

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Indução de Poliploidia *in vitro* com aplicação de
colchicina em *Heliconia bihai* (L) L.**

RECIFE

2011

Indução de Poliploidia *in vitro* com aplicação de colchicina em *Heliconia bihai* (L) L.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de mestre.

Aluno: Giovani José Feitosa Cavalcanti Filho

Orientadora: Prof^ª Dr^a Ana Maria Benko Iseppon

Coorientadora: Prof^ª Dr^a Ana Christina Brasileiro Vidal

RECIFE

2011

Cavalcanti Filho, Giovani José Feitosa
Indução de Poliploidia *in vitro* com aplicação de *Heliconia bihail*
Giovani José Feitosa Cavalcanti Filho. – Recife: O Autor, 2011.

63 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Ana Maria Benko Iseppon

Coorientadora: Ana Christina Brasileiro Vidal

**Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco,
Centro de Ciências Biológicas. Ciências Biológicas, 2011.**

Inclui bibliografia e anexo

1. Floricultura 2. Heliconia 3. Genética vegetal I. Título.

572.82

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2011-236

GIOVANI JOSÉ FEITOSA CAVALCANTI FILHO

Indução de Poliploidia *in vitro* com aplicação de colchicina em *Heliconia bihai* (L) L.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do grau de mestre.

Data de Aprovação: 20 / 05 / 2011

Situação: Aprovado.

BANCA EXAMINADORA:

Profª Drª Ana Maria Benko Iseppon (Orientadora)
Departamento de Genética – UFPE

Profº Drº Nataniel Franklin de Melo
Embrapa Semiárido

Profª Drª Vivian Loges
Universidade Federal Rural de Pernambuco- UFRPE

Profª Drª Maria José de Souza Lopes (Suplente)
Departamento de Genética – UFPE

Profª Drª Ana Christina Brasileiro Vidal (Suplente)
Departamento de Genética – UFPE

RECIFE

2011

Agradecimentos

A Deus, por todo seu amor, toda força e capacitação que tem me dado fazer e por sempre estar comigo.

A meus pais, Eliane e Giovani que estiveram ao meu lado em todos os momentos, dando-me força, confortando-me e alegrando-se comigo. Devo-lhes tudo o que sou hoje.

Às minhas avós, Mainha Lita e vovó Alicinha, que também participaram enormemente do meu desenvolvimento pessoal, e a todos os meus tios e primos (em especial Éricka, Alisson e Ingrid, a quem tenho como irmã e tenho me alegrado muito com seu crescimento).

À minha irmã Viviane e sobrinhos lindos, Giovanna e Gabriel pelo companheirismo e alegria.

Aos amigos que estão sempre ao meu lado me suportando em todos os momentos que são inesquecíveis: Renato e Túlia (líderes sem igual), aos irmãos de célula, Adriano e Sura, Hérica e Júnior, Saulo e Carol, Cibele e Williams, Marcela, Wanderson (Neginho), Marcelo Sesi, entre outros que não foram citados, mas que têm a mesma importância .

À Profª Ana Maria Benko Iseppon, que depositou confiança em mim para desenvolver esta pesquisa e ofereceu condições para que ela pudesse ser realizada.

À Profª Ana Christina Brasileiro Vidal, que me acompanhou durante todo este projeto me oferecendo uma verdadeira coorientação em todo momento.

Aos amigos de laboratório que estiveram todo esse tempo acompanhando minha trajetória durante a pesquisa, sempre me dando força e proporcionando momentos de alegria, tornando o ambiente de trabalho cada vez mais agradável. Em especial, Karla Santana (companheira de dança), Maria Ágatha (Gatha), Vanessa Souza (Sempre resolvendo nossos problemas), Lidianne Amorim e Alberto Onofre (Lindinha & Lindinho), Emanuelle (Manu), Poliana (Popô) e Hayana Arruda (“Millena” - que tem me ajudado bastante desde o momento em que comecei a fazer parte da equipe do LGBV).

Aos meus grandes amigos de graduação que estão presentes sempre que possível e sempre torceram pelo crescimento um do outro, Analice Souza, Brunno Leite, Santelmo Vasconcelos (Companheiro de laboratório), Antonio Villarim, André Borba, Lígia Spencer.

À Profª Vivian Loges e sua equipe (em especial, Taciana), pela enorme ajuda com o fornecimento do material e das imagens das inflorescências.

Ao Prof^a Claudia Ulisses e a M.Sc. Gemima Melo, que ajudaram de forma impecável com a preparação das lâminas e com as análises histológicas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) e à Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) por terem fornecido financiamento e infraestrutura para realização deste trabalho.

A todas estas pessoas e também àquelas que por algum descuido não foram mencionadas (mas que contribuíram direta ou indiretamente), quero não só deixar meus agradecimentos, mas também dizer que os amo e desejo que Deus vos abençoe enormemente.

Muitíssimo Obrigado.

RESUMO

A expansão da floricultura brasileira tem levado à necessidade da produção de uma maior variedade de insumos. Dentre eles, a *Heliconia bihai* (L.) L. destaca-se por apresentar flores com beleza exótica, atraindo consumidores. Dentre as ferramentas usadas para o melhoramento, a indução de poliploidia *in vitro* tem sido desenvolvida visando à criação de novas variedades de plantas, produzindo materiais com alterações morfológicas e fisiológicas, de grande interesse para a agricultura. Este trabalho objetivou a produção de indivíduos poliploides *in vitro* de *H. bihai*. Para este fim, plântulas de *H. bihai* foram inoculadas *in vitro* e transferidas para o meio MS com metade das concentrações dos sais, adicionado de BAP 0,03 mg/L e colchicina em diferentes concentrações (0%; 0,05%; 0,1%; 0,2%), além do acréscimo de 0,75 mL de solução de colchicina na mesma concentração de cada tratamento, por 24 ou 48 h. Em seguida, os explantes foram transferidos para um novo meio de cultura de mesma composição, sem colchicina. Após 30 dias, observou-se que materiais submetidos à colchicina apresentaram desenvolvimento reduzido ou com alterações morfológicas, sendo mais acentuados de acordo com o aumento da concentração e do tempo de exposição ao agente antimitótico. A contagem cromossômica indicou a poliploidização de dois indivíduos (0,05% e 0,1%, ambos por 48 h) em nível tetraploide, sendo observadas também alterações no tamanho e número de estômatos. Os resultados indicam que a indução de poliploides é viável para *H. bihai*, sendo estabelecidas as concentrações ideais de colchicina de 0,05% e 0,1% por 48 h, de acordo com os resultados obtidos.

Palavras-chave: Poliploidização, Colchicina, Heliconiaceae.

ABSTRACT

The expansion of the Brazilian floricultural market has led to an increased need of new varieties. Among them, *Heliconia bihai* (L.) L. is highlighted for its flowers with exotic beauty, attracting consumers. Among useful tools for breeding purposes, *in vitro* polyploidy induction has been developed aiming the production of new plant varieties, developing plants with morphological and physiological changes, interesting for the agriculture. The present research aimed to promote alterations in *in vitro* *H. bihai*, also establishing ideal doses of the agents used for polyploidization. *H. bihai* plantlets were inoculated *in vitro* and transferred to a MS medium with salts half concentrated, increased with BAP 0.03 mg/L and colchicine in several concentrations (0%; 0.05%; 0.1%; 0.2%), with addition of 0.75 mL colchicine solution in appropriated concentrations for 24 or 48 hours. Afterwards, the material was transferred to a new medium, without colchicine. After 30 days, it was observed that explants submitted to colchicine concentrations presented reduced development or morphological changes, accompanying increases of concentration and exposure time to the agent. Chromosome counting indicated polyploidization in two plants (0.05% and 0.1%, both for 48 h), at the tetraploid level, confirmed by numbers and morphological changes of the stomata. The results indicated that polyploidy induction is a recommendable technique for *H. bihai*, with concentrations of 0.05% and 0.1% for 48 hours considered ideal for this purpose.

Key-Words: Polyploidization, Colchicine, Heliconiaceae.

Lista de Figuras

Revisão Bibliográfica

- Figura 1: Distribuição do gênero *Heliconia*, regiões destacadas em vermelho correspondem à presença deste gênero. Fonte: <http://www.mobot.org/mobot/research/apweb> 16
- Figura 2: Diferentes arranjos das folhas presentes no gênero *Heliconia*. Fonte: Berry & Kress (1991). 17
- Figura 3: Inflorescências em várias espécies de *Heliconia*, organização das brácteas e disposição ereta em A: *H. rauliniana*; B: *H. psittacorum* cv. *suriname sassy*; C: *H. bihai*; e pendentes em D: *H. conlisiana*; E: *H. rostrata*; F: *H. pogonantha*. Fonte: Imagens obtidas da coleção do Laboratório de Floricultura da UFRPE. 18
- Figura 4: Diferentes pontos de ação de agentes antimitóticos no ciclo celular vegetal. Grupo 1: colchicina, colcemida, vimblastina, acenaftano, dintroanilinas, fosfoamidatos, piridinas, benzamidas, e ácido benzoico. Grupo 2: carbanatos. Fonte: Dhooghe *et al.* (2010). 22

Artigo 1:

- Figura 1: Diferenças na altura de plantas e alterações mais observadas nos materiais de *Heliconia bihai* submetidos a diferentes concentrações de colchicina *in vitro*, aos 30 dias. A: Material controle. B: Material submetido a 0,05% de colchicina por 48 h, apresentando folhas compridas e finas e intumescimento da base. C: Explante tratado com 0,1% de colchicina por 24 h, evidenciando desenvolvimento lento. 41
- Figura 2: Cromossomos metafásicos mitóticos de plantas *Heliconia bihai* submetidas a diferentes concentrações de colchicina *in vitro*. A: Controle diploide ($2n = 24$ cromossomos). B: Provável tetraploide ($2n = \text{ca. } 48$ cromossomos) submetido a 0,05% de colchicina por 48 h; C: Provável tetraploide ($2n = \text{ca. } 48$ cromossomos) submetido a 0,1% de colchicina por 48 h. 42
- Figura 3: A: material controle; B: Poliploide de 0,05% por 48 h; C: Poliploide de 0,1% 48 h. Escala = 2 cm 43
- Figura 4: Tamanho dos estômatos de plantas *Heliconia bihai* submetidas a diferentes concentrações de colchicina *in vitro*. A: Material controle diploide. B: Material poliploide de 0,05% / 48 h. Escala = 5 μm . 44

Lista de Tabelas

Artigo

Tabela 1: Percentual de explantes de <i>Heliconia bihai</i> cultivados <i>in vitro</i> , submetidos a diferentes concentrações e períodos de exposição à colchicina, que apresentaram intumescimento aos 30 dias de inoculação, necrose aos 60 dias e brotamento aos 90 dias em cada tratamento.	40
Tabela 2: Percentual de brotos de <i>Heliconia bihai</i> cultivados <i>in vitro</i> com alterações morfológicas e altura média após 30, 60 e 90 dias de submissão a tratamentos com colchicina.	42
Tabela 1: Densidade estomática e comprimento médio dos estômatos do material controle e de poliploides de <i>Heliconia bihai</i> encontrados nos tratamentos com 0,05% e 0,1%, ambos por 48 h.	44

SUMÁRIO

RESUMO	5
ABSTRACT	6
Lista de Figuras.....	7
Lista de Tabelas.....	8
INTRODUÇÃO	11
OBJETIVOS:	12
OBJETIVO GERAL.....	12
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
1.1 Mercado Floricultor.....	12
1.2 Helicônias.....	14
1.3 Cultura <i>In Vitro</i> Vegetal.....	19
1.3.1 Micropropagação	20
1.4 Indução de Variabilidade Genética em Plantas	21
1.4.1 Poliploidia versus Fatores Indutores.....	22
1.4.2 Poliploidia nas Zingiberales	24
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
ARTIGO	33
Indução de poliploidia <i>in vitro</i> e monitoramento da aplicação de colchicina em explantes de <i>Heliconia bihai</i> (L.) L.	33
CONCLUSÕES	50
ANEXO	51
Instruções para submissão de trabalhos à revista PAB (Pesquisa Agropecuária Brasileira)	52

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento da floricultura no Brasil e seu estabelecimento no mercado agrícola têm levado ao aumento de sua participação na economia do País, sendo considerado atualmente um mercado promissor (JUNQUEIRA & PEETZ, 2010). Neste sentido, métodos de propagação e de melhoramento genético, associados a maiores investimentos vêm sendo aplicados com intensidade na floricultura, visando atender às demandas do mercado mundial (MOTOS, 2000; OLIVEIRA & BRAINER, 2007).

As flores tropicais, com sua grande diversidade e beleza, são importantes elementos da cadeia produtiva do Nordeste brasileiro, que tem seu mercado liderado pelos estados do Ceará, Alagoas, Pernambuco e Bahia (JUNQUEIRA & PEETZ, 2007). Dentre as espécies cultivadas para este fim, as plantas do gênero *Heliconia* vêm sendo produzidas com maior intensidade, com destaque para a espécie *H. bihai*, que tem atraído o interesse de seus consumidores devido à sua beleza exótica, à sua resistência ao transporte e à sua durabilidade pós-colheita, promovendo o desenvolvimento de técnicas que visem o crescimento de seu cultivo (BERRY & KRESS, 1991).

A prática de cultivo *in vitro* tem sido desenvolvida para várias espécies, promovendo um aumento na produção de forma qualitativa e quantitativa, e permitindo sua associação com técnicas de indução de mutação de maneira mais controlada e segura (KUMAR & SINGH, 2009). Com o uso de agentes químicos e físicos cada vez mais aprimorados e eficazes nestes processos, diversas variedades têm sido produzidas e estão registradas em diferentes bancos de dados, direcionados ao melhoramento vegetal (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998)

A colchicina, por exemplo, tem mostrado resultados no campo do melhoramento vegetal através da produção de organismos poliploides. Essa substância é capaz de ligar-se a moléculas de tubulina, impedindo a formação das fibras do fuso acromático, responsáveis pela correta segregação dos cromossomos, gerando assim células com alterações em seu conteúdo cromossômico (DHOOGHE *et al.*, 2010). O aumento do número cromossômico é, em geral, mostrado através de um maior volume celular, o que pode ser refletido no aumento de tamanho de alguns órgãos da planta, alterando sua morfologia (Wu *et al.*, 2010).

Para o gênero *Heliconia*, técnicas de cultivo *in vitro* têm sido estabelecidas para diversas espécies utilizando-se diferentes tecidos, mostrando sua viabilidade na aplicação de experimentos de indução de poliploides e mutagênese (DIAS, 2002). O presente estudo visou à realização de ensaios de indução de poliploidia *in vitro*, com uso de colchicina, em *H. bihai*, a fim de permitir uma avaliação da eficácia desse agente no processo de indução de poliploides,

para geração de variabilidade associada a caracteres morfológicos, direcionados ao mercado floricultor.

OBJETIVOS:

OBJETIVO GERAL

- Avaliar o efeito de diferentes concentrações e períodos de exposição à colchicina no desenvolvimento *in vitro* de explantes de *H. bihai*, através de análises morfológicas, histológicas e citogenéticas, buscando estabelecer uma metodologia de indução de poliploides para a floricultura.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer concentrações ideais de colchicina para o processo de indução de poliploides.
- Analisar a morfologia dos explantes obtidos de embriões zigóticos cultivados *in vitro* e submetidos aos diferentes tratamentos.
- Observar, através de dados citogenéticos, o número cromossômico das plantas obtidas *in vitro*.
- Avaliar as estruturas estomáticas dos materiais submetidos à colchicina em comparação ao material controle.

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Mercado Floricultor

A floricultura brasileira vem ganhando espaço e se estabelecendo como um mercado promissor ao desenvolvimento econômico do país desde 1988, quando a cooperativa

agroindustrial de Holambra deu início a um programa de reestruturação visando atender ao mercado externo. Após esse período, o desenvolvimento da câmara setorial de flores e de plantas ornamentais, formada por representantes das áreas de ensino, pesquisa, financeira e da iniciativa privada do estado de São Paulo, impulsionou o desenvolvimento de setores semelhantes em outros estados (SEBRAE, 2005). Desta forma, a câmara setorial de flores e plantas ornamentais, assim como as demais câmaras setoriais de agricultura criadas pelo governo, surgiram e vêm atuando com intuito de promover um maior crescimento e fortalecimento nos diferentes ramos através da implantação de políticas de controle para cada setor (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2007).

Um crescimento marcante da cadeia produtiva da floricultura tem sido observado em todo o Brasil, com a inclusão de novos pólos regionais para o cultivo de flores e plantas ornamentais (JUNQUEIRA & PEETZ, 2008). Esse crescimento produtivo é resultado da disponibilidade de terras agricultáveis, com suas grandes extensões e boas condições edafoclimáticas, do baixo custo de produção e da presença de empreendedores e de tecnologia tropical (MINISTÉRIO DE AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2007).

No Brasil, o maior consumo da floricultura encontra-se no mercado interno, representando 97,54% de sua comercialização setorial. Embora voltada em grande parte para o consumo interno, a floricultura brasileira tem mostrado potencial para o desenvolvimento da economia do país, tendo permanecido em crescimento, mesmo durante a crise econômica mundial no período de 2008 a 2010 (JUNQUEIRA & PEETZ, 2009; 2010). Apesar da dificuldade na obtenção de informações oficiais sobre a dimensão deste mercado, devido à existência da produção e comércios informais, dados baseados em grupos como Veiling Holambra, CEAGESP e CEASA Campinas afirmam que a floricultura brasileira movimenta anualmente US\$ 1,3 bilhão, com consumo *per capita* de US\$ 7,00/ano (JUNQUEIRA & PEETZ, 2008). No que diz respeito à exportação no Brasil em 2009, os valores atingiram US\$ 31,137 milhões, representando uma queda de 12,3% em relação ao ano anterior, fato esperado devido à crise internacional, que afetou os principais mercados importadores da floricultura nacional. Apesar desta queda, o Brasil foi o país que menos sofreu com a crise, devido à concentração na venda de produtos destinados à propagação vegetativa, quando comparado à Colômbia, Costa Rica e Equador, que estão concentrados na venda de flores e folhagens secas para corte. Mesmo com a crise, o mercado floricultor apresenta um grande potencial de crescimento para a economia brasileira (JUNQUEIRA & PEETZ, 2010), o que tem gerado aumento de investimentos vindos dos governos estaduais e instituições privadas em pesquisas, programas e

feiras, visando a uma maior produtividade e qualidade dos produtos oferecidos (MOTOS, 2000; OLIVEIRA & BRAINER, 2007).

No Nordeste brasileiro, a produção de plantas ornamentais concentra-se principalmente nos estados do Ceará, Alagoas, Pernambuco e Bahia, que possuem as melhores condições para o cultivo de plantas, sobretudo no que tange à produção de flores tropicais como helicônias (*Heliconia* sp.), alpínias (*Alpinia* sp. L.) e ananás ornamental (*Ananas bracteatus* (Lindl.) Schult. & Schult. f.), entre outras (JUNQUEIRA & PEETZ, 2007). Localizado próximo ao equador, o Nordeste do Brasil possui clima tropical úmido, com pequena variação no decorrer do ano e com intensa luminosidade. Esta região dispõe também de regiões com condições edafoclimáticas variadas, sendo grande parte da região com climas áridos. Contudo, a disponibilidade de terra, água e mão-de-obra, tem proporcionado o desenvolvimento de sistemas de irrigação que possibilitam o cultivo de numerosas espécies de plantas ornamentais (OLIVEIRA & BRAINER, 2007, LIMA & FERNANDES, 2009).

As flores tropicais possuem uma beleza exótica, diversidade de formas e cores, assim como resistência ao transporte e durabilidade pós-colheita, refletindo no aumento do interesse do mercado interno e externo (LOGES *et al.*, 2005). Dentre as diversas flores tropicais, as helicônias vêm mostrando um grande poder de mercado, por pertencerem a um dos grupos mais vistosos de plantas herbáceas das florestas tropicais, apresentando uma ampla variação de caracteres florais, bem como grande distribuição nos trópicos e adaptação ao cultivo (BERRY & KRESS, 1991).

1.2 Helicônias

O gênero *Heliconia*, antes inserido na família Musaceae por possuir semelhanças com este grupo, foi assim nomeado devido ao monte Helicon na Beócia, sul da Grécia, onde a mitologia diz ser a casa do Deus Apolo e das Musas (CRILEY & BROCHAT, 1992). No entanto, a existência de algumas diferenças em relação às Musaceae, como ausência de laticíferos (que quando presentes são articulados), anatomia de suas raízes, diferenças nas folhas, flores bissexuais, entre outras características, fizeram de *Heliconia*, o único componente da família Heliconiaceae (NAKAI, 1941).

Ambas as famílias são pertencentes à ordem Zingiberales a qual inclui, além das Heliconiaceae e Musaceae, outras seis famílias de monocotiledôneas (Zingiberaceae, Lowiaceae, Cannaceae, Maranthaceae, Strelitziaceae e Costaceae), caracterizadas por possuírem folhas

grandes com venação transversa em suas lâminas, grandes pecíolos e inflorescências grandes com brácteas geralmente coloridas (BERRY & KRESS, 1991). Essas famílias estão divididas em dois grupos, o grupo das bananas (Musaceae, Lowiaceae, Heliconiaceae e Strelitziaceae), o qual é parafilético basal ancestral, e o grupo monofilético dos gengibres (Zingiberaceae, Cannaceae, Maranthaceae e Costaceae) (KRESS *et al.*, 2001).

Baseados em Análise de Dispersão e Vicariância (DIVA, *Dispersion and Vicariance Analysis*) e em técnicas de relógio molecular, Kress & Specht (2006) sugeriram que a origem das Zingiberales ocorreu por volta de 124 milhões de anos, com sua diversificação iniciada a cerca de 110 milhões de anos, durante a metade do período cretáceo. Em seguida, acompanhada pela divergência das famílias Strelitziaceae e Lowiaceae, se deu a divergência da Heliconiaceae (KRESS & SPECHT, 2006).

Conhecidas como bananeira-de-jardim, falsa-ave-do-paráíso e paquevira, atualmente existem registros no *Index Kewensis* de mais de 250 binômios específicos para o gênero *Heliconia*. Porém, devido à grande variedade de flores e colorações até mesmo dentro de espécies, muitos taxonomistas encontram dificuldades em estabelecer uma classificação precisa para espécies e subespécies (CASTRO, 1995). Com base em dados publicados, Castro *et al.* (2007) propuseram a existência de 182 espécies, subdivididas em cinco subgêneros e 23 seções, as quais permaneceram com mesma subdivisão em estudos realizados com marcadores de RAPD por Maruoelli *et al.* (2010). Dessas espécies, 176 encontram-se na região neotropical, do norte do México ao sul do Brasil em altitudes ao nível do mar até 2.000 metros, enquanto seis distribuem-se no pacífico, em altitudes de até 500 metros, estando o maior número com ocorrência na Colômbia (94), seguido do Equador (60), Panamá (56), Costa Rica (47), Brasil (37), Peru (32), Venezuela (26), Nicarágua (22), Guatemala (16), Bolívia (15), Honduras e México (14) e Suriname (13) (**Figura 1**) (KRESS, 1990; BERRY & KRESS, 1991; CRILEY & BROCHAT, 1992).



Figura 1: Distribuição do gênero *Heliconia*, regiões destacadas em vermelho correspondem à presença deste gênero. Fonte: <http://www.mobot.org/mobot/research/apweb>

As helicônias são herbáceas, eretas, perenes, com rizomas simpodiais. Seus pseudocaulis são formados por justaposição dos pecíolos ou lâminas foliares com diferentes comprimentos e formas, podendo chegar a cinco metros de comprimento, apresentando a lâmina foliar em geral oblonga pontuda. Suas folhas são dísticas, com bainhas longas basais e um longo e expandido pecíolo (CRONQUIST, 1981; DAHLGREN *et al.*, 1985; CASTRO, 1995). De acordo com o arranjo básico de suas folhas, elas podem ser classificadas como: (a) musoides, com folhas verticalmente orientadas, longos pecíolos e um hábito de crescimento como as bananeiras; (b) canoides, com pecíolos de comprimento curto ou médio, posicionado obliquamente em relação à haste, ou (c) zingiberoides, com lâminas com pecíolo curto, dispostas na horizontal em relação à haste (**Figura 2**) (BERRY & KESS, 1991).

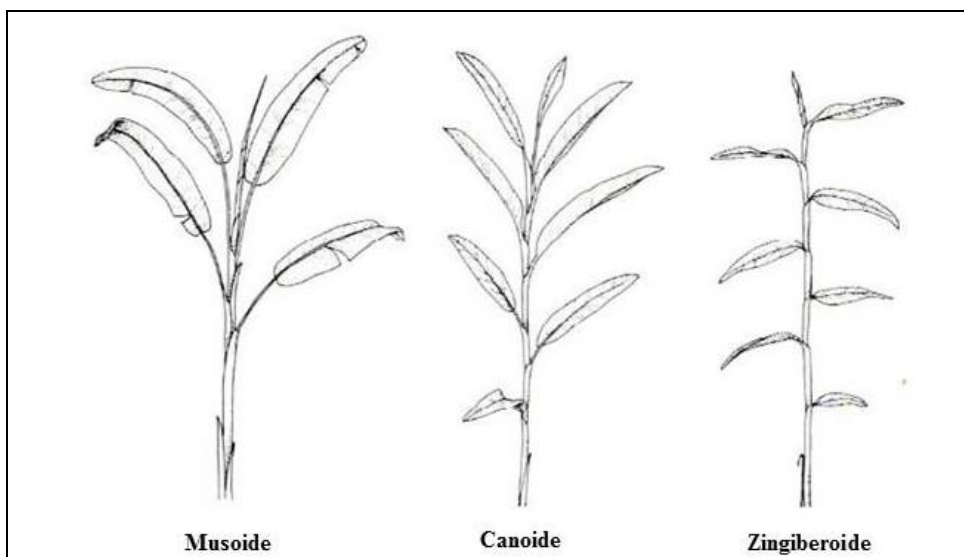


Figura 2: Diferentes arranjos das folhas presentes no gênero *Heliconia*. Fonte: Berry & Kress (1991).

Suas inflorescências são terminais, formadas por grandes brácteas, de cores fortes, com disposição dística ou espiralada ao longo de um eixo central. As flores são hermafroditas, zigomorfas, envolvidas pelas brácteas. Seu androceu é constituído por cinco estames férteis e um estaminódio. O ovário é ínfero, trilocular e possui um óvulo sub-basal simples em cada lóculo. Quanto ao formato das flores, este pode ser curvo, parabólico ou sigmoidal, estando o nectário localizado na base. As flores ainda podem estar bem visíveis e eretas nas brácteas ou bem escondidas, sendo vista apenas uma parte de sua extremidade, dependendo da espécie. Os frutos são do tipo baga possuindo até três sementes (CRILEY & BROCHAT, 1992; CASTRO, 1995).

As flores são especializadas morfológicamente, em geral, para polinização por beija-flores, tendo sido observadas algumas espécies do pacífico com polinizações por morcegos (PEDERSEN & KRESS, 1999; TAYLOR & WHITE, 2007). As inflorescências de *Heliconia* florescem por 40 a 200 dias provendo um grande insumo de néctar, de cerca de 30-69 μL por flor, embora cada flor dure apenas um dia (DOBKIN, 1984). Sua propagação é preferencialmente vegetativa, a partir do cultivo de seu rizoma ou pelo plantio de perfilhos laterais, sendo rara a propagação por meio de sementes. Quanto às inflorescências, dois tipos são encontrados nas helicônias: as eretas, com suas brácteas retas apontando para cima, e as pendentes, com brácteas penduradas apontando para baixo. Suas inflorescências são formadas pela reunião de brácteas coloridas e côncavas, unidas através da ráquis, organizadas em padrão alternado ao longo de uma espessa haste, as quais podem possuir uma orientação dística ou em espiral (**Figura 3**) (SIMÃO & SCATENA, 2004; SHEELA, 2008).



Figura 3: Inflorescências em várias espécies de *Heliconia*, organização das brácteas e disposição ereta em A: *H. rauliniana*; B: *H. psittacorum* cv. suriname sassy; C: *H. bihai*; e pendentes em D: *H. conlisiana*; E: *H. rostrata*; F: *H. pogonantha*. Fonte: Imagens obtidas da coleção do Laboratório de Floricultura da UFRPE.

A maioria das espécies de *Heliconia* pode ser encontrada em regiões encharcadas ou úmidas, embora algumas ainda sejam encontradas em áreas sazonalmente secas. Seu florescimento se dá em regiões de planícies tropicais úmidas, em habitats florestais, enquanto muitas espécies florescem bem em locais abertos como estradas, áreas de rio ou em pequenas áreas abertas em florestas (TOM, 1997).

O aumento do interesse por estas plantas pelo mercado floricultor levou à disseminação de seu cultivo por todas as regiões tropicais do mundo. Das espécies naturais do Brasil assim como das demais que foram inseridas e adaptadas às condições edafoclimáticas do país, a produção destinada ao comércio como flor de corte, está praticamente direcionada a *H. bihai*, *H. psittacorum*, *H. rostrata*, *H. stricta*, e *H. wagneriana*, bem como às cultivares Golden Torch (CASTRO *et al.*, 2007).

A espécie *H. bihai* caracteriza-se por apresentar uma inflorescência terminal ereta, cujo comprimento da planta varia de 2,4 a 4,2 m. É composta por sete a 13 brácteas laranja-avermelhadas com bordas esverdeadas, cujas flores apresentam sépalas verdes com coloração

branca na região mais basal. Os frutos são brancos, tornando-se azulados após o amadurecimento. Sua propagação ocorre preferencialmente de forma vegetativa, uma vez que a semente possui uma germinação lenta, que em geral a torna inviável, sendo necessária a aplicação de técnicas que acelerem seu desenvolvimento (BERRY & KRESS, 1991; PAIVA, 1998).

1.3 Cultura *In Vitro* Vegetal

A totipotência celular, capacidade de uma célula se diferenciar *in vitro* em qualquer outro tipo celular, formando tecidos e indivíduos completos, despertou o interesse de diversos cientistas (KUMAR & SINGH, 2009). Em vegetais, as técnicas de cultivo *in vitro* apresentaram-se mais aplicáveis, devido à presença de tecidos meristemáticos, ricos em células-tronco, que estão em constante crescimento, bem como pela capacidade de uma célula já estabelecida desdiferenciar-se (BIRNBAUM & ALVARADO, 2008).

No cultivo *in vitro*, células obtidas de um indivíduo matriz são cultivadas em meio de cultura livre de contaminação, com nutrientes e reguladores de crescimento necessários ao seu desenvolvimento. Esse cultivo pode permitir o crescimento e a formação de tecidos, órgãos e de organismos inteiros, a partir dos segmentos ou células inoculados (KUMAR & SINGH, 2009). Em vegetais, a cultura de tecidos *in vitro* tornou-se também uma aplicação frequente e importante, devido às condições de controle e segurança oferecidas para a produção, manipulação genética e propagação desses materiais (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

Em 1902, o botânico Gottlieb Haberlandt tentou estabelecer a primeira cultura de células vegetais, a qual não obteve êxito, devido à ausência de reguladores de crescimento no meio de cultura, até então desconhecidos, ou devido à utilização de espécies inadequadas e explantes retirados de tecidos muito maduros (TORRES *et al.*, 1998). Porém a pesquisa despertou o interesse de outros pesquisadores, o que levou White a apresentar, em 1934, a primeira cultura teoricamente ilimitada em crescimento de pontas de raízes de tomate, inoculadas em meio de cultura líquido, desenvolvido pelo mesmo autor em 1933, com algumas modificações (KUMAR & SINGH, 2009). Esta técnica foi assim aprimorada, principalmente depois da descoberta dos reguladores de crescimento, sendo hoje praticada com maior frequência para fins variados (RAZDAN, 2003).

Os reguladores de crescimento são fatores determinantes na formação e no padrão de desenvolvimento para a maioria dos sistemas de cultura de tecidos. Atualmente as auxinas e as citocininas são as classes de reguladores de crescimento mais utilizadas na propagação *in vitro* (DAVEY & ANTHONY, 2010). Usualmente, estes reguladores são adicionados ao meio de cultura, a fim de promover uma melhor resposta no desenvolvimento do material. As auxinas, por exemplo, são responsáveis por gerar uma maior indução da divisão celular e iniciação de formação de raízes em cultura de tecidos. As citocininas, por sua vez, exercem um papel importante na divisão celular, além de induzirem a organogênese e a embriogênese somática na etapa de desenvolvimento da cultura de tecidos (KUMAR & SINGH, 2009).

1.3.1 Micropropagação

Técnicas de propagação têm sido desenvolvidas para acelerar a produção, como é o caso da micropropagação *in vitro* de plantas ornamentais, a qual diminui o espaço físico utilizado e acelera o processo de desenvolvimento da planta (BORTOLIN, 2006). Além dessas vantagens, essa técnica possibilita seu uso em associação com procedimentos direcionados ao melhoramento vegetal, como técnicas de mutagênese e indução de poliploidia, permitindo assim o aumento da variabilidade dos produtos para horticultura que vem crescendo cada vez mais, em todas as regiões do país (SLEPER & POEHLMAN, 2006).

Na micropropagação, são encontradas três etapas principais: (1) a excisão de um determinado tecido da planta ou célula (o explante) e inoculação deste em meio de cultura asséptico; (2) multiplicação do propágulo e, por fim, (3) o restabelecimento da cultura *in vivo* (aclimação) (MURASHIGE, 1974). Antes de qualquer etapa, para garantir o sucesso do cultivo, é ideal fazer a escolha do genótipo a ser utilizado, da fonte de explante e das condições de cultivo apropriadas (ANDRADE, 2002).

O meio de cultura é responsável por fornecer os principais sais minerais, vitaminas e aminoácidos essenciais ao crescimento do organismo, que controlam, em grande parte, o padrão de desenvolvimento do explante. Logo, é de extrema importância estudar a composição do meio, de acordo com a espécie utilizada e suas exigências, a fim de estabelecer as melhores condições para seu cultivo. Diversos meios de cultura foram desenvolvidos e estabelecidos, ao longo dos anos e muitos deles vêm sendo utilizados como meio padrão para o cultivo de diferentes materiais vegetais, sendo necessária apenas a realização de pequenas modificações (CALDAS *et al.*, 1998). Atualmente, um dos meios mais utilizados tem sido o desenvolvido por Murashige &

Skoog, em 1962. Os autores utilizaram a solução de White e, a partir de testes de suplementação com extrato de tabaco, estabeleceram quantidades ideais de sais e vitaminas para o meio (KARTHA, 1985).

A atuação conjunta da propagação *in vitro* com outras técnicas pode ser utilizada para fins de conservação e avaliação de germoplasma, assim como, para introgressão de genes de interesse em espécies-alvo, através do uso da polinização *in vitro* ou do cultivo de embriões (VAN TUYL *et al.*, 1991; PENG *et al.*, 2005; SKÁLOVÁ *et al.*, 2010.). Essas associações de diferentes metodologias também têm sido aplicadas a fim de permitir a aceleração de programas de melhoramento com o uso da germinação *in vitro*, cultura de anteras ou clonagem de genótipos, ou ainda para promover o aumento de variabilidade genética a partir de variação somaclonal ou através de mutagênese ou indução de poliploidia *in vitro*, com o uso de agentes químicos ou físicos (XIAODING *et al.*, 2002; BISWAS *et al.*, 2009; KUMAR & SINGH, 2009).

1.4 Indução de Variabilidade Genética em Plantas

A variabilidade genética é a principal responsável pelo processo de adaptação e manutenção de um organismo ao ambiente, sendo sua preservação também de grande interesse ao mercado agricultor. Essa variabilidade pode ser gerada de forma espontânea nos organismos, por meio de mutações que ocorrem com baixa frequência e de forma lenta na natureza, como os processos de poliploidização gerados a partir de ciclos endomitóticos, importantes na divergência e biodiversidade das angiospermas (LEITCH & LEITCH, 2008). Dessa forma, processos de indução de mutações artificiais foram desenvolvidos, visando acelerar o processo de mutação nos organismos, consequentemente aumentando a variabilidade genética e aprimorando o melhoramento vegetal (VAN HARTEN, 1998).

O surgimento de agentes químicos, como a colchicina, e a descoberta da capacidade deste agente em provocar alterações em componentes envolvidos no ciclo celular e indiretamente no material genético de diversos indivíduos (consequentemente, refletido na morfologia) despertaram o interesse de geneticistas e, sobretudo, de agricultores, visando a sua utilização para o melhoramento vegetal (DIXON & MALDEN, 1908; EIGSTI, 1938). Cultivares vegetais com traços de alta qualidade aos diversos ramos do mercado agricultor têm sido desenvolvidas através do uso desse agente (EIGSTI & DUSTIN, 1955; SLEPER & POEHLMAN, 2006). Como exemplos, podem ser citadas plantas com características de resistência a adversidades

ambientais, assim como uma grande variedade de flores e plantas ornamentais, entre outras (NTULI & ZOBOLO, 2008; GANTAIT *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2011).

1.4.1 Poliploidia versus Fatores Indutores

Na natureza, a poliploidia pode ocorrer por um erro meiótico, gerado a partir da não redução do número cromossômico e produção de gametas com números cromossômicos de células somáticas ou pela endomitose ocorrida em células precursoras da meiose. Neste último caso, células com genoma duplicado entram na fase de mitose, que ocorre de forma incompleta, não havendo o rompimento da carioteca, nem a divisão celular, o que produzirá células poliploides as quais, passarão ao processo de meiose (LEE *et al.*, 2008).

A poliploidia também pode ser induzida artificialmente por processos de junção de núcleos, através da fusão de protoplastos, ou com uso de agentes químicos capazes de atuar em diferentes pontos do ciclo mitótico, alterando sua via padrão (**Figura 4**). Devido ao interesse sobre o material produzido pela poliploidização e à baixa frequência de sua ocorrência natural, o uso de indução artificial tem crescido nos programas de melhoramento, levando a um aprimoramento das técnicas (DHOOGHE *et al.*, 2010).

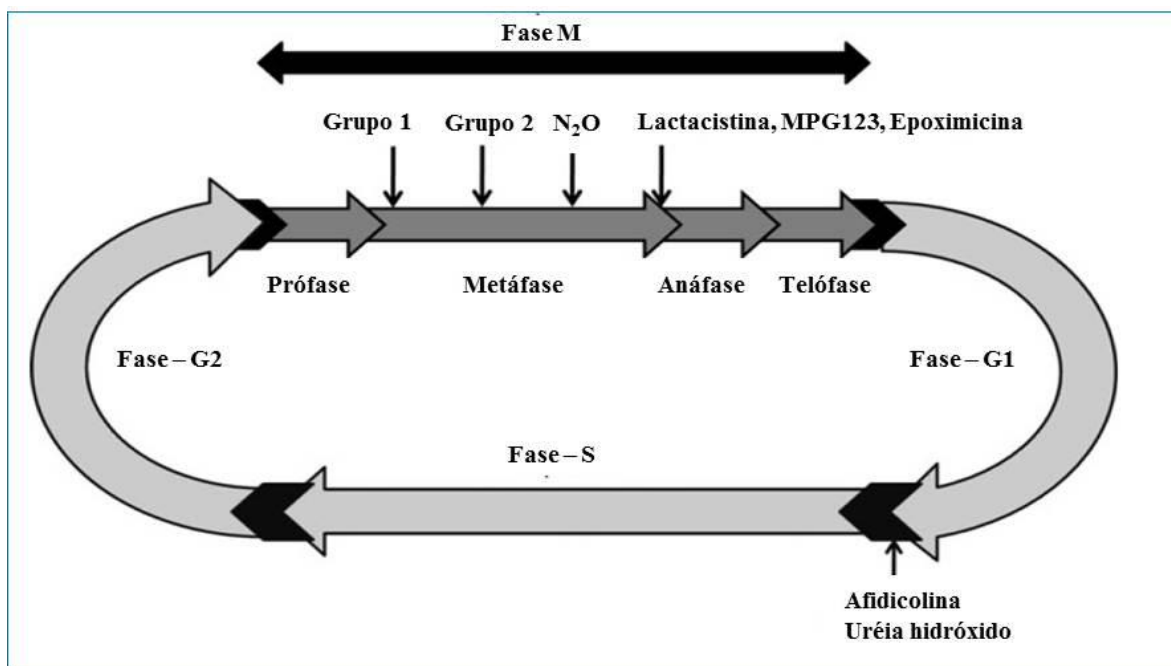


Figura 4: Diferentes pontos de ação de agentes antimitóticos no ciclo celular vegetal. Grupo 1: colchicina, colcemida, vimblastina, acenaftano, dintroanilinas, fosfoamidatos, piridinas, benzamidas, e ácido benzoico. Grupo 2: carbanatos. Fonte: Dhooghe *et al.* (2010).

Dentre os fatores químicos utilizados na poliploidização, encontra-se a colchicina, um alcaloide responsável por provocar erros no ciclo mitótico da célula, gerando uma divisão celular incorreta que produz células com diferentes níveis de ploidia. Estas células podem ter seu número cromossômico multiplicado, produzindo indivíduos poliploides, que irão possivelmente apresentar características diferentes do material doador (EIGSTI & DUSTIN, 1955; DHOOGHE *et al.*, 2010). Tal efeito é resultante da sua capacidade em ligar-se aos dímeros de tubulina, impedindo a formação dos microtúbulos e consequentemente das fibras do fuso, importantes para a migração dos cromossomos aos pólos da célula durante a mitose (DHOOGHE *et al.*, 2010).

Extraída de sementes e bulbos de *Colchicum autumnale* L. (Liliaceae), esta substância teve seus primeiros relatos apresentados no “*Ebers papyrus*”, um documento egípcio preparado por volta de 1550 a.C., com sua utilização para tratamento de reumatismo e especialmente da gota. Os primeiros estudos botânicos para este gênero foram apresentados por Dioscorides em seu escrito “*De matéria medica*” por volta do ano 512, através de observações das plantas existentes na região de Colchis, atual Geórgia, próxima ao Mar Negro local e na utilização de seus compostos na medicina (EIGSTI & DUSTIN, 1955). A colchicina foi estudada, sendo apresentado por Dixon e Malden (1908) seu efeito sobre células sanguíneas retiradas da medula óssea, o qual em seguida foi apresentado em outros estudos pelo seu poder antimitótico em células animais e vegetais (DUSTIN, 1934; 1937; 1938). Em 1937, Blakeslee e Avery apresentaram então, os primeiros resultados de indução de duplicação cromossômica em plantas através da utilização da colchicina, o que representou um avanço para o uso deste reagente no melhoramento vegetal (BLAKESLEE & AVERY, 1937; SORIANO *et al.*, 2007; GLOWACKA *et al.*, 2009).

O aumento no número cromossômico é, em geral, refletido pela célula, através do aumento de seu volume que, por conseguinte, pode ser observado também com o crescimento de alguns órgãos da planta. Indivíduos poliploides podem ser classificados, de acordo com sua origem, em autopoliploides (originados a partir de células ou indivíduos com um mesmo genoma) ou aloploiploides (originados a partir de células ou indivíduos, com genomas diferentes) (STEBBINS, 1950; GUERRA, 1988).

Com o desenvolvimento do cultivo *in vitro* e a possibilidade que este oferece no controle dos padrões de cultivo, a poliploidização tornou-se uma técnica mais popular, com o primeiro trabalho *in vitro* sendo apresentado por Murashige e Nakano (1966). O uso desta técnica para o

mercado horticultor tem sido mais frequente uma vez que as alterações são expressas geralmente na morfologia da planta, como o aumento do tamanho de suas folhas e flores, maior intensidade de cor, novas formas e em muitos casos a recuperação da fertilidade de plantas antes estéreis (ESCANDÓN *et al.*, 2005). Atualmente, encontram-se registradas no banco de dados da FAO/IAEA (2010) 39 variedades de plantas, obtidas a partir de tratamento com colchicina, dentre as quais 18 referiram-se a plantas ornamentais, além dos diversos estudos não registrados neste banco, mostrando a aplicação desta técnica no melhoramento vegetal.

1.4.2 Poliploidia nas Zingiberales

A diversidade de plantas na ordem Zingiberales e a consequente importância econômica de muitas espécies despertam o interesse da criação de novas cultivares, buscando aumentar a variedade e qualidade de seus produtos (BABU & RAVINDRAN, 2005; BERMÚDEZ-CARABALLOSO *et al.*, 2010). Neste sentido, a poliploidização tem sido aplicada em algumas espécies, produzindo materiais com qualidades de interesse ao mercado (ROUX *et al.*, 2001; HESLOP-HARRISON & SCHWARZACHER, 2007).

O gênero *Musa* tem sido um dos mais submetidos a técnicas de melhoramento, devido a sua grande produção e comercialização, que está em quarto lugar no mundo, localizada em mais de 120 países, com produção de cerca de 104 milhões de toneladas (ARVANITOYANNIS *et al.*, 2008; JAIN, 2010). As cultivares domesticadas e de maior aceitação no mercado são indivíduos triploides ou híbridos estéreis, com frutos partenocárpicos originados a partir do cruzamento entre as espécies *M. acuminata* (A) e *M. balbisiana* (B), o que dificulta a aplicação de técnicas de melhoramento convencionais (LEE *et al.*, 1997, SILVA *et al.*, 2001). Desta forma, a produção de indivíduos poliploides têm sido útil em *Musa*, a fim de produzir materiais férteis estáveis como uma etapa intermediária na obtenção de novas cultivares comerciais (BAKRY *et al.*, 2007). Apesar de o gênero *Musa* apresentar um maior avanço na poliploidização, dentro da família Zingiberaceae, também têm sido produzidos poliploides, a fim de ultrapassar as barreiras de cruzamentos e auxiliar na produção de novas cultivares (BABU & RAVINDRAN, 2005). Como exemplo, tetraploides de *Hedychium muluense* R. M. Smith foram obtidos após a exposição de calos embriogênicos à colchicina e à orizalina (SAKHANOKHO *et al.*, 2009). Também pela exposição à colchicina, foram gerados tetraploides de *Zingiber officinale* Roscoe, a partir do cultivo *in vitro* de gemas apicais (ADANIYA & SHIRAI, 2001).

Para o gênero *Heliconia*, família Heliconiaceae, indivíduos triploides têm sido reportados para *H. psittacorum* cv. Sassy, cv. Petra e cv. Iris (LEE *et al.*, 1994), no entanto, originados por eventos naturais. Nenhuma aplicação de indução de poliploides foi demonstrada para qualquer espécie do gênero, o que devido a sua importância econômica seria de grande utilidade, para o uso em programas de melhoramento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADANIYA, S.; SHIRAI, D. In vitro induction of tetraploid ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) and its pollen fertility and germinability. **Scientia Horticulturae**, v. 88, p. 277-287, 2001.
- ANAND, R. P.; GANAPATHI, A.; VENGADESAN, G.; SELVARAJ, N.; ANBAZHAGAN, V. R.; KULOTHUNGAN, S. Plant regeneration from immature cotyledon-derived callus of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. (cowpea). **Current Science**, v. 80, p. 671-674, 2001.
- ANDRADE, S. R. M. **Princípios da cultura de Tecidos vegetais**. Planaltina: Embrapa cerrados, 2002. 16 p.
- ARVANITOYANNIS, J. S.; MAVROMATIS, A. G.; GRAMMATIKAKI-AVGELI, G.; SAKELLARIOU, M. Banana: cultivars, biotechnological approaches and genetic transformation. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 43, p. 1871-1879, 2008.
- BABU, K. N.; RAVINDRAN, P. N. **Ginger: The genus Zingiber**. Boca Raton, Flórida, USA: CRC press, 2005, 551 p.
- BAKRY, F.; DE LA REBERDIERE, N. P.; PICHOT, S.; JENNY, C. In liquid medium colchicine treatment induces non chimerical doubled-diploids in a wide range of mono- and interspecific diploid banana clones. **Fruits**, v. 62, p. 3-12, 2007.
- BERMÚDEZ-CARABALLOSO, I.; GARCÍA, L. R.; VEITÍA, N.; TORRES, D.; PADRÓN, Y.; ROMERO, C.; ORELLANA, P. Mutant plantains (*Musa* spp.) with height reduction obtained by in vitro mutagenesis. **Euphytica**, v. 176, p. 105-112, 2010.

- BERRY, F.; KRESS, W. J. **Heliconia: an identification guide**. 1. ed., Washington: Smithsonian Institute Press, 1991. 334 p.
- BIRNBAUM, K. D.; ALVARADO, A. S. Slicing across Kingdoms: Regeneration in Plants and Animals. **Cell**, v. 132, p. 697-710, 2008.
- BISWAS, M. K.; DUTT, M.; ROY, U. K.; ISLAM, R., HOSSAIN, M. Development and evaluation of in vitro somaclonal variation in strawberry for improved horticultural traits. **Scientia Horticulturae**, v. 122, p. 409-416, 2009.
- BLAKESLEE, A. F.; AVERY, A. G. Methods of inducing doubling of chromosomes in plants. **The Journal of Heredity**, v. 28, n. 12, p. 393-411, 1937.
- BORTOLIN, B. Flores: alta tecnologia na produção e diversificação. Inovação Uniemp, Campinas, V.2, n.1, 2006. Disponível em: http://inovacao.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1808-23942006000100010&lng=pt&nrm=iso. Acesso em: 05 de janeiro, 2010.
- 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: DF, 1998. cap. 4, p. 87-132.
- CASTRO, C. E. F. **Cultivo de Helicônias para exportação**. FRUPEX, Brasília, 1995, 42p.
- CASTRO, C. E. F.; MAY, A.; GONÇALVES, C. Atualização da nomenclatura de espécies do gênero *Heliconia* (Heliconiaceae). **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 13, n. 1, p. 38-62, 2007.
- COLUSSI, F.; DABUL, A. N. G.; AYUB, R. A. Regeneração de *Euphorbia heterophylla* L. in Vitro. **Ciência e Agrotecnologia**. V. 32, p. 1317-1321, 2008.
- CRILEY, R. A.; BROCHAT, T. K. *Heliconia*: botany and horticulture of a new floral crop. **Horticultural Reviews**. V. 14, p. 1-55, 1992.
- CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia Univ. Press, 1981
- DAHLGREN, R. M. T.; CLIFFORD H. T.; YEO P. F. **The families of the monocotyledons. Structure, evolution, and taxonomy**. Berlin, Springer-Verlag, 1985, 520 p.

- DIAS, M. A. S. **Determinação de fontes de explantes em *Helicônia* (*Heliconia bihai*, ANGIOSPERMAE, HELICONIACEAE), isolamento, identificação e controle de microrganismos envolvidos nas dificuldades de cultivo *in vitro***. 2002. 86 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.
- DIXON, W. E.; MALDEN, W. Colchicine with special reference to its mode of action and effect on bone marrow. **Journal of Physiology**, v. 37, p. 50-76, 1908.
- DHOOGHE, E.; LAERE, K. V.; EECKHAUT, T.; LEUS, L.; HUYLENBROECK, J. V. Mitotic chromosome doubling of plant tissues *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 2010. Disponível em: <http://www.springerlink.com/content/w6l7x75227700134/fulltext.pdf> Acesso em: 05 de janeiro de 2011.
- DOBKIN, D. S. Flowering patterns of long-lived *Heliconia* inflorescences: implications for visiting and resident nectarivores. **Oecologia**, v. 64, p. 245-254, 1984.
- DUSTIN, A. P. Contribution à l'étude de l'action de poisons caryoclasiques sur les tumeurs animales. II Action de la colchicine sur le sarcome greffé, type crocker, de la souris. **Bulletin de l'Academie Royale de Medicine**, Belgique, v. 14, p. 487-502, 1934.
- DUSTIN, A. P. La colchicine e ses applications à l'analyse des quelques problèmes de cytophysiologie. **Mélanges Jean Demoor**, p. 170-180, 1937.
- DUSTIN, A. P. L'action des arsenicaux et de la colchicine sur la mitose. La stathmocinèse. **Comptes Rendus de l'Association des Anatomistes**, v. 33, p. 204-212, 1938.
- EIGSTI, O. J. A cytological study of colchicine effects in the induction of polyploidy in plants. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v. 24, n. 2, p. 56-63, 1938.
- EIGSTI, O. J.; DUSTIN, P. Jr. **Colchicine in agriculture, medicine, biology and chemistry**. Ames, Iowa, U.S.A., The Iowa State College Press, 1955, 470 p.
- ESCANDÓN, A. S.; MIYAJIMA, I.; ALDERETE, M.; HAGIWARA, J. C.; FACCIUTO, G.; MATA, D.; SOTO, S. M. Wild ornamental germplasm exploration and domestication based on biotechnological approaches. *In vitro* colchicine treatment to obtain a new cultivar of *Scoparia montevidensis*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 2,

2005. Disponível em: <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol8/issue2/full/2/> Acesso em: 05 de janeiro de 2011.

FAO/IAEA (Food and Agriculture Organization/International Atomic Energy Agency). **Mutant varieties database**, 2010, disponível em: <http://mvgs.iaea.org/Search.aspx>. Acesso em: 05 de janeiro de 2010.

GANTAIT, S.; MANDAL, N.; BHATTACHARYYA, S. B.; DAS, P. K. Induction and identification of tetraploids using in vitro colchicine treatment of *Gerbera jamesonii* Bolus cv. Sciella. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 2011. Disponível em: <http://www.springerlink.com/content/tn1657t11r881623/> acesso em: 11 de abril de 2011.

GLOWACKA, K.; JEZ, S.; KACZMAREK, Z. Polyploidization of *Miscanthus sinensis* and *Miscanthus x giganteus* by plant colchicine treatment. **Industrial Crops and Products**, v. 30, p. 444 - 446, 2009.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: DF, 1998. cap. 9, p. 183-260.

GUERRA, M. S. **Introdução à Citogenética Geral**. Rio de Janeiro, RJ, Guanabara Koogan, 1988, 142 p.

HABERLANDT, G. Cultuversuche mit isolierten Pflanzenzellen. 1902 In: LAIMER, M.; RÜCKER, W. **Plant Tissue Culture: 100 Years Since Gottlieb Haberlandt**. New York: Springer, 2003. p. 1-24.

HESLOP-HARRISON, J. S.; SCHWARZACHER, T. Domestication, Genomics and the Future for Banana. **Annals of Botany**, v. 100, p. 1073-1084, 2007.

JAIN, S. M. *In vitro* mutagenesis in banana (*Musa ssp.*) improvement. In: DUBOIS, T.; HAUSER, S.; STAVER, C.; COYNES, D. International Conference on Banana and Plantain in Africa on Harnessing International Partnerships to Increase Research Impact - **Acta Horticulturae**, v. 879, p. 605-614, 2010.

JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, M. S.; **Projeto de fortalecimento do setor de flores e plantas ornamentais do estado do Espírito Santo, acesso a mercados: levantamento de**

- informações das empresas e do mercado de atuação.** Hortica Consultoria e Treinamento, 2007, 67 p.
- JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, M. S.; Mercado interno para os produtos da floricultura brasileira: características, tendências e importância socioeconômica recente. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental.** Campinas, SP, v. 14, n. 1, p. 37-52, 2008.
- JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, M. S.; **Análise conjuntural do comércio exterior da floricultura Brasileira: balanço 2009 e perspectivas 2010.** Hortica Consultoria e Treinamento, 2009, 7 p.
- JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, M. S.; Análise conjuntural do comércio exterior da floricultura Brasileira: 1º semestre de 2010. **Hortica Consultoria e Treinamento**, 2010, 7 p.
- KARTHA, K.K. **Cryopreservation of plant cells and organs.** USA: CRC Press, 1985, 276 p.
- KRESS, W. J. Taxonomy of old world *Heliconia* (Heliconiaceae). **Allertonia**, v. 6, p. 1-58, 1990.
- KRESS, W. J.; PRINCE, L. M.; HAHN, W. J.; ZIMMER, E. A. Unraveling the Evolutionary Radiation of the Families of the Zingiberales Using Morphological and Molecular Evidence. **Systematic Biology**, v. 50, n. 6, p. 926-944, 2001.
- KRESS, W. J.; SPECHT, C. D. The evolutionary and biogeographic origin and diversification of the tropical monocot order Zingiberales. **ALISO**, v. 22, p. 621-632, 2006.
- KUMAR, S.; SINGH, M.P. Plant tissue culture. New Delhi: **APH Publishing**, 2009. 278 p.
- LEE, Y. H.; NG, N. Y.; GOH, C. J. Pollen formation and fruit set in some cultivars of *Heliconia psittacorum*. **Scientia Horticulturae**, v. 60, p. 167-172, 1994.
- LEE, K. S.; ZAPATA-ARIAS, F. J.; BRUNNER, H.; AFZA, R. Histology of somatic embryo initiation and organogenesis from rhizome explants of *Musa* spp. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 51, p. 1-8, 1997.
- LEE, G. J.; CHUNG, S. J.; PARK, I. S.; LEE, J. S.; KIM, J. B.; KIM, D. S.; KANG, S. Y. Variation in the Phenotypic Features and Transcripts of Color Mutants of *Chrysanthemum* (*Dendranthema grandiflorum*) Derived from Gamma ray Mutagenesis. **Journal of Plant Biology**, v. 51, n. 6, p. 418-423, 2008.

- LEICHT, A. R.; LEICHT I. J. Genomic Plasticity and the Diversity of Polyploid Plants. **Science**, v. 320, p. 480-483, 2008.
- LIU, S.; CHEN, S.; CHEN, Y.; GUAN, Z.; YIN, D.; CHEN, F. *In vitro* induced tetraploid of *Dendranthema nankingense* (Nakai) Tzvel. shows an improved level of abiotic stress tolerance. **Scientia Horticulture**, v. 127, p. 411-419, 2011.
- LOGES, V.; TEIXEIRA, M. C. F.; CASTRO, A. C. R.; COSTA, A.S. Colheita, pós-colheita e embalagem de flores tropicais em Pernambuco. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.23, n.3, p.699-702, 2005.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Contribuições das Câmaras Setoriais e Temáticas à Formulação de Políticas Públicas e Privadas para o Agronegócio. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**. Campinas, SP, v.13, n. 1, p. 3-12, 2007.
- MOTOS, J. R.; **Flores de corte, Apostila Flortec** – Consultoria e Treinamento, 2000.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, V. 15, p. 473-497, 1962.
- MURASHIGE, T.; NAKANO, R. Tissue Culture as a Potential Tool in Obtaining Polyploid Plants **Journal of Heredity**, v. 57, n. 4, p. 115-118, 1966.
- MURASHIGE, T. Plant Propagation Through Tissue Cultures. **Plant Physiology**, v. 25, p. 135-166, 1974.
- NAKAI, T. Notulae ad plantas Asiae Orientalis (XVI) In: the Amomales or Zingiberales. **Journal of Japanese Botany**, v.17, n.4, p.189-203, 1941.
- African Journal of Biotechnology Vol. 7 (20), pp. 3548-3652, 20 October 2008, N. R.; ZOBOLO, A. M. Effect of water stress on growth of colchicine induced polyploid *Coccinia palmata* and *Lagenaria sphaerica* plants. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 20, p. 3548-3652, 2008.
- OLIVEIRA, A. A. P.; BRAINER, M. S. C. P. **Floricultura: caracterização e mercado**. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, 2007, 180 p.
- PAIVA, W. O. **A cultura de helicônias**. Fortaleza: EMBRAPA-CNPAT, 1998. 20 p.

- PEDERSEN, L. B.; KRESS, W. J. Honeyeater (Meliphagidae) pollination and floral biology of Polynesian *Heliconia* (Heliconiaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v.26, p. 1-21, 1999.
- PENG, X. B.; SUN, M. X.; YANG, H. Y. A novel *in vitro* system for gamete fusion in maize. **Cell Research**. V. 15, p. 734-738, 2005.
- RAZDAN, M. K. **Introduction to plant tissue culture**. USA: Science Publisher, 2º ed., 2003, 330 p.
- ROUX, N.; DOLEZEL, J.; SWENNEN, R.; ZAPATA-ARIAS, F. J. Effectiveness of three micropropagation techniques to dissociate cytochimeras in *Musa* spp. **Plant cell, Tissue and Organ Culture**, v. 66, p. 189-197, 2001
- SAKHANOKHO, H. F.; RAJASEKARAN, K.; KELLEY, R. Y.; ISLAM-FARIDI, N. Induced polyploidy in diploid ornamental ginger (*Hedychium muluense* R. M. Smith) using colchicine and oryzalin. **Hortscience**, v. 44, n. 7, p. 1809-1814, 2009.
- SEBRAE AGRONEGÓCIOS. **Serviço brasileiro de apoio às micro e pequenas empresas**. Brasília: Gráfica Ipiranga, 2005. n.1.
- SILVA, S. O.; SOUZA-JUNIOR, M. T.; ALVES, H. J.; SILVEIRA J. R. S.; LIMA, M. B. Banana breeding program at Embrapa. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 1, n. 4, p. 399-436, 2001.
- SIMÃO, D. G.; SCATENA, V. L. Morfoanatomia das brácteas em *Heliconia* (Heliconiaceae) ocorrentes no Estado de São Paulo, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 18, n. 2, p. 261-270, 2004.
- SHEELA, V. L. **Flowers for trade**. Pitam Pura, Nova Deli, Índia: New India Publishing, 2008, 369 p.
- SKÁLOVÁ, D.; NAVRÁTILOVÁ, B.; ONDØEJ, V.; LEBEDA, A. Optimizing culture for *in vitro* pollination and fertilization in *Cucumis sativus* and *C. melo*. **Acta Biologica Cracoviensia**, v. 52, n. 1, p. 111-115, 2010.
- SLEPER, D. A.; POEHLMAN, J. M. **Breeding field crops**. Ames, Iowa, U.S.A.: Blackwell Publishing, 2006, 424 p.

- SORIANO, M.; CISTUÉ, L.; VALLÉS, M. P.; CASTILLO, A. M. Effects of colchicine on anther and microspore culture of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 91, p. 225-234, 2007.
- STEBBINS, G. L. **Variation and Evolution in Plants**. New York, U.S.A: Columbia University Press, 1950, 643 p.
- TAYLOR, J.; WHITE, S. A. Observations of hummingbird feeding behavior at flowers of *Heliconia beckneri* and *H. tortuosa* in southern Costa Rica. **Ornitologia Neotropical**, v. 18, n. 1, p. 133-138, 2007.
- TOM, W. Stokes tropical: a source for heliconia plants. **Biologia Plantarum**, v. 39, n. 6, p. 635-639, 1997.
- TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa-CNPq. V. 2, 1998. 864 p.
- VAN HARTEN, A. M. **Mutation breeding: theory and practical applications**. Ucraina: Cambridge University Press, 1998, 353 p.
- VAN TUYL, J. M.; VAN DIËN, M. P.; VAN CREIJ, M. G. M.; VAN KLEINWEE, T. C. M.; FRANKEN, J.; BINO, R. J. Application of *in vitro* pollination, ovule culture and embryo rescue for overcoming incongruity barriers in interspecific *Lilium* crosses. **Plant Science**. v. 74, p. 115-126, 1991.
- WU, C. Y.; ROLFE, P. A.; GIFFORD, D., K; FINK, G. R. Control of Transcription by Cell Size. **PLoS Biology**, v. 8, p. 1-16, 2010.
- XIAODING, G.; YAJU, L.; DE, M. Z. Sweet potato germplasm research in China. In: RAO, R.; CAMPILAN, D., Exploring the complementarities of In situ and *ex situ* conservation strategies for Asian sweet potato genetic resources, proceedings of the 3rd International Workshop of the Asian network for sweet potato genetic resources (ANSWER). Indonesia: **International Plant Genetic Resources Institute**, 2002, p. 35-41.

ARTIGO

**Indução de Poliploidia *in vitro* com aplicação de
colchicina em *Heliconia bihai* (L) L.**

A ser submetido ao periódico
Pesquisa Agropecuária Brasileira
Brasília, DF.

Indução de Poliploidia *in vitro* com aplicação de colchicina em *Heliconia bihai* (L) L.

Giovani José F. Cavalcanti-Filho⁽¹⁾, Ana Christina Brasileiro-Vidal⁽¹⁾, Claudia Ulisses⁽²⁾, Gemima Melo⁽²⁾, Vivian Loges⁽²⁾ e Ana Maria Benko-Iseppon⁽¹⁾

Resumo – O crescimento da floricultura e consequentemente uma maior exigência na qualidade e variedade de seus produtos têm levado à aplicação de técnicas biotecnológicas para o melhoramento vegetal. Este trabalho objetivou a produção de indivíduos poliploides *in vitro* de *H. bihai*. Plântulas de *H. bihai* foram inoculadas *in vitro* e transferidas para o meio MS com metade das concentrações dos sais, adicionado de BAP 0,03 mg/L e colchicina em diferentes concentrações (0%; 0,05%; 0,1%; 0,2%), além do acréscimo de 0,75 mL de solução de colchicina na mesma concentração de cada tratamento, por 24 ou 48 h. Em seguida, os explantes foram transferidos para um novo meio de cultura de mesma composição, sem colchicina. Após 30 dias, observou-se que materiais submetidos à colchicina apresentaram desenvolvimento reduzido ou com alterações morfológicas, sendo mais acentuados de acordo com o aumento da concentração e do tempo de exposição ao agente antimitótico. A contagem cromossômica indicou a poliploidização de dois indivíduos (0,05% e 0,1%, ambos por 48 h) em nível tetraploide, fato confirmado por alterações no tamanho e número de estômatos. Os resultados indicam a viabilidade da técnica para *H. bihai*, sendo estabelecidas as concentrações ideais de colchicina de 0,05% e 0,1% por 48 h.

Termos para indexação: poliploidização, melhoramento vegetal, alterações morfológicas, Heliconiaceae.

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de genética, Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal. giovanifeitosa@hotmail.com; ana.iseppon@gmail.com; brasileiro_vidal@hotmail.com

² Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE. vivianloges@yahoo.com.br

***In vitro* polyploidy induction via colchicine application in *Heliconia bihai* (L) L.**

Abstract – The expansion of the flower market, together with larger demands regarding the quality and variety of its products have led to the application of biotechnological methods for breeding purposes. The present research aimed to promote the production of polyploids plants of *H. bihai* *in vitro*. *H. bihai* plantlets were inoculated *in vitro* and transferred to a MS medium with salts half concentrated, increased with BAP 0.03 mg/L and colchicine in several concentrations (0%; 0.05%; 0.1%; 0.2%), with addition of 0.75 mL colchicine solution in appropriated concentrations for 24 or 48 hours. Afterwards, the material was transferred to a new medium, without colchicine. After 30 days, it was observed that explants submitted to colchicine concentrations presented reduced development or morphological changes, accompanying increases of concentration and exposure time to the agent. Chromosome counting indicated polyploidization in two plants (0.05% and 0.1%, both for 48 h), at the tetraploid level, confirmed by numbers and morphological changes of the stomata. The results indicated that polyploidy induction is a recommendable technique for *H. bihai*, with concentrations of 0.05% and 0.1% for 48 hours considered ideal for this purpose.

Indexing-terms: polyploidization, plant breeding, morphological changes, Heliconiaceae.

Introdução

Heliconia bihai (L.) L. destaca-se pela beleza exótica de sua inflorescência terminal ereta, avermelhada com bordas esverdeadas, associada a algumas características inerentes das flores tropicais como resistência e durabilidade no período pós-colheita, despertando o interesse de consumidores e demandando um aumento de sua produção para a floricultura (Loges *et al.*, 2005; Castro *et al.*, 2007). Pertencente ao gênero *Heliconia*, único componente da família Heliconiaceae (Cronquist, 1981), seu cultivo é favorecido pelas condições edafoclimáticas do Brasil, com produção liderada pela região Nordeste (Oliveira & Brainer, 2007). O aumento no consumo de helicônias no mercado floricultor tem levado à procura por uma maior variedade de produtos, incentivando a aplicação de técnicas que visam à obtenção de plantas com novas características (Rodrigues *et al.*, 2005; Urrea e Ceballos, 2005).

A indução de indivíduos poliploides tem auxiliado em programas de melhoramento genético de plantas visando à produção de novas cultivares (Escandón, 2005; FAO/IAEA, 2010). A multiplicação cromossômica observada em poliploides pode ser refletida na morfologia do material, produzindo vegetais com órgãos de tamanhos, em geral, maiores, com cores ou formas diferentes das apresentadas pelo material de origem (Schepper *et al.*, 2001; Ewald *et al.*, 2009; Ye *et al.*, 2010). Os poliploides podem ser produzidos por processos naturais (Adams & Wendel, 2005) ou ainda, induzidos através do uso de agentes químicos (Thao *et al.*, 2003; Allum *et al.*, 2007). Dentre os agentes químicos, a colchicina é um alcaloide largamente utilizado na poliploidização, devido à sua afinidade em ligar-se aos dímeros de tubulina, impedindo a formação das fibras do fuso acromático e a correta migração dos cromossomos para os pólos opostos durante o ciclo mitótico (Omran & Mohammad, 2008; Skálová *et al.*, 2010).

A aplicação da colchicina, em geral, é realizada *in vitro*. Poliploides tem sido obtidos em *Musa ssp.* e em *Zingiber officinale*, facilitados pelo cultivo *in vitro* de seus embriões e meristemas apicais, respectivamente, através da aplicação da colchicina (Azhar *et al.*, 1998; Asif *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2004). Para *H. bihai*, o desenvolvimento da cultura de tecidos tem permitido sua produção e multiplicação de forma rápida, a partir de diferentes tecidos como brotos laterais e embriões zigóticos (Rodrigues, 2005; Torres *et al.*, 2005; Ulisses *et al.*, 2010), sendo de grande utilidade para aplicação de técnicas de poliploidização *in vitro*.

Acessos triploides de *H. psittacorum* ($2n = 3x = 36$) têm sido observados na natureza, os quais são denominados *H. psittacorum* cv. Sassy, cv. Petra e cv. Iris (Lee *et al.*, 1994). *Heliconia bihai* possui $2n = 2x = 24$, não sendo reportado na literatura poliploides para esta espécie (Anderson, 1984). Nesse sentido, a presente pesquisa teve como objetivo avaliar o efeito de

diferentes concentrações e períodos de exposição à colchicina no desenvolvimento *in vitro* de explantes de *H. bihai*, através de análises morfológicas, histológicas e citogenéticas, buscando estabelecer uma metodologia de indução de poliploides para o mercado floricultor.

Material e Métodos

Material vegetal

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal (LGBV) do Departamento de Genética da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Os explantes de *H. bihai* foram obtidos a partir do desenvolvimento de embriões inoculados *in vitro*, resgatados de sementes. As plantas na quais foram obtidas as sementes encontram-se cultivadas em condição de campo nas seguintes localidades: (1) Coleção de Germoplasma da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Fazenda Bem-te-vi, Km 13, Aldeia, Camaragibe-PE; (2) área de produção da Atlantis Flora Tropical em Guabiraba, Recife-PE, e (3) campus da UFPE, Recife-PE.

Obtenção dos explantes

Na primeira etapa, frutos de *H. bihai* foram submetidos ao processo de desinfestação conforme proposto por Ulisses *et al.* (2010), constituído de imersão em álcool 70% por 1 min, seguido por uma solução de hipoclorito de cálcio (CaCl_2O_2) 3% com adição de três gotas de detergente Tween 20% por 20 min. Em seguida, o material foi imerso em solução de CaCl_2O_2 1,5% com três gotas de Tween 20% por 15 min. Após este período, os frutos foram lavados três vezes em água destilada autoclavada e passados para etapa de resgate dos embriões. Com a ajuda de bisturi e pinças, o pericarpo foi extraído das sementes que tiveram seus embriões resgatados, conforme técnica descrita por Torres *et al.* (2005). A seguir, os embriões foram inoculados em frascos (três por frasco) contendo 20 mL de meio Murashige e Skoog (1962) com metade das concentrações dos sais, isento de reguladores de crescimento, acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose e 10 g L⁻¹ de ágar. Os embriões foram mantidos no escuro a 25 ± 2°C, durante oito dias. Após esse período, passaram a um ambiente com fotoperíodo de 16 h, a uma intensidade de 90 a 110 $\mu\text{mol s}^{-1}\text{ m}^{-2}$.

Tratamento com colchicina

Trinta dias após a inoculação, 48 plântulas (medindo de 2 a 3 cm de comprimento) foram transferidas individualmente para tubos de ensaio contendo 8 mL do meio básico descrito acima, acrescido de 0,03 g L⁻¹ de BAP e diferentes concentrações de colchicina (0%; 0,05%, 0,1% e 0,2%). Em cada recipiente foram adicionados sobre os explantes 750 µL de solução de colchicina, nas concentrações de cada tratamento. Os explantes permaneceram nestes tratamentos por períodos de 24 ou 48 h, sendo mantidos em sala de cultivo com temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 16 h. Em seguida, o material foi transferido para tubos contendo 20 mL do mesmo meio de cultivo descrito acima isento de colchicina.

Contagem Cromossômica

Pontas de raízes com 2 a 2,5 mm foram excisadas dos explantes e pré-tratadas em 8-hidroxiquinolina (2 mM) por 20-22 h a 10 °C antes de serem fixadas em metanol:ácido acético (3:1, v:v) por 3-24 h em temperatura ambiente, sendo mantidas após este período a -20 °C. A preparação das lâminas foi realizada segundo a metodologia descrita por Carvalho & Saraiva (1993) com modificações apresentadas por Vasconcelos *et al.* (2010). As pontas das raízes foram lavadas três vezes em água destilada, digeridas em solução 2% celulase (Calbiochem 21947) e 20% pectinase (Sigma) por 2,5-3 h. O meristema foi lavado em água destilada, colocado sobre uma lâmina de vidro inclinada verticalmente (ca 30°) e lavada com fixador gelado. Em seguida, pontas de raízes foram maceradas individualmente, secas com o auxílio de bombas de ar e mergulhadas em ácido acético 45% por 10 s. A lâmina foi então levada para secagem em superfície plana pré-aquecida (42 °C) por 5 min e estocadas a -20 °C. Para análise, as lâminas foram coradas com DAPI (4'-6-diamidino-2-fenilindol), montadas em tampão McIlvaine-glicerol (1:1), e as melhores células foram selecionadas e fotografadas em microscópio de epifluorescência Leica DMRB, com uma câmera Leica DC 300F, através do programa Leica CW4000.

Estômatos

Para análise dos estômatos, folhas obtidas dos explantes poliploides e material controle foram submetidas a cortes paradermais manualmente, os quais foram despigmentados em solução de hipoclorito de sódio 0,75% por 10-15 min. Em seguida, os materiais foram corados em solução Safrablau (Azul de Alcian 1% + Safranina 1%) (Kraus & Arduin, 1997) e o tamanho de seus estômatos e a densidade estomática dos indivíduos diploides e poliploides foram analisados em microscópio de luz e aferidos, baseando-se em escala micrométrica para a ocular utilizada. A densidade estomática foi determinada segundo a equação abaixo:

$$DE = \frac{\text{Número de estômatos}}{\text{mm}^2}$$

Análise dos dados

O experimento foi conduzido segundo delineamento inteiramente casualizado, em um arranjo fatorial 4 x 2, perfazendo um total de oito tratamentos, correspondentes a quatro concentrações de colchicina e a dois períodos de submissão ao antimitótico. A unidade experimental constou de um tubo de ensaio contendo uma plântula, com seis repetições por tratamento. Os explantes foram avaliados aos 30, 60, 90 dias após a inoculação, adotando-se como variáveis características morfológicas (altura da planta, forma folhas e características estomáticas), a taxa de mortalidade e o período de desenvolvimento dos embriões. Os materiais que apresentaram diferenças em relação ao controle tiveram número cromossômico e estômatos analisados. Os dados de altura média, densidade estomática e comprimento médio dos estômatos foram submetidos a testes de normalidade e, quando necessário, foi aplicada análise de variância e teste de Tukey, com ajuda do software Assistat versão 7.6 beta (2011).

Resultados e Discussão

Alterações fisiológicas e morfológicas

Na primeira análise, após 30 dias de inoculação pôde-se observar que 100% do material controle se desenvolveu satisfatoriamente. Um intumescimento na base dos explantes foi notado em todos os tratamentos, com exceção do controle, sendo visível em 100% dos explantes submetidos a 0,1% e 0,2% de colchicina em ambos os períodos (Tabela 1). Alterações na forma das folhas (folhas mais estreitas e compridas, ou folhas mais largas) bem como, um menor comprimento das plantas quando comparadas ao material controle, foram vistos nos materiais tratados com colchicina. De acordo com a concentração e com o tempo de exposição, foram observadas alterações foliares em 40% das plantas a 0,1% por 24 e 48 h, respectivamente; atingindo valores de 60% e 50% a 0,2% por 24 e 48 h, nos primeiros 60 dias de desenvolvimento. Um decréscimo no comprimento da planta, com diferenças significativas em relação ao controle foi observado no material tratado de modo inversamente proporcional aos níveis de concentração e tempo de exposição à colchicina (Figura 1A, B, C; Tabela 2). Em geral, alterações morfológicas, como intumescimento de explantes e alterações na forma das folhas, têm sido observadas e consideradas em indivíduos submetidos à colchicina *in vitro*, especialmente aqueles poliploidizados, evidenciando a influência da colchicina no

desenvolvimento de diversos materiais vegetais (Liu *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2009).

Tabela 1: Percentual de explantes de *Heliconia bihai* cultivados *in vitro*, submetidos a diferentes concentrações e períodos de exposição à colchicina, que apresentaram intumescimento aos 30 dias de inoculação, necrose aos 60 dias e com brotação aos 90 dias em cada tratamento.

Concentração de colchicina (%) / Período de exposição (h)	Intumescimento aos 30 dias (%)	Oxidação aos 60 dias (%)	Brotação aos 90 dias (%)
0/ 24	-(¹)	-	50
0/ 48	-	-	50
0,05/ 24	33	-	16
0,05/ 48	40	16	16
0,1/ 24	70	33	33
0,1/ 48	80	33	66
0,2/ 24	100	33	33
0,2/ 48	100	100	16

(¹) Células com hífen representam variáveis não observadas na análise.

Após 60 dias, 100% do material com concentração e período de exposição maiores sofreu oxidação, estando esta taxa em torno de 33% para os tratamentos de 0,1% por 24 e 48 h e 0,2% por 24 h. Para o material submetido a 0,05% por 48 h, foi observada oxidação em 16% dos explantes, estando a dose mais baixa, com período de exposição menor e o material controle com 100% de sobrevivência. Apesar da alta oxidação do material submetido a 0,2% por 48 h, após 90 dias, 16 % deste material apresentou brotações, estando esta taxa em 50% e 66% para o material controle em ambos os períodos e o tratado a 0,1% por 48 h, respectivamente. (Tabela 1). As plântulas submetidas à colchicina apresentaram um desenvolvimento inicial mais lento que o material controle, normalizando após 60 dias (Figura 1 C). Na literatura, a mortalidade e um desenvolvimento inicial mais lento em outros materiais vegetais submetidos à poliploidização estão relacionados na literatura possivelmente à toxicidade da colchicina, que bloqueia a

formação das fibras do fuso acromático, alterando o ciclo mitótico, podendo interrompê-lo por completo (Tang *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2010; Ye *et al.*, 2010).

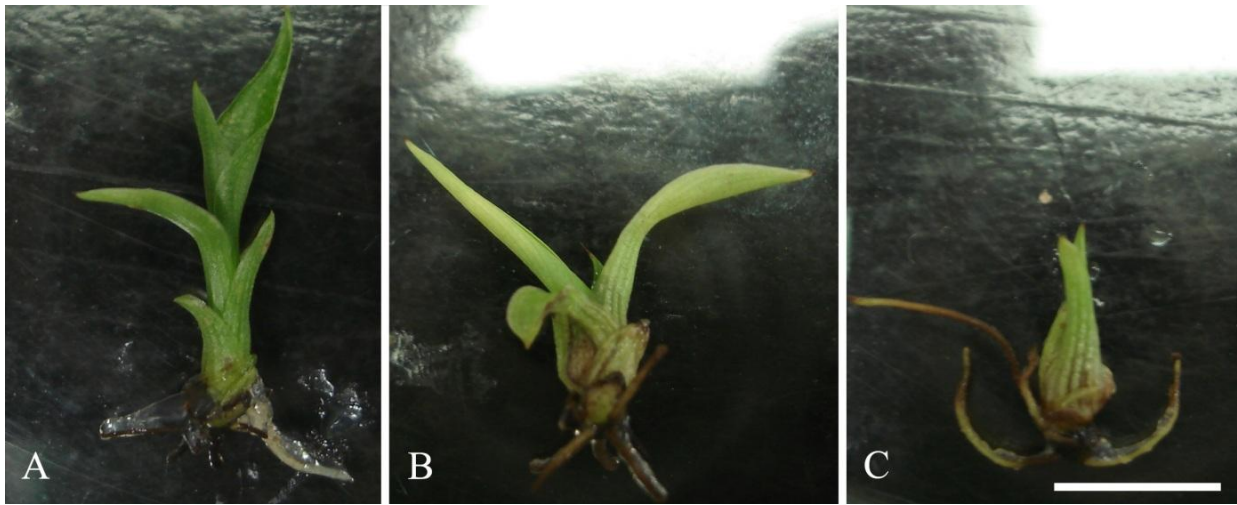


Figura 1: Diferenças na altura de plantas e alterações mais observadas nos materiais de *Heliconia bihai* submetidos a diferentes concentrações de colchicina *in vitro*, aos 30 dias. A: Material controle. B: Material submetido a 0,05% de colchicina por 48 h, apresentando folhas compridas e finas e intumescimento da base. C: Explante tratado com 0,1% de colchicina por 24 h, evidenciando desenvolvimento lento. Escala = 1 cm.

Contagem cromossômica

A contagem cromossômica tem sido um dos métodos mais utilizados e mais confiáveis, para análise direta do nível de ploidia em diversos estudos (Dhooghe *et al.*, 2009; Nilanthi *et al.*, 2009, Liu *et al.*, 2011). Para *H. bihai* o número cromossômico conhecido é de $2n = 24$ (Anderson, 1984), sendo observado o mesmo valor no material controle utilizado neste estudo (Figura 2 A). Além desse valor, dois indivíduos apresentaram $2n = \text{ca. } 48$ cromossomos, um para o tratamento de 0,05% (16%) e outro para o de 0,1% por 48 h (16%), sendo ambos considerados possíveis tetraploides (4x) (Figura 2 B e C; Figura 3).

Tabela 2: *Heliconia bihai* cultivada *in vitro* com percentual de alterações morfológicas e altura média após 30, 60 e 90 dias de submissão a tratamentos com colchicina.

Concentração de colchicina (%) / Período de exposição (h)	Alterações foliares / desenvolvimento (%)		Altura média (cm)		
	60 dias	90 dias	30 dias	60 dias	90 dias
0/ 24	-(¹)	-	2,8 a ⁽²⁾	3,53 a	3,71 a
0/ 48	-	-	2,83 a	2,6 ab	3,78 a
0,05/ 24	16	16	1,9 ab	2,9 ab	3,35 ab
0,05/ 48	-	-	1,8 ab	2,8 ab	3,31ab
0,1/ 24	40	40	1,5 ab	2,7 ab	3,33 ab
0,1/ 48	40	40	1,03 b	2,6 ab	3,18 ab
0,2/ 24	60	60	0,8 b	2,03 b	2,96 b
0,2/ 48	50	50	0,88 b	-	-

(¹) Células com hífen representam variáveis não observadas na análise. (²) Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si (Teste de Tukey $p < 0,05$).

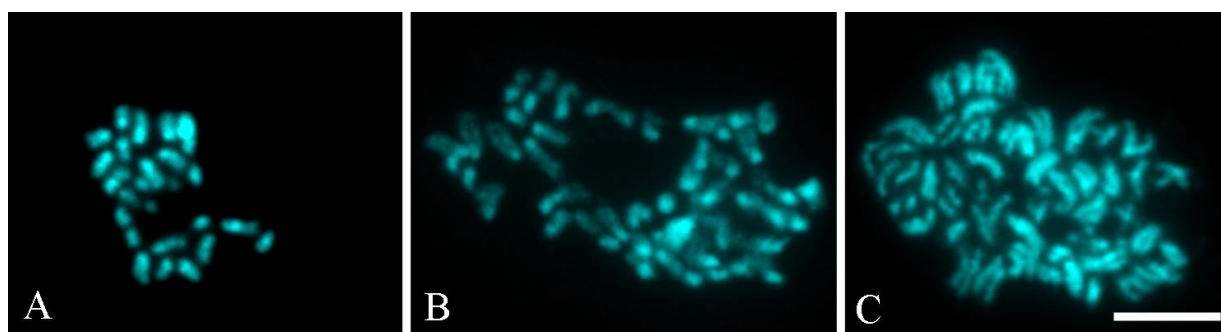


Figura 2: Cromossomos metafásicos mitóticos de plantas *Heliconia bihai* submetidas a diferentes concentrações de colchicina *in vitro*. A: Controle diploide ($2n = 24$ cromossomos). B: Provável tetraploide ($2n = \text{ca. } 48$ cromossomos) submetido a 0,05% de colchicina por 48 h; C: Provável tetraploide ($2n = \text{ca. } 48$ cromossomos) submetido a 0,1% de colchicina por 48 h. Escala = 10 μm .

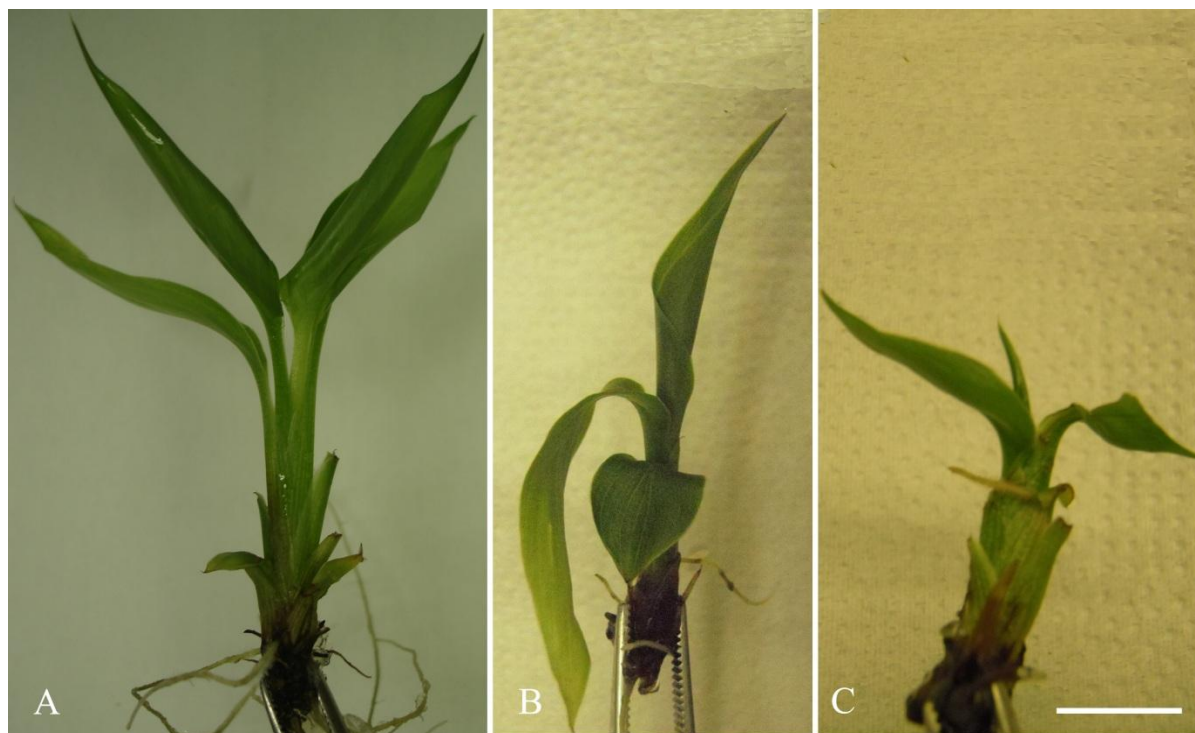


Figura 3: Plantas de *Heliconia bihai* submetidos à diferentes concentrações de colchicina *in vitro*, aos 120 dias. A: Material controle. B: Poliploide ($2n = \text{ca. } 48$ cromossomos) submetido a 0,05% de colchicina por 48 h; C: Poliploide ($2n = \text{ca. } 48$ cromossomos) a 0,1% 48 h. Escala = 2 cm.

Características estomáticas

Os estômatos dos poliploides apresentaram morfologia tetracítica e células-guarda sem alterações significativas; porém, possuíram um tamanho maior que os estômatos apresentados pelo tratamento controle, além de uma menor densidade estomática (Figura 4 A e B; Tabela 3). Estas diferenças no tamanho e número de estômatos por área têm sido características comuns apresentadas por diversos materiais vegetais submetidos à poliploidização, sendo utilizadas como características base na identificação de indivíduos poliploides em diversos estudos (Viehmannová *et al.*, 2009; Glowacka *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010).

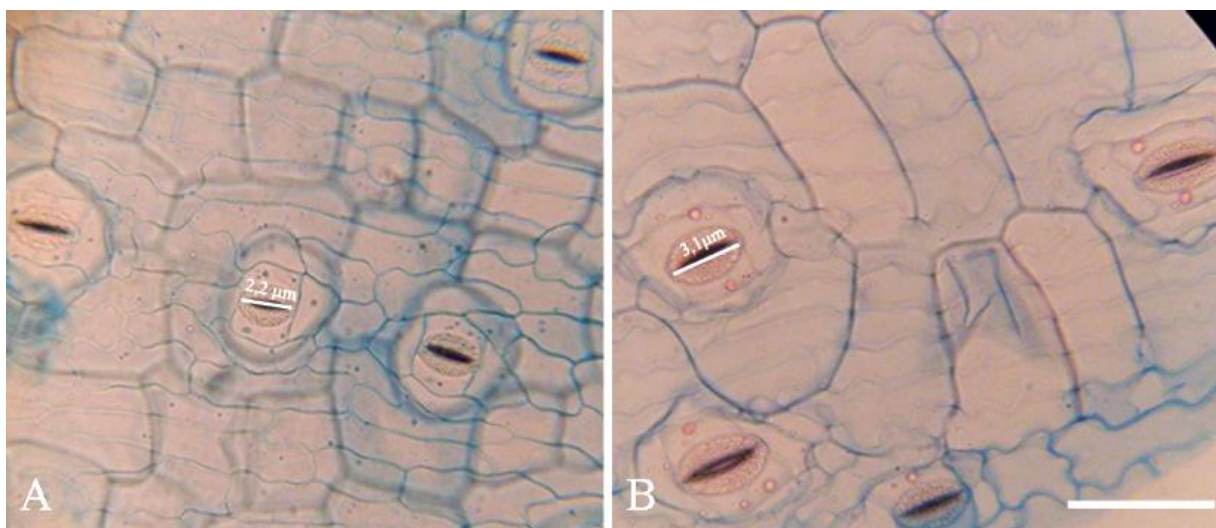


Figura 4: Tamanho dos estômatos de plantas *Heliconia bihai* submetidas à diferentes concentrações de colchicina *in vitro*. A: Material controle diploide. B: Material poliploide submetido a 0,05% de colchicina por 48 h. Escala = 5 µm.

Tabela 3: Densidade estomática e comprimento médio dos estômatos do material controle e de poliploides de *Heliconia bihai* encontrados nos tratamentos com 0,05% e 0,1%, ambos por 48 h.

Concentração de colchicina (%)/ Período de exposição (h)	Densidade estomática	Comprimento médio dos estômatos (µm)
0/ 0	9,27500 a ⁽¹⁾	1,97692 c
0,05/ 48	4,87500 b	2,93846 a
0,1/ 48	6,72500 ab	2,70769 b

⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferirem estatisticamente entre si (Teste de Tukey $p < 0,05$).

Conclusão

Os resultados obtidos neste estudo demonstram a eficiência do tratamento da colchicina no processo de indução de poliploidia para *H. bihai*, indicando ser esta, uma técnica de utilidade ao melhoramento vegetal desta espécie.

As doses intermediárias de 0,05% e 0,1%, ambos por 48 h de exposição, mostraram-se mais eficientes na produção de poliploides (16% para cada dose), podendo ser indicadas como tratamentos ideais para poliploidização em *H. bihai* e como base para futuros estudos com outras espécies do gênero.

Agradecimentos

Agradecemos à equipe do laboratório de Floricultura da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), pela ajuda com a coleta das sementes, e a Atlantis Flora Tropical e a UFRPE, pelo fornecimento do material vegetal. Ao CNPq e a FACEPE somos gratos pelo apoio na forma de bolsas e auxílio financeiro para o desenvolvimento desta pesquisa.

Referências

- ADAMS, K. L.; WENDEL, J. F. Polyploid and genome evolution in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 8, p. 135-141, 2005.
- ALLUM, J. F.; BRINGLOE, D. H.; ROBERTS, A. V. Chromosome doubling in a *Rosa rugosa* Thunb. Hybrid by exposure of *in vitro* nodes to oryzalin: the effects of node length, oryzalin concentration and exposure time. **Plant Cell Reports**, v. 26, p. 1977-1984, 2007.
- ANDERSON, L. The chromosome number of *Heliconia* (Musaceae). **Nordic Journal of Botany**, v. 4, p. 191-193, 1984.
- ASIF, M. J.; MAK, C., YASMIN, O R. Polyploid induction in a local wild banana (*Musa acuminata* ssp. *malaccensis*). **Pakistan Journal of Biological Science**, v. 3, n. 5, p. 740-743, 2000.
- AZHAR, M.; MAK, C.; MOHD-NAZIR, B. Polyploidy induction in Pisang Mas, a diploid banana (*Musa* ssp.). In: WAHAB, Z. **Proceedings of the First National Banana Seminar**. Awana Genting, Pahang, Malásia, 2000. 343 p.
- CARVALHO, C.R.; SARAIVA, L.S. An air drying technique for maize chromosomes without enzymatic maceration. **Biotechnology Histochemistry**, v. 68, p. 142–145, 1993.
- CASTRO, C. E. F.; MAY, A.; GONÇALVES, C. Atualização da nomenclatura de espécies do gênero *Heliconia* (Heliconiaceae). **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 13, n. 1, p. 38-62, 2007.
- CHEN, W. H.; TAG, C. Y.; KAO, Y. L. Ploidy doubling by *in vitro* culture of excised protocorms or protocorm-like bodies in *Phalaenopsis* species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 98, p. 229-238, 2009.
- CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia Univ. Press, 1981.
- DABUL, A. N. G.; BELEFANT-MILLER, H.; ROYCHOWDHURY, M.; HUBSTENBERG, J. F.; LORENCE, A.; PHILLIPS, G. C. Screening of a broad range of rice (*Oryza sativa* L.) germplasm for *in vitro* rapid plant regeneration and development of an early prediction system. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 45, p. 414-420, 2009.
- DHOOGHE, E.; DENIS, S.; EECKHAUT, T.; REHUEL, D.; LABEKE, M. C. V. *In vitro* induction of tetraploids in ornamental *Ranunculus*. **Euphytica**, v. 168, p. 30-40, 2009.
- DIAS, M. A. S. **Determinação de fontes de explantes em Helicônia (*Heliconia bihai*, ANGIOSPERMAE, HELICONIACEAE), isolamento, identificação e controle de**

- microrganismos envolvidos nas dificuldades de cultivo *in vitro***. 2002. 86p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.
- DUTT, M.; VASCONCELLOS, M.; SONG, K. J. *In vitro* production of autotetraploid Ponkan mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) using cell suspension cultures. **Euphytica**, v. 173, p. 235 – 242, 2010.
- ESCANDÓN, A. S.; MIYAJIMA, I.; ALDERETE, M.; HAGIWARA, J. C.; FACCIUTO, G.; MATA, D.; SOTO, S. M. Wild ornamental germplasm exploration and domestication based on biotechnological approaches. *In vitro* colchicine treatment to obtain a new cultivar of *Scoparia montevidensis*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 2, 2005. Disponível em: <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol8/issue2/full/2/> Acesso em: 05 de janeiro de 2011.
- EWALD, D.; ULRICH, K.; NAUJOKS, G.; SHRÖDER, M. B. Induction of tetraploid poplar and black locust plants using colchicine: chloroplast number as an early marker for selecting polyploids *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 99, p. 353-357, 2009.
- FAO/IAEA (Food and Agriculture Organization/International Atomic Energy Agency). **Mutant varieties database**, 2010, disponível em: <http://mvgs.iaea.org/Search.aspx>. Acesso em: 05 de janeiro de 2010.
- GŁOWACKA, K.; JEZOWSKI, S.; KACZMAREK, Z. *In vitro* induction of polyploidy by colchicine treatment of shoots and preliminary characterisation of induced polyploids in two *Miscanthus* species. **Industrial Crops and Products**, v. 32, p. 88-96, 2010.
- KRAUS, J.E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro: EDUR, 1997. p. 198.
- LEE, Y. H.; NG, N. Y.; GOH, C. J. Pollen formation and fruit set in some cultivars of *Heliconia psittacorum*. **Scientia Horticulturae**, v. 60, p. 167-172, 1994.
- LIU, G.; LI, Z.; BAO, M. Colchicine-induced chromosome doubling in *Platanus acerifolia* and its Effect on plant morphology. **Euphytica**, v. 157, p. 145-154, 2007.
- LIU, S.; CHEN, S.; CHEN, Y.; GUAN, Z.; YIN, D.; CHEN, F. *In vitro* induced tetraploid of *Dendranthema nankingense* (Nakai) Tzvel. shows an improved level of abiotic stress tolerance. **Scientia Horticulture**, v. 127, p. 411-419, 2011.

- LOGES, V.; TEIXEIRA, M. C. F.; CASTRO, A. C. R.; COSTA, A.S. Colheita, pós-colheita e embalagem de flores tropicais em Pernambuco. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.23, n.3, p. 699-702, 2005.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, V. 15, p. 473-497, 1962.
- NILANTHI, D.; CHEN, X. L.; ZHAO, F. C.; YANG, Y. S.; WU, H. Induction of Tetraploids from Petiole Explants through Colchicine Treatments in *Echinacea purpurea* L. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2009, p. 1-7, 2009.
- OLIVEIRA, A. A. P.; BRAINER, M. S. C. P. **Floricultura: caracterização e mercado**. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, 2007, 180 p.
- OMRAN, A.; MOHAMMAD, B. N. Polyploidization effect in two diploid cotton (*Gossypium herbaceum* L. and *G. arboreum* L.) species by colchicine treatments. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 2, p. 102-108, 2008.
- RODRIGUES, P. H. V. *In vitro* establishment of *Heliconia rauliniana* (Heliconiaceae). **Scientia Agricola**, v. 62, n.1, p. 69-71, 2005.
- SCHEPPER, S.; LEUS, L.; MERTENS, M.; DEBERGH, P.; BOCKSTAELE, E. V.; DE LOOSE, M. Somatic polyploidy and its consequences for flower coloration and flower morphology in azalea. **Plant Cell Reports**, v. 20, p. 583-590, 2001.
- SKÁLOVÁ, D.; ONDREJ, V.; DOLEZALOVÁ, I.; NAVRÁTILOVÁ, B.; LESBEDA, A. Polyploidization Facilitates Biotechnological In Vitro Techniques in the Genus *Cucumis*. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, p. 1-8, 2010.
- SMITH, M.K.; HAMILL, S.D.; GOGEL, B.J.; SEVERN-ELLIS, A.A. Ginger (*Zingiber officinale*) autotetraploids with improved processing quality produced by an *in vitro* colchicine treatment. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 44, p. 1065–1072, 2004.
- TANG, Z. Q.; CHEN, D. L.; SONG, Z. J. HE, Y. C.; CAI, T. D. In vitro induction and identification of tetraploid plants of *Paulownia tomentosa*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 102, p. 213-220, 2010.
- THA, N. T. P.; URESHIMO, K.; MIYAJIMA, I.; OZAKI, Y.; OKUBO, H. Induction of tetraploids in ornamental *Alocasia* through colchicine and oryzalin treatments. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 72, p. 19-25, 2003.

- TORRES, A. C.; DUVAL, F. G.; 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, p.789-792, 2005.
- ULISSES, C.; MELO-DE-PINNA, G. F.; WILLADINO, L.; ALBUQUERQUE, C. C.; CAMARA, T. R. *In Vitro* Propagation of *Heliconia bihai* (L.) L. from Zygotic Embryos. **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, n. 1, p. 184-192, 2010.
- VASCONCELOS, S.; SOUZA, A. A.; GUSMÃO, C. L. S.; MILANI, M.; BENKO-ISEPPON, A. M.; BRASILEIRO-VIDAL, A. C. Heterochromatin and rDNA 5S and 45S sites as reliable cytogenetic markers for castor bean (*Ricinus communis*, Euphorbiaceae). **Micron**, v. 41, p. 746-753, 2010.
- VIEHMANNOVÁ, I.; CUSIMAMANI, E. F.; BECHYNE, M.; VYVADILOVÁ, M.; GREPLOVÁ, M. *in vitro* induction of polyploidy in yacon (*Smallanthus sonchifolius*). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 97, p. 21-25, 2009.
- XU, L.; NAJEEB, U.; NAEEM, M. S.; DAUD, M. K.; CAO, J. S.; GONG, H. J.; SHEN, W. Q.; ZHOU, W. J. Induction of tetraploidy in *Juncus effusus* by colchicine. **Biologia Plantarum**, v. 54, n. 4, p. 659-663, 2010.
- YE, Y. M.; TONG, J.; SHI, X. P.; YUAN, W.; LI, G. R. Morphological and cytological studies of diploid and colchicine-induced tetraploid lines of crape myrtle (*Lagerstroemia indica* L.). **Scientia Horticulturae**, v. 124, p. 95-101, 2010.
- ZHANG, Z.; DAI, H.; XIAO, M.; LIU, X. *In vitro* induction of tetraploids in *Phlox subulata* L. **Euphytica**, v. 159, p. 59-65, 2008.
- ZHANG, O. Y.; LUO, F. X.; LIU, L.; GUO, F. C. *In vitro* induction of tetraploids in crape myrtle (*Lagerstroemia indica* L.) **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 101, P. 41-47, 2010.

CONCLUSÕES

- Os resultados obtidos neste estudo demonstram a eficiência do tratamento da colchicina no processo de indução de poliploidia para *H. bihai*, indicando ser esta, uma técnica de utilidade ao melhoramento vegetal desta espécie.
- As doses intermediárias de 0,05% e 0,1%, ambas por 48 h de exposição, mostraram-se mais eficientes na produção de poliploides (16% para cada dose), podendo ser indicadas como tratamentos ideais para poliploidização em *H. bihai* e como base para futuros estudos com outras espécies do gênero.

ANEXO

Instruções para submissão de trabalhos à revista PAB (Pesquisa Agropecuária Brasileira)

Os trabalhos enviados à PAB devem ser inéditos e não podem ter sido encaminhados a outro periódico científico ou técnico. Dados publicados na forma de resumos, com mais de 250 palavras, não devem ser incluídos no trabalho.

A Comissão Editorial faz análise dos trabalhos antes de submetê-los à assessoria científica. Nessa análise, consideram-se aspectos como: escopo; apresentação do artigo segundo as normas da revista; formulação do objetivo de forma clara; clareza da redação; fundamentação teórica; atualização da revisão da literatura; coerência e precisão da metodologia; resultados com contribuição significativa; discussão dos fatos observados frente aos descritos na literatura; qualidade das tabelas e figuras; originalidade e consistência das conclusões. Após a aplicação desses critérios, se o número de trabalhos aprovados ultrapassa a capacidade mensal de publicação, é aplicado o critério da relevância relativa, pelo qual são aprovados os trabalhos cuja contribuição para o avanço do conhecimento científico é considerada mais significativa. Esse critério só é aplicado aos trabalhos que atendem aos requisitos de qualidade para publicação na revista, mas que, em razão do elevado número, não podem ser todos aprovados para publicação. Os trabalhos rejeitados são devolvidos aos autores e os demais são submetidos à análise de assessores científicos, especialistas da área técnica do artigo.

São considerados, para publicação, os seguintes tipos de trabalho: Artigos Científicos, Notas Científicas e Artigos de Revisão, este último a convite do Editor. Os trabalhos publicados na PAB são agrupados em áreas técnicas, cujas principais são: Entomologia, Fisiologia Vegetal, Fitopatologia, Fitotecnia, Fruticultura, Genética, Microbiologia, Nutrição Mineral, Solos e Zootecnia. O texto deve ser digitado no editor de texto Word, em espaço duplo, fonte Times New Roman, corpo 12, folha formato A4, margens de 2,5 cm, com páginas e linhas numeradas.

Escopo e política editorial

A revista Pesquisa Agropecuária Brasileira (PAB) é uma publicação mensal da Embrapa, que edita e publica trabalhos técnico-científicos originais, em português, espanhol ou inglês, resultantes de pesquisas de interesse agropecuário. A principal forma de contribuição é o Artigo, mas a PAB também publica Notas Científicas e Revisões a convite do Editor.

Análise dos artigos

A Comissão Editorial faz a análise dos trabalhos antes de submetê-los à assessoria científica. Nessa análise, consideram-se aspectos como escopo, apresentação do artigo segundo

as normas da revista, formulação do objetivo de forma clara, clareza da redação, fundamentação teórica, atualização da revisão da literatura, coerência e precisão da metodologia, resultados com contribuição significativa, discussão dos fatos observados em relação aos descritos na literatura, qualidade das tabelas e figuras, originalidade e consistência das conclusões. Após a aplicação desses critérios, se o número de trabalhos aprovados ultrapassa a capacidade mensal de publicação, é aplicado o critério da relevância relativa, pelo qual são aprovados os trabalhos cuja contribuição para o avanço do conhecimento científico é considerada mais significativa. Esse critério é aplicado somente aos trabalhos que atendem aos requisitos de qualidade para publicação na revista, mas que, em razão do elevado número, não podem ser todos aprovados para publicação. Os trabalhos rejeitados são devolvidos aos autores e os demais são submetidos à análise de assessores científicos, especialistas da área técnica do artigo.

Forma e preparação de manuscritos

- Os trabalhos enviados à PAB devem ser inéditos (não terem dados – tabelas e figuras – publicadas parcial ou integralmente em nenhum outro veículo de divulgação técnico-científica, como boletins institucionais, anais de eventos, comunicados técnicos, notas científicas etc.) e não podem ter sido encaminhados simultaneamente a outro periódico científico ou técnico. Dados publicados na forma de resumos, com mais de 250 palavras, não devem ser incluídos no trabalho.
- São considerados, para publicação, os seguintes tipos de trabalho: Artigos Científicos, Notas Científicas e Artigos de Revisão, este último a convite do Editor.
- Os trabalhos publicados na PAB são agrupados em áreas técnicas, cujas principais são: Entomologia, Fisiologia Vegetal, Fitopatologia, Fitotecnia, Fruticultura, Genética, Microbiologia, Nutrição Mineral, Solos e Zootecnia.
- O texto deve ser digitado no editor de texto Microsoft Word, em espaço duplo, fonte Times New Roman, corpo 12, folha formato A4, com margens de 2,5 cm e com páginas e linhas numeradas.

Informações necessárias na submissão on-line de trabalhos

No passo 1 da submissão (Início), em "comentários ao editor", informar a relevância e o aspecto inédito do trabalho. No passo 2 da submissão (Inclusão de metadados), em "resumo da biografia" de cada autor, informar a formação e o grau acadêmico. Clicar em "incluir autor" para inserir todos os coautores do trabalho, na ordem de autoria.

Ainda no passo 2, copiar e colar o título, resumo e termos para indexação (key words) do trabalho nos respectivos campos do sistema. Depois, ir à parte superior da tela, no campo "Idioma do formulário", e selecionar "English". Descer a tela (clique na barra de rolagem) e copiar e colar o "title", "abstract" e os "index terms" nos campos correspondentes. (Para dar continuidade ao processo de submissão, é necessário que tanto o título, o resumo e os termos para indexação quanto o title, o abstract e os index terms do manuscrito tenham sido fornecidos.)

No passo 3 da submissão (Transferência do manuscrito), carregar o trabalho completo em arquivo Microsoft Word 1997 a 2003.

No passo 4 da submissão (Transferência de documentos suplementares), carregar, no sistema on-line da revista PAB, um arquivo Word com todas as cartas (mensagens) de concordância dos coautores coladas conforme as explicações abaixo:

Colar um e-mail no arquivo word de cada coautor de concordância com o seguinte conteúdo: "Eu, ..., concordo com o conteúdo do trabalho intitulado "....." e com a submissão para a publicação na revista PAB.

Organização do Artigo Científico

- A ordenação do artigo deve ser feita da seguinte forma:
- Artigos em português Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Resumo, Termos para indexação, título em inglês, Abstract, Index terms, Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão, Conclusões, Agradecimentos, Referências, tabelas e figuras.
- Artigos em inglês Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Abstract, Index terms, título em português, Resumo, Termos para indexação, Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion, Conclusions, Acknowledgements, References, tables, figures.
- Artigos em espanhol Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Resumen, Términos para indexación; título em inglês, Abstract, Index terms, Introducción, Materiales y Métodos, Resultados y Discusión, Conclusiones, Agradecimientos, Referencias, cuadros e figuras.
- O título, o resumo e os termos para indexação devem ser vertidos fielmente para o inglês, no caso de artigos redigidos em português e espanhol, e para o português, no caso de artigos redigidos em inglês.
- O artigo científico deve ter, no máximo, 20 páginas, incluindo-se as ilustrações (tabelas e figuras), que devem ser limitadas a seis, sempre que possível.

Título

- Deve representar o conteúdo e o objetivo do trabalho e ter no máximo 15 palavras, incluindo-se os artigos, as preposições e as conjunções.
- Deve ser grafado em letras minúsculas, exceto a letra inicial, e em negrito.
- Deve ser iniciado com palavras chaves e não com palavras como "efeito" ou "influência".
- Não deve conter nome científico, exceto de espécies pouco conhecidas; neste caso, apresentar somente o nome binário.
- Não deve conter subtítulo, abreviações, fórmulas e símbolos.
- As palavras do título devem facilitar a recuperação do artigo por índices desenvolvidos por bases de dados que catalogam a literatura.

Nomes dos autores

- Grafar os nomes dos autores com letra inicial maiúscula, por extenso, separados por vírgula; os dois últimos são separados pela conjunção "e", "y" ou "and", no caso de artigo em português, espanhol ou em inglês, respectivamente.
- O último sobrenome de cada autor deve ser seguido de um número em algarismo arábico, em forma de expoente, entre parênteses, correspondente à chamada de endereço do autor.
- **Endereço dos autores**
- São apresentados abaixo dos nomes dos autores, o nome e o endereço postal completos da instituição e o endereço eletrônico dos autores, indicados pelo número em algarismo arábico, entre parênteses, em forma de expoente.
- Devem ser agrupados pelo endereço da instituição.
- Os endereços eletrônicos de autores da mesma instituição devem ser separados por vírgula.

Resumo

- O termo Resumo deve ser grafado em letras minúsculas, exceto a letra inicial, na margem esquerda, e separado do texto por travessão.
- Deve conter, no máximo, 200 palavras, incluindo números, preposições, conjunções e artigos.
- Deve ser elaborado em frases curtas e conter o objetivo, o material e os métodos, os resultados e a conclusão.
- Não deve conter citações bibliográficas nem abreviaturas.
- O final do texto deve conter a principal conclusão, com o verbo no presente do indicativo.

Termos para indexação

- A expressão Termos para indexação, seguida de dois-pontos, deve ser grafada em letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- Os termos devem ser separados por vírgula e iniciados com letra minúscula.
- Devem ser no mínimo três e no máximo seis, considerando-se que um termo pode possuir duas ou mais palavras.
- Não devem conter palavras que componham o título
- Devem conter o nome científico (só o nome binário) da espécie estudada.
- Devem, preferencialmente, ser termos contidos no AGROVOC: Multilingual Agricultural Thesaurus ou no Índice de Assuntos da base SciELO.

Introdução

- A palavra Introdução deve ser centralizada e grafada com letras minúsculas, exceto a letra inicial, e em negrito.
- Deve apresentar a justificativa para a realização do trabalho, situar a importância do problema científico a ser solucionado e estabelecer sua relação com outros trabalhos publicados sobre o assunto.
- O último parágrafo deve expressar o objetivo de forma coerente com o descrito no início do Resumo.

Material e Métodos

- A expressão Material e Métodos deve ser centralizada e grafada em negrito; os termos Material e Métodos devem ser grafados com letras minúsculas, exceto as letras iniciais.
- Deve ser organizado, de preferência, em ordem cronológica.
- Deve apresentar a descrição do local, a data e o delineamento do experimento, e indicar os tratamentos, o número de repetições e o tamanho da unidade experimental.
- Deve conter a descrição detalhada dos tratamentos e variáveis.
- Deve-se evitar o uso de abreviações ou as siglas.
- Os materiais e os métodos devem ser descritos de modo que outro pesquisador possa repetir o experimento.
- Devem ser evitados detalhes supérfluos e extensas descrições de técnicas de uso corrente.
- Deve conter informação sobre os métodos estatísticos e as transformações de dados.

- Deve-se evitar o uso de subtítulos; quando indispensáveis, grafá-los em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial, na margem esquerda da página.

Resultados e Discussão

- A expressão Resultados e Discussão deve ser centralizada e grafada em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- Todos os dados apresentados em tabelas ou figuras devem ser discutidos
- As tabelas e figuras são citadas sequencialmente.
- Os dados das tabelas e figuras não devem ser repetidos no texto, mas discutidos em relação aos apresentados por outros autores.
- Evitar o uso de nomes de variáveis e tratamentos abreviados. Dados não apresentados não podem ser discutidos.
- Não deve conter afirmações que não possam ser sustentadas pelos dados obtidos no próprio trabalho ou por outros trabalhos citados.
- As chamadas às tabelas ou às figuras devem ser feitas no final da primeira oração do texto em questão; se as demais sentenças do parágrafo referirem-se à mesma tabela ou figura, não é necessária nova chamada.
- Não apresentar os mesmos dados em tabelas e em figuras.
- As novas descobertas devem ser confrontadas com o conhecimento anteriormente obtido.

Conclusões

O termo Conclusões deve ser centralizado e grafado em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.

- Devem ser apresentadas em frases curtas, sem comentários adicionais, com o verbo no presente do indicativo.
- Devem ser elaboradas com base no objetivo do trabalho.
- Não podem consistir no resumo dos resultados.
- Devem apresentar as novas descobertas da pesquisa.
- Devem ser numeradas e no máximo cinco.

Agradecimentos

A palavra Agradecimentos deve ser centralizada e grafada em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.

- Devem ser breves e diretos, iniciando-se com "Ao, Aos, À ou Às" (pessoas ou instituições).
- Devem conter o motivo do agradecimento.

Referências

- A palavra *Referências* deve ser centralizada e grafada em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- Devem ser de fontes atuais e de periódicos: pelo menos 70% das referências devem ser dos últimos 10 anos e 70% de artigos de periódicos.
- Devem ser normalizadas de acordo com a NBR 6023 da ABNT, com as adaptações descritas a seguir.
- Devem ser apresentadas em ordem alfabética dos nomes dos autores, separados por ponto-e-vírgula, sem numeração.
- Devem apresentar os nomes de todos os autores da obra.
- Devem conter os títulos das obras ou dos periódicos grafados em negrito.
- Devem conter somente a obra consultada, no caso de citação de citação.
- Todas as referências devem registrar uma data de publicação, mesmo que aproximada.
- Devem ser trinta, no máximo.

Exemplos:

- Artigos de Anais de Eventos (aceitos apenas trabalhos completos)

AHRENS, S. A fauna silvestre e o manejo sustentável de ecossistemas florestais. In: SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO SOBRE MANEJO FLORESTAL, 3., 2004, Santa Maria. **Anais**. Santa Maria: UFSM, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, 2004. p.153-162.

- Artigos de periódicos

SANTOS, M.A. dos; NICOLÁS, M.F.; HUNGRIA, M. Identificação de QTL associados à simbiose entre *Bradyrhizobium japonicum*, *B. elkanii* e soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p.67-75, 2006.

- Capítulos de livros

AZEVEDO, D.M.P. de; NÓBREGA, L.B. da; LIMA, E.F.; BATISTA, F.A.S.; BELTRÃO, N.E. de M. Manejo cultural. In: AZEVEDO, D.M.P.; LIMA, E.F. (Ed.). **O agronegócio da mamona**

no Brasil. Campina Grande: Embrapa Algodão; Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. p.121-160.

- Livros

OTSUBO, A.A.; LORENZI, J.O. **Cultivo da mandioca na Região Centro-Sul do Brasil.** Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste; Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. 116p. (Embrapa Agropecuária Oeste. Sistemas de produção, 6).

- Teses

HAMADA, E. **Desenvolvimento fenológico do trigo (cultivar IAC 24 - Tucuruí), comportamento espectral e utilização de imagens NOAA-AVHRR.** 2000. 152p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

- Fontes eletrônicas

EMBRAPA AGROPECUÁRIA OESTE. **Avaliação dos impactos econômicos, sociais e ambientais da pesquisa da Embrapa Agropecuária Oeste:** relatório do ano de 2003. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2004. 97p. (Embrapa Agropecuária Oeste. Documentos, 66). Disponível em: . Acesso em: 18 abr. 2006.

Citações

Não são aceitas citações de resumos, comunicação pessoal, documentos no prelo ou qualquer outra fonte, cujos dados não tenham sido publicados.

- A autocitação deve ser evitada.
- Devem ser normalizadas de acordo com a NBR 10520 da ABNT, com as adaptações descritas a seguir.
- Redação das citações dentro de parênteses.
- Citação com um autor: sobrenome grafado com a primeira letra maiúscula, seguido de vírgula e ano de publicação.
- Citação com dois autores: sobrenomes grafados com a primeira letra maiúscula, separados pelo "e" comercial (&), seguidos de vírgula e ano de publicação.
- Citação com mais de dois autores: sobrenome do primeiro autor grafado com a primeira letra maiúscula, seguido da expressão et al., em fonte normal, vírgula e ano de publicação.

- Citação de mais de uma obra: deve obedecer à ordem cronológica e em seguida à ordem alfabética dos autores.
- Citação de mais de uma obra dos mesmos autores: os nomes destes não devem ser repetidos; colocar os anos de publicação separados por vírgula.
- Citação de citação: sobrenome do autor e ano de publicação do documento original, seguido da expressão "citado por" e da citação da obra consultada.
- Deve ser evitada a citação de citação, pois há risco de erro de interpretação; no caso de uso de citação de citação, somente a obra consultada deve constar da lista de referências.
- Redação das citações fora de parênteses.
- Citações com os nomes dos autores incluídos na sentença: seguem as orientações anteriores, com os anos de publicação entre parênteses; são separadas por vírgula.

Fórmulas, expressões e equações matemáticas

- Devem ser iniciadas à margem esquerda da página e apresentar tamanho padronizado da fonte Times New Roman.
- Não devem apresentar letras em itálico ou negrito, à exceção de símbolos escritos convencionalmente em itálico.

Tabelas

- As tabelas devem ser numeradas sequencialmente, com algarismo arábico, e apresentadas em folhas separadas, no final do texto, após as referências.
- Devem ser auto-explicativas.
- Seus elementos essenciais são: título, cabeçalho, corpo (colunas e linhas) e coluna indicadora dos tratamentos ou das variáveis.
- Os elementos complementares são: notas-de-rodapé e fontes bibliográficas.
- O título, com ponto no final, deve ser precedido da palavra Tabela, em negrito; deve ser claro, conciso e completo; deve incluir o nome (vulgar ou científico) da espécie e das variáveis dependentes.
- No cabeçalho, os nomes das variáveis que representam o conteúdo de cada coluna devem ser grafados por extenso; se isso não for possível, explicar o significado das abreviaturas no título ou nas notas-de-rodapé.
- Todas as unidades de medida devem ser apresentadas segundo o Sistema Internacional de Unidades.

- Nas colunas de dados, os valores numéricos devem ser alinhados pelo último algarismo.
- Nenhuma célula (cruzamento de linha com coluna) deve ficar vazia no corpo da tabela; dados não apresentados devem ser representados por hífen, com uma nota-de-rodapé explicativa.
- Na comparação de médias de tratamentos são utilizadas, no corpo da tabela, na coluna ou na linha, à direita do dado, letras minúsculas ou maiúsculas, com a indicação em nota-de-rodapé do teste utilizado e a probabilidade.
- Devem ser usados fios horizontais para separar o cabeçalho do título, e do corpo; usá-los ainda na base da tabela, para separar o conteúdo dos elementos complementares. Fios horizontais adicionais podem ser usados dentro do cabeçalho e do corpo; não usar fios verticais.
- As tabelas devem ser editadas em arquivo Word, usando os recursos do menu Tabela; não fazer espaçamento utilizando a barra de espaço do teclado, mas o recurso recuo do menu Formatar Parágrafo.
- Notas de rodapé das tabelas.
- Notas de fonte: indicam a origem dos dados que constam da tabela; as fontes devem constar nas referências.
- Notas de chamada: são informações de caráter específico sobre partes da tabela, para conceituar dados. São indicadas em algarismo arábico, na forma de expoente, entre parênteses, à direita da palavra ou do número, no título, no cabeçalho, no corpo ou na coluna indicadora. São apresentadas de forma contínua, sem mudança de linha, separadas por ponto.
- Para indicação de significância estatística, são utilizadas, no corpo da tabela, na forma de expoente, à direita do dado, as chamadas ns (não-significativo); * e ** (significativo a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente).

Figuras

- São consideradas figuras: gráficos, desenhos, mapas e fotografias usados para ilustrar o texto. Só devem acompanhar o texto quando forem absolutamente necessárias à documentação dos fatos descritos.
- O título da figura, sem negrito, deve ser precedido da palavra Figura, do número em algarismo arábico, e do ponto, em negrito.
- Devem ser auto-explicativas.

- A legenda (chave das convenções adotadas) deve ser incluída no corpo da figura, no título, ou entre a figura e o título.
- Nos gráficos, as designações das variáveis dos eixos X e Y devem ter iniciais maiúsculas, e devem ser seguidas das unidades entre parênteses.
- Figuras não-originais devem conter, após o título, a fonte de onde foram extraídas; as fontes devem ser referenciadas.
- O crédito para o autor de fotografias é obrigatório, como também é obrigatório o crédito para o autor de desenhos e gráficos que tenham exigido ação criativa em sua elaboração.
- As unidades, a fonte (Times New Roman) e o corpo das letras em todas as figuras devem ser padronizados.
- Os pontos das curvas devem ser representados por marcadores contrastantes, como: círculo, quadrado, triângulo ou losango (cheios ou vazios).
- Os números que representam as grandezas e respectivas marcas devem ficar fora do quadrante.
- As curvas devem ser identificadas na própria figura, evitando o excesso de informações que comprometa o entendimento do gráfico.
- Devem ser elaboradas de forma a apresentar qualidade necessária à boa reprodução gráfica e medir 8,5 ou 17,5 cm de largura.
- Devem ser gravadas nos programas Word, Excel ou Corel Draw, para possibilitar a edição em possíveis correções.
- Usar fios com, no mínimo, 3/4 ponto de espessura.
- No caso de gráfico de barras e colunas, usar escala de cinza (exemplo: 0, 25, 50, 75 e 100%, para cinco variáveis).
- Não usar negrito nas figuras.
- As figuras na forma de fotografias devem ter resolução de, no mínimo, 300 dpi e ser gravadas em arquivos extensão TIF, separados do arquivo do texto.
- Evitar usar cores nas figuras; as fotografias, porém, podem ser coloridas.

Notas Científicas

- Notas científicas são breves comunicações, cuja publicação imediata é justificada, por se tratar de fato inédito de importância, mas com volume insuficiente para constituir um artigo científico completo.
- Apresentação de Notas Científicas

- A ordenação da Nota Científica deve ser feita da seguinte forma: título, autoria (com as chamadas para endereço dos autores), Resumo, Termos para indexação, título em inglês, Abstract, Index terms, texto propriamente dito (incluindo introdução, material e métodos, resultados e discussão, e conclusão, sem divisão), Referências, tabelas e figuras.
- As normas de apresentação da Nota Científica são as mesmas do Artigo Científico, exceto nos seguintes casos:
- Resumo com 100 palavras, no máximo.
- Deve ter apenas oito páginas, incluindo-se tabelas e figuras.
- Deve apresentar, no máximo, 15 referências e duas ilustrações (tabelas e figuras).

Outras informações

- Não há cobrança de taxa de publicação.
- Os manuscritos aprovados para publicação são revisados por no mínimo dois especialistas.
- O editor e a assessoria científica reservam-se o direito de solicitar modificações nos artigos e de decidir sobre a sua publicação.
- São de exclusiva responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos. Os trabalhos aceitos não podem ser reproduzidos, mesmo parcialmente, sem o consentimento expresso do editor da PAB.

Contatos com a secretaria da revista podem ser feitos por telefone: (61)3448-4231 e 3273-9616, fax: (61)3340-5483, via e-mail: pab@sct.embrapa.br ou pelos correios: Embrapa Informação Tecnológica.

Pesquisa Agropecuária Brasileira – PAB,
Caixa Postal 040315
CEP 70770 901 Brasília, DF.