes concentrações de reguladores de crescimento testadas. O maior número de brotações (4,4) foi obtido quando se adicionou  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP +  $2 \text{ mg.L}^{-1}$  de CIN no meio (Tabela 1).

**Tabela 1:** Efeito da adição de reguladores de crescimento no número e comprimento médio das brotações (cm) e na taxa de multiplicação de *Etilingera elatior* cv. Red Torch, aos 90 dias de cultivo *in vitro*.

Tratamentos	Número das brotações	Comprimento das brotações (cm)	Taxa de multiplicação*
1 mg/L BAP + 1mg.L <sup>-1</sup> ANA	3,6 c	2,51a	8,12
1 mg/L BAP + 2mg.L <sup>-1</sup> ANA	3,8 bc	2,60 a	7,84
1 mg/L BAP + 1mg.L <sup>-1</sup> CIN	4,1 ab	2,32 b	9,36
1 mg/L BAP + 2mg.L <sup>-1</sup> CIN	4,4 a	2,31 b	10,04
CV (%)	17,03	10,79	

Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (5%). \*Número final de explantes produzidos/número de explantes introduzidos.

Trabalhos publicados, sobre a micropropagação de plantas da família Zingiberaceae mostram que o meio de cultura MS, tem sido o mais utilizado para a multiplicação *in vitro*. A associação de reguladores de crescimento tem sido também utilizada como estratégia para o crescimento e multiplicação. Por exemplo, Loc et al. (2005), utilizando várias combinações de reguladores de crescimento na multiplicação de *Curcuma zedoaria* Roscoe, obtiveram o melhor número médio de brotações/mês (5,6) ao utilizar o meio de cultura MS acrescido de 3 mg.L<sup>-1</sup> de BAP associado a 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de IBA. Borthakur et al. (1999), utilizando o meio de cultura MS suplementado com 3 mg.L<sup>-1</sup> de CIN para a multiplicação *in vitro* de *Alpinia galanga* obtiveram um número médio de 7,1 brotos/mês. No entanto quando utilizaram 4 mg.L<sup>-1</sup> de CIN + 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de ANA houve uma redução no número médio de brotos/mês para 5.

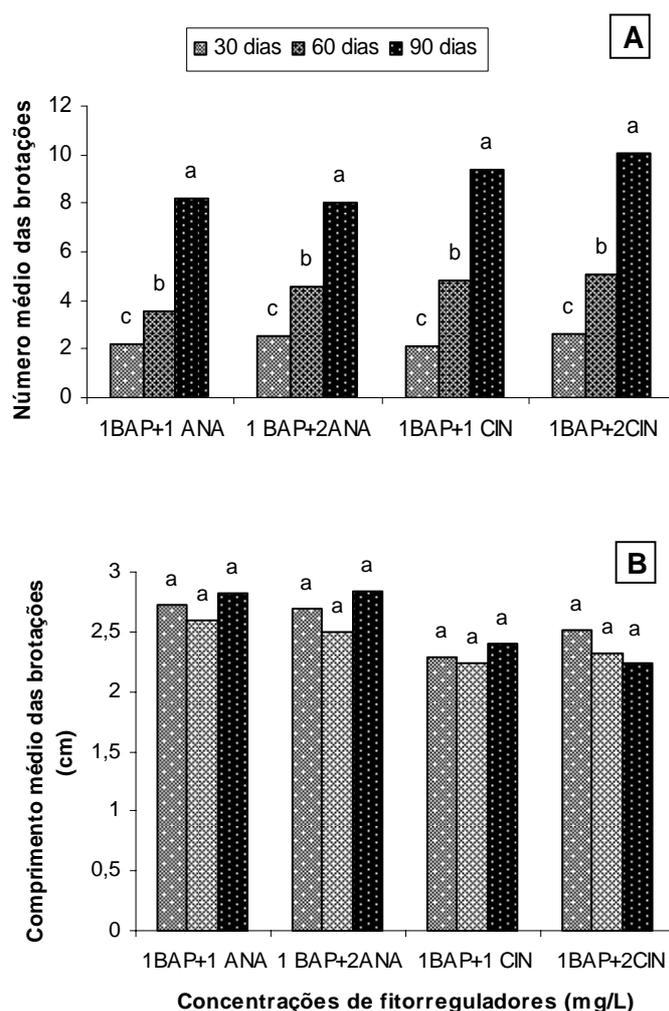
De acordo com Sharma & Singer (1997), gemas de *Zingiber officinale* cultivadas em meio de cultura MS suplementado com os reguladores de crescimento BAP, CIN, ANA e IBA, mostraram que a suplementação isolada do meio de cultura com 8 mg.L<sup>-1</sup> de CIN induziu uma média de 4,3 novos brotos/mês e a suplementação combinada com 2 mg.L<sup>-1</sup> de CIN + 2 mg.L<sup>-1</sup> de ANA, induziu uma média de 7 brotos/mês. A média de brotos/mês superior a 4 mostra que os resultados obtidos nesse trabalho se aproximam dos valores obtidos em outras espécies mais estudadas da mesma família.

O comprimento médio das brotações foi maior nos tratamentos combinados com a citocinina (BAP) e auxina (ANA). Portanto, a suplementação do meio MS com 1 mg.L<sup>-1</sup> BAP associado a 2 mg.L<sup>-1</sup> de ANA proporcionou maior comprimento médio das brotações (2,6 cm) (Tabela 1).

Hu & Wang (1986), relatam que a auxina na multiplicação parece anular o efeito inibitório que as citocininas têm sobre o alongamento das culturas. Foi verificado, por exemplo, que nos meios de multiplicação de diversos clones de *Eucalyptus*, contendo citocinina, as partes aéreas se alongaram com a adição de AIA ou AIB. Com o mesmo objetivo, uma auxina pode ser utilizada para estimular o enraizamento do explante inicial e a manutenção de um caule único com dominância apical num sistema onde novos segmentos nodais sejam desejados como forma de multiplicação (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

Na figura 3A observa-se o número médio das brotações em três épocas diferentes de cultivo *in vitro* (30, 60 e 90 dias), mostrando diferenças estatísticas significativas entre as épocas em todos os tratamentos. Porém, após 90 dias de cultivo obteve-se a maior proliferação de brotos/explantes para todos os tratamentos utilizados.

O comprimento médio das brotações ao longo do tempo observado, não mostrou diferenças estatísticas entre as épocas (30, 60 e 90 dias) indicando que, o aumento do número médio das brotações, nos explantes, manteve o comprimento médio dos mesmos constante nas diferentes épocas (Figura 3B).

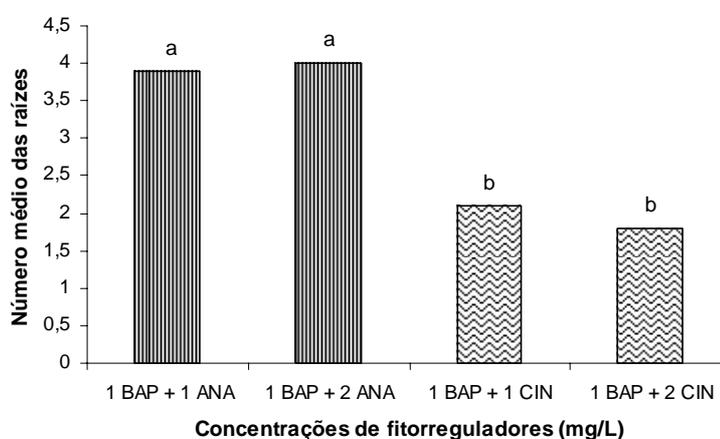


**Figura 3:** Número médio (A) e comprimento médio (B) das brotações de *Etilingera elatior* cv. Red Torch emitidos por explantes iniciais aos 30, 60 e 90 dias de cultivo *in vitro* nos diferentes tratamentos. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (5%).

O número médio das raízes aumentou significativamente nos tratamentos combinados com citocinina (BAP) e auxina (ANA), sendo o tratamento que mais favoreceu ao enraizamento com  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  BAP +  $2 \text{ mg.L}^{-1}$  ANA apresentando média de 4 raízes/explante (Figura 4). A maior quantidade de raízes nos explantes surge de uma combinação equilibrada de auxinas e

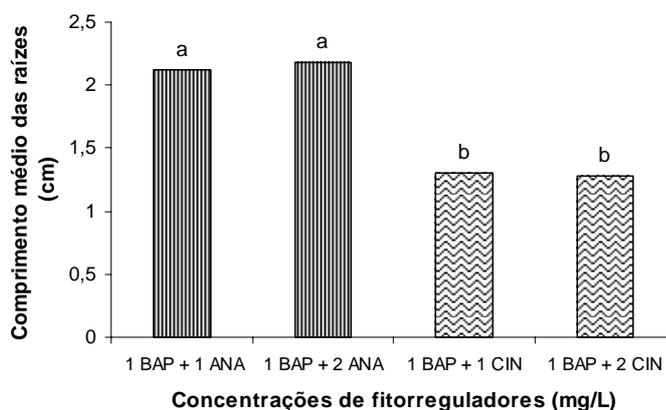
citocininas, principalmente quando prevalece o efeito estimulante das primeiras (CALDAS et al., 1998; GEORGE, 1993)

Tem sido demonstrado que um aspecto importante no enraizamento *in vitro* é a composição dos meios de multiplicação prévia a que foram submetidos os explantes (ASSIS & TEIXEIRA, 1998). Explantes oriundos de meios de multiplicação com mais citocininas, em geral necessitam de um balanço de reguladores que favoreça mais as auxinas do que as citocininas (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).



**Figura 4:** Efeito da adição de fitorreguladores no número médio das raízes de *Etlingera elatior* cv. Red Torch, ao longo de 90 dias de cultivo *in vitro*.

O comprimento médio das raízes também foi favorecido pelo mesmo tratamento que favoreceu o seu número (1 mg.L<sup>-1</sup> BAP + 2 mg.L<sup>-1</sup> ANA) apresentando o dobro do comprimento médio dos explantes dos outros tratamentos após 90 dias de cultivo (Figura 5). Borthakur et al., (1999), trabalhando com a micropropagação *Alpinia galanga*, espécie de Zingiberaceae, suplementou o meio de cultura MS com diversas combinações ou isolados dos reguladores de crescimento BAP, ANA e CIN, e verificou um maior comprimento das raízes (4,5 cm) ao utilizar o meio isolado de 3 mg.L<sup>-1</sup> de CIN.



**Figura 5:** Efeito da adição de fitorreguladores no comprimento médio das raízes (cm) de *Etilingera elatior* cv. Red Torch, ao longo de 90 dias de cultivo *in vitro*.

A maior taxa de multiplicação *in vitro* observada nesse trabalho, de 10,04 brotos após 90 dias, pode ser considerada um bom avanço para a micropropagação dessa espécie, sendo compatível com resultados obtidos com outras plantas da mesma família (Zingiberaceae) ou famílias relacionadas (Heliconiaceae, Musaceae, Costaceae).

A aclimatização das microplantas após 30 dias em telado apresentaram uma taxa de pegamento de 82%, sendo que, após 60 dias, as mudas sobreviventes apresentavam-se desenvolvidas o bastante (cerca de 20 cm de comprimento) com sistema radicular abundante para serem transferidas para o campo.

## CONCLUSÕES

1. É possível estabelecer plantas *in vitro* com a utilização de embriões isolados de sementes, de *Etlingera elatior* cv Red Torch cultivados em meio de cultura na presença de até 2 mg.L<sup>-1</sup> de BAP;

2. A germinação de embriões isolados é superior à germinação de sementes, sendo recomendada para iniciar culturas *in vitro* de *Etlingera elatior* cv. Red Torch;

3. A utilização do meio de cultura MS enriquecido com 1 mg.L<sup>-1</sup> BAP + 2 mg.L<sup>-1</sup> CIN, proporciona alta taxa de multiplicação na espécie *Etlingera elatior* cv. Red Torch, cultivada *in vitro*;

4. O maior número e comprimento médio de raízes, em plântulas de *Etlingera elatior* cv. Red Torch cultivadas *in vitro* são obtidos com o meio MS suplementado com 1 mg.L<sup>-1</sup> BAP+2 mg/L<sup>-1</sup> ANA;

## AGRADECIMENTOS

À CAPES pela concessão da bolsa à primeira autora e à Sra. Lizete Monteiro, produtora de flores tropicais, pela doação de frutos de bastão do imperador para a retirada das sementes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSIS, T. F. e TEIXEIRA, S. L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A. Carlos, CALDAS, L. S., BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA/CBAB. v.1, 1998, p.87-132.

BORTHAKUR, M.; HAZARIKA, J.; SINGH, R.S. A protocol for micropropagation of *Alpinia galanga*. **Plant cell, tissue and organ culture**. v. 55, 1999, p. 231-233. Disponível em: <<http://www.periodicos.capes.gov.br/>>. Acesso em: 12 dez. 2006.

CALDAS, L. S., HARIDASSAN, P., FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. Carlos, CALDAS, L. S., BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA/CBAB. v.1, 1998, p.87-132.

CASTRO, C. E. F. **Heliconia para exportação**: aspectos técnicos da produção. Brasília: MAARA-SDR- FRUPEX/ISPI. (FRUPEX. Publicações Técnicas, 16). 1995

CASTRO, C.E.F. **Curso**: Técnicas de cultivo de flores tropicais. 1998.

CHAGAS, A. J. da C. **Floricultura tropical na zona da mata de Pernambuco**. Recife, SEBRAE, 2000. 24 p.

DUVAL, F.G. Cultura de embrião e anatomia do desenvolvimento de embrião zigótico de *heliconia rostrata*. 2004. **CAPES- Banco de teses**. Universidade de Brasília.

GEORGE, E.F., **Plant propagation by tissue culture**. The technology. Exegetics Limited., London. 1993. 574p.

GRATTAPAGLIA, D., MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C., CALDAS, L. S., BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA/CBAB. v.1. 1998 p.183-260.

HU, C. Y.; FERREIRA, A.G. Cultura de embriões. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA/CBAB. v.1, 1998, p.261-296.

HU, C.Y.; WANG, P. Embryo Culture: Technique and applications. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.A.; AMIRATO, P.V. ed. **Handbook of plant cell culture**. New york: Macmillan, 1986. v.4, p. 43-96.

LAMAS,A.M. **Floricultura tropical**: Técnicas de cultivo. Recife: SEBRAE/PE, 2002. 88p.

LOC, N.H.; DUC, D.T.; KWON, T.H.; YANG, M. S. Micropropagation of Zedoary (*Curcuma zedoaria* Roscoe) – a valuable medicinal plant. **Plant cell, tissue and organ culture**. v. 81, 2005. Disponível em: <<http://www.periodicos.capes.gov.br/>>. Acesso em: 18 Jan. 2007.

LOGES, V.; SOUZA, J.W.O.; PINHEIRO, P.G.L.; CASTRO, A.C. R. de; LIRA JUNIOR, M. A. Desenvolvimento de inflorescências de *Etlingera elatior*, *Tapeinochilos ananasseae* e *Zingiber spectabilis*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 14. CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS, 1. Lavras, 2003. **Anais...** Lavras: UFLA/FAEPE, 2003. p. 395.

MELLO, M. O.; AMARAL, A. F. C. MELO, M. Quantifying the micropropagation of *Curcuma zedoaria* Roscoe. **Scientia Agricola**. v. 57, n. 4, 2000, p.703-707. Disponível em: <<http://www.informaçãoesociedade.ufpb.br/>>. Acesso em: 26 Jan. 2007.

MURASHIGE., T.; SKOOG, F. A Revised Médium for Rapid Growth and Bioassays With Tabacco Tissue Culture. **Physiologia Plantarum**, v.15, p. 437-497, 1962.

RAGHAVAN, V. Embryo culture. **Internantional Revision Cytology**, n.11. 1980. p.209-240.

RODRIGUES, P.H.V. *In vitro* establishment of *Heliconia rauliniana* (Heliconiaceae). **Scientia Agricola**. v. 62, n. 1. 2005. Piracicaba. Disponível em: <<http://www.periodicos.capes.gov.br/>>. Acesso em: 28 nov. 2006.

SHARMA, T. R.; SINGH, B. M. High- frequency *in vitro* multiplication of disease-free *Zingiber officinale* Rosc. **Plant Cell, Report**, v.17, p. 68-72, 1997. Disponível em: <<http://www.periodicos.capes.gov.br/>>. Acesso em: 26 Jan. 2006.

TORRES, A.C., DUVAL, F.D.; RIBEIRO, D.G.; BARROS, A. F. F.; ARAGÃO, F.A.D. Efeito da sacarose, cinetina, isopentenil, adenina e zeatina no desenvolvimento de embriões de *Heliconia rostrata in vitro*. **Horticultura Brasileira**. v. 23 n.3, 2005. Disponível em: <<http://www.periodicos.capes.gov.br/>>. Acesso em: 14 out. 2006.

WILLADINO, L.; CÂMARA, T. **Cultura de tecidos vegetais**: Cultivo *in vitro* de vegetais. Disponível em: <<http://www.ufrpe.br/>>. Acesso em: 14 Mar. 2006.

## **CAPITULO IV**

### **Micropropagação de *Etilingera elatior* (Jack) R.M. Smith sob Diferentes Concentrações de 6-benzilaminopurina<sup>1</sup>**

### **Micropropagation of *Etilingera elatior* (Jack) R.M. Smith under Different Concentrations of 6-benzinaminopurine <sup>1</sup>**

<sup>2</sup>JAQUELINE FIGUEREDO DE OLIVEIRA; <sup>3</sup>EURICO EDUARDO PINTO DE LEMOS;

<sup>3</sup>LEILA DE PAULA REZENDE

---

<sup>1</sup> Parte da dissertação de mestrado da primeira autora; <sup>2</sup>Aluna do curso de Mestrado em Produção Vegetal/UFAL (Bolsista CAPES), [jaquelinefigueredo@hotmail.com](mailto:jaquelinefigueredo@hotmail.com); <sup>3</sup>Professores do centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas, [eepl@uol.com.br](mailto:eepl@uol.com.br); [leilarezende02@hotmail.com](mailto:leilarezende02@hotmail.com)

## RESUMO

O bastão do imperador (*Etlingera elatior*) é uma flor tropical que vem sendo cultivada no Nordeste principalmente nos estados de Pernambuco e Alagoas, que exportam para outros países e estados brasileiros. Um grande problema para o seu cultivo está na produção de mudas, que, feita convencionalmente por divisão de touceiras, acarreta elevados custos e problemas fitossanitários. Este trabalho teve por objetivo avaliar o potencial multiplicativo *in vitro* e a aclimatação do bastão do imperador. O material vegetal utilizado para realização dos experimentos foram plântulas de *Etlingera elatior* cv. Red Torch, oriundas de sementes germinadas *in vitro*. As plântulas individualizadas, com cerca de 2 cm, foram cultivadas no meio de cultura MS básico, enriquecido com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e 0, 1, 2 e 3 mg.L<sup>-1</sup> de 6-benzilaminopurina (BAP). Os resultados mostraram que plantas produziram em média o maior número de brotos (7,86) em meio de cultura com 3 mg.L<sup>-1</sup> BAP. Na ausência do regulador de crescimento os explantes apresentaram maior comprimento médio das brotações, maior número e comprimento das raízes. Durante a aclimatação das plântulas em casa de vegetação obteve-se uma taxa de pegamento superior a 80%, as quais estavam prontas para serem transferidas para o campo aos 60 dias.

**Palavras-chave:** bastão do imperador, reguladores de crescimento, aclimatação.

**ABSTRACT**

*Etlingera elatior* is a tropical flower plant that has been cultivated in Northeast Brazil in the states of Pernambuco and Alagoas, that exports to other countries and Brazilian states. A considerable problem for this activity is the seedlings production that, made as a rule by bunch division, increase the production costs and can disseminate disease problems. This work had the objective to evaluate the *in vitro* multiplication potential and the acclimatization of the micropropagated *Etlingera elatior* cv. Red Torch. The started plant material used for the experiments was plants of *Etlingera elatior* cv. Red Torch, originated from *in vitro* germinated seeds. The plants with about 2 cm were placed on a basic Murashige and Skoog (MS) medium enriched with 30 g.L<sup>-1</sup> of sucrose and 0, 1, 2 or 3 mg.L<sup>-1</sup> of 6-benzilaminopurine (BAP). The results showed that the explants produced the highest number of sprouts (7,86) when placed on a MS medium culture enriched with 3 mg.L<sup>-1</sup> BAP. In the absence of the BAP the explants presented the highest length of the sprouts, and the highest number and length of the roots. The acclimatization rate of the explants in a glasshouse was superior to 80%, and the seedlings were ready to be transferred to the field after 60 days.

**Index terms:** tropical flower, citocinin, propagation.

## INTRODUÇÃO

*Etilingera elatior* (Jack) R.M. Smith, é uma flor tropical pertencente à família Zingiberaceae conhecida por bastão do imperador (LAMAS, 2002). O gênero *Etilingera* inclui várias espécies, geralmente com inflorescências belas e vistosas em diferentes tonalidades (LAMAS, 2005).

Várias espécies da família Zingiberaceae utilizadas principalmente como medicamentos e temperos já foram propagadas *in vitro*, tais como, *Curcuma zedoaria* Roscoe (MELLO et al., 2000; LOC et al., 2005), *Alpinia galanga* Willd (BORTHAKUR et al., 1999), *Kaempferia galanga* (SHIRIN et al., 2000); *Zingiber officinale* (DEBIASI et al., 2004; ROUT et al., 2001). Todavia, estudos para micropropagação de *Etilingera elatior* ainda não são conhecidos na literatura.

Um dos grandes problemas das flores tropicais, inclusive do bastão do imperador, está relacionado com a produção de mudas, usualmente feita através da propagação vegetativa por rizomas que são estruturas subterrâneas (LAMAS, 2002). Convencionalmente, os produtores propagam suas próprias mudas ou as adquirem de outros produtores com pouco ou nenhum cuidado em relação à sanidade do material vegetal. Esta prática tem acarretado a disseminação de algumas pragas e doenças importantes que, a cada ciclo da cultura, são transmitidas entre plantios sucessivos.

A micropropagação tem sido uma ferramenta importante para propagar com segurança várias espécies vegetais, inclusive flores tropicais (MELLO et al., 2000). Através do isolamento de meristemas, embriões, ápices caulinares e outras estruturas pode-se multiplicar plantas com risco muito menor de se estar também multiplicando patógenos tais como, nematóides, fungos, bactérias, vírus etc (ROGALSKI et al., 2003). Para se ter maior segurança na multiplicação do material livre de patógenos, pode-se associar a micropropagação ao tratamento inicial do explante com técnicas do tipo tratamento térmico, imersão em fungicida, antibiótico, exposição à luz ultravioleta, etc. (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

A aclimatação é um passo importante na sobrevivência das plantas micropropagadas. Durante o crescimento *in vitro*, as plantas se desenvolvem em condições heterotróficas e relativamente controladas, incluindo ambientes fechados, sem trocas gasosas, com elevada umidade do ar, baixa intensidade luminosa, e o uso de açúcares do meio como uma fonte de

carbono e energia (SCIUTTI & MORINI, 1993; POSPÍSILOVÁ et al., 1999). A seleção de um substrato satisfatório para aclimatação pode ser decisiva para o rápido retorno das plantas micropropagadas à condição autotrófica e ao crescimento vigoroso (HOFFMANN et al., 2001; SILVA et al., 2003).

Este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito da adição de diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) ao meio de cultura, na multiplicação *in vitro* de *Etilingera elatior* (Jack) R.M. Smith e avaliar a aclimatação das plântulas.

## METODOLOGIA

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia Vegetal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas, em Rio Largo estado de Alagoas.

**Obtenção dos explantes:** Frutos maduros de *Etlingera elatior* var. Red Torch, provenientes plantio comercial na Fazenda Monteiro no município de Messias, Alagoas, foram mergulhados em solução de hipoclorito de sódio a 0,2% por 30 minutos e em seguida lavados com água corrente por 1 minuto.

As sementes foram retiradas dos frutos e despulpadas em uma peneira sob água corrente até a retirada total da mucilagem e levadas para a câmara de fluxo laminar onde se realizou a desinfestação de acordo com a seguinte seqüência: 1) lavagem em 1L de água destilada com 3 gotas de detergente comum por 10 minutos; 2) lavagem por 10 minutos em fungicida tiofanato metílico (Cercobim 700 PM) a 2 g L<sup>-1</sup>; 3) lavagem por 1 minuto em álcool 70% (v/v); 4) lavagem por 30 minutos em solução de hipoclorito de sódio a 0,6%, juntamente com 2 gotas do detergente Tween 80. Ao final de cada etapa, as sementes receberam três enxágües em água estéril.

As sementes foram postas para germinar em papel de filtro umedecido dentro de placas de Petri esterilizadas em autoclave. As sementes germinadas nas placas foram transferidas para frascos contendo 30 mL do meio de cultura básico de MS enriquecido com 3 mg.L<sup>-1</sup> de BAP. A cada período de 30 dias, os explantes eram repicados até a obtenção de uma quantidade suficiente para o início do experimento de multiplicação.

**Experimento de multiplicação:** Os explantes obtidos na fase anterior foram submetidos a um experimento de multiplicação em meio de cultura básico de MS enriquecido com 0; 1; 2 e 3 mg.L<sup>-1</sup> de BAP e repicados a cada 30 dias.

A cada 15 dias, durante 90 dias, avaliou-se o número de brotações emitidas por explante e o comprimento dessas brotações, por serem indicativos da potencialidade de multiplicação. Foram ainda avaliados o número e o comprimento das raízes por explante, por serem fatores importantes na aclimatação dos explantes.

O experimento foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado com 4 tratamentos e 5 repetições, sendo cada repetição representada por cinco frascos contendo um único explante. Os resultados foram submetidos à análise de variâncias e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Foi utilizado o

programa estatístico SISVAR-Sistema de análise de variância para dados balanceados. Todas as fases do presente estudo, foram conduzidas em câmara de crescimento sob intensidade luminosa de cerca de  $50 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , proveniente de lâmpadas frias Philips TDL. O fotoperíodo utilizado de 16 horas e a temperatura foi ajustada para  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ .

Para a aclimação do material, foram selecionadas 80 microplantas com cerca de 3 cm enraizadas *in vitro*, independente do tratamento utilizado, as quais tiveram suas raízes lavadas em água corrente para a completa remoção do meio de cultura aderido, sendo, em seguida, plantadas em copos descartáveis com capacidade para 200 mL, contendo uma mistura de pó de fibra de coco + terra de encosta + torta de filtro nas proporções de 1:2:1. Os copos com as plantas foram mantidos em bandejas envolvidas com sacolas plásticas durante 15 dias para formar uma câmara úmida. Após esse período, os copos com as plântulas foram levados para um telado com 70% de sombreamento e irrigados diariamente por microaspersão. Após 30 dias da retirada das plantas dos frascos, foram avaliadas a porcentagem de plantas vivas e a altura das plantas.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após 90 dias de cultivo *in vitro* foram observadas diferenças significativas no número de brotações dos explantes na presença das diferentes concentrações de BAP testadas, observando-se elevadas taxas de produção mensal de brotos. No entanto, a adição da concentração mais elevada de BAP (3 mg.L<sup>-1</sup>) determinou uma maior produção de brotos (Tabela 1).

Os resultados mostraram que a espécie *Etilingera elatior* cv. Red Torch possui um elevado potencial para multiplicação *in vitro*, maior do que outras espécies da mesma família Zingiberaceae, tais como *Curcuma* spp. e *Zingiber officinale*, que apresentaram média de 4 novos brotos por explante, em meio de cultura MS + 3 mg.L<sup>-1</sup> de BAP (BALACHANDRAN et al., 1990).

Borthakur et al. (1999) ao suplementarem o meio de cultura MS com 2 mg.L<sup>-1</sup> de BAP obtiveram uma média de 3,3 brotos/explante na micropropagação de *Alpinia galanga*. Debiasi et al. (2004), ao utilizar o meio de cultura MS sem reguladores de crescimento e com 1 mg.L<sup>-1</sup> de BAP em *Zingiber officinale*, obtiveram média de 4,1 e 4,2 novos brotos, respectivamente. Miachir et al. (2004) trabalhando com *Curcuma zedoria* obtiveram de multiplicação média *in vitro* de 2,3 novos brotos/mês, após 30 dias de cultivo, utilizando 2 mg.L<sup>-1</sup> de BAP em meio de cultura MS.

O papel estimulante das citocininas na divisão celular em sistemas de cultura de tecidos é bastante conhecido (TAIZ & ZEIGER, 2004). O BAP tem se destacado entre as citocininas pela sua eficiência em induzir a formação de grande número de brotos e elevadas taxas de multiplicação em várias espécies de plantas e por isso tem sido mais utilizado em trabalhos de multiplicação *in vitro* do que outras citocininas (CALDAS et al., 1998; GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

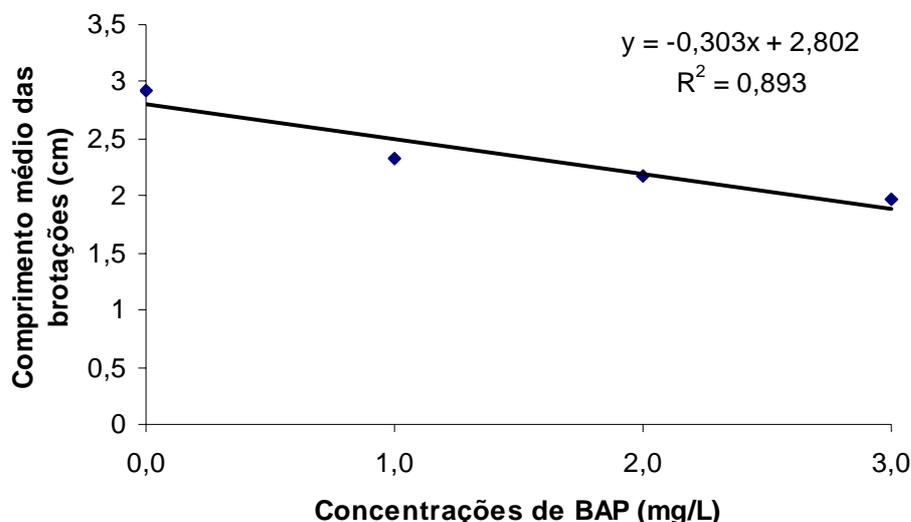
**Tabela 1:** Efeito do BAP, no número e comprimento médio das brotações (cm) e na taxa de multiplicação de *Etilingera elatior* cv. Red torch, aos 90 dias de cultivo *in vitro*.

Concentrações de BAP (mg.L <sup>-1</sup> )	Número médio das brotações	Comprimento médio das brotações (cm)	Taxa de multiplicação*
0	4,28 c	2,93 a	9,08
1	5,60 b	2,32 b	14,6
2	5,72 b	2,17 bc	14,88
3	7,86 a	1,97 c	20,2
CV (%)	17,28	13,28	

Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem significativamente pelo teste de Tukey (5%).\* Número final de explantes produzidos/número de explantes introduzidos.

O comprimento médio das brotações produzidos por *Etilingera elatior* foi significativamente superior nas concentrações mais baixas de BAP (Tabela 1). Observou-se que à medida que se aumentou a concentração de BAP no meio de cultivo, houve redução no comprimento médio dos brotos (Figura 1). Debiasi et al. (2004), também obtiveram maior comprimento de brotações, ao cultivar *Zingiber officinale* em meio de cultura MS desprovido de reguladores de crescimento. Esse fato tem sido relacionado diretamente à conhecida capacidade das citocininas em promoverem muitas brotações na parte aérea em detrimento do alongamento. Lemos et al. (2001), cultivando clones de banana cv. Terra (*Musa*), observaram que o comprimento médio do pseudocaule dos explantes cultivados no meio de cultura sem reguladores de crescimento foi maior do que o daqueles explantes cultivados em meio com BAP.

Debiasi et al. (2004), depois de observações realizadas na micropropagação de *Zingiber officinale*, relatam que o comprimento médio das brotações micropropagadas é inversamente proporcional à taxa proliferativa, ou seja, quanto maior a altura média, menor será o número médio de brotos formados. Esta informação é confirmada neste trabalho, já que as maiores médias em altura, dos novos brotos emitidos, foram verificadas no meio de cultura MS desprovido de reguladores de crescimento, com menores taxas proliferativas.

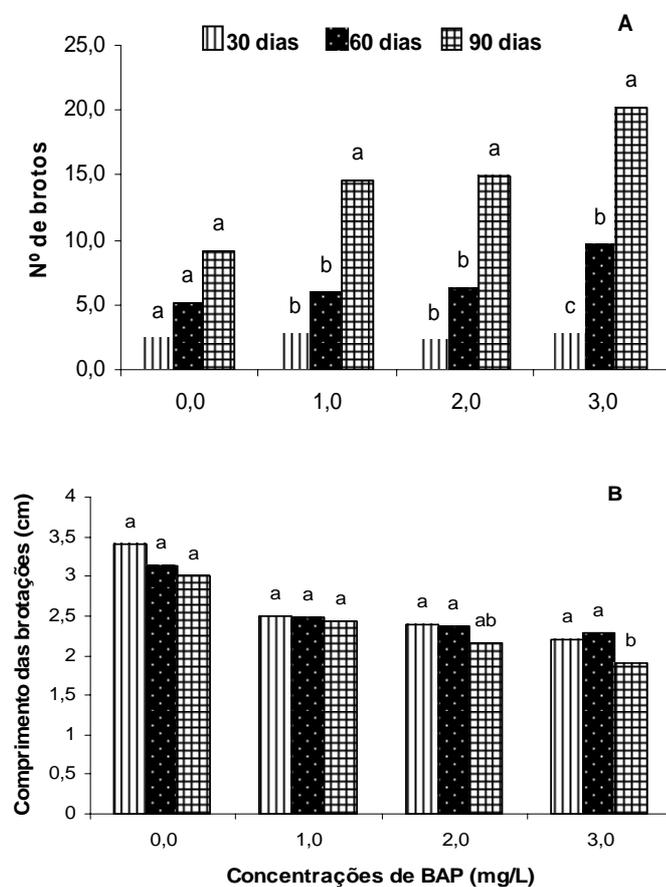


**Figura 1:** Efeito de diferentes concentrações de BAP no comprimento médio das brotações (cm) de *Etilingera elatior* cv. Red Torch aos 90 dias de cultivo.

A taxa das brotações mostrou diferenças estatísticas significativas entre as épocas (30, 60 e 90 dias) para os tratamentos que continham BAP (Figura 2A), mostrando que a adição desse regulador de crescimento ao meio nas concentrações utilizadas estimulou, de fato, o aparecimento de novas brotações.

Essa taxa praticamente duplicou a cada 30 dias, principalmente nos tratamentos com BAP entre 60 e 90 dias, chegando a apresentar cerca de 20 brotos por explante ao final de 90 dias no tratamento com 3 mg.L<sup>-1</sup> de BAP (Figura 2A). No tratamento desprovido de BAP o número aumentou a cada mês, mas a taxa de multiplicação dos brotos permaneceu constante (Figura 2B). Debiasi et al. (2004) trabalhando com *Zingiber officinale* observou que a taxa de brotação não apresentou diferenças estatísticas entre as épocas (15 e 30 dias) de cultivo *in vitro* entre os tratamentos.

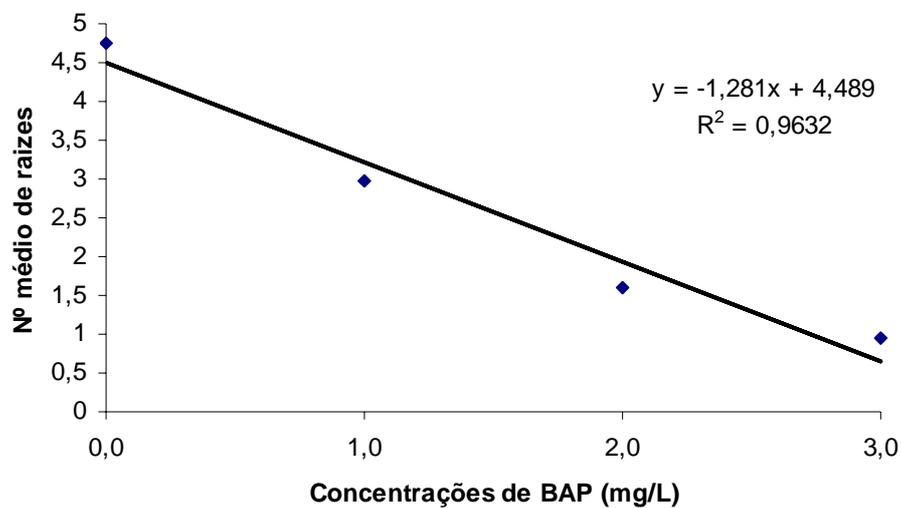
O comprimento médio das brotações variou significativamente entre os tratamentos, principalmente entre os extremos sem BAP e 3 mg.L<sup>-1</sup> de BAP, mas não entre as épocas dentro de cada tratamento (Figura 2B). Todavia, a redução média no comprimento de cerca de 1 cm entre os brotos que mais alongaram (2,93 cm) e os que menos alongaram (1,97 cm) não prejudicou a viabilidade dos menores como potencial multiplicativo para os explantes.



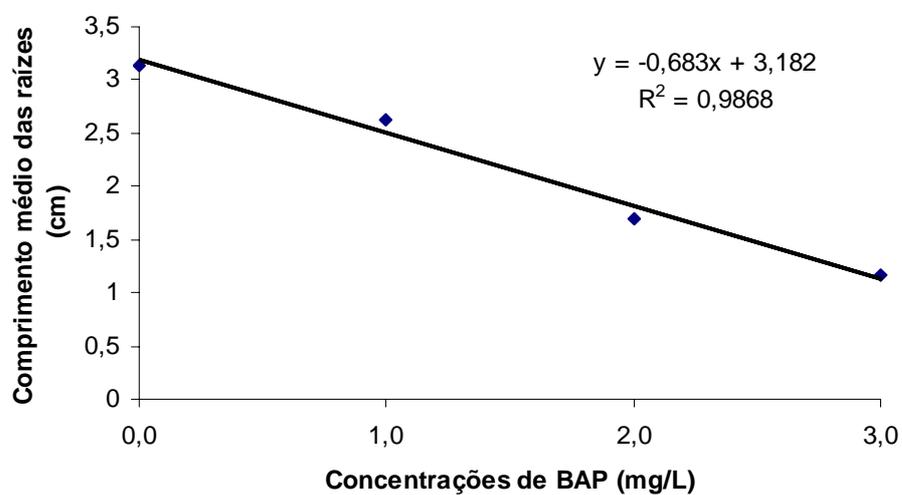
**Figura 2:** Número médio (A) e comprimento médio (B) das brotações de *Etlingera elatior* cv. Red Torch emitidos por explantes iniciais aos 30, 60 e 90 dias de cultivo *in vitro* nos diferentes tratamentos. Médias seguidas da mesma letra dentro dos tratamentos não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (5%).

A produção de raízes nos explantes seguiu os padrões esperados para a maioria das espécies cultivadas *in vitro*. Explantes em meio de cultura MS desprovido de reguladores de crescimento mostraram-se capazes de produzir o maior número (4,75) e comprimento médio das raízes (3,14cm) em relação aos meios com diferentes concentrações de BAP (Figuras 3 e 4). Resultados semelhantes no número de raízes podem ser observados em trabalho realizado por Borthakur et al. (1999) para *Alpinia galanga* (3,1 raízes por explante). Os resultados aqui obtidos confirmam o efeito indutor de brotações da citocinina (BAP) e inibidor do alongamento de brotos

e de raízes em um número significativo de espécies (COSTA et al., 2006; CANTAGALLO et al., 2005).



**Figura 3:** Efeito de diferentes concentrações de BAP no número médio das raízes de *Etilingera elatior* cv. Red Torch, aos 90 dias de cultivo.



**Figura 4:** Efeito de diferentes concentrações de BAP no comprimento médio das raízes (cm) de *Etilingera elatior* cv. Red Torch, aos 90 dias de cultivo.

As microplantas retiradas dos frascos de cultura com cerca de 3 cm de comprimento e levadas para a aclimação em casa de vegetação apresentaram índice de pegamento e adaptação superior a 80%. Após 30 dias de cultivo *ex vitro* as plantas mostravam comprimento médio de 8,64 cm e após 60 dias as plantas dobraram de tamanho e estavam prontas para serem transferidas para o campo.

## **CONCLUSÕES**

A taxa de multiplicação obtida nesse trabalho, foi suficientemente elevada para viabilizar uma produção em larga escala de mudas micropropagadas de *Etlingera elatior* cv. Red Torch.

A aclimatação das plantas micropropagadas de *Etlingera elatior* cv. Red Torch é um procedimento relativamente simples, com elevado índice de pegamento, o que contribui para o estabelecimento de uma rotina de micropropagação nessa espécie.

## **AGRADECIMENTOS**

A CAPES pela concessão da bolsa ao primeiro autor e a Sra. Lizete Monteiro, produtora de flores tropicais, pela disponibilização do material vegetal.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALACHANDRAN, S.M.; BHAT, S.R.; CHANDEL, K.P.S. In vitro clonal multiplication of turmeric (*Curcuma* spp.) and ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). **Plant Cell Reports**. v. 8, n 9, 1990, p. 521-524. Disponível em: <<http://www.periodicos.capes.gov.br/>>. Acesso em: 28 nov. 2006.

BORTHAKUR, M.; HAZARIKA, J.; SINGH, R.S. A protocol for micropropagation of *Alpinia galanga*. **Plant cell, tissue and organ culture**. v. 55, 1999, p. 231-233. Disponível em: <<http://www.periodicos.capes.gov.br/>>. Acesso em: 12 dez. 2006.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios Nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA/CBAB. 1998. p.261-296.

CANTAGALLO, F.S.; AZEVEDO, F.A.; SCHINOR, E.H.; MORÃO FILHO, F.A.A.; MENDES, B.M.J. Micropropagação de citrumelo “Swingle” pelo cultivo *in vitro* de gemas axilares. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. 27, n.1, 2005. p.136-138.

COSTA, F.H.S.; PEREIRA, J.E.S.; PEREIRA, M. A.A.; OLIVEIRA, J.P. Efeito da interação entre carvão ativado e n<sup>6</sup>-Benzilaminopurina na micropropagação *in vitro* de bananeira, cv. grand naine (AAA). **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. 28, n.2, 2006. p.280-283.

DEBIASI, C.; FELTRIN, F.; MICHELUZZI, F. de C. Micropropagação de gengibre (*Zingiber officinale*). **Revista Brasileira Agrociência**, v. 10, n.1, p 61-65, 2004. Disponível em: <<http://www.periodicos.capes.gov.br/>>. Acesso em: 24 set. 2006.

GRATTAPAGLIA, D., MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C., CALDAS, L. S., BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA/CBAB. v. 1. 1998 p.183-260.

HOFFMANN, A.; PASQUAL, M.; CHALFUN, N.N.J.; FRÁGUAS, C.B. Efeito de substratos na aclimatização de plantas micropropagadas do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido'. **Ciência Agrotecnológica**, v.25, p.462-467, 2001. Disponível em: <<http://www.periodicos.capes.gov.br/>>. Acesso em: 28 nov. 2006.

LAMAS, A.M. **Floricultura tropical**: Técnicas de cultivo. Recife: SEBRAE/PE, 2002. 88p.

LAMAS, A. M. Curso: **Agente de desenvolvimento rural**: Tecnologia de Produção e Pós-colheita. Maceió-Alagoas, junho, 2005, 76p.

LOC, N.H.; DUC, D.T.; KWON, T.H.; YANG, M. S. Micropropagation of Zedoary (*Curcuma zedoaria* Roscoe) – a valuable medicinal plant. **Plant cell, tissue and organ culture**. v. 81, 2005. Disponível em: <<http://www.periodicos.capes.gov.br/>>. Acesso em: 18 Jan. 2007.

LE MOS, E.P.L.; FERREIRA, M. S., ALENCAR, L.M. C., OLIVEIRA, J.G.L., MAGALHÃES.V.S. Micropropagação de clones de Banana cv. Terra em biorreator de imersão temporária. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal-SP. v. 23, n.3, p.482-487. Dezembro, 2001.

MELLO, M. O.; AMARAL, A. F. C. MELO, M. Quantifying the micropropagation of *Curcuma zedoaria* Roscoe. **Scientia Agricola**. v. 57, n. 4, 2000, p.703-707. Disponível em: <<http://www.periodicos.capes.gov.br/>>. Acesso em: 28 nov. 2006.

MIACHIR, J. I.; MELO, M.; CROCOMO, O. J. ; ROMANI, V. L. M.; AMARAL, A. F. C. . Micropropagation and callogenesis of *Curcuma zedoaria* Roscoe. **Scientia Agricola**, Piracicaba - SP., v. 61, n. 4, p. 427-432, 2004. Disponível em: <<http://www.periodicos.capes.gov.br/>>. Acesso em: 28 nov. 2006.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised médium for rapid growth and bioassays with tabacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v.15, 1962. p. 437-497.

POSPÍŠILOVÁ, J.; TICHÁ, I.; KADLECEK, P.; HAISEL, D.; PLZÁKOVÁ, S. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. **Biologia Plantarum**, v.42, 1999. p.481-497.

Disponível em: <<http://www.periodicos.capes.gov.br/>>. Acesso em: 18 Jan. 2007.

ROGALSKI, M.; GUERRA, M.P.; SILVA, A. da S. Multiplicação *in vitro* da ameixeira ‘Santa Rosa’: efeito da citocinina BAP. **Revista Brasileira Fruticultura**. v.25. n.2. Jaboticabal, 2003.

ROUT, G. R. PALAI, S.K. and DAS P. Onset of *in vitro* rhizogenesis response and peroxidase activity in *Zingiber officinale* (Zingiberaceae). **Biologia Tropical**. v. 49. n. 3-4. 2001. Disponível em: <<http://www.periodicos.capes.gov.br/>>. Acesso em: 31 Jan. 2007.

SCIUTTI, R.; MORINI, S. Effect of relative humidity in *in vitro* culture on some growth characteristics of a plum rootstock during shoot proliferation and rooting and on plantlet survival. **Advances in Horticultural Science**, v.7, 1993. p.153-156. Disponível em: <<http://www.periodicos.capes.gov.br/>>. Acesso em: 12 fev. 2007.

SHIRIN, F.; KUMAR, S.; MISHRA, Y. *In vitro* plantlet production system for *Kaempferia galanga*, a rare Indian medicinal herb. **Plant cell, tissue and organ culture**. n. 63. 2000. p.193-197. Disponível em: <<http://www.periodicos.capes.gov.br/>>. Acesso em: 28 nov. 2006.

SILVA, A.B.; PASQUAL, M.; MACIEL, A.L.R.; DUTRA, L.F. BAP e substrato na aclimatização de plântulas de gloxínia (*Sinningia speciosa* Lood. Hiern.) provenientes de cultura de tecidos. **Ciência Agrotecnológica**, v.27, p.255-260, 2003. Disponível em: <<http://www.periodicos.capes.gov.br/>>. Acesso em: 06 dez.. 2006.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Trad. Eliane Romanato Santarém et al., 3 ed., Porto Alegre: Artmed, 2004. 718 p.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os métodos de cultura de tecidos vegetais utilizados neste estudo possibilitaram a obtenção de um protocolo para a micropropagação de bastão do imperador (*Etlingera elatior* R.M. Smith). Este protocolo permite a produção de mudas *in vitro*, em larga escala, livres de pragas e doenças. Diante dos resultados obtidos, há necessidade de mais estudos sobre a germinação e o desenvolvimento de embriões a serem utilizados como explantes, visto que houve uma baixa porcentagem de germinação das sementes e dos embriões introduzidos.

A dificuldade de obtenção de frutos e sementes viáveis das variedades desta espécie é um fator limitante para a micropropagação, pois só foi possível a introdução de sementes da cultivar Red Torch, sendo necessários estudos relacionados à biologia floral, uma vez que verificou-se uma baixíssima produção de frutos principalmente nas cultivares Pink Torch e Porcelana e ainda a não germinação das sementes. Sendo descartada a hipótese da inviabilidade dos grãos de pólen, é possível que a baixa produção de frutos nessa espécie seja função do atrofiamento do ovário da maioria das flores ou da incompatibilidade fisiológica entre as cultivares, o que poderia levar à não germinação do grão de pólen sobre a superfície do estigma, ou isso somente acontecer sob condições muito particulares.

Assim, o início de um programa de melhoramento e o estabelecimento de cruzamentos intervarietais terá que esperar por novos estudos que identifiquem com precisão as causas dessa incompatibilidade natural. Todavia, o potencial econômico da espécie é enorme face ao grande desenvolvimento da floricultura tropical no Nordeste, sobretudo em Alagoas.

Com o protocolo de micropropagação dessa espécie descrito nesse trabalho, o tempo entre o surgimento de uma nova cultivar e o seu efetivo cultivo em escala comercial poderá ser significativamente reduzido. Considerando a taxa de multiplicação obtida, estima-se que mais de 50 mil mudas podem ser obtidas anualmente a partir de cada explante introduzido. Além disso, a garantia de que tais mudas serão livres de pragas e doenças darão maior longevidade, dinamismo, qualidade e rentabilidade aos plantios e, conseqüentemente, aos produtores.