

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

PROPAGAÇÃO DE *Hippeastrum reticulatum* var. *striatifolium* (Herb.) Herb.

Willian Heintze  
Engenheiro Agrônomo/UFRGS

Dissertação apresentada com um dos requisitos  
à obtenção do Grau de Mestre em Fitotecnia  
Ênfase Horticultura

Porto Alegre (RS), Brasil  
Junho de 2014

WILLIAN HEINTZE  
Engenheiro Agrônomo - UFRGS

## **DISSERTAÇÃO**

Submetida como parte dos requisitos  
para obtenção do Grau de

### **MESTRE EM FITOTECNIA**

Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia  
Faculdade de Agronomia  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovado em: 23.06.2014  
Pela Banca Examinadora

Homologado em: 22.10.2014  
Por

GILMAR SCHÄFER  
Orientador - PPG Fitotecnia

GILMAR ARDUINO BETTIO MARODIN  
Coordenador do Programa de  
Pós-Graduação em Fitotecnia

CLAUDIMAR SIDNEI FIOR  
Coorientador - PPG Fitotecnia

SERGIO FRANCISCO SCHWARZ  
PPG Fitotecnia

PAULO VITOR DUTRA DE SOUZA  
PPG Fitotecnia

ENIO LUIZ PEDROTTI  
UFSC

PEDRO ALBERTO SELBACH  
Diretor da Faculdade de  
Agronomia

*Todo mundo pensa em deixar um planeta melhor para nossos filhos.  
Quando é que pensarão em deixar filhos melhores para o nosso planeta?*

Autor desconhecido

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Flávio e Laieta, embora geograficamente distantes, mentalmente sempre próximos. Vocês sempre foram meu grande exemplo de vida, me ensinaram o que as escolas muitas vezes não ensinam: respeito, ética, honestidade e trabalho. Agradeço cada dia de minha vida por ter nascido e crescido em um lar com muito amor e carinho.

À minha noiva, Juliana da Silva Arnort, obrigado por sempre me apoiar, seja fazendo companhia no laboratório, seja ajudando nos experimentos pra terminar mais rápido, ou mesmo levando um lanche após horas de confinamento na câmara de fluxo.

Ao meu orientador, Gilmar Schäfer, coorientador Claudimar Sidnei Fior, e professor Sergio Francisco Schwarz: vocês sempre foram muito mais que somente professores, foram amigos, constantemente me aconselhando, contribuindo com ideias, críticas ou sugestões, mas sobretudo, sempre presentes, dispostos e disponíveis.

Às amigas Elisandra Maria Pradella e Claudia Maria Girardi, sem a ajuda de vocês este trabalho teria sido muito mais árduo e certamente menos divertido. Foram muitas horas que agora parecem tão poucas. Também agradeço à colega Daniela Ribeiro, embora tenhamos trabalhado menos tempo juntos, tua ajuda foi muito importante.

Aos amigos Rafael Elgert e Marília Milani, juntos descobrimos que adubar plantas pode ser confuso, que montar sistemas de irrigação dá bastante trabalho, mas que medir raízes dá muito mais.

Aos professores Paulo Vitor de Souza e Renar João Bender, sempre dispostos a trocarem ideias, e juntamente com os demais professores, esforçados para manter os laboratórios disponíveis e em funcionamento.

Aos professores Ricardo Wanke de Melo e Magnólia Aparecida Silva da Silva, a contribuição de vocês na disciplina de seminários foi muito importante pra mim. Obrigado pelas dicas e pelo estímulo.

À professora Lilian Eggers, que auxiliou na revisão da descrição morfológica da espécie, sua contribuição foi muito significativa.

Aos amigos Ernani Pezzi e Idenir Couto, vocês foram os servidores que estiveram dispostos nos momentos em que os laboratórios mais precisaram de vocês, sem o empenho de vocês talvez este trabalho sequer tivesse iniciado.

Aos amigos Henrique Queiroz, Mateus Pereira Gonzatto, Divanilde Guerra, Henrique Belmonte Petry, Fabrício Nunes, Gustavo Klammer de Almeida, Wagner Soares, Daiane Lattuada, Fernanda Varela Nascimento, Cristiane Wesp, Samanta, Tiago Telesca, Alisson Kovaleski, Bruno Casamali, Vinicius Boaro, Ricardo Benetti, Sandra Rieth, Maristela Watthier, Amanda Pezzi, Monica Spier, Cesar Gois Prestes, Taís Domiciano e Felipe Pereira Dias. Obrigado pelos momentos de estudo, chimarrão, churrascos, aniversários e conversas. O companheirismo entre os colegas da salinha da pós-graduação torna tudo muito mais fácil e divertido.

# PROPAGAÇÃO DE *Hippeastrum reticulatum* var. *striatifolium* (Herb.) Herb.<sup>1</sup>

Autor: Willian Heintze  
Orientador: Gilmar Schäfer  
Coorientador: Claudimar Sidnei Fior

## RESUMO

*Hippeastrum reticulatum* var. *striatifolium* (Herb.) Herb. é uma espécie nativa no Brasil. Possui elevado potencial ornamental pela beleza de suas folhas perenes e floração anual. Moderadamente tolerante ao sombreamento, a torna indicada para uso em interiores. A produção de mudas é pouco estudada, refletindo em indisponibilidade e baixa difusão dessa espécie no mercado produtor e consumidor. Este trabalho teve por objetivo investigar aspectos relacionados à produção de mudas por micropropagação e por sementes. Bulbos de plantas existentes na Faculdade de Agronomia-UFRGS foram desinfestados com NaClO e termoterapia para micropropagação. Variações na posição de incubação (posição horizontal e vertical), concentrações de sacarose, reguladores de crescimento no meio de cultivo (BAP e ANA) e tamanho prévio dos bulbos foram avaliadas em relação à organogênese *in vitro*. Mudanças micropropagadas foram aclimatizadas em diferentes substratos. Foi determinado o teor de umidade de sementes e avaliado o pré tratamento com frio e sua implicação na germinação. A desinfestação com NaClO 1,72% por 15' associada à imersão dos explantes por 30 minutos em água a 52°C diminuiu a contaminação *in vitro* sem ocasionar morte dos explantes. Explantes incubados na posição vertical em relação ao seu eixo polar apresentaram maior número e diâmetro de brotações, número e soma do comprimento de raízes e número de folhas por explante, em relação aos incubados na horizontal. Concentrações de sacarose próximas e menores que 60g L<sup>-1</sup> aumentaram o número e tamanho de brotações, enquanto que menores que 50g L<sup>-1</sup> melhoraram o enraizamento e a formação de folhas. A concentração testada de 100g L<sup>-1</sup> foi prejudicial. A utilização de 6- benzilaminopurina (BAP) no meio de cultivo inibiu a formação de raízes e o diâmetro das brotações, enquanto a utilização de ácido naftaleno acético (ANA) aumentou o número de brotações. A combinação de ANA e BAP foi antagônica em relação à média do comprimento de raízes e folhas, com maior média observada na ausência de ambos. A presença de carvão ativado no meio de cultivo diminuiu os efeitos inibitórios do BAP. Explantes originários de bulbos com maior diâmetro formaram mudas maiores, mais numerosas e com maior massa de matéria fresca. A aclimatização de mudas micropropagadas foi eficiente em diversos substratos (sobrevivência > 90%), com destaque qualitativo à casca de *Pinus* compostada e quantitativo ao Comercial 1. Sementes maduras apresentaram teor de umidade próximo a 80%. A propagação por sementes foi possível, sem a necessidade de quebra de dormência com frio, com tempo médio de germinação em torno de 30 dias.

---

<sup>1</sup> Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (75p.) Junho de 2014.

## PROPAGATION OF *Hippeastrum reticulatum* var. *striatifolium* (Herb.) Herb.<sup>2</sup>

Author: Willian Heintze  
Adviser: Gilmar Schäfer  
Co-adviser: Claudimar Sidnei Fior

### ABSTRACT

*Hippeastrum reticulatum* var. *striatifolium* (Herb.) Herb. is a native species on Brazil. Has high ornamental potential of its beautiful annual flowering and perennial leaves. Moderately tolerant to shade, makes it suitable for indoor use. Seedling production is poorly studied, reflecting in unavailability and low spread of this species in the producer and consumer markets. This work was aimed to investigate aspects related to seedling production through micropropagation and seedling. Bulbs of the plants conserved at the Faculty of Agronomy, UFRGS were disinfected with NaClO and thermotherapy for micropropagation. Variations in incubation position (horizontal and vertical), sucrose concentrations, growth regulators in the culture medium (BAP and NAA) and previous size of the bulbs, were evaluated for *in vitro* organogenesis. Seedlings were acclimatized in different substrates. The moisture content of seeds was determined and the pretreatment with cold as well as their involvement in germination were evaluated. The disinfection of the explants with 1.72% NaClO for 15' associated with the immersion of the explants for 30 minutes in water at 52 °C decreased contamination *in vitro*, without causing death. Explants incubated in an upright position on its polar axis showed higher germinating number and diameter as well as number and total root length and number of leaves per explants compared to those incubated horizontally. Concentrations of sucrose close and less than 60g L<sup>-1</sup> increased the number and size of shoots, while less than 50 g L<sup>-1</sup> improved rooting and leaf formation. The tested concentration of 100 g L<sup>-1</sup> was harmful. The use of 6-benzylaminopurine (BAP) in the medium inhibited the formation of roots and the diameter of shoots, while the use of naphthalene acetic acid (NAA) increased the number of shoots. The combination of NAA and BAP was antagonistic in respect to length of roots and leaves, with the highest average observed in the absence of both. The presence of activated charcoal in the culture medium decreased the inhibitory effects of BAP. Explants originated from bulbs with highest diameter formed larger, more numerous and seedlings with more mass. The acclimatization of seedlings was efficient on various substrates (survival > 90 %), highlighting qualitative to *Pinus* bark composted and the quantitative to Commercial 1. Ripe seeds showed moisture content close to 80 %. Propagation by seed is possible, without the need to break dormancy with cold, with average germination time of around 30 days.

---

<sup>2</sup> Master of Science dissertation in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (75p.) June, 2014.

## SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
2.1 Descrição da espécie .....	7
2.2 Tratos culturais e cultivo.....	8
2.3 Indução do florescimento.....	9
2.4 Micropropagação.....	9
2.5 Análise de sementes .....	14
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1 Descrição morfológica da espécie.....	17
3.2 Produção de mudas por micropropagação .....	17
3.2.1 Origem e desinfestação dos explantes.....	17
3.2.1.1 Desinfestação de tecidos de hippeastrum. ....	17
3.2.2 Variações no meio de cultivo .....	19
3.2.2.1 Organogênese <i>in vitro</i> em hippeastrum: concentração de sacarose e posição dos explantes sobre o meio de cultivo.....	19
3.2.2.2 Concentrações de Ácido naftaleno acético (ANA) e 6-Benzilaminopurina (BAP) no cultivo <i>in vitro</i> de hippeastrum .....	21
3.2.2.3 Concentrações de 6-Benzilaminopurina (BAP) no cultivo <i>in vitro</i> de hippeastrum na presença de carvão ativado .....	24
3.2.3 Aclimatização de mudas.....	25
3.2.3.1 Aclimatização de mudas em diferentes substratos .....	25
3.3 Propagação por sementes .....	27
3.3.1 Teor de umidade das sementes de hippeastrum .....	27
3.3.1.1 Determinação da umidade em sementes de hippeastrum.....	27
3.3.2 Germinação de sementes de hippeastrum .....	28

	Página
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	29
4.1 Descrição morfológica da espécie.....	29
4.2 Produção de mudas por micropropagação .....	33
4.2.1 Origem e desinfestação dos explantes.....	33
4.2.1.1 Desinfestação de tecidos de hippeastrum. ....	33
4.2.2 Variações no meio de cultivo .....	36
4.2.2.1 Organogênese <i>in vitro</i> em hippeastrum: concentração de sacarose e posição dos explantes sobre o meio de cultivo.....	36
4.2.2.2 Concentrações de Ácido naftaleno acético (ANA) e 6-Benzilaminopurina (BAP) no cultivo <i>in vitro</i> de hippeastrum .....	44
4.2.2.3 Concentrações de 6-Benzilaminopurina (BAP) no cultivo <i>in vitro</i> de hippeastrum na presença de carvão ativado .....	54
4.2.3 Aclimatização de mudas.....	58
4.2.3.1 Aclimatização de mudas em diferentes substratos .....	58
4.2.4 Outros aspectos observados .....	62
4.3 Propagação por sementes .....	62
4.3.1 Teor de umidade das sementes de hippeastrum .....	62
4.3.2 Germinação de sementes de hippeastrum .....	63
5 CONCLUSÕES.....	66
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	68
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	69



## RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1. Experimentos, tratamentos físicos com imersão em água e data da incubação dos explantes <i>in vitro</i> . .....	18
2. Percentual de contaminação (%C), sobrevivência (%S) e de explantes não contaminados que não sobreviveram (%NCNS) de <i>Hippeastrum reticulatum</i> var. <i>striatifolium</i> tratados com termoterapia por imersão em água a 25°C por 30' (TC) e: 52°C por 30' (T1); 55°C por 1'+52°C por 29' (T2); 60°C por 1'+52°C por 29' (T3), incubados <i>in vitro</i> . .....	34
3. Número de brotações (NBE), média do diâmetro de brotações (MDB), soma do diâmetro de brotações por explante (SDB) e número de folhas por brotação (NFB) em função da concentração de 6-benzilaminopurina, na micropropagação de <i>Hippeastrum reticulatum</i> var. <i>striatifolium</i> . Porto Alegre-RS-Brasil. 2013. ....	47
4. Número (NBE) média (MDB) e soma do diâmetro de brotações por explante (SDB), número (NR) e soma do comprimento de raízes por explante (SCR), e número (NFB), soma do comprimento de folhas por brotação (SCF), massa de matéria fresca (MF) e percentual de mudas consideradas aptas à aclimatização (%A) em função da concentração de ácido naftaleno acético (ANA) no meio de cultivo na micropropagação de <i>Hippeastrum reticulatum</i> var. <i>striatifolium</i> . Porto Alegre-RS-Brasil. 2013. ....	53
5. Número (NBE), média do diâmetro (MDB) e soma do diâmetro de brotações por explante (SDB), número de raízes por explante (NR), e número (NFB), média do comprimento (MCF) e soma do comprimento de folhas por brotação (SCF), massa de matéria fresca (MF) e percentual de mudas consideradas aptas à aclimatização (%A) em função da concentração de 6-benzilaminopurina (BAP), na micropropagação de <i>Hippeastrum reticulatum</i> var. <i>striatifolium</i> . Porto Alegre-RS-Brasil. 2013. ....	56
6. Análise dos substratos utilizados no experimento de aclimatização de mudas de <i>Hippeastrum reticulatum</i> var. <i>striatifolium</i> . Laboratório de Análise de Substratos, Departamento de Horticultura e Silvicultura, Faculdade de Agronomia Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, 2012. ....	59
7. Resultados da avaliação de mudas de <i>Hippeastrum reticulatum</i> var. <i>striatifolium</i> aclimatizadas em cinco substratos: T1-Vermiculita; T2-Casca de Arroz Carbonizada (CAC); T3-Comercial 1 (CAC+Vermiculita+Turfa); T4-Fibra de coco; e, T5-Casca de <i>Pinus</i> Compostada (CPC). Percentual de sobrevivência à aclimatização (%S), soma do diâmetro de brotações por muda (SDB), média do diâmetro de brotações por brotação (MDB), número (NR) e soma do comprimento de raízes por muda (SCR), e número (NFB) e soma do comprimento de folhas por brotação (SCF), massa fresca por muda (MF), e percentual de mudas selecionadas para o transplântio do total de mudas que sobreviveram (%T). ....	61

8. Percentual de germinação e vigor calculado pelo tempo médio de germinação (TMG) e índice de velocidade de germinação (IVGM) em sementes de *Hippeastrum reticulatum* var. *striatifolium* germinadas sobre areia e submetidas a dois pré-tratamentos térmicos durante 30 dias no escuro. Porto Alegre-RS-Brasil. 2012. ....64

## RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
1. Bulbo de <i>Hippeastrum reticulatum</i> var. <i>striatifolium</i> após a lavagem, escovação, remoção do terço superior com parte aérea, das raízes e da última camada de túnica. Foto: Willian Heintze. Porto Alegre-RS-Brasil. 2012.....	19
2. Medidor fixo para classificação dos bulbos pelo diâmetro ( $\emptyset$ ) em: M quando $7 \geq \emptyset > 5$ mm; P quando $5 \geq \emptyset > 3$ mm; e, PP quando $\emptyset \leq 3$ mm, com bulbos nos respectivos espaços. Foto: Willian Heintze. Porto Alegre-RS-Brasil. 2013.....	21
3. Bulbos de <i>Hippeastrum reticulatum</i> var. <i>striatifolium</i> classificados divididos radialmente em quatro partes, quando originalmente com $7 \geq \emptyset > 5$ mm (classe M), em duas partes quando com $5 \geq \emptyset > 3$ mm (classe P), e mantidos inteiros quando com $\emptyset \leq 3$ mm (classe PP). Foto: Willian Heintze. Porto Alegre-RS-Brasil. 2013. ....	22
4. Explantes de <i>Hippeastrum reticulatum</i> var. <i>striatifolium</i> incubados em frascos de 150mL sobre meio de cultivo. Foto: Willian Heintze. Porto Alegre-RS-Brasil. 2013.....	23
5. Bancada com bandejas (blocos), cada uma com cinco substratos (tratamentos) e dez mudas por parcela (fileira em cada bandeja). Ao centro uma mangueira perfurada (M) que distribui a água sobre a bancada, e sob a peça metálica o orifício de drenagem da bancada (O). Foto: Willian Heintze. Porto Alegre-RS-Brasil. 2013. ....	26
6. <i>Hippeastrum reticulatum</i> var. <i>striatifolium</i> : bulbo (A), folhas (B), flor (C) e fruto com sementes (D). Fotos: Willian Heintze. Porto Alegre-RS-Brasil. 2012 e 2013.....	30
7. Inflorescência de <i>Hippeastrum reticulatum</i> var. <i>striatifolium</i> (A), com detalhe da textura e brilho das tépalas (B). Fotos: Willian Heintze. Porto Alegre-RS-Brasil. 2012.....	31
8. Flor de <i>Hippeastrum reticulatum</i> var. <i>striatifolium</i> em corte. Em detalhe ovário mostrando óvulos. Fotos: Willian Heintze. São Francisco de Paula-RS-Brasil. 2014.....	32
9. Anteras de <i>Hippeastrum reticulatum</i> var. <i>striatifolium</i> . Foto: Willian Heintze. Porto Alegre-RS-Brasil. 2013. ....	32
10. Explantes de <i>Hippeastrum reticulatum</i> var. <i>striatifolium</i> que não contaminaram, à esquerda, submetido ao tratamento com imersão por 30' em água a 25°C (TC), e à direita, que foi submetido a imersão em água a 60°C por 30' (T3) e não sobreviveu. Fotos: Willian Heintze. Porto Alegre-RS-Brasil. 2012. ....	34
11. Número de brotações por explante <i>in vitro</i> (NBE) aos 84 dias após a incubação, em função da concentração de sacarose e da posição de incubação de explantes sobre o meio de cultivo, na micropropagação de <i>Hippeastrum reticulatum</i> var. <i>striatifolium</i> . Porto Alegre-RS-Brasil. 2013. ....	37

12. Soma do diâmetro das brotações laterais por explante <i>in vitro</i> (SDB) aos 84 dias após a incubação, em função da concentração de sacarose e da posição de incubação de explantes sobre o meio de cultivo, na micropropagação de <i>Hippeastrum reticulatum</i> var. <i>striatifolium</i> . Porto Alegre-RS-Brasil. 2013. ....	38
13. Número de raízes por explante <i>in vitro</i> (NR) aos 84 dias após a incubação, em função da concentração de sacarose e da posição de incubação de explantes sobre o meio de cultivo, na micropropagação de <i>Hippeastrum reticulatum</i> var. <i>striatifolium</i> . Porto Alegre-RS-Brasil. 2013. ....	39
14. Soma do comprimento de raízes por explante <i>in vitro</i> (SCR) aos 84 dias após a incubação, em função da concentração de sacarose e da posição de incubação de explantes sobre o meio de cultivo, na micropropagação de <i>Hippeastrum reticulatum</i> var. <i>striatifolium</i> . Porto Alegre-RS-Brasil. 2013. ....	40
15. Média do comprimento de raízes por explante <i>in vitro</i> (MCR) aos 84 dias após a incubação, em função da concentração de sacarose e da posição de incubação de explantes sobre o meio de cultivo, na micropropagação de <i>Hippeastrum reticulatum</i> var. <i>striatifolium</i> . Porto Alegre-RS-Brasil. 2013. ....	41
16. Soma do número de folhas por explante <i>in vitro</i> (SNF) aos 84 dias após a incubação, em função da concentração de sacarose e da posição de incubação de explantes sobre o meio de cultivo, na micropropagação de <i>Hippeastrum reticulatum</i> var. <i>striatifolium</i> . Porto Alegre-RS-Brasil. 2013. ....	42
17. Número de folhas por brotação (NFB) aos 84 dias após a incubação, em função da concentração de sacarose, na micropropagação de <i>Hippeastrum reticulatum</i> var. <i>striatifolium</i> . Porto Alegre-RS-Brasil. 2013. ....	43
18. Gráfico de superfície de resposta para Média do Comprimento de Raízes (MCR) (em cm) por explante em função da concentração de ácido naftaleno acético (ANA) (em mg L <sup>-1</sup> ) e 6-benzilaminopurina (BAP) (em mg L <sup>-1</sup> ), na micropropagação de <i>Hippeastrum reticulatum</i> var. <i>striatifolium</i> . Porto Alegre-RS-Brasil. 2013. ....	45
19. Gráfico de superfície de resposta para Média do Comprimento de Folhas por brotação (MCF) (em cm) em função da concentração de ácido naftaleno acético (ANA) (em mg L <sup>-1</sup> ) e 6-benzilaminopurina (BAP) (em mg L <sup>-1</sup> ), na micropropagação de <i>Hippeastrum reticulatum</i> var. <i>striatifolium</i> . Porto Alegre-RS-Brasil. 2013. ....	45
20. Número de raízes por explante em função da concentração de 6-benzilaminopurina (BAP), na micropropagação de <i>Hippeastrum reticulatum</i> var. <i>striatifolium</i> . Porto Alegre-RS-Brasil. 2013. ....	49
21. Soma do comprimento de raízes por explante em função da concentração de 6-benzilaminopurina (BAP), na micropropagação de <i>Hippeastrum reticulatum</i> var. <i>striatifolium</i> . Porto Alegre-RS-Brasil. 2013. ....	49
22. Taxa de mudas consideradas aptas à aclimatização em função da concentração de 6-benzilaminopurina (BAP), na micropropagação de <i>Hippeastrum reticulatum</i> var. <i>striatifolium</i> . Porto Alegre-RS-Brasil. 2013. ....	50
23. Soma do comprimento de folhas por brotação em função da concentração de 6-benzilaminopurina (BAP), na micropropagação de <i>Hippeastrum reticulatum</i> var. <i>striatifolium</i> . Porto Alegre-RS-Brasil. 2013. ....	51

	Página
24. Massa fresca por muda em função da concentração de 6-benzilaminopurina (BAP), na micropropagação de <i>Hippeastrum reticulatum</i> var. <i>striatifolium</i> . Porto Alegre-RS-Brasil. 2013. ....	51
25. Ilustração da resposta das mudas de <i>Hippeastrum reticulatum</i> var. <i>striatifolium</i> . às concentração de 6-benzilaminopurina (mg L <sup>-1</sup> ) adicionadas ao meio de cultivo na micropropagação dessa espécie. Parte sombreada nas mudas representa uma fração inexistente. Arte: Willian Heintze. Porto Alegre-RS-Brasil. 2013. ....	52
26. Ilustração da resposta das mudas de <i>Hippeastrum reticulatum</i> var. <i>striatifolium</i> . às concentração de ácido naftaleno acético (mg L <sup>-1</sup> ) adicionadas ao meio de cultivo na micropropagação dessa espécie. Parte sombreada nas mudas representa uma fração inexistente. Arte: Willian Heintze. Porto Alegre-RS-Brasil. 2013. ....	54
27. Soma do comprimento de raízes por explante em função da concentração de 6-benzilaminopurina (BAP), na micropropagação de <i>Hippeastrum reticulatum</i> var. <i>striatifolium</i> . Porto Alegre-RS-Brasil. 2013. ....	55
28. Média do comprimento de raízes por explante em função da concentração de 6-benzilaminopurina (BAP), na micropropagação de <i>Hippeastrum reticulatum</i> var. <i>striatifolium</i> . Porto Alegre-RS-Brasil. 2013. ....	55
29. Sementes de <i>Hippeastrum reticulatum</i> var. <i>striatifolium</i> : teste de germinação sobre substrato areia (A); protrusão do hipocótilo (B); hipocótilo com radícula, a qual não consegue se fixar ao substrato (C), e semente contaminada por microorganismo (D). Fotos: Willian Heintze. Porto Alegre-RS-Brasil. 2012. ....	65

## RELAÇÃO DE FIGURAS

- ADE: água deionizada esterilizada (autoclavada);
- ANA: ácido naftaleno acético;
- AIA: ácido indol acético;
- BAP: 6-benzilaminopurina;
- Brotação: estrutura contendo um bulbo e uma ou mais folhas, obtidos a partir de um explante;
- CAC: substrato casca de arroz carbonizada;
- CCC: cloreto de 2-cloroetil-trimetil amônio;
- Explante: o tecido incubado *in vitro*;
- i.a.: ingrediente ativo;
- MCF: média do comprimento de folhas;
- MCR: média do comprimento de raízes;
- MDB: media do diâmetro de brotações;
- MF: massa de matéria fresca de cada muda;
- MS: meio de cultivo (Murashige & Skoog, 1962);
- NBE: número de brotações por explante;
- NBB: número de brotações por bulbo;
- NFB: número de folhas por brotação;
- NR: número de raízes;
- pH: potencial hidrogeniônico;
- PH: explantes incubados na posição horizontal;

- PV: explantes incubados na posição vertical;
- SCF: soma do comprimento de folhas;
- SCR: soma do comprimento de raízes;
- SDB: soma do diâmetro de brotações;
- SNF: soma do número de folhas por explante;
- TC: tratamento controle;
- UFRGS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul;
- URA: umidade relativa do ar;
- %A: percentual de mudas aptas à aclimatização;
- %C: percentual de contaminação;
- %NSNC: percentual de explantes que não sobreviveram mesmo não tendo contaminado;
- %S: percentual de sobrevivência;
- %T: percentual de mudas selecionadas para o transplante do total de mudas que sobreviveram.

## 1 INTRODUÇÃO

A área mundial cultivada com flores e plantas ornamentais é estimada em aproximadamente 424 mil ha, sendo a maior parte desta localizada no Canadá (96,172 mil ha), principalmente para a produção de árvores de Natal (51 mil ha). Em seus diversos segmentos, a atividade da floricultura movimenta anualmente em torno de 100 bilhões de dólares, sendo o principal produto a flor cortada, destacando-se rosas, cravos e crisântemos, seguidos pelas plantas de flores e folhagens em vasos (Oliveira & Brainer, 2007).

No Brasil, segundo o último censo agropecuário realizado pelo IBGE em 2006, existem mais de 3,5 mil estabelecimentos que produzem flores e folhagens para corte, quase três mil que produzem mudas de plantas ornamentais e, 2,3 mil que produzem plantas ornamentais em vaso. Estas são as três principais atividades dentre as que compõem a cadeia produtiva da floricultura, somando mais de R\$ 450 milhões em valor bruto da produção, relativo a um total do setor de 632,86 milhões de reais (IBGE, 2014). A maior concentração da produção nacional está na região Sudeste e Sul, que representaram 71% e 16%, respectivamente, do valor bruto da produção de plantas ornamentais.

A floricultura brasileira utiliza em torno de 33 mil trabalhadores rurais diretos, dos quais 19 mil só no estado de São Paulo, empregando uma média de 3,7 homens por hectare de área cultivada (Kiyuna *et al.*, 2002). Segundo dados do Instituto Brasileiro de Floricultura (IBRAFLOR), o setor da floricultura gera 209 mil empregos diretos no Brasil, sendo 28,1% destes na produção, 4% na distribuição, 64,6% no varejo e 3,3% em outras funções (Opitz, 2013).



A demanda por flores e plantas ornamentais depende da renda dos consumidores, sendo que os gastos aumentam com a elevação da renda (Oliveira & Brainer, 2007). Os países europeus apresentam o maior consumo anual *per capita*, destacando-se: Suíça (US\$ 174), Noruega (US\$ 167), Alemanha (US\$ 121), Áustria (US\$ 109), e Suécia (US\$ 89) (Oliveira & Brainer, 2007). Segundo Kiyuna *et al.* (2002), o valor do mercado da floricultura brasileira foi estimado em R\$ 500 milhões a nível de produtor, R\$ 750 milhões a nível de atacado e R\$ 1,5 bilhão em nível de varejo.

Culturalmente, o hábito de consumo de flores e plantas ornamentais é pouco expressivo no Brasil, destacando-se em datas específicas, como dia dos namorados, mães e finados, e festividades, como casamentos e formaturas.

No primeiro semestre de 2011 ocorreu um crescimento de 15% no mercado brasileiro de flores, quando comparado ao desempenho no mesmo período do ano anterior. A esse crescimento são atribuídas, como principais razões, o maior leque de opções e variedades ao consumidor, aumento da durabilidade das flores, maior eficiência da cadeia, aumento do consumo das classes C e D via supermercado e das classes A e B via internet (IBRAFLOR, 2012), proporcionando um aumento estimado no consumo *per capita* de R\$ 8,50 ao ano (Kiyuna *et al.* 2002) para R\$ 20,00 por habitante por ano (IBRAFLOR, 2012), o que significa um aumento de 135% em relação a 2002. Em função da crise mundial que afetou e ainda está afetando os mercados consumidores europeus, as exportações estão sofrendo quedas ano a ano, a partir de 2009 (Junqueira & Peetz, 2011a, Junqueira & Peetz, 2011b, Junqueira & Peetz, 2010), após recordes em 2006 e 2007, com aumento de 15 e 9%, respectivamente (Junqueira & Peetz, 2007).

No ano 2000 o Rio Grande do Sul possuía 560 unidades de produção (UPs) de flores e plantas ornamentais efetivas, que estavam distribuídas em 133 municípios, sendo os municípios com maior densidade de UPs: Pareci Novo, São Sebastião do Caí, Capela de Santana e Santa Cruz do Sul, com um número entre 70 e 23 UPs (Daudt, 2002). Segundo o

censo agropecuário de 2006 (IBGE, 2014), o valor da produção de plantas ornamentais no Rio Grande do Sul foi R\$ 52,8 milhões, com destaque especial para Santa Cruz do Sul (R\$ 21,5 milhões), Vacaria (R\$ 6,5 milhões) e Pareci Novo (R\$ 1,9 milhões). O Rio Grande do Sul vem se destacando na produção de flores e plantas anuais tipo forração, sendo um dos Estados com maior índice de consumo *per capita* de flores e plantas no país, direcionando sua produção ao consumo interno (Schmiedt, 2012).

O Brasil tem uma das floras mais ricas do mundo, com mais de 56 mil espécies descritas (Giulietti *et al.*, 2005). A comercialização de plantas nativas para ornamentação, apesar da diversidade disponível, ainda é muito pequena. A diversidade e a amplitude de climas e solos no Brasil permitem cultivos de inúmeras espécies de flores e plantas ornamentais, de origens nativas e exóticas, de origem de clima temperado e tropical (Kiyuna *et al.*, 2004).

Condições ambientais favoráveis fazem do país, uma região ótima para a produção de plantas ornamentais. Entre as famílias botânicas de maior potencial ornamental destacam-se: Bignoniaceae, Bromeliaceae, Cactaceae, Fabaceae, Liliaceae, Myrtaceae e Orchidaceae, algumas delas com alto valor comercial (Veiga *et al.*, 2009). Estes recursos fitogenéticos, em muitos casos nativos, são alternativas na geração de novos nichos de mercado, visto ser um setor que sempre almeja novidades. A redução no uso de espécies exóticas ou sua substituição por espécies nativas de potencial ornamental é uma nova tendência na floricultura, especificamente no paisagismo moderno, devido à baixa necessidade de manutenção, regionalismo, diversidade biológica e habitat para a vida silvestre local (Buckstrup & Bassuk, 1997).

A Região Sul do Brasil, composta pelos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, caracteriza-se por apresentar uma ampla variedade de relevos, entre planaltos, serras, planícies e depressões, o que proporciona condições geográficas particulares refletidas no clima e na vegetação (Herrmann & Rosa, 1990). Estas condições

particulares abrigam grande variedade de espécies vegetais nativas muitas com potencial ornamental ainda não explorado. Coradin *et al.* (2011) detalharam 149 espécies da flora da região sul do Brasil, consideradas prioritárias para uso pelos diferentes segmentos da sociedade, dentre essas, 20 ornamentais. Stumpf *et al.* (2009), em um trabalho descrevendo espécies do Bioma Pampa com potencial ornamental, catalogaram 100 espécies, muitas delas sem nenhum trabalho de domesticação, propagação e/ou melhoramento.

O *Hippeastrum reticulatum* var. *striatifolium* (Herb.) Herb., planta bulbosa da família das amarilidáceas, nativa das florestas tropicais úmidas da Mata Atlântica. De grande beleza estética, apresenta folhas quase perenes, de cor verde escura brilhante em contraste com espessa nervura central esbranquiçada. Floresce uma vez ao ano, sendo verificada sua ocorrência no final do verão a início do outono para o hemisfério sul, emitindo um escapo único que pode apresentar de três a cinco flores de cor rósea em forma de trompete, pendentes com duração efêmera (cerca de uma semana), com floração que pode passar de um mês devido a sequencialidade da abertura de cada flor do mesmo escapo. As plantas deste gênero vêm sendo domesticadas e hibridizadas desde o final dos anos 1700 em vários países da Europa, para onde foram levadas as primeiras plantas selvagens provenientes da América do Sul (Traub, 1958). Desde então, sendo uma das plantas ornamentais mais apreciadas em jardins europeus, muitas variedades híbridas recentemente desenvolvidas são lançadas no mercado mundial de flores, anualmente.

A conservação da vegetação nativa é vital para a manutenção da biodiversidade por ser um elemento chave do funcionamento de paisagens e ecossistemas, e sua redução não é somente medida pela perda de árvores, arbustos, vegetação marinha, e demais espécies, mas também pela sua inter-relação com espécies de microorganismos, qualidade da água, fauna aquática e outros aspectos como a qualidade de vida das pessoas (Williams *et al.*, 2001).

O processo de urbanização ameaça áreas de ocorrência de muitas espécies nativas, que têm a possibilidade de se extinguirem antes mesmo de se tornarem conhecidas e ter seu potencial utilizado (Leal & Biondi, 2006). Como a flora nativa permanece praticamente ausente nos viveiros comerciais, torna-se relevante a introdução de plantas nativas em cultivo, pois esse processo consiste em instrumento de conservação dessas espécies (Leal & Biondi, 2006).

De acordo com Stumpf *et al.* (2009), além de valorizar a biodiversidade local, a inserção de espécies nativas na floricultura é uma forma de fortalecer as identidades regionais, representando um diferencial em um mercado altamente competitivo, continuamente em busca de novidades, e cada vez mais inclinado a produtos considerados de baixo impacto ambiental e ecologicamente corretos. A prospecção de novas plantas ornamentais, a partir das espécies nativas, representa um grande potencial de produção e comercialização, tanto para o mercado interno quanto para a exportação.

A valorização e a apropriação do patrimônio genético silvestre estão dentre os requisitos para o desenvolvimento social e econômico brasileiro. Contribuem para o desenvolvimento e uso sustentável, e para a contenção do iminente processo de extinção de germoplasma, o domínio sobre as preferências ambientais e o conhecimento do potencial das espécies da flora nativa (Fior *et al.*, 2004). Estudos que visam geração e difusão do conhecimento sobre utilização comercial de plantas nativas são muito importantes, visto que são o princípio para a exploração sustentável de nossos recursos, de forma a beneficiar diretamente a nação. Quando isto não acontece internamente, se repetem os tradicionais procedimentos, em que plantas são, muitas vezes ilegalmente exportadas com sua variabilidade genética original, melhoradas e selecionadas internacionalmente e revendidas ao país de origem com o acréscimo de patentes que beneficiam pesquisadores e instituições estrangeiras. *Hippeastrum* spp., nativas da América do Sul, são exemplos, sendo mais conhecidas internacionalmente que nacionalmente.

Desta forma, o presente trabalho teve por objetivo geral fazer uma breve descrição morfológica da espécie, investigar aspectos relacionados à produção de mudas por micropropagação, englobando a desinfestação dos tecidos para incubação, a composição do meio de cultivo e a aclimatização de mudas, e produção de mudas por sementes, pela avaliação do teor de umidade e teste de germinação, a fim de subsidiar a produção comercial de mudas de *Hippeastrum reticulatum* var. *striatifolium*.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Descrição da espécie

*Hippeastrum* spp. são espécies herbáceas pertencentes à família Amaryllidaceae, originárias da América subtropical, encontradas do leste do Brasil ao centro sul dos Andes (Bailey & Bailey, 1976 apud Dole & Wilkins, 2004). Segundo a classificação *Angiosperm Phylogeny Group* (APG-III) (Chase *et al.*, 2009), a família Amaryllidaceae é composta por 1605 espécies em 73 gêneros, dentre eles o *Hippeastrum*, formado por 55 espécies. Popularmente são chamadas de amarílis, muito comercializados mundialmente com a principal finalidade de utilização como plantas envasadas para usos em interiores, como bulbos induzidos ao florescimento para plantio em jardins e até como flor de corte (Tombolato *et al.*, 2001). Uma característica de fácil identificação que distingue *H. reticulatum* de outras espécies do gênero *Hippeastrum*, é que a primeira possui sementes pouco numerosas e volumosas, enquanto as demais espécies do gênero possuem sementes secas e achatadas (Meerow & Snijman, 1998). O grupo *reticulata* é composto por duas espécies, *H. reticulatum* e *H. blumenavia* (K.Koch & C.D. Bouché ex Carrière) Sealy (Traub, 1958). *Hippeastrum reticulatum* está dividido em duas variedades, *H. reticulatum* var. *reticulatum* (Herb.) Herb. e *H. reticulatum* var. *striatifolium* (Herb.) Herb., sendo que a diferença básica entre elas é que a segunda possui uma listra branca ou rosada no centro das folhas (Traub, 1958).

## 2.2 Tratos culturais e cultivo

*Hippeastrum reticulatum* var. *striatifolium* é uma ornamental bela e pouco exigente em tratos culturais, podendo ser cultivada em ambientes internos, desde que mantida próxima à janelas para permitir um mínimo de luminosidade para a sobrevivência da planta. Quando cultivada em ambientes com baixa intensidade luminosa poderá não ocorrer floração. Kämpf (2005) classificou amarílis como uma planta de meia sombra, que necessita estar exposta a nível médio de iluminação. Traub (1958) recomendou que *H. reticulatum* seja cultivada à sombra parcial para obter os melhores resultados.

O cultivo de plantas almejando o máximo de desempenho e o melhor custo-benefício é muito complexo, dependente de diversos fatores, dentre eles a adequada disponibilidade de nutrientes, de acordo com as necessidades da planta. A disponibilidade de nutrientes também é afetada de modo geral pelo pH do substrato, porém, cada planta possui melhor adaptação em uma faixa de pH. Cavins *et al.* (2000) classificaram *Hippeastrum* spp. dentro da faixa ideal de pH para água lixiviada na metodologia do teste PourThru entre 6,1 e 6,4. Mateus (2008) avaliou o crescimento de *H. hybridum*, verificando que o maior acúmulo de massa seca se deu ao final do ciclo produtivo da cultura (referente ao período entre 300 e 420 dias após o plantio), sugerindo que seja o momento de maior exigência nutricional, talvez pelo acúmulo de reservas no bulbo para formação do escapo floral.

Variações térmicas ambientais induzem o desenvolvimento de diferentes estruturas em algumas plantas. Hayashi & Suzuki (1970) avaliaram o efeito de temperaturas durante o dia e a noite e a resposta no desenvolvimento de *H. hybridum* e concluíram que, temperaturas de 28°/23°C (dia/noite) promoveram o crescimento de folhas, mas inibiram o desenvolvimento do bulbo e o início da emissão do escapo floral, quando comparadas com temperaturas de 23°/18°C. O crescimento do bulbo foi mais rápido em temperaturas de 18°/13°C e 13°/8°C.

### 2.3 Indução do florescimento

Vernalização é a exigência de um período de frio para induzir a brotação ou floração de bulbos e germinação de sementes (Hartmann *et al.*, 1990, Nardi *et al.*, 2004, Dole, 2003). Yuri *et al.* (2004) avaliaram períodos de vernalização no cultivo *in vitro* de alho entre 40 e 90 dias a  $5\pm 2^{\circ}\text{C}$  e encontraram reposta significativa e linear, com um aumento de 1,4% no número de bulbos obtidos por ápice caulinar para cada dia de vernalização. Segundo Dole & Wilkins (2004), amarílis não necessita um período de dormência antes do reflorescimento. Boyle & Stimart (1987) avaliaram a influência da interrupção da irrigação por 2, 4 e 8 semanas sobre o florescimento de *Hippeastrum x hybridum* 'Red Lion' e concluíram que quanto maior a duração do estresse hídrico, menor foi o intervalo de tempo entre a retomada da irrigação e a emissão do escapo floral, sendo que quando se aplicou um estresse com duração de oito semanas, o florescimento do primeiro escapo ocorreu 60 dias após a retomada da irrigação. Aos 160 dias após a retomada da irrigação 100% das plantas que passaram por estresse hídrico floresceram, comparadas com 83% das que receberam irrigação continuamente (controle).

### 2.4 Micropropagação

A propagação de plantas *in vitro*, ou micropropagação, possibilita a produção de mudas geneticamente homogêneas em tempo reduzido quando comparada com outras técnicas de propagação, por se tratar de uma técnica de clonagem em um ambiente propício para maximizar o desenvolvimento e a multiplicação das mudas. A cultura de tecidos é realizada dentro de frascos, onde os explantes se desenvolvem sobre um meio nutritivo, requerendo para isto condições de máxima assepsia. O meio de cultivo mais utilizado atualmente é o MS (Murashige & Skoog, 1962), em sua composição original ou com algumas modificações na concentração de algumas substâncias.



A Instrução Normativa nº 22, de 27 de agosto de 2012, define explante como o “*material utilizado para iniciar o processo de produção de mudas ou de outras estruturas de propagação obtidas por meio de cultura de tecidos de plantas*” (Brasil, 2012, p. 2).

A contaminação microbiológica é um grande entrave na cultura de tecidos de plantas, sobretudo quando os explantes são originários de órgãos em contato com o substrato (Heintze *et al.*, 2011), como bulbos. O solo e o substrato são meios naturalmente ricos em uma biota diversificada de espécies de fungos, bactérias e leveduras, que entram em equilíbrio e normalmente não são patogênicos às plantas. Na cultura de tecidos, os meios nutritivos, ricos em sais, vitaminas e açúcares, constituem um ambiente muito favorável ao desenvolvimento de plantas, mas também de microorganismos (Caldas *et al.*, 1998), se fazendo necessária a desinfestação do material a ser utilizado como explante. Segundo Veltinari & Quisen (2012), são quatro as fontes de contaminação: o explante, o meio nutritivo, o ambiente e o operador. Dentre estas, certamente a de maior variabilidade e mais difícil de ser controlada é a primeira. Preventivamente, é recomendável que as plantas matrizes sejam mantidas em um local limpo que minimize contato com poeira, plantas doentes e molhamento foliar, podendo ser obtido pelo cultivo em casa de vegetação. Aliado a isto, é recomendada a aplicação periódica de fungicidas, sistêmicos e de contato, de princípios ativos diversificados (Grattapaglia & Machado, 1998). Os procedimentos de desinfestação mais utilizados consistem em imersão em etanol com concentração entre 70 e 80%, por 0,5 a 5 minutos, seguido de drenagem e imersão em hipoclorito de sódio (NaClO) 0,5 a 5% de cloro ativo por 5 a 30 minutos, com posterior triplo enxágue em água deionizada esterilizada (ADE), em câmara de fluxo estéril (Grattapaglia & Machado, 1998). Tratamentos físicos, como imersão em água quente, podem ser utilizados aliados aos químicos. Os tempos, concentrações e temperaturas variam de acordo com o tipo do tecido utilizado como explante. Existem diversas substâncias que podem ser utilizadas na desinfestação dos tecidos, além do NaClO, como o

hipoclorito de cálcio ( $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ ), cloreto de mercúrio ( $\text{HgCl}_2$ ), timerosal (mertiolate) ( $\text{C}_9\text{H}_9\text{HgNaO}_2\text{S}$ ) etc. (Grattapaglia & Machado, 1998).

Para desinfestação de bulbos de *Hippeastrum hybridum* para inoculação *in vitro*, Tombolato *et al.* (2001), após lavá-los em água corrente e detergente comum, removendo o solo, partes escuras, raízes e escamas mais externas, mergulharam os bulbos em etanol 70% por 30 segundos, seguido de imersão em  $\text{Ca}(\text{ClO})_2$  3% + 5 gotas de Tween 20 por 10 minutos. Vargas *et al.* (2006) lavaram os explantes com água e sabão comercial, trataram com fungicida Vitavax (carboxim 17% e Thiram 17%) por três horas, enxaguaram duas vezes com água destilada, seguido da colocação dos explantes por 30 minutos em solução comercial de cloro 50% (que supostamente constituiu uma concentração de cloro ativo entre 1 e 1,5%) + duas gotas de Tween 20, com posterior duplo enxágue em água destilada. Estes autores classificaram este método de desinfestação como adequado, afirmando terem observado 20% de explantes contaminados.

Métodos físicos para desinfestação são utilizados com muita frequência. A escovação, anterior a desinfestação química, é um exemplo. Termoterapia é um método físico de desinfestação frequentemente descrito como parte de técnicas de eliminação de vírus em microenxertia (Ozudogru & Previati, 2010). Flores (2003) utilizou imersão de bulbos de *Hippeastrum aulicum* por 30 minutos em banho-maria a 54°C, complementarmente a desinfestação com etanol e  $\text{NaClO}$ . A exposição dos bulbos a temperaturas extremas pode ocasionar a morte dos meristemas. A verificação da temperatura máxima tolerada pelos bulbos para tratamentos térmicos pode constituir uma forma segura, ambientalmente correta e eficiente na desinfestação dos mesmos previamente a inoculação *in vitro*. Silva *et al.* (2008) avaliaram a viabilidade de sementes e o crescimento microbiano após tratamento de termoterapia em *Schlechtendalia luzulifolia* com o objetivo de controlar microorganismos endofíticos, e concluíram que o isolado

bacteriano pode ser controlado através de termoterapia a com imersão por cinco minutos a 60°C, sem que a viabilidade das sementes seja comprometida.

Explantos de bainha de bulbos de *Hippeastrum* podem apresentar diferenças no número de brotações produzidas, de acordo com sua posição no bulbo. Tombolato *et al.* (1994) trabalharam com propagação de *H. hybridum* por estaquia de dupla camada de bainhas foliares com uma porção do caule (prato), observando que as estacas com posição mais externa no bulbo produziram maior número de brotações e raízes, comparadas às mais internas. Em estudo semelhante com *H. aulicum*, Flores (2003), obteve resultados contraditórios ao de Tombolato *et al.* (1994), verificando que estacas de bainhas foliares provenientes da região central do bulbo apresentaram maior sobrevivência, produção de brotações e raízes.

Rodrigues *et al.* (1996) trabalhando com micropropagação de cebola, que como *Hippeastrum* possui bulbos tunicados, a partir de bulbos, em meio de cultivo com concentrações variadas de sacarose, obtiveram melhores respostas quanto à frequência de regeneração e número de brotações em concentrações elevadas (entre 60 e 120g L<sup>-1</sup>), e respostas extremamente baixas quando utilizaram a concentração original do meio MS (30g L<sup>-1</sup>). De modo semelhante, trabalhando com *H. hybridum*, Sultana *et al.* (2010) obtiveram o melhor percentual de regeneração, o maior número de túnicas e o maior peso de bulbos quando utilizaram 90g L<sup>-1</sup> de sacarose em meio MS, porém, o menor percentual de brotações. O mesmo experimento apontou que o maior percentual de brotações foi obtido no meio de cultivo suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose.

O balanço ideal de reguladores de crescimento em cada fase da cultura de tecidos pode representar a diferença entre o sucesso e o insucesso na micropropagação. As concentrações de máxima resposta são muito variáveis, mesmo de espécie para espécie. Em geral, são utilizadas concentrações maiores de citocininas nas fases iniciais, quando o objetivo é a máxima multiplicação, passando para uma maior concentração de auxinas

quando se almeja a obtenção de raízes, previamente à aclimatização das plântulas (Grattapaglia & Machado, 1998).

Tombolato *et al.* (2001), trabalhando com explantes de bainha foliar de *H. hybridum* observaram que concentrações de 2,5 a 5 mg L<sup>-1</sup> de AIA (ácido 3-indolacético) combinada com 10 mg L<sup>-1</sup> de BAP (6-benzilaminopurina), promoveram maior número de bulbos e menor número de raízes em relação às demais concentrações avaliadas. Observaram também que a presença de AIA não exerceu qualquer influencia sobre os explantes, nas concentrações testadas. Flores (2003), trabalhando com *H. aulicum* e o mesmo tipo de explante, obteve o maior número de brotações por explante e número de bulbos por explante aos 210 dias, em meio MS suplementado com 0,043 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,19 mg L<sup>-1</sup> de ANA (ácido naftaleno acético). Em relação ao número de raízes por explante aos 210 dias, Flores (2003) obteve os melhores resultados quando o meio MS foi suplementado com 0,043 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,19 mg L<sup>-1</sup> de ANA ou 0,857 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,035 mg L<sup>-1</sup> de ANA. Sultana *et al.* (2010) obtiveram o maior percentual de regeneração, o menor intervalo de indução de bulbos, o maior número de bulbos por explante de dupla camada de bainha e os bulbos mais pesados quando adotaram, no meio MS com 90g L<sup>-1</sup> de sacarose, as concentrações de 500 mg L<sup>-1</sup> de CCC (cloreto de 2-cloroetil-trimetil amônio) e 6 mg L<sup>-1</sup> de BAP. O mesmo estudo apontou que quando foi utilizado apenas CCC ou apenas BAP os resultados foram, em geral, estatisticamente inferiores do que quando ambos foram combinados. A não utilização de BAP e de CCC promoveu, em geral, os menores índices em cada variável (Sultana *et al.*, 2010). Ao utilizar apenas BAP, os melhores resultados para percentual de regeneração, menor intervalo de indução, maior número por explante e maior peso de bulbos foi obtido quando utilizada a concentração de 4 mg L<sup>-1</sup> (Sultana *et al.*, 2010).

O carvão ativado é muito utilizado em diversos segmentos, incluindo a confecção de máscaras respiratórias para gases tóxicos, tratamento de água. Segundo Guillarduci *et al.*

(2006), o carvão ativado é um componente que tem seu poder de adsorção explicado pela sua alta área superficial e a presença de grupos funcionais variados em sua superfície. Na cultura de tecidos é utilizado para escurecer o meio de cultivo (Grattapaglia & Machado, 1998) e, principalmente, adsorver compostos fenólicos (Costa *et al.*, 2006) liberados pelo explante que causam a oxidação destes, porém, ao mesmo tempo, adsorve outros componentes do meio de cultivo, como os reguladores de crescimento, fazendo-se necessário aumentar a concentração desses reguladores quando se utiliza carvão ativado. Costa *et al.* (2006) verificou que ocorreu interação entre carvão ativado ( $3\text{g L}^{-1}$ ) e BAP na micropropagação de bananeira, sendo que quando foi utilizado carvão ocorreu aumento no comprimento de brotações, vigor e número de raízes por planta, e diminuição na taxa de multiplicação e oxidação.

A micropropagação gera um rejuvenescimento do material incubado (Klerk, 2002), contudo, em seus experimentos, este autor observou que quando foram excessivamente subcultivadas, microestacas apresentaram uma redução na capacidade de enraizamento. O número sucessivo de subcultivos pode gerar variações genótípicas nos explantes, chamada de variação somaclonal (Santos & Rodrigues, 2004; Santiago *et al.*, 2012).

## 2.5 Análise de sementes

A determinação do grau de umidade em sementes é descrita por Brasil (2009). A umidade é determinada pela diferença percentual de massa após secagem a  $105^{\circ}\text{C}$  até peso constante (Brasil, 2009).

Em relação ao comportamento no armazenamento, Roberts (1973) classificou sementes como ortodoxas e recalcitrantes. Segundo Hong & Ellis (1996), ortodoxas seriam as que podem ser conservadas por um longo período, *ex situ*, desde que em ambiente apropriado. As recalcitrantes são as que podem ser armazenadas apenas por um curto período. Ellis *et al.* (1990), identificaram uma terceira categoria, com comportamento intermediário, que, como o nome diz, seriam intermediárias entre ortodoxas e

recalcitrantes. O conhecimento dessa classificação é importante para determinar o ambiente e o tempo máximo mais adequado para o armazenamento das sementes. Hong & Ellis (1996) demonstraram graficamente, de maneira generalizada, que sementes recalcitrantes morreriam quando a umidade das mesmas estivesse abaixo de 15 a 20%, e máximo percentual germinativo com teores de umidade elevados, enquanto as ortodoxas, mesmo com teores de umidade abaixo de 5% apresentariam um alto percentual de germinação, contudo, os autores deixam claro que sementes que tolerem dessecação até 5% de umidade não apresentam necessariamente comportamento ortodoxo, visto que podem apresentar um baixo percentual de germinação após o armazenamento.

As sementes apresentam algumas características que as classificam quanto à germinação em relação ao desenvolvimento inicial e o comportamento em relação à luminosidade. Rodrigues *et al.* (2007) avaliaram a germinação de *H. stylosum*, constatando ser uma planta hipógea, como ocorre em outras monocotiledôneas. Ao compararem germinação sob luz ou na ausência dela, não obtiveram diferença, concluindo que se tratam de sementes fotoblásticas neutras. A germinação não foi afetada quando comparada a retirada ou não do tegumento, e em *H. stylosum* a germinação iniciou no 15º dia.

Em *H. aulicum*, Flores (2003) obteve resposta semelhante na germinação, tanto sob luz constante, quanto na ausência de luz, a temperaturas de 25 ou 35°C, com percentual de germinação entre 92 e 100% para esta espécie, com início da germinação rapidamente após a semeadura.

Testes de germinação podem ser realizados sobre areia, desde que esta satisfaça alguns requisitos de padronização, como o tamanho de partículas, as quais devem passar por uma peneira de malha 0,8 e ficarem retidas em uma malha 0,05mm (Brasil, 2009). A esterilização pode ser feita em autoclave a 120°C por 60 minutos, ou em estufa a 200°C por duas horas. A capacidade de retenção de água do substrato areia nas condições acima é de aproximadamente 20% (v:v). A metodologia de Brasil (2009) define que a quantidade

ótima de água a ser adicionada seja 60% da capacidade de retenção para sementes grandes, como *H. reticulatum*.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

Todos os experimentos foram executados no Laboratório de Biotecnologia em Horticultura, da Faculdade de Agronomia da UFRGS, e envolveram a espécie *Hippeastrum reticulatum* var. *striatifolium* (Herb.) Herb., que será denominada apenas como “hippeastrum”.

#### **3.1 Descrição morfológica da espécie**

Plantas existentes no Laboratório de Biotecnologia em Horticultura – UFRGS, foram observadas e suas características morfológicas classificadas.

#### **3.2 Produção de mudas por micropropagação**

##### **3.2.1 Origem e desinfestação dos explantes**

###### **3.2.1.1 Desinfestação de tecidos de hippeastrum.**

Bulbos de plantas de hippeastrum mantidos em vasos em casa de vegetação, tratados com fungicida Trifloxistrobina (0,19g L<sup>-1</sup> i.a.) + Ciproconazol (0,08g L<sup>-1</sup> i.a.) e inseticida Fenitrothion (1g L<sup>-1</sup> i.a.) (0,5 e 2mL p.c. L<sup>-1</sup> de calda, respectivamente), permanecendo sobre bancada em casa de vegetação por quatro dias. Após isso, parte desses bulbos foram transplantados para vasos de polipropileno com capacidade de 1,3L com 1L da mistura dos substratos casca de *Pinus* compostada e casca de arroz carbonizada (1:1, v:v), e a outra parte (30 bulbos) foram divididos em seis grupos de cinco bulbos, que foram utilizados em três experimentos espaçados temporalmente em 30 dias um do outro.



Nesse período os bulbos permaneceram sob refrigeração (5°C), em frascos de vidro fechados, um bulbo por frasco, no escuro.

Ao início de cada experimento, os bulbos que o compunham foram novamente tratados com o mesmo fungicida na mesma concentração anterior e após seis horas foram lavados em água corrente, escovados com detergente neutro, seguido de remoção do terço apical do bulbo, dos resquícios de raízes, além do catáfilo mais externo (Figura 1). Na sequência foram desinfestados com: imersão em etanol 70% por um minuto (1'); NaClO 1,72% por 15', seguido de triplo enxágue com água deionizada esterilizada (ADE) em câmara de fluxo laminar estéril. Em associação a isso foram aplicados tratamentos físicos com imersão dos bulbos em água a: 25°C por 30' (TC) (controle); 52°C por 30' (T1); 55°C por 1'+52°C por 29' (T2); 60°C por 1'+52°C por 29' (T3), conforme apresentado na Tabela 1.

TABELA 1. Experimentos, tratamentos físicos com imersão em água e data da incubação dos explantes *in vitro*.

<b>Experimento</b>	<b>Nome do tratamento</b>	<b>Tratamento</b>	<b>Incubação</b>
1	TC	25°C por 30'	30/07/2012
	T1	52°C por 30'	
2	TC	25°C por 30'	30/06/2012
	T2	55°C por 1'+52°C por 29'	
3	TC	25°C por 30'	31/05/2012
	T3	60°C por 1'+52°C por 29'	

Depois dos tratamentos os bulbos foram divididos radialmente em seis a doze partes, dependendo do tamanho, com os maiores divididos em mais partes e os menores em menor número de partes, e incubados em tubos de ensaio contendo meio de cultivo MS (Murashige & Skoog, 1962) com metade da concentração de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> e KNO<sub>3</sub>, 2% (m:v) de sacarose, 0,15% (m:v) de carvão ativado, 0,8% de Agar e pH corrigido a 5,8. Os frascos foram mantidos em sala climatizada a 26°C, no escuro nos primeiros sete dias, e sob fotoperíodo de 16h (31µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) pelo restante do período. O delineamento experimental foi em blocos casualizados. Aos 60 dias após a incubação foi avaliado o percentual de

contaminação (%C), sobrevivência (%S), e o de explantes que não sobreviveram mesmo não tendo contaminado (%NSNC) em cada experimento.

Os bulbos que foram transplantados para vasos, foram irrigados de forma localizada e adubados em doses supraótimas (zero a 0,4g de N, 0,11g de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e 0,59g de K<sub>2</sub>O a cada duas semanas por vaso, com sulfato de amônio, ácido fosfórico 85% e cloreto de potássio, respectivamente) por três meses, como teste piloto para determinar a resistência das plantas à adubação. Três meses após, alguns desses bulbos foram retirados do substrato, e repetidos os procedimentos de limpeza, desinfestação química, e de termoterapia com TC e T1, tal como descrito acima, sendo avaliado o percentual de contaminação após 60 dias.



FIGURA 1. Bulbo de *Hippeastrum reticulatum* var. *striatifolium* após a lavagem, escovação, remoção do terço superior com parte aérea, das raízes e da última camada de túnica. Foto: Willian Heintze. Porto Alegre-RS-Brasil. 2012.

### 3.2.2 Variações no meio de cultivo

#### 3.2.2.1 Organogênese *in vitro* em hippeastrum: concentração de sacarose e posição dos explantes sobre o meio de cultivo

Bulbos de plantas subcultivadas *in vitro*, com diâmetro médio de 7,7mm, tiveram raízes e parte aérea removidos, sendo seccionados radialmente em quatro, cada parte constituindo um explante, o qual foi incubado em tubo de ensaio de 20x2,5cm contendo

15mL de meio de cultivo Murashige & Skoog (1962) com 50% da concentração de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e  $\text{KNO}_3$ , pH=5,8, 0,75% de Agar, e as seguintes concentrações de sacarose :

- 1- 10 g L<sup>-1</sup>;
- 2- 25 g L<sup>-1</sup>;
- 3- 50 g L<sup>-1</sup>;
- 4- 100 g L<sup>-1</sup>.

Os explantes foram incubados em duas posições em relação ao seu eixo polar:

- 1- Posição horizontal (PH);
- 2- Posição vertical (PV).

Os explantes incubados na PH ficaram com a camada mais externa da túnica em contato com o meio de cultivo, enquanto os incubados na PV ficaram com o caule e a base da túnica mais externa em contato com o meio. O material foi mantido em sala de crescimento a  $25\pm 2^\circ\text{C}$ , por sete dias no escuro, seguido de fotoperíodo de 16h (irradiância de  $31\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Aos 53 dias, os explantes foram transferidos para novos tubos com meio idêntico, momento em que foi realizada poda de todas as raízes, rente ao ponto de inserção das mesmas no explante.

O delineamento experimental foi o de blocos casualizados, em esquema fatorial 4x2 (concentração de sacarose x posição dos explantes), com seis repetições e seis tubos por parcela, com um explante por tubo, totalizando 288 tubos. Aos 84 dias foi avaliado (por explante): o número de brotações (NBE); o número de raízes (NR); a soma do comprimento de raízes (SCR); a média do comprimento de raízes (MCR); a soma do diâmetro das brotações (SDB); a média do diâmetro das brotações (MDB); a soma do número de folhas (SNF); e, o número de folhas por brotação (NFB).

Para a contabilização do número, foram consideradas como brotação as gemas axilares que se desenvolveram e formaram novos bulbos de tamanho mínimo visível a olho nu. As medidas de comprimento foram realizadas com régua milimetrada, e o diâmetro dos

bulbos tomados com o auxílio de medidor fixo confeccionado para tal finalidade (Figura 2), estabelecendo-se a classificação dos mesmos de acordo com o diâmetro nos seguintes parâmetros: PP (muito pequeno) quando era maior ou igual a 3mm; P (pequeno) quando maior que 3 e menor ou igual a 5mm; M (médio) quando maior que 5 e menor ou igual a 7mm. Para fins de análise, considerou-se que o diâmetro das brotações o valor médio de cada classe: PP=2mm; P=4mm e M=6mm. Os dados foram submetidos à análise de variância e de regressão.

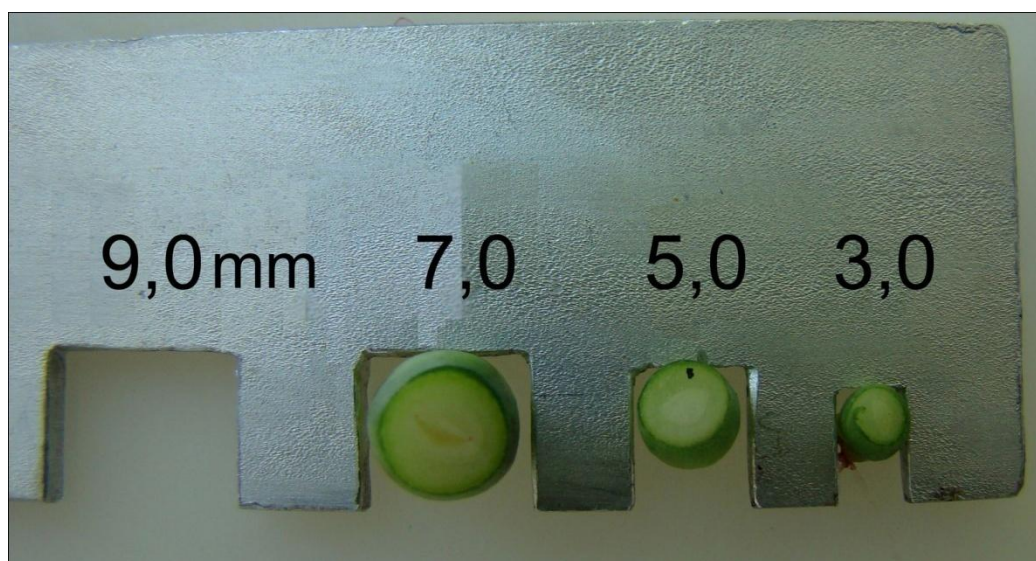


FIGURA 2. Medidor fixo para classificação dos bulbos pelo diâmetro ( $\emptyset$ ) em: M quando  $7 \geq \emptyset > 5$ mm; P quando  $5 \geq \emptyset > 3$ mm; e, PP quando  $\emptyset \leq 3$ mm, com bulbos nos respectivos espaços. Foto: Willian Heintze. Porto Alegre-RS-Brasil. 2013.

### 3.2.2.2 Concentrações de Ácido naftaleno acético (ANA) e 6-Benzilaminopurina (BAP) no cultivo *in vitro* de hippeastrum

Bulbos de hippeastrum subcultivados *in vitro* tiveram as raízes e folhas removidas. Estes bulbos foram classificados em três classes de tamanho, controladas pelo delineamento, sendo que os menores (classe PP) ( $\emptyset \leq 3$ mm) (Bloco 3) foram incubados inteiros, os medianos (classe P) ( $3 < \emptyset \leq 5$ mm) (Bloco 1, 2 e 4) divididos em duas e os maiores (classe M) ( $5 < \emptyset \leq 7$ mm) (Bloco 5) divididos radialmente em quatro partes (Figura 2 e Figura 3), cada parte considerada um explante. Os explantes, foram incubados em frascos de 150 mL contendo 30 mL de meio de cultivo MS, com 50% da concentração

original de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e  $\text{KNO}_3$ , 0,8% de ágar (m:v), 2% de sacarose (m:v) e pH corrigido a 5,8, contendo as seguintes combinações de concentrações dos reguladores de crescimento, em  $\text{mg L}^{-1}$ : ANA (0,0; 0,4 e 0,8) e BAP (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0).

Em cada frasco foram incubados quatro explantes (Figura 4). Os frascos foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de  $25\pm 2^\circ\text{C}$ , por cinco dias no escuro, seguido por fotoperíodo de 16h ( $31\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), sendo transferidos 35 dias após para meio idêntico. O delineamento experimental foi o de blocos completos casualizados em esquema fatorial 3x5 (ANA x BAP), com cinco repetições, sendo cada parcela constituída por dois frascos, totalizando 600 explantes.



FIGURA 3. Bulbos de *Hippeastrum reticulatum* var. *striatifolium* classificados divididos radialmente em quatro partes, quando originalmente com  $7 \geq \text{Ø} > 5\text{mm}$  (classe M), em duas partes quando com  $5 \geq \text{Ø} > 3\text{mm}$  (classe P), e mantidos inteiros quando com  $\text{Ø} \leq 3\text{mm}$  (classe PP). Foto: Willian Heintze. Porto Alegre-RS-Brasil. 2013.

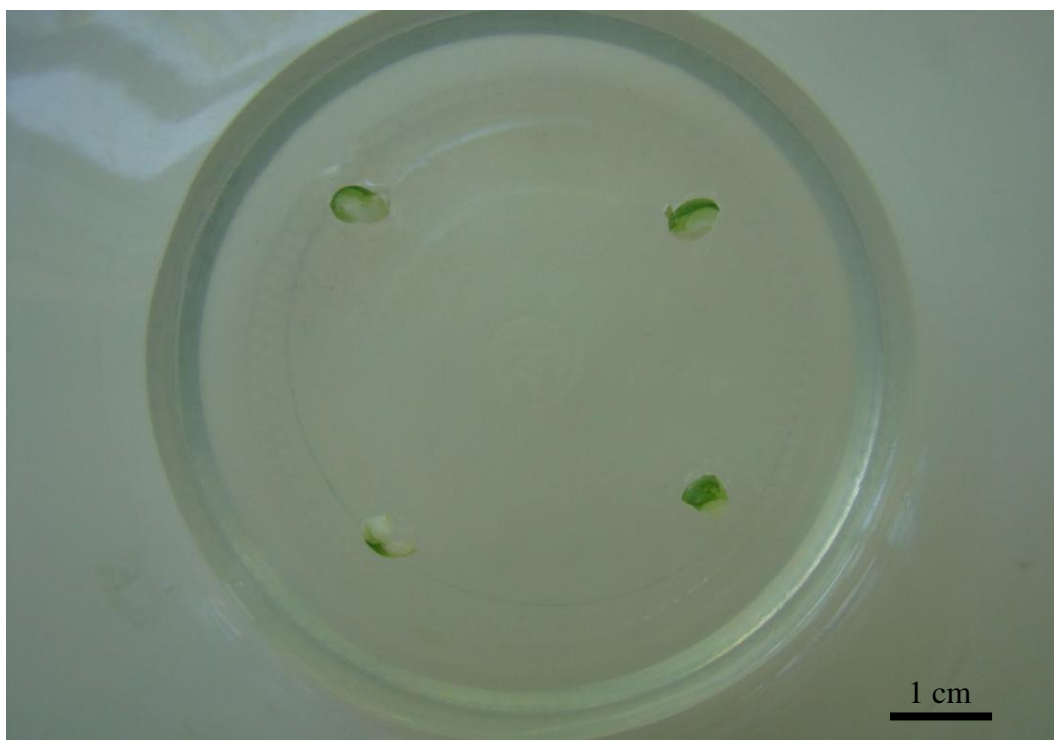


FIGURA 4. Explantes de *Hippeastrum reticulatum* var. *striatifolium* incubados em frascos de 150mL sobre meio de cultivo. Foto: Willian Heintze. Porto Alegre-RS-Brasil. 2013.

Aos 85 dias após o início do experimento foram avaliados: o número (NR), média (MCR) e soma do comprimento de raízes por explante (SCR); o número (NBE), média do diâmetro (MDB) e a soma do diâmetro de brotações por explante (SDB); número de brotações por bulbo (NBB), o número (NFB), média do comprimento (MCF) e soma do comprimento de folhas por brotação (SCF); a massa fresca de cada muda (MF); e, o percentual de mudas aptas à aclimatização (%A). A determinação das medidas das raízes e folhas foi realizada com régua milimetrada, o diâmetro com paquímetro digital, e a massa em balança analítica. Para a avaliação da aptidão à aclimatização, foram considerados como aptos as mudas que possuíam raízes, folhas e brotações visualmente desenvolvidas. Os dados de NBB foram obtidos multiplicando o NBE pelo número de divisões realizado em cada bulbo. As médias foram comparadas pela análise de variância e de regressão. Também foi realizada análise de correlação.

### 3.2.2.3 Concentrações de 6-Benzilaminopurina (BAP) no cultivo *in vitro* de *hippeastrum* na presença de carvão ativado

Bulbos de *hippeastrum* subcultivados *in vitro*, tiveram as raízes e folhas removidas. Estes bulbos foram classificados em três classes de tamanho, controladas pelo delineamento: classe P ( $3 < \varnothing \leq 5$ mm) (Bloco 5); classe M ( $5 < \varnothing \leq 7$ mm) (Bloco 1, 2 e 4); e, classe G ( $\varnothing > 7$ mm) (Bloco 3). Todos os bulbos foram divididos radialmente em duas partes. Cada uma dessas partes constituiu um explante, os quais foram incubados em tubos de ensaio de 150x25 mm contendo 16 mL de meio de cultivo MS, com 50% da concentração original de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e  $\text{KNO}_3$ , 0,8% de ágar (m:v), 2,5% de sacarose (m:v), 0,05% de carvão ativado (m:v) e pH corrigido a 5,8, contendo as seguintes concentrações de BAP, em  $\text{mg L}^{-1}$ : 0,0; 4,0; 8,0; 12,0; e, 16,0. Em cada tubo foi incubado um explante.

Os frascos foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , por sete dias no escuro, seguido por fotoperíodo de 16h ( $31 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

O delineamento experimental foi o de blocos completos casualizados com cinco repetições de cinco tratamentos e cada parcela constituída por 11 tubos, totalizando 275. Aos 74 dias após o início do experimento foi avaliado: o número (NR), média (MCR) e soma do comprimento de raízes por explante (SCR); o número (NBE), média do diâmetro (MDB) e a soma do diâmetro de brotações por explante (SDB); número de brotações por bulbo (NBB), o número (NFB), média do comprimento (MCF) e soma do comprimento de folhas por brotação (SCF); a massa fresca de cada muda (MF); e, o percentual de mudas consideradas aptas à aclimatização (%A). A determinação das medidas das raízes e folhas foi realizada com régua milimetrada, o diâmetro com paquímetro digital, e a massa em balança analítica. Para a avaliação da aptidão à aclimatização, foram considerados como aptos explantes que possuíam raízes, folhas e brotações visualmente desenvolvidas. Os dados de NBB foram obtidos multiplicando o NBE pelo número de divisões realizado em cada bulbo. As médias foram comparadas pela análise de variância e de regressão.

Também foi realizada análise de correlação inicial do bulbo e as demais variáveis analisadas.

### **3.2.3 Aclimatização de mudas**

#### **3.2.3.1 Aclimatização de mudas em diferentes substratos**

Mudas micropropagadas, com média de duas folhas e bulbos com 4,7 mm de diâmetro foram transplantadas para bandejas de polietileno com 50 células de 50cm<sup>3</sup> cada, contendo os substratos:

T1- vermiculita expandida;

T2- casca de arroz carbonizada (CAC);

T3- comercial 1 (segundo especificações no rótulo era composto de “turfa de Sphagno, vermiculita expandida, CAC, calcário dolomítico, gesso agrícola e fertilizante NPK (traços)”);

T4- fibra de coco; e,

T5- casca de *Pinus* compostada.

Foi realizada análise física e química dos substratos no Laboratório de Análise de Substratos para Plantas, Faculdade de Agronomia – UFRGS.

Após o transplante as bandejas foram mantidas durante 17 dias em casa de vegetação com irrigação intermitente por nebulização, no qual o acionamento do sistema de irrigação era realizado durante 15 segundos a cada 5 minutos das 7 às 19h (dia), e por 15 segundos a cada 15 minutos das 19 às 7h (noite), mantendo a URA com média de 87,5% ( $\sigma$  7,7%) e temperatura média de 24,9°C ( $\sigma$  4,6°C). No restante do período (80 dias) as bandejas foram mantidas sobre uma bancada em casa de vegetação nas condições de URA média de 78,1% ( $\sigma$  13,0%) e temperatura média de 23,2°C ( $\sigma$  5°C), com irrigação intermitente por capilaridade (Figura 5), em que o sistema de irrigação liberava a água sobre a bancada por uma mangueira perfurada (furos com diâmetro de 4 mm) durante dois



minutos, duas vezes ao dia, de modo que a água formava uma lâmina de dois centímetros sobre a bancada, lâmina que diminuía gradativamente até ser drenada por completo por um orifício localizado no centro da bancada, processo que durava aproximadamente cinco minutos após o desligamento do sistema. Durante estes curtos períodos de inundação o substrato era reidratado pela parte inferior das bandejas.



FIGURA 5. Bancada com bandejas (blocos), cada uma com cinco substratos (tratamentos) e dez mudas por parcela (fileira em cada bandeja). Ao centro uma mangueira perfurada (M) que distribui a água sobre a bancada, e sob a peça metálica o orifício de drenagem da bancada (O). Foto: Willian Heintze. Porto Alegre-RS-Brasil. 2013.

O delineamento experimental foi em blocos casualizados, com sete repetições e dez mudas por parcela.

Após 97 dias, as plantas foram avaliadas quanto ao percentual de sobrevivência (%S), número de raízes (NR) e soma do comprimento de raízes por muda (SCR), soma do diâmetro das brotações por muda (SDB), média do diâmetro de brotações (MDB), número de folhas (NFB) e soma do comprimento de folhas por brotação (SCF), a massa fresca por muda (MF) e o percentual de mudas selecionadas para o transplântio do total de mudas que sobreviveram (%T). Considerou-se cada bulbo como uma brotação, visto que ocorreram mudas com mais de um bulbo interligado, exceto para a variável %T, em que cada

brotação foi destacada das demais e considerada como uma muda. As medidas de comprimento foram tomadas com utilização de régua, as de diâmetro com paquímetro digital, e as de massa em balança analítica. Para o %T, foram separadas as brotações múltiplas das mudas que as possuíssem, e cada brotação passou a ser considerada como uma muda, se calculando o %T pela razão entre o número total de mudas de cada parcela sobre o total de mudas consideradas visualmente aptas e bem desenvolvidas.

Os dados foram submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

### **3.3 Propagação por sementes**

#### **3.3.1 Teor de umidade das sementes de *hippeastrum***

##### **3.3.1.1 Determinação da umidade em sementes de *hippeastrum***

No Laboratório de Biotecnologia em Horticultura, Faculdade de Agronomia - UFRGS, em junho de 2012 foram colhidas cápsulas de *hippeastrum* em início de deiscência. As sementes foram divididas em três lotes. O primeiro lote foi formado por sementes colhidas de cápsulas verdes em início de deiscência. Os outros dois foram formados por sementes oriundas de cápsulas em início de deiscência colhidas e secas em sala climatizada, com temperatura de 26°C e umidade relativa do ar (URA) de 60%, por quatro dias. Em junho de 2013 foram colhidas sementes diretamente de cápsulas totalmente deiscentes na própria planta.

A metodologia foi realizada de acordo com as normas de análises de sementes (Brasil, 2009). A média da massa de sementes utilizadas em cada lote em 2012 foi de 1,4g (5 a 6 sementes por lote), e em cada uma das três repetições em 2013 de 1,7 g (6 a 7 sementes por repetição).

### 3.3.2 Germinação de sementes de *hippeastrum*

As sementes foram colhidas em junho de 2012, de plantas matrizes cultivadas em casa de vegetação. Os tratamentos consistiram na manutenção das sementes por 30 dias no escuro, em frascos de vidro hermeticamente fechados, nas temperaturas de 26°C (tratamento controle) ou 5°C (tratamento com Frio).

Em caixas acrílicas do tipo gerbox foi colocado 180cm<sup>3</sup> de areia média umedecida a 60% da capacidade de retenção de água, padronizada segundo as Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009). As sementes foram dispostas sobre a areia, sendo em seguida mantidas em ambiente com temperatura de 26°C e fotoperíodo de 16 horas, com irradiância de 31µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos completos casualizados, com quatro repetições e 25 sementes por parcela. Como critério para a avaliação da germinação (E1), foi utilizada a protrusão do hipocótilo em, pelo menos, dois milímetros, e para o estágio de formação de plântula (E2), a emissão da primeira folha. Foi avaliado o percentual de germinação, e calculados o tempo médio (Silva & Nakagawa, 1995) e o índice de velocidade de germinação (Santana & Ranal, 2004). Os dados foram submetidos à análise de variância.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Descrição morfológica da espécie

*Hippeastrum reticulatum* var. *striatifolium* (Herb.) Herb. é uma erva bulbosa que possui raízes fasciculadas. Conforme observado, entre cada catafilo de seu bulbo tunicado (Figura 6A), no ponto de inserção no caule, existem diversas gemas laterais dormentes, sendo imperceptíveis a olho nu enquanto estiverem inibidas, das quais, em situações naturais, algumas iniciam o desenvolvimento sob estímulos específicos. A filotaxia é alterna dística, normalmente quatro a sete folhas por planta, as quais são planas, oblanceoladas, glabras, coriáceas, com bordo inteiro e nervação paralelinérvea, sendo a nervura central muito evidente na face adaxial, branca e central a um limbo verde escuro brilhante (Figura 6B). Em espécies de *Hippeastrum*, um escapo floral oco e glabro é emitido da parte central do bulbo em um ciclo de quatro folhas para a emissão da inflorescência (Hartmann *et al.*, 1990; Dole & Wilkins, 2004). Em *H. reticulatum* var. *striatifolium* o florescimento ocorre anualmente, normalmente do final do verão ao início do outono, conforme constatado nas plantas cultivadas para este trabalho. A inflorescência é do tipo umbela, com número de flores que varia de quatro a seis, frequentemente quatro desenvolvidas mais uma ou duas atrofiadas. Do ápice do escapo floral, protegidas por duas brácteas maiores e quatro mais estreitas, abaixo das maiores, ocorre sequencialmente o desenvolvimento das flores, que se inicia pelo desenvolvimento de um botão floral cor rosa-claro. O botão se alonga e cerca de uma semana (em média) após o início do seu crescimento a flor se abre. Observou-se que concomitante ao desenvolvimento do primeiro

botão, outro ou outros botões iniciam seu desenvolvimento (Figura 7A). A flor é diclamídea homoclamídea, com perigônio formado por seis tépalas de coloração predominante rosa-claro na base, que gradualmente escurece em direção ao ápice, contrastando com nervuras rosadas de tonalidade mais escura que formam uma rede (“reticulatum”), em um conjunto delicado de textura drapeada, que reflete milhares de minúsculos pontos brilhantes de acordo com o ângulo de incidência da luz sobre o tecido das tépalas (Figura 7B e Figura 8).



FIGURA 6. *Hippeastrum reticulatum* var. *striatifolium*: bulbo (A), folhas (B), flor (C) e fruto com sementes (D). Fotos: Willian Heintze. Porto Alegre-RS-Brasil. 2012 e 2013.



FIGURA 7. Inflorescência de *Hippeastrum reticulatum* var. *striatifolium* (A), com detalhe da textura e brilho das tépalas (B). Fotos: Willian Heintze. Porto Alegre-RS-Brasil. 2012.

As flores são zigomorfas, trímeras, dialitépalas. Possuem seis estames dialistêmones, com curvatura geotropicamente negativa, anteras dorsifixas, as quais são ditecas com deiscência rimosa (Figura 6C e Figura 9). O gineceu é gamocarpelar, tricarpelar e trilocular, polispérmico, com placentação axial (Figura 8). O ovário é ínfero e o fruto é uma cápsula loculicida (Figura 6D). Em 40 cápsulas polinizadas manualmente, das plantas utilizadas neste trabalho, foi obtida uma média de 12,3 sementes por cápsula, com um desvio padrão de 6,1, sendo 26 o maior número de sementes obtido em uma cápsula. As sementes possuem testa negra brilhante (Figura 6D).

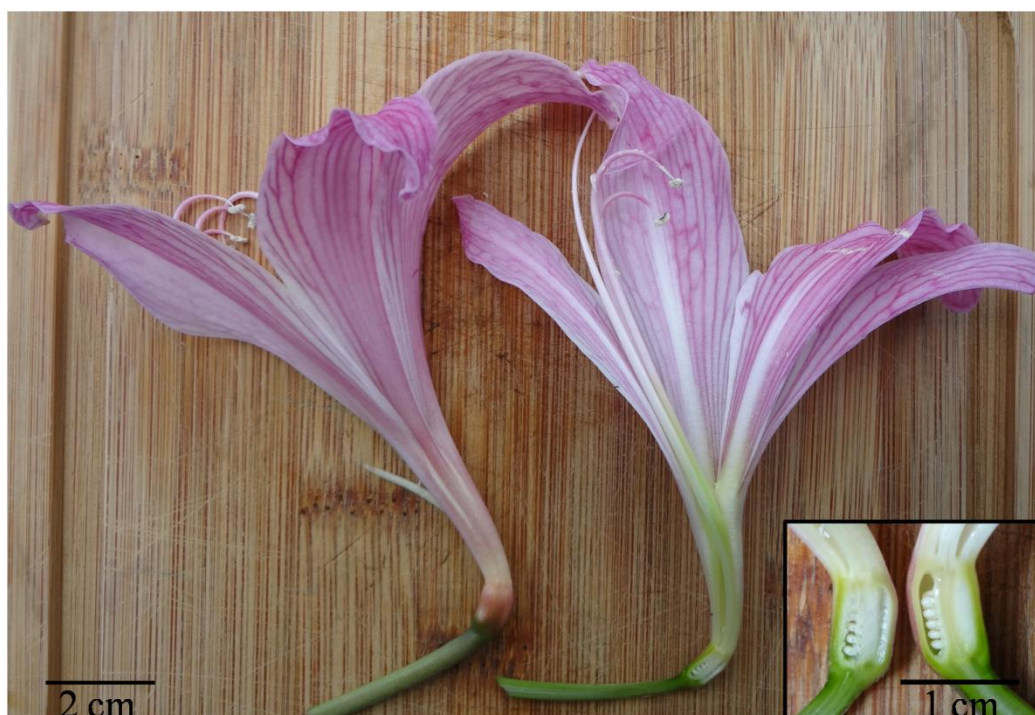


FIGURA 8. Flor de *Hippeastrum reticulatum* var. *striatifolium* em corte. Em detalhe ovário mostrando óvulos. Fotos: Willian Heintze. São Francisco de Paula-RS-Brasil. 2014.

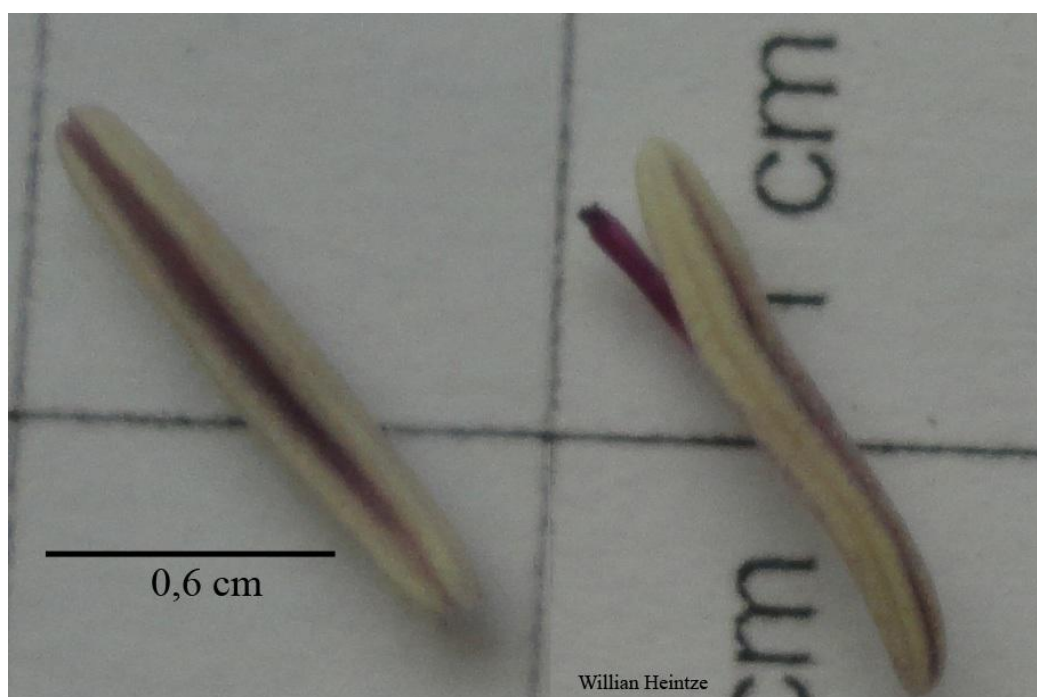


FIGURA 9. Anteras de *Hippeastrum reticulatum* var. *striatifolium*. Foto: Willian Heintze. Porto Alegre-RS-Brasil. 2013.

## **4.2 Produção de mudas por micropropagação**

### **4.2.1 Origem e desinfestação dos explantes**

#### **4.2.1.1 Desinfestação de tecidos de hippeastrum.**

Os resultados das comparações de cada tratamento com imersão em água quente contra os tratamentos controle (TC) estão apresentados na Tabela 2. Tratar os explantes com imersão por 30' em água a 52°C (T1) foi eficiente na redução da contaminação, comparando com a imersão a 25°C (TC), sem comprometer a sobrevivência. No experimento 1 não foi observado explante que não tenha sobrevivido por algum motivo que não fosse a contaminação, porém, foram observados explantes que sobreviveram apesar da contaminação, o que possibilita a utilização destas mudas para aclimatização, mas limita seu uso na cultura de tecidos. No experimento 2, não ocorreu diferença entre TC e T2 para percentual de contaminação (%C), possivelmente devido ao baixo índice de contaminação obtido em TC (Figura 10). T2 afetou significativamente a sobrevivência dos explantes, sendo que apenas 9,7% sobreviveram ao tratamento térmico. O dano ficou mais evidente no experimento 3, quando foi aplicado o T3, não ocorrendo contaminação, mas nenhum explante sobreviveu (Figura 10). Estes resultados se agregam aos encontrados por Flores (2003), que utilizou 54°C por 30' e obteve percentual de sobrevivência de 50%, possibilitando a suposição de que a temperatura limite suportada pelo bulbo seja igual ou levemente superior a 52°C.



TABELA 2. Percentual de contaminação (%C), sobrevivência (%S) e de explantes não contaminados que não sobreviveram (%NCNS) de *Hippeastrum reticulatum* var. *striatifolium* tratados com termoterapia por imersão em água a 25°C por 30' (TC) e: 52°C por 30' (T1); 55°C por 1'+52°C por 29' (T2); 60°C por 1'+52°C por 29' (T3), incubados *in vitro*.

Experimento	Tratamento	%C	%S	%NCNS
1	TC	34,0% b	73,2% b	0,0%
	T1	0,0% a	100,0% a	0,0%
	<i>p</i>	0,0234	0,0316	-----
2	TC	3,1% a	89,1% a	7,8% a
	T2	0,0% a	9,7% b	90,3% b
	<i>p</i>	0,3910	0,0020	0,0008
3	TC	20,8% a	76,0% a	3,1% a
	T3	0,0% a	0,0% b	100,0% b
	<i>p</i>	0,1942	0,015	<0,0001

Médias seguidas por letras distintas nas colunas dentro de cada experimento diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

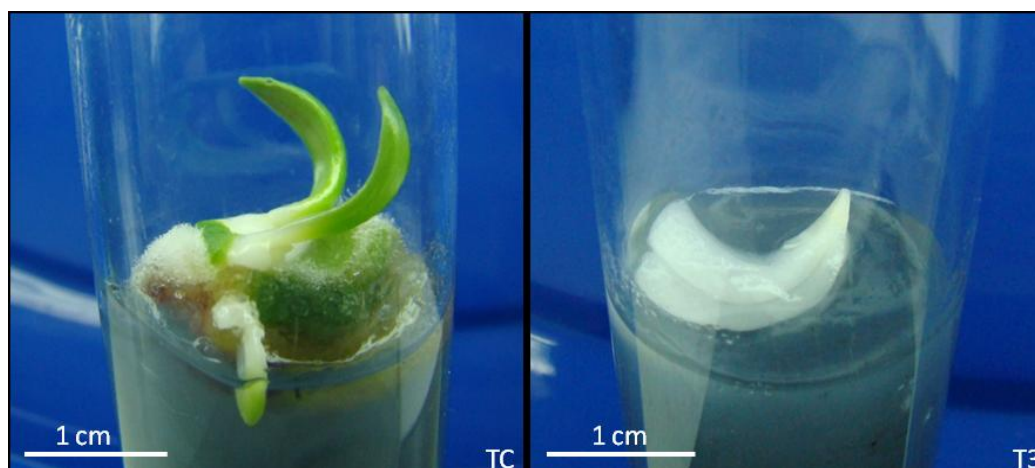


FIGURA 10. Explantes de *Hippeastrum reticulatum* var. *striatifolium* que não contaminaram, à esquerda, submetido ao tratamento com imersão por 30' em água a 25°C (TC), e à direita, que foi submetido a imersão em água a 60°C por 30' (T3) e não sobreviveu. Fotos: Willian Heintze. Porto Alegre-RS-Brasil. 2012.

Dentre os tratamentos testados, a maior eficiência na desinfestação e sobrevivência de explantes foi obtida quando se utilizou tratamento térmico com imersão a 52°C por 30' (T1), visto que nos tratamentos T2 e T3 ocorreu elevada mortalidade de explantes devido exclusivamente ao tratamento, embora o resultado dos tratamentos controle (média geral de 74,3%) não tenha sido tão inferior, o que poderia compensar a utilização de TC à T1, em virtude do ônus da realização do tratamento térmico em T1.

Em trabalhos posteriores, partindo dos bulbos daquelas plantas que foram transplantadas e superadubadas (de modo não intencional), e utilizando-se o tratamento TC, em um total de 30 frascos, o %C foi de 65%. Acreditando que a contaminação poderia ser devido à manipulação, foi repetido com 63 frascos, obtendo 72,9% de contaminação. Uma terceira tentativa com o procedimento TC foi realizada, e todos os 11 frascos contaminaram. Visto que o procedimento TC não estava sendo eficiente, se optou por aplicar um método que seria de maior eficiência, T1, e, de 33 frascos, apesar do tratamento térmico, o %C foi de 91%.

A desinfestação abrange um processo pontual dependente de outro muito amplo e de igual importância: os cuidados com as plantas matrizes (substrato, irrigação, adubação, ambiente e tratamentos fitossanitários). Frequentemente esta etapa prévia não é descrita pelos autores na metodologia científica. Embora não tenha sido o objetivo deste trabalho, fica evidenciada a importância dos cuidados com as plantas matrizes e o grande efeito desta etapa na obtenção de explantes livres de contaminação, ao ponto de transformar uma metodologia funcional, num primeiro momento, em uma metodologia não funcional. Veltinari & Quisen (2012) ressaltam que a origem e a forma de manejo das plantas matrizes são determinantes para o controle da contaminação por microorganismos, principalmente endofíticos.

O estresse causado pelo erro de superadubação pode ter afetado as plantas, de modo a diminuir sua imunidade, desequilibrando a população de microorganismos, no substrato, ou mesmo endofíticos. É desaconselhável a utilização de explantes oriundos de plantas que estejam passando sob qualquer tipo de estresse (Carvalho & Silva, 2012). Outra possibilidade é a de que o substrato para o qual foram transplantadas possuísse algum microorganismo que se instalou endogenamente nas plantas, sem lhes causar danos aparentes *in vivo*. A confirmação destas hipóteses demandaria estudos complexos e específicos, que não constituíram o objetivo deste trabalho.

## 4.2.2 Variações no meio de cultivo

### 4.2.2.1 Organogênese *in vitro* em *hippeastrum*: concentração de sacarose e posição dos explantes sobre o meio de cultivo

Ocorreu interação entre os fatores de tratamento para número de brotações por explante (NBE), soma do diâmetro das brotações por explante (SDB), número de raízes por explante (NR), soma do comprimento de raízes por explante (SCR), média do comprimento de raízes por explante (MCR) e a soma do número de folhas por explante (SNF), evidenciando efeito diferenciado da concentração de sacarose em relação à posição de incubação dos explantes no meio.

Para a variável número de brotações por explante (NBE), foi observado efeito linear quando foi realizada incubação dos explantes na horizontal (PH) ( $p < 0,05$ ), com um acréscimo de 0,07 brotações a cada  $10 \text{ g L}^{-1}$  de aumento na concentração de sacarose, e efeito quadrático para incubação na vertical (PV) ( $p < 0,001$ ), com ponto de máxima resposta estimada na concentração de sacarose de  $61,1 \text{ g L}^{-1}$ , com  $NBE=3,8$  (Figura 11). Este resultado foi análogo ao obtido por Rodrigues *et al.* (1996) em cebola, e oposto ao obtido por Sultana *et al.* (2010) em *H. hybridum* e por Bruyn *et al.* (1992) em *H. belladonna*, que verificaram que embora uma quantidade de sacarose, mesmo que pequena, foi necessária à regeneração, concentrações elevadas ( $60 \text{ g L}^{-1}$ ) provocaram um efeito negativo à regeneração dos explantes. A incubação na posição vertical proporcionou um maior número de brotações em todas as concentrações de sacarose testadas, contrapondo o observado por Bruyn *et al.* (1992), que não obteve diferença significativa entre o número de brotações formadas por explante quando estes foram fixados ao meio de cultivo pela base do caule ou pelo ápice da túnica (base do caule voltada para cima).

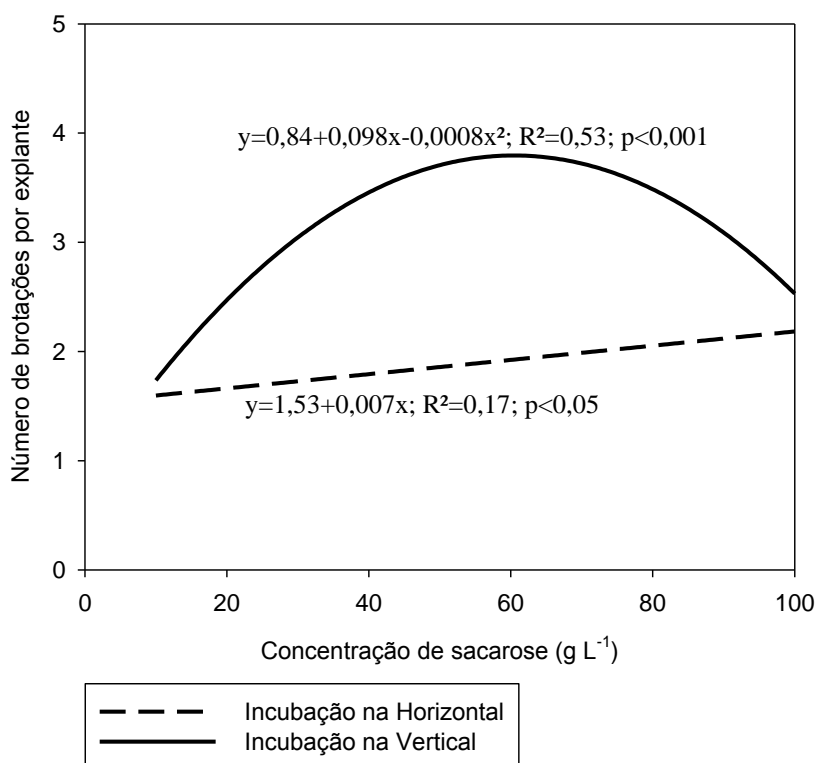


FIGURA 11. Número de brotações por explante *in vitro* (NBE) aos 84 dias após a incubação, em função da concentração de sacarose e da posição de incubação de explantes sobre o meio de cultivo, na micropropagação de *Hippeastrum reticulatum* var. *striatifolium*. Porto Alegre-RS-Brasil. 2013.

A maior soma do diâmetro de brotações por explante (SDB) foi obtida quando realizada incubação na posição vertical para todas as concentrações de sacarose testadas (Figura 12). Foi observado efeito quadrático para SDB, com máxima resposta estimada na concentração de sacarose de 57,8 g L<sup>-1</sup> associada à incubação na posição vertical (0,94mm) e de 71,1 g L<sup>-1</sup> associada à incubação na posição horizontal (PH) (0,66mm).

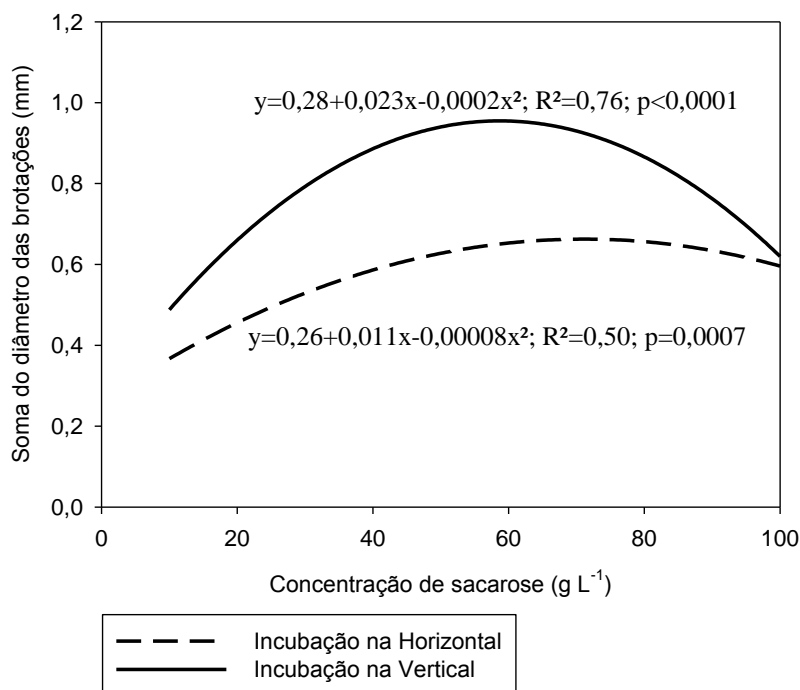


FIGURA 12. Soma do diâmetro das brotações laterais por explante *in vitro* (SDB) aos 84 dias após a incubação, em função da concentração de sacarose e da posição de incubação de explantes sobre o meio de cultivo, na micropropagação de *Hippeastrum reticulatum* var. *striatifolium*. Porto Alegre-RS-Brasil. 2013.

Não ocorreu diferença significativa nem interação entre os tratamentos para a média do diâmetro das brotações por explante (MDB), com média de 0,31mm por brotação. Isto é importante por demonstrar que ocorreu um equilíbrio entre o número e a soma do diâmetro de brotações em todos os tratamentos, produzindo mudas de qualidade idêntica em relação ao diâmetro das brotações em todas as concentrações, permitindo assim a escolha do tratamento mais favorável de acordo com o objetivo. Quando a intenção é multiplicar as mudas *in vitro*, a maior produção de brotações por explante poderá ser obtida com a utilização de 60 g L<sup>-1</sup> de sacarose associada à incubação na posição vertical.

Para a variável número de raízes por explante (NR) ocorreu efeito quadrático ( $p<0,001$ ), com ponto de máxima resposta estimada na concentração de 54,7 g L<sup>-1</sup> de sacarose, associado à incubação na posição horizontal (PH), resultando em um NR=5,2, e, com 53,1 g L<sup>-1</sup> associado à incubação na PV, resultando em um NR=7,5 (Figura 13). O maior número de raízes para cada concentração de sacarose foi obtido quando realizada a

incubação na posição vertical, exceto ao ser utilizada a concentração 100 g L<sup>-1</sup>. Galdiano Junior *et al.* (2013), em *Cattleya loddigesii*, observaram ponto de máxima resposta em relação ao número de raízes por planta já na concentração estimada de 20,7 g L<sup>-1</sup>. Bandinelli *et al.* (2013) não obtiveram variação no número de raízes de batata entre as concentrações de 30, 45 e 60 g L<sup>-1</sup>.

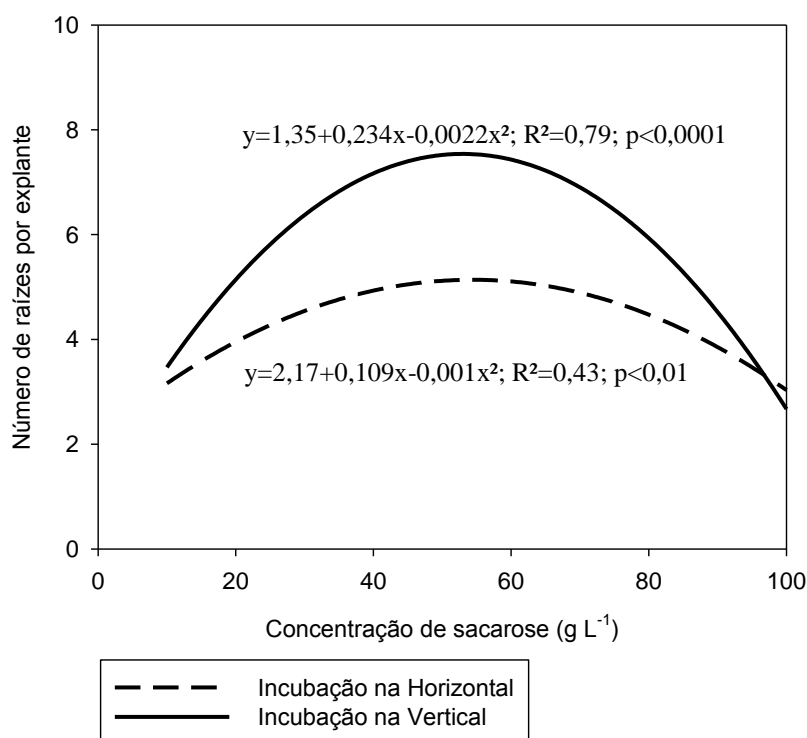


FIGURA 13. Número de raízes por explante *in vitro* (NR) aos 84 dias após a incubação, em função da concentração de sacarose e da posição de incubação de explantes sobre o meio de cultivo, na micropropagação de *Hippeastrum reticulatum* var. *striatifolium*. Porto Alegre-RS-Brasil. 2013.

Observou-se efeito quadrático para a variável soma do comprimento de raízes por explante (SCR), com interação significativa entre os fatores de tratamento. Foi estimado efeito de máxima resposta para SCR quando na concentração de sacarose de 42,6 g L<sup>-1</sup> com incubação na posição horizontal (PH) (SCR=19,2cm) e 48,4 g L<sup>-1</sup> com incubação na posição vertical (PV) (SCR=27,2cm) (Figura 14). A maior SCR para as concentrações intermediárias de sacarose testadas foi obtida quando realizada incubação na vertical.

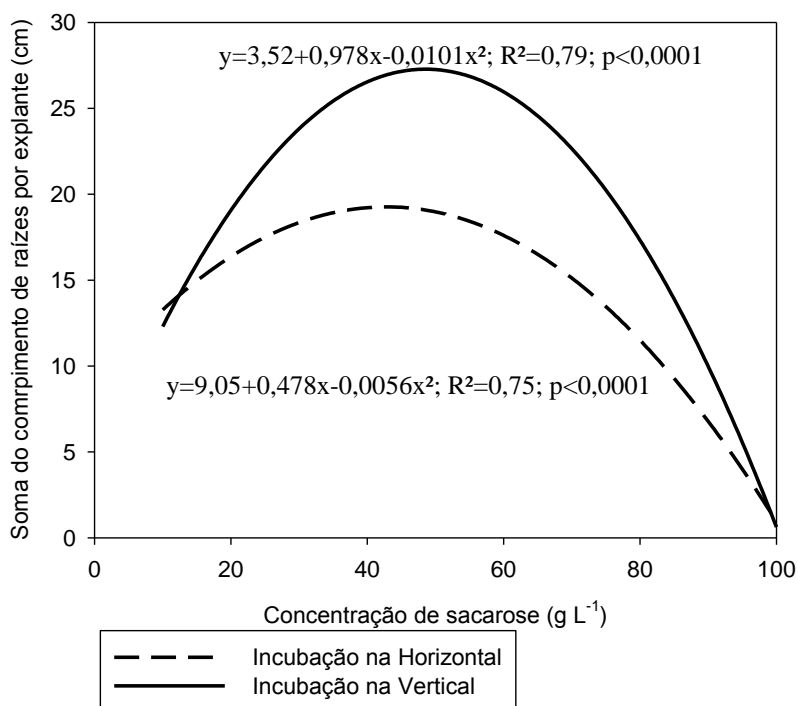


FIGURA 14. Soma do comprimento de raízes por explante *in vitro* (SCR) aos 84 dias após a incubação, em função da concentração de sacarose e da posição de incubação de explantes sobre o meio de cultivo, na micropropagação de *Hippeastrum reticulatum* var. *striatifolium*. Porto Alegre-RS-Brasil. 2013.

A média do comprimento de raízes por explante (MCR) é a razão da soma do comprimento de raízes (SCR) para número de raízes (NR). Este é um dado importante por ser complementar ao número e soma do comprimento, permitindo a identificação da concentração que proporcionou, em média, as maiores raízes, o que muitas vezes pode ser indesejado no momento da aclimatização, fazendo-se necessária uma etapa de poda para evitar amassamentos, dobramentos e enovelamentos, prejudicando, assim, a muda. Quando os explantes foram incubados horizontalmente, a maior média do comprimento de raízes (MCR) foi estimada na concentração de 18,4 g L<sup>-1</sup>, e 34,4 g L<sup>-1</sup> quando incubados na posição vertical (Figura 15). A MCR foi maior em todas as concentrações de sacarose quando os explantes foram incubados na posição horizontal (PH). Em relação ao enraizamento *in vitro* pensando em posterior aclimatização das mudas, a incubação na posição vertical (PV) mostrou-se mais eficiente, produzindo explantes com maior número e soma do comprimento de raízes, ao mesmo tempo em que produziu raízes com

comprimento médio menor que quando os explantes foram incubados na PH. Os resultados mais favoráveis à aclimatização de mudas foram estimados quando a concentração de sacarose utilizada fosse próxima a  $50 \text{ g L}^{-1}$  associada à incubação na vertical. Em *Alocasia amazonica*, Jo *et al.* (2009) observaram maior número de comprimento de raízes na concentração de  $30 \text{ g L}^{-1}$ .

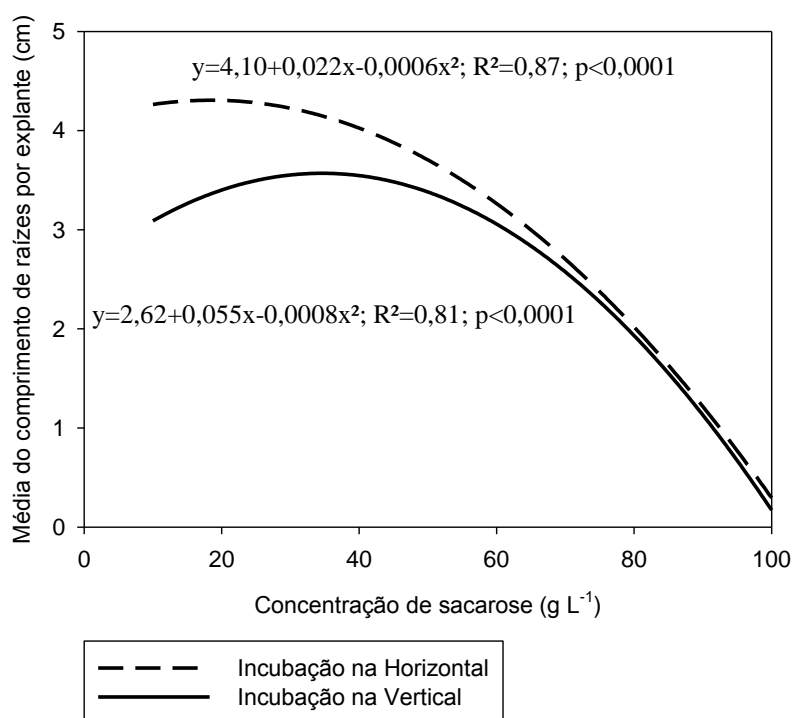


FIGURA 15. Média do comprimento de raízes por explante *in vitro* (MCR) aos 84 dias após a incubação, em função da concentração de sacarose e da posição de incubação de explantes sobre o meio de cultivo, na micropropagação de *Hippeastrum reticulatum* var. *striatifolium*. Porto Alegre-RS-Brasil. 2013.

A maior soma do número de folhas por explante (SNF) foi estimada quando utilizada a concentração de sacarose de  $40,4 \text{ g L}^{-1}$  associada à incubação na posição vertical (PV) (3,7 folhas por explante), e na concentração de  $35,9 \text{ g L}^{-1}$  quando a incubação for realizada na posição horizontal (PH) (2,8 folhas por explante) (Figura 16). Nas concentrações de sacarose acima destas, ocorreu acentuado decréscimo na soma do número de folhas por explante.



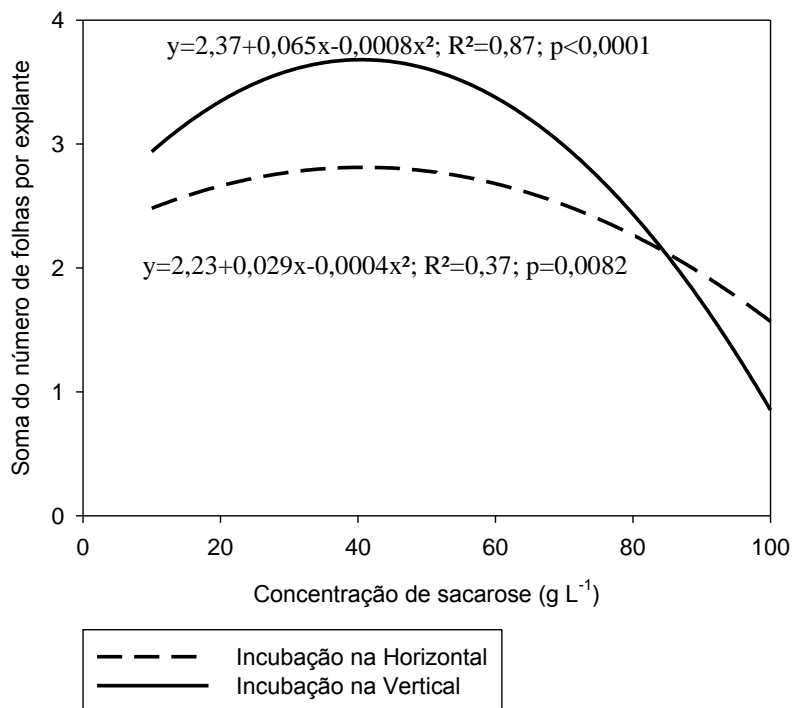


FIGURA 16. Soma do número de folhas por explante *in vitro* (SNF) aos 84 dias após a incubação, em função da concentração de sacarose e da posição de incubação de explantes sobre o meio de cultivo, na micropropagação de *Hippeastrum reticulatum* var. *striatifolium*. Porto Alegre-RS-Brasil. 2013.

Como em geral cada explante possui mais de uma brotação, com valores elevados de número de brotações por explante (NBE) nas concentrações intermediárias de sacarose quando incubados na posição vertical, e nas mais altas quando incubados na posição horizontal (Figura 11), a tendência é de decréscimo do número de folhas por brotação, conforme obtido e apresentado na Figura 17. Sem distinção significativa entre as posições de incubação, a elevação da concentração de sacarose no meio de cultivo reduziu acentuadamente o número de folhas por brotação, ao ponto que na concentração mais elevada quase metade das brotações sequer apresentavam folhas. O maior número de folhas por brotação (NFB) foi obtido na concentração mais baixa de sacarose utilizada, com média de 1,9 folhas por brotação.

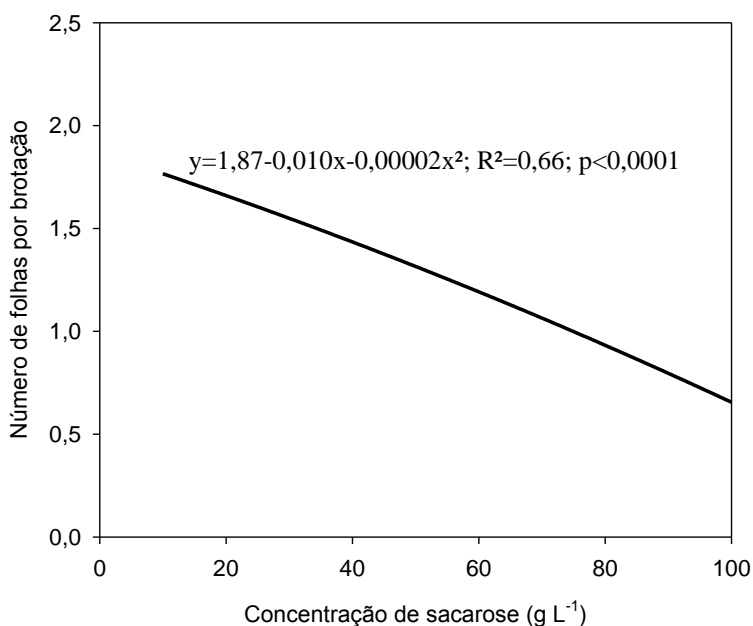


FIGURA 17. Número de folhas por brotação (NFB) aos 84 dias após a incubação, em função da concentração de sacarose, na micropropagação de *Hippeastrum reticulatum* var. *striatifolium*. Porto Alegre-RS-Brasil. 2013.

Genes promotores da fotossíntese de células autotróficas são regulados pela depleção de açúcar (Koch, 1996). Baixos níveis de açúcar aumentam a atividade dos órgãos onde ele é produzido, incluindo a fotossíntese, mobilização e exportação de nutrientes, enquanto que altos níveis estimulam o crescimento e o armazenamento (Rolland *et al.*, 2002). Jo *et al.* (2009) observaram efeito inibitório na formação de folhas em *Alocasia amazonica* na concentração de 90 g L<sup>-1</sup> de sacarose, e o maior número de folhas na concentração zero, sem distinção da concentração 30 g L<sup>-1</sup>. Já Bandinelli *et al.* (2013) e Galdiano Junior *et al.* (2013) avaliaram as concentrações máximas de 60 e 40 g L<sup>-1</sup> em batata e em *Cattleya loddigesii*, respectivamente, observando redução na formação de folhas nessas espécies nessas concentrações, e o maior número de folhas nas concentrações 30 g L<sup>-1</sup> (a menor concentração avaliada), e 18 g L<sup>-1</sup>, respectivamente, e, em relação à utilização de concentrações de sacarose com o objetivo de armazenar tecidos como banco de germoplasma *in vitro*, os autores observaram que a concentração de 100 g L<sup>-1</sup> passou a ser inibitória, de acordo com os dados de soma do diâmetro das brotações. Para Jo *et al.* (2009), que também observaram crescimento lento em concentrações acima de 60g L<sup>-1</sup>,

este pode ser atribuído ao impedimento das atividades metabólicas causado pelo estresse osmótico, indicado pelo decréscimo do potencial hídrico. Nestes casos, a planta se tornaria ineficiente em mobilizar este recurso abundantemente disponível no meio de cultivo para os órgãos de reserva. O impedimento das atividades metabólicas em concentrações elevadas de sacarose pelo estresse osmótico também ajuda a explicar o grande decréscimo no número e comprimento das raízes.

Há uma faixa de concentração de sacarose no meio de cultivo, calculada pela equação da curva, em que ocorre melhor resposta dos explantes ao enraizamento (concentração de sacarose entre 40 e 50g L<sup>-1</sup>), formação de folhas (concentração de sacarose ≤ 40g L<sup>-1</sup>) ou brotações (concentração de sacarose próxima a 60g L<sup>-1</sup>). Concentrações acima de 60g L<sup>-1</sup> (calculada) prejudicaram as plantas.

#### **4.2.2.2 Concentrações de Ácido naftaleno acético (ANA) e 6-Benzilaminopurina (BAP) no cultivo *in vitro* de *hippeastrum***

As concentrações de ANA em interação com as concentrações de BAP alteraram de forma significativa a média do comprimento de raízes por explante (MCR) (Figura 18) e a média do comprimento de folhas por brotação (MCF) (Figura 19). A maior MCR e MCF foi observada quando utilizada a concentração zero de ambos reguladores de crescimento. O aumento nas concentrações de BAP quando na ausência de ANA diminuiu de modo mais expressivo tanto a MCR quanto a MCF do que quando foi utilizada a concentração 0,8 mg L<sup>-1</sup> ANA. Ao mesmo tempo, a utilização de ANA, quando a concentração de BAP foi zero, afetou de forma negativa ambas variáveis, e de forma mais positiva conforme o aumento da concentração de BAP. Em *H. hybridum*, Tombolato *et al.* (2001) também observaram decréscimo acentuado no comprimento de raízes com o aumento da concentração de BAP no meio de cultivo.

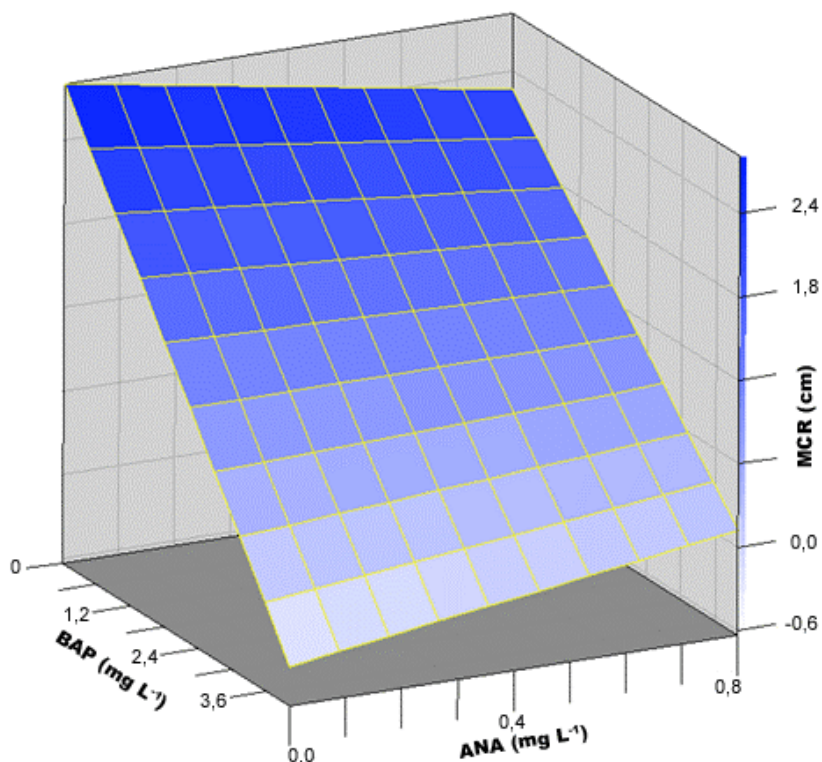


FIGURA 18. Gráfico de superfície de resposta para Média do Comprimento de Raízes (MCR) (em cm) por explante em função da concentração de ácido naftaleno acético (ANA) (em  $\text{mg L}^{-1}$ ) e 6-benzilaminopurina (BAP) (em  $\text{mg L}^{-1}$ ), na micropropagação de *Hippeastrum reticulatum* var. *striatifolium*. Porto Alegre-RS-Brasil. 2013.

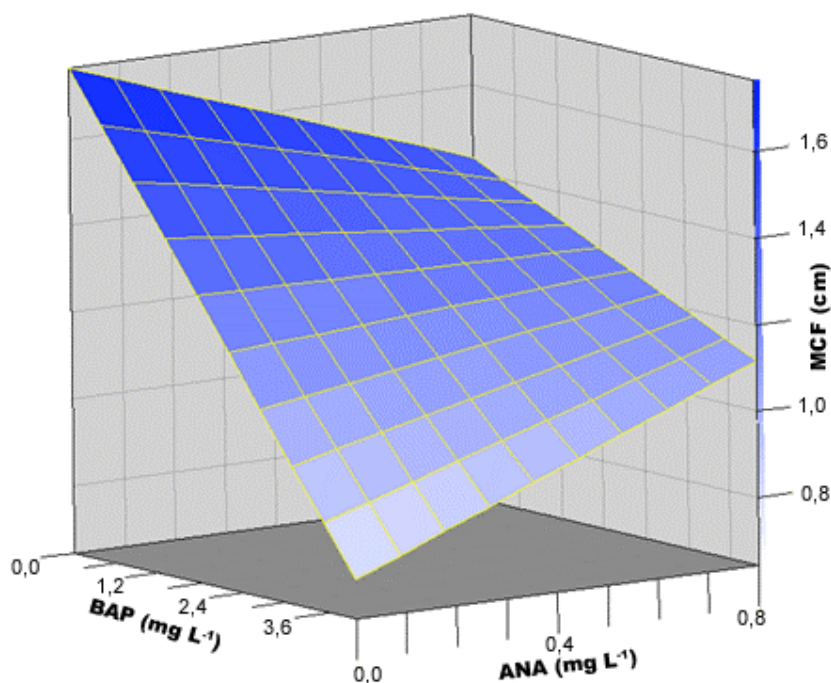


FIGURA 19. Gráfico de superfície de resposta para Média do Comprimento de Folhas por brotação (MCF) (em cm) em função da concentração de ácido naftaleno acético (ANA) (em  $\text{mg L}^{-1}$ ) e 6-benzilaminopurina (BAP) (em  $\text{mg L}^{-1}$ ), na micropropagação de *Hippeastrum reticulatum* var. *striatifolium*. Porto Alegre-RS-Brasil. 2013.

Uma alta razão de auxina:citocinina estimula a formação de raízes, enquanto uma baixa razão estimula a formação da parte aérea (Taiz & Zeiger, 2006). Estes mesmos autores descrevem que auxinas induzem a biossíntese de etileno pelo aumento da ACC sintase. O aumento da concentração desse hormônio gasoso pode causar epinastia, senescência foliar e inibição do crescimento radicial (Cato, 2006). Para algumas plantas, o fornecimento constante de auxinas pode prejudicar o enraizamento pela ação do etileno ou mesmo somente pela ação inibitória da auxina, sendo que o ideal seria a aplicação da auxina apenas num primeiro momento, ou, a utilização de auxinas degradáveis, como o ácido indol acético (AIA), que por ser fotossensível se degrada no meio de cultivo e reduz drasticamente sua concentração com a exposição à luz (Klerk, 2002), ao contrário do ANA, fotoestável. Além disso, a utilização combinada de auxinas e citocininas, dependendo da concentração de cada uma delas, pode induzir efeito antagônico ou sinérgico (Bielach *et al.*, 2012). Foi observado efeito antagônico para média do comprimento de raízes (Figura 18) e média do comprimento de folhas (Figura 19), visto que quando foram utilizadas concentrações elevadas combinadas de ANA e BAP ocorreu efeito inibitório menos acentuado que quando utilizado somente um desses reguladores de crescimento, análogo ao observado por Sultana *et al.* (2010).

A exceção das variáveis “média do comprimento de raízes (MCR)” e “média do comprimento de folhas (MCF)”, não ocorreu interação entre os reguladores de crescimento testados para as demais variáveis avaliadas, apresentadas de modo isolado abaixo.

O número de brotações e a soma do diâmetro de brotações por explante não foram afetados pelas concentrações de BAP. O mesmo foi observado por Bruyn *et al.* (1992) em *H. belladonna* quando utilizou BAP e ANA, contudo, os explantes que não receberam reguladores de crescimento produziram um menor número de brotações por explante. Já Soares (2013) obteve decréscimo linear no comprimento de brotos de maracujazeiro conforme o aumento da concentração de BAP no meio de cultivo MS.

A variação na concentração de BAP afetou de forma significativa o número de raízes por explante (NR) (Figura 20), a soma do comprimento de raízes por explante (SCR) (Figura 21), o número de folhas por brotação (NFB) (Tabela 3) e a soma do comprimento de folhas por brotação (SCF) (Figura 23). A ausência de BAP, independentemente da concentração de ANA aumentou o número e a soma do comprimento de raízes, e a soma do comprimento de folhas por brotação. O maior número de folhas por brotação foi observado nas concentrações 0 e 1 mg L<sup>-1</sup> de BAP, não diferindo da concentração 3 mg L<sup>-1</sup> (Tabela 3).

TABELA 3. Número de brotações (NBE), média do diâmetro de brotações (MDB), soma do diâmetro de brotações por explante (SDB) e número de folhas por brotação (NFB) em função da concentração de 6-benzilaminopurina, na micropropagação de *Hippeastrum reticulatum* var. *striatifolium*. Porto Alegre-RS-Brasil. 2013.

BAP (mg L <sup>-1</sup> )	NBE	MDB (mm)	SDB (mm)	NFB
0	1,50 <sup>ns</sup>	2,50 a*	3,50 <sup>ns</sup>	1,67 a
1	1,82	2,21 b	3,67	1,72 a
2	1,84	2,12 b	3,43	1,47 b
3	1,73	2,20 b	3,52	1,52 ab
4	1,81	2,20 b	3,76	1,46 b
Média	1,74	-	3,58	-
<i>p</i>	0,185	0,009	0,730	0,028
CV (%)	24,9	13,0	20,8	17,2

<sup>ns</sup> Não Significativo. \*Médias seguidas por letras distintas nas colunas diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Um esclarecimento importante a ser observado em relação ao número de brotações por explante (NBE) é que embora a média tenha sido pequena, 1,74 brotações a partir de cada explante, o que poderia inviabilizar a técnica de micropropagação, os bulbos maiores (M) foram divididos em quatro partes (explantes), os intermediários (P) em duas partes e os pequenos (PP) mantidos inteiros, logo, a partir de um bulbo da classe M são esperadas 6,96 brotações, e a partir de um bulbo pertencente à classe P, 3,38 brotações. Cada uma destas brotações, reconduzidas, pode gerar pelo menos uma muda.

Para verificar a veracidade desta informação, foi realizada análise de correlação entre o diâmetro inicial do bulbo e as médias de número de brotações por explante (NBE) e

por bulbo (NBB). Ocorreu correlação positiva significativa ( $r=0,56$  e  $p<0,0001$ ) entre o diâmetro inicial do bulbo e o NBB, com média geral de 3,39 brotações por bulbo, sendo que a média do NBB foi de 6,73 para bulbos da classe M, 3,55 para bulbos P, e 1,61 para bulbos PP, valores muito próximos ao esperado. Ao mesmo tempo, não foi verificada correlação significativa entre o diâmetro inicial dos bulbos e o número de brotações por explante (NBE), nem significativa com  $r>0,2$  (valor de  $r$  muito baixo para ser considerado) para nenhuma das outras variáveis analisadas, o que evidencia que a divisão realizada originou explantes altamente homogêneos e com capacidade semelhante para produzir brotações, raízes ou folhas.

Ocorreu decréscimo no número de raízes por explante (NR) (Figura 20), soma do comprimento de raízes por explante (SCR) (Figura 21), no percentual mudas consideradas aptas à aclimatização (%A) (Figura 22) e na soma do comprimento de folhas por brotação (SCF) (Figura 23) pelo aumento da concentração de BAP no meio de cultivo.

Mesmo a concentração mais baixa de BAP inibiu a formação de raízes, diminuindo em 5,8 vezes o número e em 14,2 vezes a soma do comprimento. A inibição da formação de raízes é um dos efeitos típicos do BAP, contudo, este efeito foi muito evidente mesmo em concentrações baixas deste regulador de crescimento, evidenciando elevada sensibilidade de resposta dessa espécie ao BAP para a formação de raízes. Este resultado é interessante e aplicável na propagação *in vitro* de *hippeastrum* em fases da micropropagação em que a presença de raízes é indesejada, como a de multiplicação, e em que é desejada, como a de enraizamento em preparação à aclimatização. Fato análogo pode ocorrer para a maioria das espécies na micropropagação, porém, cada espécie apresenta respostas diferentes às concentrações distintas desse regulador de crescimento.

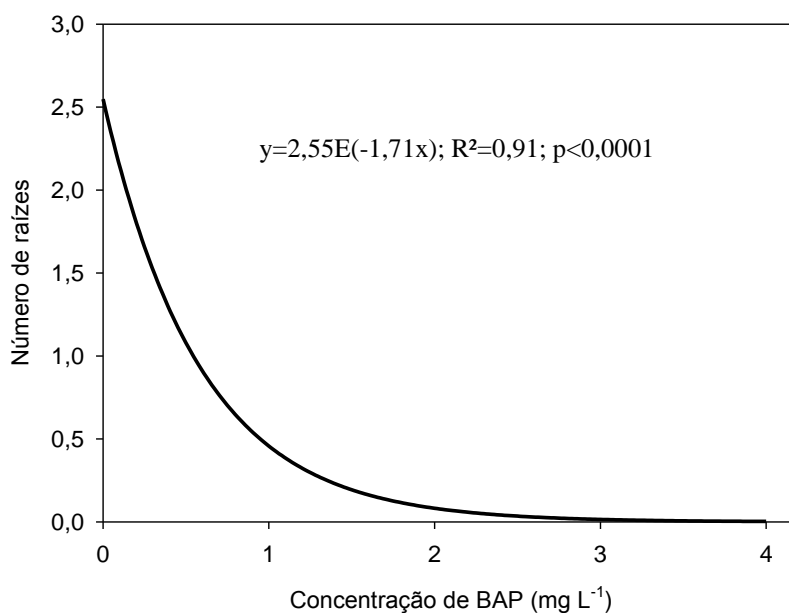


FIGURA 20. Número de raízes por explante em função da concentração de 6-benzilaminopurina (BAP), na micropropagação de *Hippeastrum reticulatum* var. *striatifolium*. Porto Alegre-RS-Brasil. 2013.

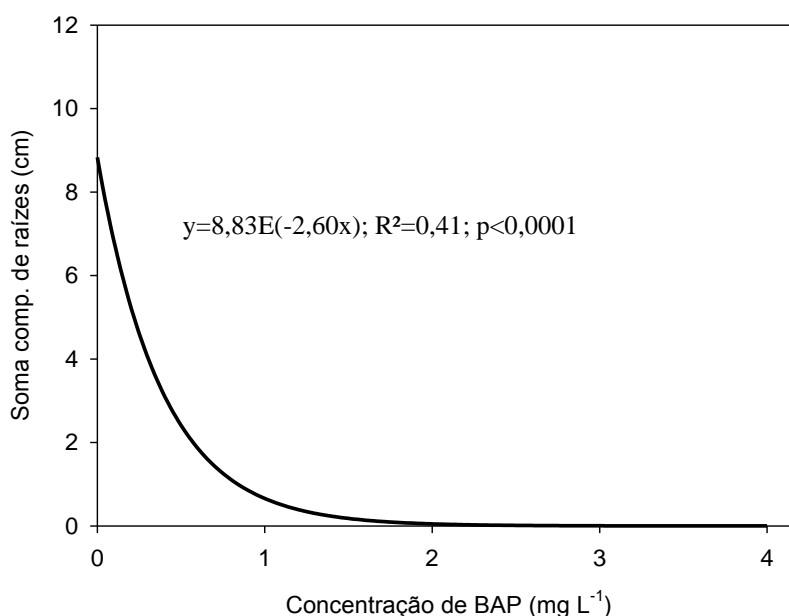


FIGURA 21. Soma do comprimento de raízes por explante em função da concentração de 6-benzilaminopurina (BAP), na micropropagação de *Hippeastrum reticulatum* var. *striatifolium*. Porto Alegre-RS-Brasil. 2013.

A presença de raízes é uma das principais características a serem observadas para selecionar uma muda para aclimatização. O enraizamento *in vitro* facilita a aclimatização por melhorar a fixação da planta ao substrato, a absorção de água durante o período inicial de aclimatização, além de possibilitar a adição de nutrientes extras e compostos que podem



melhorar o desempenho das mudas (Klerk, 2002). Neste experimento, a ausência de raízes na grande maioria das mudas em que foi utilizado BAP contribuiu para que um menor número de mudas fossem consideradas aptas à aclimatização (Figura 22). Em outros testes foi observado que mudas de *hippeastrum* sem raízes se desenvolveram (testes realizados em ambiente adequado, com irrigação por nebulização intermitente, mantendo elevada a URA), porém de forma muito mais lenta que as mudas que são aclimatizadas com raízes.

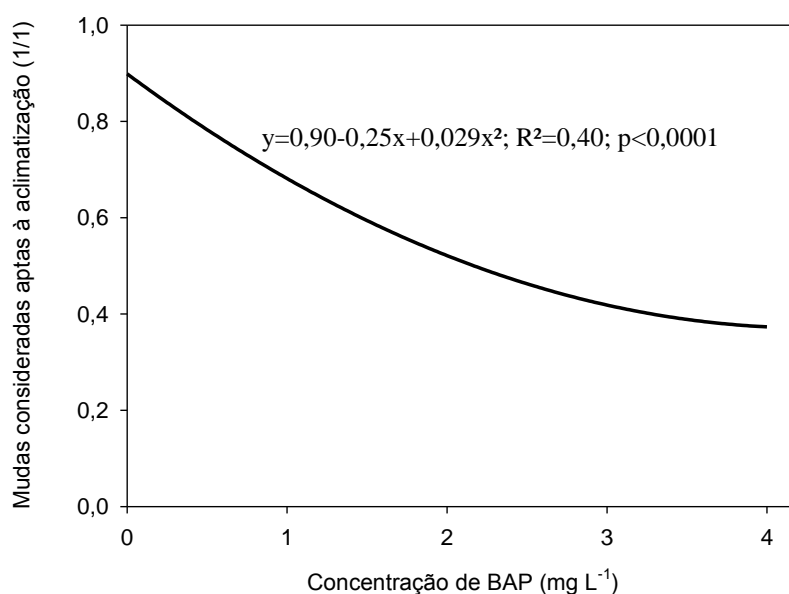


FIGURA 22. Taxa de mudas consideradas aptas à aclimatização em função da concentração de 6-benzilaminopurina (BAP), na micropropagação de *Hippeastrum reticulatum* var. *striatifolium*. Porto Alegre-RS-Brasil. 2013.

O tamanho das folhas reduziu com o aumento da concentração de BAP (Figura 23), porém de forma menos acentuada que o observado com as raízes.

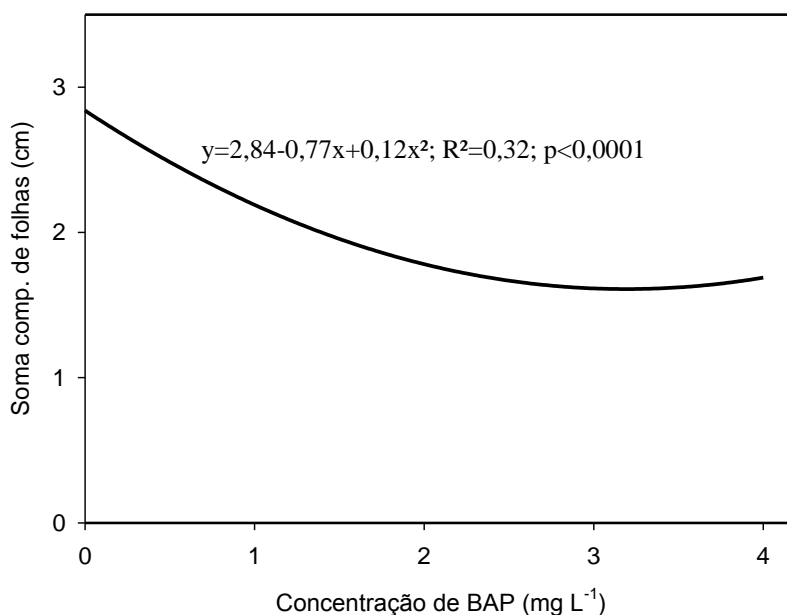


FIGURA 23. Soma do comprimento de folhas por brotação em função da concentração de 6-benzilaminopurina (BAP), na micropropagação de *Hippeastrum reticulatum* var. *striatifolium*. Porto Alegre-RS-Brasil. 2013.

A menor massa fresca por muda estimada foi na concentração de BAP de 3,13 mg L<sup>-1</sup>, com média de 0,05g por muda, e a maior massa foi obtida na ausência de BAP, com 0,13g por muda (Figura 24).

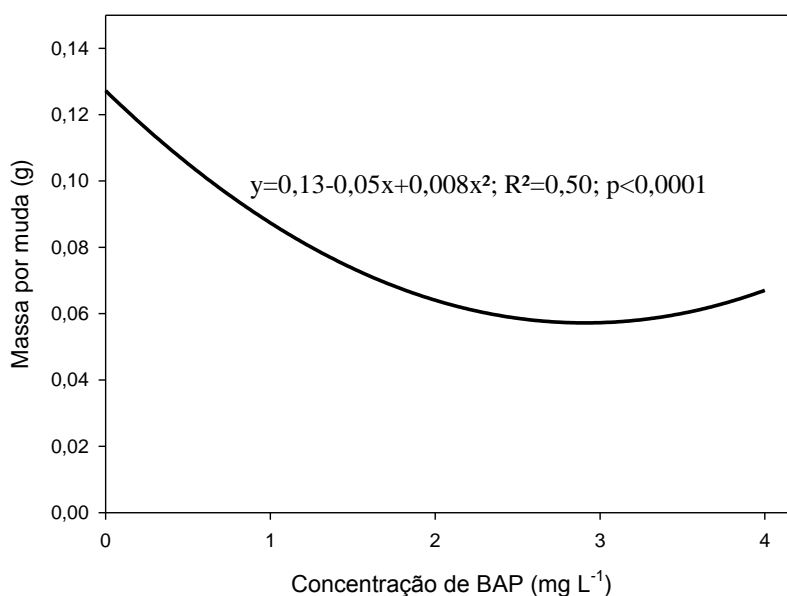


FIGURA 24. Massa fresca por muda em função da concentração de 6-benzilaminopurina (BAP), na micropropagação de *Hippeastrum reticulatum* var. *striatifolium*. Porto Alegre-RS-Brasil. 2013.

Na Figura 25 estão ilustradas as mudas obtidas em cada tratamento com BAP. Nesta figura fica mais evidente o decréscimo no número e comprimento de folhas e raízes com o aumento nas concentrações deste regulador de crescimento.

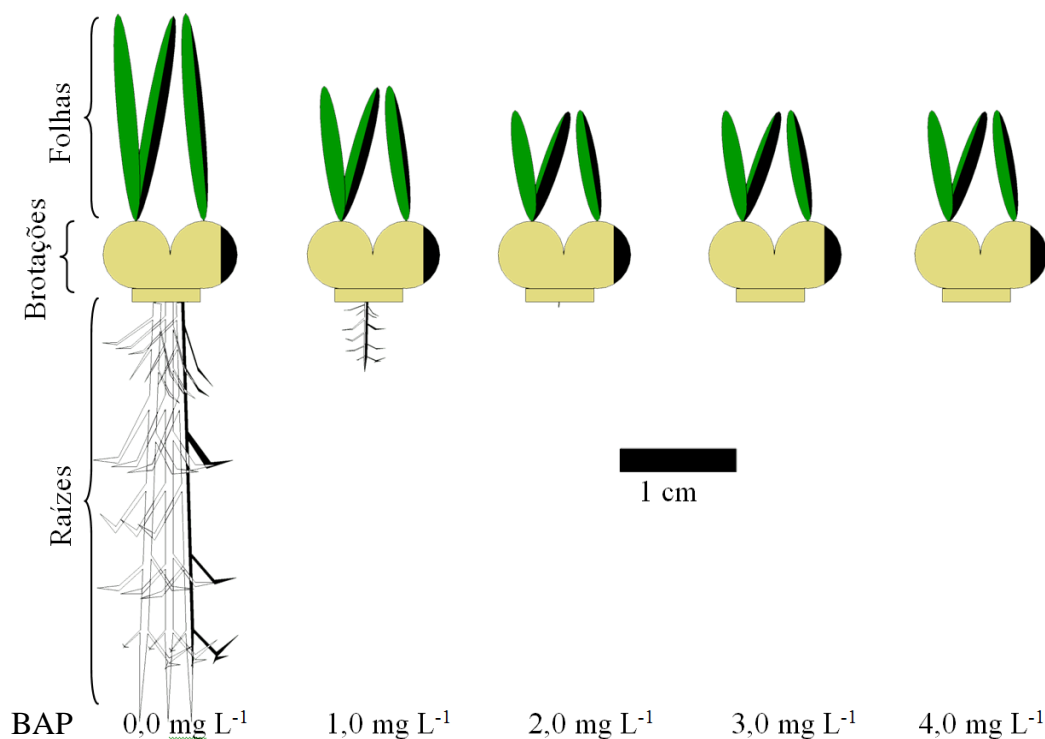


FIGURA 25. Ilustração da resposta das mudas de *Hippeastrum reticulatum* var. *striatifolium*. às concentração de 6-benzilaminopurina ( $\text{mg L}^{-1}$ ) adicionadas ao meio de cultivo na micropropagação dessa espécie. Parte sombreada nas mudas representa uma fração inexistente. Arte: Willian Heintze. Porto Alegre-RS-Brasil. 2013.

A variação na concentração de ANA afetou de forma significativa o número de brotações por explante (NBE) (Tabela 4), com o menor número obtido na ausência deste regulador de crescimento. Este resultado é contraditório ao observado por Okubo *et al.* (1999), que obtiveram maior número de brotações por explante de dupla camada de bainha com uma porção do caule na ausência de ANA. Uma ressalva importante é que esses autores fizeram a utilização de diversas substâncias “anti-auxinas”, as quais produziram efeito inibitório sobre o número de brotações por explante. Já ao avaliar a formação de protocormos, verificaram que, além do efeito prejudicial do ANA, explantes de dupla camada de bainha com uma porção do caule na base não foram capazes de se diferenciar nestas estruturas, ao contrário das camadas simples de bainha com uma porção do caule na

base. As demais variáveis não foram alteradas pelas concentrações desta auxina, analogamente ao observado por Tombolato *et al.* (2001), com AIA. A soma do diâmetro de brotações por explante (SDB) e o número de brotações por explante (NBE) não foram afetados de forma significativa pelos tratamentos.

TABELA 4. Número (NBE) média (MDB) e soma do diâmetro de brotações por explante (SDB), número (NR) e soma do comprimento de raízes por explante (SCR), e número (NFB), soma do comprimento de folhas por brotação (SCF), massa de matéria fresca (MF) e percentual de mudas consideradas aptas à aclimatização (%A) em função da concentração de ácido naftaleno acético (ANA) no meio de cultivo na micropropagação de *Hippeastrum reticulatum* var. *striatifolium*. Porto Alegre-RS-Brasil. 2013.

ANA (mg L <sup>-1</sup> )	NBE	MDB (mm)	SDB (mm)	NR	SCR (cm)	NFB	SCF (cm)	MF (g)	%A (%)
0	1,56 b*	2,27 <sup>ns</sup>	3,29 <sup>ns</sup>	0,55 <sup>ns</sup>	1,95 <sup>ns</sup>	1,58 <sup>ns</sup>	2,00 <sup>ns</sup>	0,079 <sup>ns</sup>	52,6 <sup>ns</sup>
0,4	1,85 a	2,25	3,79	0,71	2,22	1,55	1,90	0,080	55,6
0,8	1,81 a	2,23	3,64	0,65	1,88	1,57	2,16	0,082	65,4
Média	-	2,25	3,58	0,64	2,01	1,57	2,02	0,081	57,9
<i>p</i>	0,041	0,849	0,056	0,172	0,740	0,908	0,348	0,927	0,064
CV (%)	24,9	13,0	20,8	48,1	85,5	17,2	31,5	27,8	34,1

<sup>ns</sup> Não Significativo. \*Médias seguidas por letras distintas nas colunas diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Na Figura 26 estão ilustradas as mudas obtidas em cada concentração de ANA. A parte sombreada nas mudas representa uma fração inexistente, tornando claro que somente o número de brotações foi afetado pela concentração desta auxina.

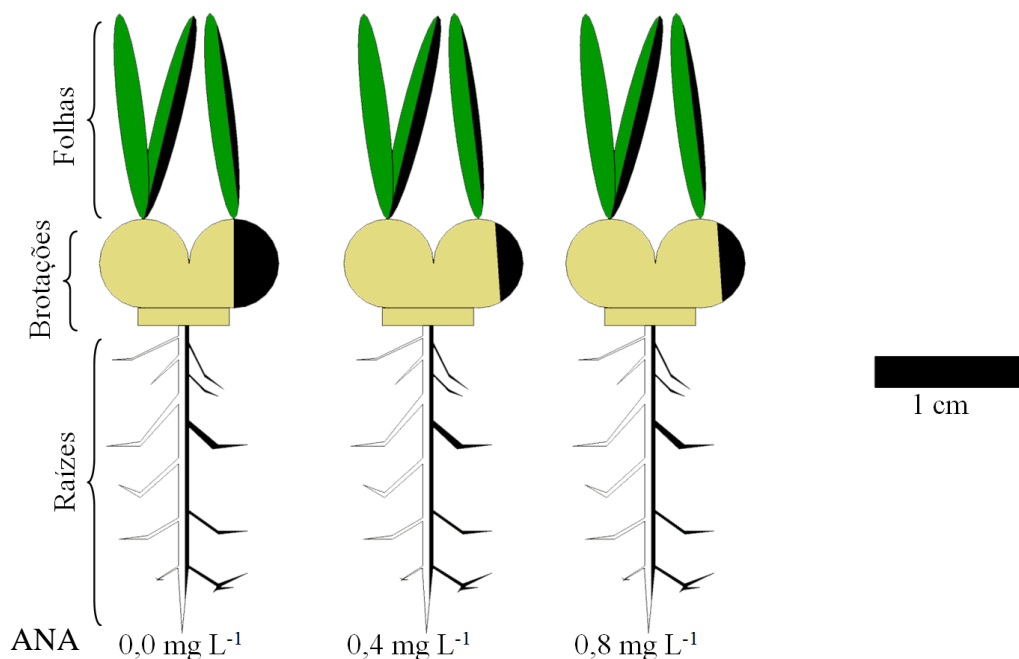


FIGURA 26. Ilustração da resposta das mudas de *Hippeastrum reticulatum* var. *striatifolium*. às concentração de ácido naftaleno acético ( $\text{mg L}^{-1}$ ) adicionadas ao meio de cultivo na micropropagação dessa espécie. Parte sombreada nas mudas representa uma fração inexistente. Arte: Willian Heintze. Porto Alegre-RS-Brasil. 2013.

#### 4.2.2.3 Concentrações de 6-Benzilaminopurina (BAP) no cultivo *in vitro* de hippeastrum na presença de carvão ativado

A soma e a média do comprimento de raízes reduziram com o aumento da concentração de BAP (Figura 27 e Figura 28). Ocorreu formação de raízes mesmo nas concentrações mais altas de BAP, ao contrário do observado no experimento anterior (4.2.2.2).

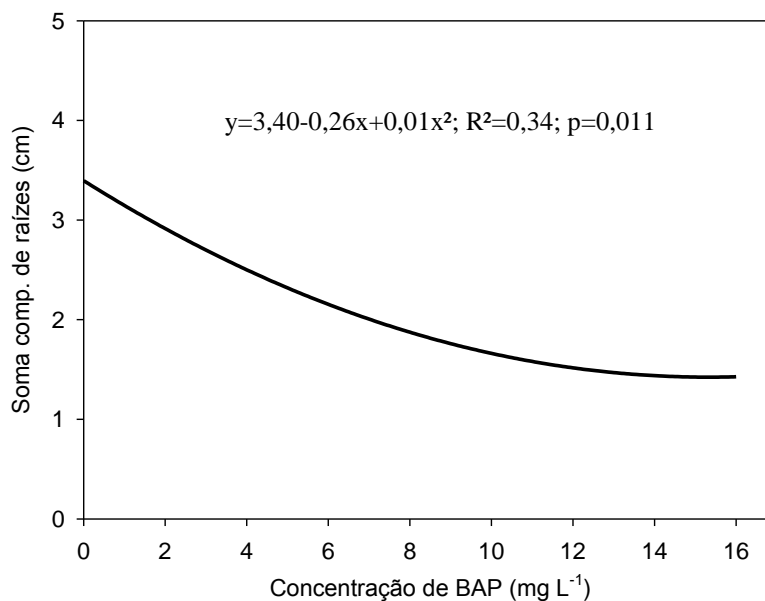


FIGURA 27. Soma do comprimento de raízes por explante em função da concentração de 6-benzilaminopurina (BAP), na micropropagação de *Hippeastrum reticulatum* var. *striatifolium*. Porto Alegre-RS-Brasil. 2013.

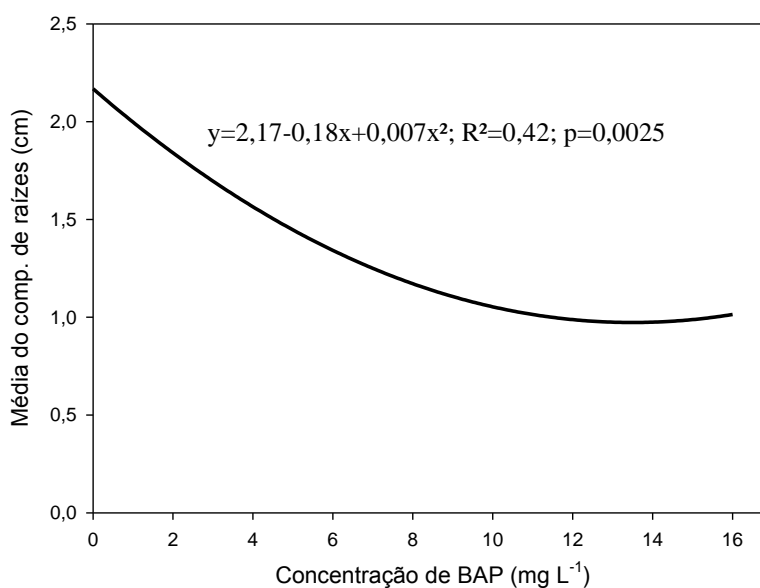


FIGURA 28. Média do comprimento de raízes por explante em função da concentração de 6-benzilaminopurina (BAP), na micropropagação de *Hippeastrum reticulatum* var. *striatifolium*. Porto Alegre-RS-Brasil. 2013.

As concentrações de BAP não alteraram de forma significativa o número de brotações por explante (NBE), a soma do diâmetro de brotações por explante (SDB), o número de folhas por brotação (NFB), a média do comprimento de folhas por brotação (MCF) e a soma do comprimento de folhas por brotação (SCF) (Tabela 5), com média

geral de 1,01 brotações por explante, soma do diâmetro de 7,44 mm nas brotações de cada explante, 0,74 folhas por brotação com média de 0,80cm de comprimento e soma de 0,81 cm, respectivamente. Costa *et al.* (2006) observaram que a utilização de carvão ativado ( $3 \text{ g L}^{-1}$ ) manteve constante o número de raízes nas concentrações de BAP entre 0 e  $6 \text{ mg L}^{-1}$ , enquanto que quando não foi utilizado carvão ocorreu decréscimo linear no número de raízes. Resultado similar foi obtido no experimento anterior, quando não foi utilizado carvão ativado, conforme pode ser observado na Figura 20.

As concentrações de BAP afetaram significativamente: a média do diâmetro de brotações por explante (MDB), com a maior média de diâmetro observada na ausência de BAP (sem distinção das concentrações 4 a  $12 \text{ mg L}^{-1}$ ); o número de raízes por explante (NR), com maior número observado na ausência de BAP (sem distinção da concentração  $12 \text{ mg L}^{-1}$ ); a massa de matéria fresca (MF), com maior massa obtida na concentração zero de BAP (sem distinção da concentração  $8 \text{ mg L}^{-1}$ ); e, o percentual de mudas consideradas aptas à aclimatização (%A), com maioria absoluta de mudas consideradas aptas quando não foi utilizado BAP no meio de cultivo.

TABELA 5. Número (NBE), média do diâmetro (MDB) e soma do diâmetro de brotações por explante (SDB), número de raízes por explante (NR), e número (NFB), média do comprimento (MCF) e soma do comprimento de folhas por brotação (SCF), massa de matéria fresca (MF) e percentual de mudas consideradas aptas à aclimatização (%A) em função da concentração de 6-benzilaminopurina (BAP), na micropropagação de *Hippeastrum reticulatum* var. *striatifolium*. Porto Alegre-RS-Brasil. 2013.

BAP ( $\text{mg L}^{-1}$ )	NBE	MDB (mm)	SDB (mm)	NR	NFB	MCF (cm)	SCF (cm)	MF (g)	%A (%)
0	0,98 <sup>ns</sup>	7,58 a*	7,64 <sup>ns</sup>	1,15 a	0,86 <sup>ns</sup>	1,17 <sup>ns</sup>	1,18 <sup>ns</sup>	0,50 a	54 a
4	0,93	7,44 ab	7,44	0,73 bc	0,78	0,90	0,90	0,39 b	26 b
8	1,00	7,43 ab	7,67	0,56 c	0,76	0,71	0,72	0,44 ab	29 b
12	1,13	6,91 ab	7,41	0,87 ab	0,65	0,66	0,68	0,39 b	29 b
16	1,02	6,85 b	7,06	0,54 c	0,63	0,55	0,55	0,36 b	29 b
Média	1,01	-	7,44	-	0,74	0,80	0,81	-	-
<i>p</i>	0,31	0,04	0,42	<0,01	0,83	0,33	0,32	0,03	0,03
CV (%)	14,18	6,92	7,18	29,80	47,00	60,88	59,72	16,16	40,27

<sup>ns</sup> Não Significativo. \*Médias seguidas por letras distintas nas colunas diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

A analogia entre os dois experimentos realizados com a utilização de BAP, embora não possibilite a comparação estatística, é possível, devido à expressividade da diferença entre os resultados. Enquanto no primeiro a média do comprimento de folhas por brotação (MCF) tendeu a zero com o aumento da concentração de BAP (Figura 19), no segundo sequer ocorreu diferença entre as concentrações (Tabela 5). A mesma analogia foi observada em relação à soma do comprimento de folhas por brotação (SCF) (Figura 23 e Tabela 5). Este resultado coincide com o obtido por Costa *et al.* (2006) em relação ao comprimento de brotações. O número (NR) e a soma de raízes por explante (SCR) reduziu com o aumento da concentração de BAP em ambos os experimentos, contudo no segundo esta redução foi de forma muito menos acentuada (Figura 20, Figura 21, Tabela 5 e Figura 27). Este efeito pode ser explicado pela presença do carvão ativado no meio de cultivo, adsorvedor de nutrientes e reguladores de crescimento (Costa *et al.*, 2006), explicando parte das diferenças entre os resultados do primeiro e do segundo experimento, em que quando o carvão ativado esteve presente na composição do meio de cultivo, as curvas referentes às variáveis relacionadas com raízes não tenderam a zero, mesmo em altas concentrações de BAP.

Foi observada correlação significativa positiva entre o diâmetro inicial e: o número de brotações por bulbo (NBB) ( $r=0,47$  e  $p<0,0001$ ); média do diâmetro de brotações por explante (MDB) ( $r=0,65$  e  $p<0,0001$ ); soma do diâmetro de brotações (SDB) ( $r=0,64$  e  $p<0,0001$ ); número de folhas por brotação (NFB) ( $r=0,16$  e  $p=0,01$ ); média do comprimento de folhas por brotação (MCF) ( $r=0,18$  e  $p=0,004$ ); soma do comprimento de folhas por brotação (SCF) ( $r=0,18$  e  $p=0,005$ ); massa de matéria fresca (MF) ( $r=0,70$  e  $p<0,0001$ ); e, percentual de mudas consideradas aptas à aclimatização (%A) ( $r=0,17$  e  $p=0,005$ ). O número de brotações por bulbo (NBB) foi de 4,00 para os bulbos maiores (M), 2,37 para os intermediários (P) e 1,20 para os bulbos pequenos (PP), o que representa uma redução expressiva em relação ao primeiro experimento. Um dos fatores que pode ter



afetado esta redução no NBB é que no segundo experimento, independentemente do tamanho, cada bulbo foi dividido apenas em duas partes. Outro fator a ser considerado é o número de subcultivos, maior no segundo experimento. Segundo Klerk (2002) o número de raízes adventícias formadas em microestacas de macieira diminuiu ao longo dos subcultivos, atribuindo parte deste efeito ao amadurecimento progressivo dos tecidos incubados ao longo dos subcultivos.

### **4.2.3 Aclimatização de mudas**

#### **4.2.3.1 Aclimatização de mudas em diferentes substratos**

Na aclimatização sob irrigação por nebulização, se almeja um substrato que drene rapidamente o excesso de água, ou seja, com um elevado espaço de aeração (EA) (Calvete *et al.*, 2000), o que foi obtido principalmente em T1 a T4 (Tabela 6). Quando este quesito não é atendido de forma satisfatória, podem ocorrer danos às mudas pelo excesso de água e conseqüentemente deficiência na aeração das raízes, que sob este sistema de irrigação pode conduzir inclusive ao acúmulo de água sobre as bandejas, situação que não foi observada neste experimento.

Ao transferir as bandejas para bancadas com irrigação intermitente por capilaridade, o ideal é um substrato que armazene a água de forma disponível para as plantas, com elevado percentual de água disponível, valor obtido pela soma da água facilmente disponível (AFD) e água tamponante (AT) (Kämpf, 2005). O substrato T3 foi o que apresentou os maiores volumes de água disponível (Tabela 6).

Para permitir uma troca gasosa eficiente e evitar a falta de oxigênio para a respiração das raízes (Kämpf, 2005), a porosidade total em um substrato ideal deve ser em torno de 85% (De Boodt & Verdonck, 1972). Somente o substrato T5 se destacou aquém ao ideal em relação à porosidade total (Tabela 6).

Em relação ao pH, apenas o substrato CAC apresentou valor destacado acima do recomendado (5,0 a 5,8) (Kämpf, 2005; Wilkerson, 2014) (Tabela 6), porém este substrato apresenta pouco poder tamponante, não sendo o pH um fator limitante neste caso.

Somente o substrato Comercial 1 apresentou valores de condutividade elétrica (CE) acima do limite superior da faixa de CE considerada normal ( $0,65 \text{ mS cm}^{-1}$ ) (Tabela 6), quando determinado pelo método 1:5, apresentada por Cavins *et al.* (2000). Valores muito elevados de CE na aclimatização podem ocasionar mortalidade de mudas. Apesar de *Hippeastrum* sp. ser citado como um gênero que não é muito exigente em fertilidade (Cavins *et al.*, 2000; Dole & Wilkins 2004), apresenta boa tolerância a teores de salinidade na água lixiviada para o teste PoutThru (Cavins *et al.*, 2000) na faixa dos  $4 \text{ mS cm}^{-1}$ , desde que o fornecimento de água seja adequado.

TABELA 6. Análise dos substratos utilizados no experimento de aclimatização de mudas de *Hippeastrum reticulatum* var. *striatifolium*. Laboratório de Análise de Substratos, Departamento de Horticultura e Silvicultura, Faculdade de Agronomia Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, 2012.

Determinações		Tratamento				
		T1*	T2	T3	T4	T5
<b>pH</b>	H <sub>2</sub> O	5,84	6,73	5,51	5,72	5,29
<b>CE</b>	mS cm <sup>-1</sup>	0,12	0,08	0,81	0,19	0,16
<b>DU</b>	kg m <sup>-3</sup>	473,60	216,97	304,83	132,17	580,60
<b>DS</b>	kg m <sup>-3</sup>	162,03	139,56	153,74	69,75	465,22
<b>UA</b>	%	65,79	35,68	49,56	47,24	19,93
<b>PT</b>	%	93,12	85,42	88,35	83,55	54,92
<b>EA</b>	%	39,79	62,50	35,32	44,78	12,76
<b>AFD</b>	%	8,83	12,52	20,42	12,34	10,15
<b>AT</b>	%	2,42	0,84	3,27	1,13	1,57
<b>AR</b>	%	42,08	9,56	29,33	25,30	30,44

\*T1-Vermiculita; T2-Casca de Arroz Carbonizada (CAC); T3-Comercial 1 (CAC + Vermiculita + Turfa); T4-Fibra de coco (FC); e, T5-Casca de Pinus Compostada (CPC); pH = determinado em água, diluição 1:5 (v/v); CE = condutividade elétrica obtida em solução 1:5 (v/v); DU=Densidade úmida; DS= Densidade seca; PT=Porosidade total; EA=Espaço de Aeração; AFD=Água Facilmente Disponível; AT=Água tamponante; AR=Água remanescente.

O percentual de sobrevivência foi elevado em todos os substratos testados, 96%, sem distinção estatística significativa entre os tratamentos. O fato da espécie estudada ser uma bulbosa contribui para a homogeneidade das mudas entre os tratamentos, mantendo a planta nutrida as custas das reservas dos bulbos mesmo quando o substrato não oferece os

nutrientes necessários, refletindo principalmente no número de mudas sobreviventes ao processo de aclimatização. Não ocorreu diferença significativa entre os substratos para soma do diâmetro de brotações (SDB), com soma do diâmetro dos bulbos de cada muda de 11,33mm. As plantas cultivadas no substrato CAC foram as que apresentaram a menor média do diâmetro de brotações (MDB) (8,1, não diferindo de Vermiculita). O substrato casca de *Pinus* compostada foi o que proporcionou o maior: número de raízes (NR) (5,5, não diferindo de Vermiculita, Comercial 1 e Fibra de coco); soma do comprimento de raízes (SCR) (56,5cm); número de folhas por brotação (NFB) (2,5, não diferindo de Vermiculita); soma do comprimento de folhas (SCF) (17,60cm, não diferindo de Vermiculita, CAC e Comercial 1); e massa de matéria fresca (MF) (2,16g) (Tabela 7). A média do número de brotações por muda foi de 1,23. Apesar do substrato T5 apresentar porosidade total aquém da ideal, as mudas se desenvolveram muito bem nesse substrato durante a aclimatização.

Na produção comercial de mudas, após a aclimatização, as mesmas são selecionadas visualmente, de modo dinâmico e rápido, levando em consideração todos os fatores apresentados acima, separando as mudas em aptas e não aptas ao transplântio. Com base nisso, o maior percentual de mudas selecionadas para o transplântio (%T) foi obtido no substrato Comercial 1 (97,7%, não diferindo de Vermiculita e Fibra de coco) (Tabela 7).

TABELA 7. Resultados da avaliação de mudas de *Hippeastrum reticulatum* var. *striatifolium* aclimatizadas em cinco substratos: T1-Vermiculita; T2-Casca de Arroz Carbonizada (CAC); T3-Comercial 1 (CAC+Vermiculita+Turfa); T4-Fibra de coco; e, T5-Casca de *Pinus* Compostada (CPC). Percentual de sobrevivência à aclimatização (%S), soma do diâmetro de brotações por muda (SDB), média do diâmetro de brotações por brotação (MDB), número (NR) e soma do comprimento de raízes por muda (SCR), e número (NFB) e soma do comprimento de folhas por brotação (SCF), massa fresca por muda (MF), e percentual de mudas selecionadas para o transplântio do total de mudas que sobreviveram (%T).

Substrato	%S (%)	SDB (mm)	MDB (mm)	NR	SCR (cm)	NFB	SCF (cm)	MF (g)	%T (%)
T1	95,7 <sup>ns</sup>	11,10 <sup>ns</sup>	8,36 ab*	5,2 ab	47,8 b	2,4 ab	15,8 ab	1,67 b	88,8 ab
T2	98,6	12,18	8,10 b	5,0 b	47,6 b	2,2 bc	15,5 ab	1,74 b	80,8 b
T3	95,7	10,88	8,86 a	5,2 ab	47,3 b	2,3 b	16,2 ab	1,73 b	97,7 a
T4	92,9	10,54	8,78 a	5,2 ab	46,3 b	2,1 c	14,6 b	1,59 b	90,5 ab
T5	97,1	11,94	8,93 a	5,5 a	56,5 a	2,5 a	17,6 a	2,16 a	85,2 b
Média	96,0	11,33	-	-	-	-	-	-	-
CV (%)	6,84	15,13	8,48	12,55	15,23	8,81	12,79	19,80	10,86

<sup>ns</sup> Não Significativo. \*Médias seguidas por letras distintas nas colunas diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

O substrato CAC (T2) apresentou destaque negativo para diversas variáveis relacionadas ao crescimento das mudas. De modo análogo a isso, Calvete *et al.* (2000) observaram que as mudas de morangueiro que cresceram nos substratos com os menores valores de espaço de aeração (EA) se destacaram em todos os parâmetros com os resultados melhores. Este destaque negativo também pode estar relacionado ao fato de CAC ser um substrato inerte, que além de apresentar elevado EA em relação aos demais avaliados, também foi o que apresentou a menor média absoluta de condutividade elétrica.

Apesar de sempre ser desejada a maximização do processo produtivo, a aclimatização das mudas micropropagadas foi eficiente em todos os substratos, especialmente em casca de *Pinus* compostada, em termos qualitativos, que além de ser um substrato barato apresentou excelentes resultados. O número de raízes foi normal em todos os tratamentos, bem como a qualidade do sistema radicial, com muitas raízes longas por muda, se fazendo necessária a poda das raízes de todas as mudas ao transplântio para vasos, após a avaliação do experimento. Todos os substratos possibilitaram um elevado

percentual de mudas adequadas ao transplântio (%T), acima de 80%, com destaque especial neste quesito ao Comercial 1. A presença de nutrientes minerais, segundo o rótulo, na formulação do substrato Comercial 1, pode ter contribuído para o crescimento das mudas, especialmente as mais debilitadas inicialmente, aumentando o %T, porém, a presença de fertilizantes na composição pode ser prejudicial para aclimatização de espécies mais sensíveis, sobretudo as que não possuem estruturas para armazenamento de reservas, como as bulbosas.

#### **4.2.4 Outros aspectos observados**

Apesar do objetivo não ter sido obter a máxima taxa de multiplicação, visto que se trata de experimentos, em que muitas vezes mudas são propositalmente descartadas e não há uma repicagem em intervalos de tempo adequados, a partir de 40 bulbos iniciais (dos quais 12 foram destruídos já no primeiro experimento, sobrando 28) foram produzidas aproximadamente 1230 novas mudas em menos de dois anos, o que resultou em uma taxa de multiplicação de 44 mudas por bulbo, mostrando o grande potencial de produção de mudas.

### **4.3 Propagação por sementes**

#### **4.3.1 Teor de umidade das sementes de *hippeastrum***

Não foram encontrados estudos que avaliaram o teor de umidade de sementes de *H. reticulatum*, e, avaliações com outras espécies deste gênero podem não ser representativas, visto que, conforme apresentado por Meerow & Snijman (1998), é característica nesta espécie as sementes serem volumosas enquanto o restante do gênero apresenta sementes secas e achatadas.

As sementes colhidas em 2012, da repetição em que não foi realizada secagem da cápsula em sala climatizada, apresentaram 85,4% de umidade em sua composição. As sementes oriundas de cápsulas secas em sala climatizada por quatro dias apresentaram

média de  $79,3 \pm 1,7\%$  de umidade. As sementes colhidas em 2013, de cápsulas que completaram a deiscência na planta, apresentaram média de  $78,0 \pm 0,5\%$  de umidade, teor elevado justificável pela morfologia das sementes dessa espécie (Meerow & Snijman, 1998). Apesar de não ter sido avaliada a germinação após a redução da umidade das sementes e o armazenamento, o fato das mesmas apresentarem este elevado teor de umidade após a maturação fisiológica pode indicar que se tratem de sementes recalcitrantes, conforme os parâmetros de classificação sugeridos por Hong & Ellis (1996). Se esta classificação se confirmar, as sementes desta espécie de *hippeastrum* perderão a viabilidade ao serem secas e armazenadas por períodos relativamente longos.

#### **4.3.2 Germinação de sementes de *hippeastrum***

Não ocorreu diferença significativa entre o percentual de germinação dos dois tratamentos, obtendo-se média de 61,7%. O tratamento Frio, no qual as sementes foram mantidas à 5°C por 30 dias antes do início do teste de germinação, aumentou o tempo médio de germinação em 7,5 dias, comparado ao tratamento controle (sementes mantidas a 26°C por 30 dias antes do início do teste de germinação), e diminuiu o índice de velocidade de germinação médio (Tabela 8). Em *H. stylosum* Rodrigues *et al.* (2007) obtiveram percentuais de germinação entre 90 e 92, e TMG entre 19,78 e 22,47 dias, bem maior e menor, respectivamente, que o observado em *Hippeastrum reticulatum* var. *striatifolium*. Flores (2003) também obteve elevado percentual de germinação (92 a 100%) em *H. aulicum*.

TABELA 8. Percentual de germinação e vigor calculado pelo tempo médio de germinação (TMG) e índice de velocidade de germinação (IVGM) em sementes de *Hippeastrum reticulatum* var. *striatifolium* germinadas sobre areia e submetidas a dois pré-tratamentos térmicos durante 30 dias no escuro. Porto Alegre-RS-Brasil. 2012.

<b>Tratamento</b>	<b>Germinação (%)</b>	<b>TMG (dias)</b>	<b>IVGM</b>
Frio (5°C)	60,0 a*	41,0 b	0,028 b
Controle (26°C)	63,3 a	33,5 a	0,036 a
<i>p</i>	0,711	0,056	0,074
CV (%)	23,8	18,8	19,8

\*Médias seguidas por letras distintas nas colunas diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 7,5% de probabilidade de erro.

Ocorreu contaminação de algumas sementes ao longo do experimento, que afetou negativamente a germinação destas. A desinfestação previa das sementes poderia ter diminuído ou retardado a contaminação. Nenhuma semente formou plântula (E2), visto que as mesmas não conseguiram fixar a radícula ao substrato (Figura 29), a qual morria após alguns dias. A elevada densidade do substrato pode estar relacionada a este fato, visto que quando a germinação foi realizada em substrato comercial (composto por turfa de Sphagno, vermiculita expandida, CAC, calcário dolomítico, gesso agrícola e fertilizante NPK (traços)) a germinação e a posterior formação de plântula ocorreu normalmente, assim como quando as sementes foram postas para germinar sobre meio de cultivo *in vitro*.



FIGURA 29. Sementes de *Hippeastrum reticulatum* var. *striatifolium*: teste de germinação sobre substrato areia (A); protrusão do hipocótilo (B); hipocótilo com radícula, a qual não consegue se fixar ao substrato (C), e semente contaminada por microorganismo (D). Fotos: Willian Heintze. Porto Alegre-RS-Brasil. 2012.



## 5 CONCLUSÕES

- Desinfestação com NaClO 1,72% por 15 minutos associada à imersão dos bulbos de *Hippeastrum reticulatum* var. *striatifolium* por 30 minutos em água a 52°C diminuiu a contaminação dos explantes *in vitro* sem diminuir a sobrevivência dos mesmos;
- A incubação dos explantes na posição vertical em relação ao eixo polar melhorou a resposta na maioria das variáveis mensuradas.
- Na fase de multiplicação, concentrações de sacarose no meio de cultivo próximas e menores que 60g L<sup>-1</sup> (estimada) foram mais adequadas, por auxiliarem no aumento do número e tamanho das brotações.
- Na fase de enraizamento, concentrações de sacarose menores que 50g L<sup>-1</sup> foram mais eficientes por melhorarem o enraizamento e a formação de folhas, em geral.
- A concentração de sacarose de 100g L<sup>-1</sup> (testada) foi muito prejudicial às mudas.
- A utilização de BAP no meio de cultivo inibiu a formação de raízes, sem afetar o número de brotações, e com o ônus de diminuir um pouco o diâmetro médio das brotações.
- A utilização de ANA no meio de cultivo aumentou levemente o número de brotações por explante, sem afetar outras características de forma muito expressiva.
- ANA e BAP foram antagônicos em relação à média do comprimento de raízes e de folhas. As maiores médias de raízes e folhas foram observadas na ausência de ambos reguladores de crescimento.

- A multiplicação e o enraizamento em meio sem reguladores de crescimento foram satisfatórios.
- A presença de carvão ativado no meio de cultivo diminuiu os efeitos inibitórios do BAP.
- Explantes originários de bulbos subcultivados com maior diâmetro formaram maior quantidade de mudas, mudas maiores, com maior massa de matéria fresca e número de folhas, que quando utilizados como explante bulbos com menor diâmetro.
- A aclimatização de mudas foi eficiente em diversos substratos, sob irrigação por nebulização intermitente, com sobrevivência acima de 90%.
- As mudas aclimatizadas no substrato casca de *Pinus* compostado se destacaram qualitativamente (raízes, folhas e massa de matéria fresca).
- Mudas aclimatizadas no substrato Comercial 1 se destacaram quantitativamente, com maior percentual de mudas aptas ao transplante.
- O percentual de umidade das sementes maduras foi próximo a 80%.
- A propagação por sementes é possível. A germinação independe de tratamentos de quebra de dormência frio.
- O tempo médio para início da germinação foi de 37 dias após a semeadura.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Fatores anteriores à desinfestação são determinantes para o sucesso da desinfestação. Estes fatores estão relacionados aos cuidados com a planta matriz.

- Conforme análises paralelas a estes experimentos, a autopolinização é possível, produzindo sementes férteis e viáveis. É interessante a realização de testes avaliando a segregação de características morfológicas de plantas obtidas por propagação sexuada, com e sem autopolinização.

- A produção de mudas por sementes não foi possível nos experimentos de germinação, com a morte recorrente após a germinação, sobre ou entre areia, ao contrário do que ocorreu em substrato úmido, recipiente aberto e casa de vegetação. Para testes de germinação, areia não foi considerado um bom substrato.

- Estudos que identifiquem condições para armazenamento com variações no tempo, umidade e temperatura, com posterior germinação dessas sementes, são importantes para avaliar a possibilidade de armazenamento destas.

Há carência de estudos relacionados ao cultivo dessa espécie em vasos, sobretudo relacionados à adubação e níveis de sombreamento para cultivo, visto que foi identificada sensibilidade à insolação direta.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAILEY, L. H.; BAILEY, E. Z. Hippeastrum. In: Hortus Third: a concise dictionary of plants cultivated in the United States and Canada. New York: Macmillan, 1976. p. 564-565.
- BANDINELLI M.G. et al.. Concentração dos sais e da sacarose do meio MS na multiplicação in vitro e na aclimatização de batata. **Horticultura Brasileira**, Vitória da Conquista, v. 31, n. 2, p.242-247, abr-jun 2013.
- BIELACH, A. et al. Genetic approach towards the identification of auxincytokinin crosstalk components involved in root development. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, London, v. 367, n. 1595, p. 1469-1478, jun 2012.
- BOYLE, T. H.; STIMART, D. P. Influence of irrigation interruptions on flowering of Hippeastrum x hybridum 'Red Lion'. **HortScience**, Alexandria, v. 22, n. 6, p.1290-1292, dec. 1987.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes. Brasília: Mapa/ACS, 2009. 399 p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa 22/2012. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 28 ago. 2012. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAt oPortalMapa&chave=5558912>>. Acesso em: 27 mai. 2013.
- BRUYN, M.h. de et al. In vitro propagation of Amaryllis belladonna. **Plant Cell, Tissue And Organ Culture**, Netherlands, v. 31, p.179-184, 1992.
- BUCKSTRUP, M.; BASSUK, N. Native vs. exotic for the home landscape. **Ecogardening Factsheet**, [Ithaca], n.18, 1997.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E.. Meios Nutritivos. In: CULTURA de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa-SPI, 1998. p. 87-132. v. 1.
- CALVETE, E. O.; KÄMPF, A. N.; DAUDT, R. Efeito do substrato na aclimatização ex vitro de morangueiro cv Campinas, Fragaria x ananassa Duch. In: KÄMPF, A.N.; FERMINO, M.H. (Ed.). **Substrato para plantas**: a base da produção vegetal em recipientes. Porto Alegre: Genesis, 2000. p.257-264.

CARVALHO, J. M. F. C.; SILVA, M. M. DE A. **Plantas matrizes na propagação vegetativa**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2012. 40 p. (Embrapa Algodão. Documentos, 242).

CATO, S. C.. **Ação de bioestimulante nas culturas do amendoizeiro, sorgo e trigo e interações hormonais entre auxinas, citocininas e giberelinas**. 2006. 73 f. Tese (Doutorado) - Curso de Agronomia, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba-SP, 2006.

CAVINS, T. J. et al. Monitoring and managing pH and EC using the PourThru extraction method. **Horticulture Information Leaflet**, North Carolina, v.590 p.1-17, 2000.

CHASE M. W., REVEAL J. L., FAY M. F. A subfamilial classification for the expanded asparagalean families, Amaryllidaceae, Asparagaceae and Xanthorrhoeaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v.161, n. 2, p.132–136, out, 2009.

CORADIN, L.; SIMINSKI, A.; REIS, A. (Ed.). **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro - região sul**. Brasília: MMA, 2011. 934 p.

COSTA, F. H. S. et al. Efeito da interação entre carvão ativado e N6-benzilaminopurina na propagação in vitro de bananeira, cv. Grand Naine (AAA). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal-SP, v.28, n. 3, p.280-283, ago. 2006.

DAUDT, R. H. S.. **Censo da produção de flores e plantas ornamentais no Rio Grande do Sul / Brasil na virada do milênio**. 2002. 115 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

DE BOODT, M; VERDONCK, O. The physical properties of the substrates in horticulture. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 26, p.37-44, 1972.

DOLE, J. M.; WILKINS, H. F. **Floriculture: principles and species**. 2nd. ed. Upper Saddle River: Pearson, 2004. p. 583-592.

DOLE, J. M. Research approaches for determining cold requirements for forcing and flowering of geophytes. **HortScience**, Alexandria, v. 38, n. 3, p.341-346, jun. 2003.

ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, E. H. An intermediate category of seed storage behaviour? I. Coffee. **Journal of Experimental Botany**, London, v.41, n.230, p.1167-1174, 1990.

FIOR, C. S.; CALIL, A. C.; LEONHARDT, C.. *Siphocampylus betulaefolius* (Cham.) G. Don: propagação e o potencial ornamental. **Iheringia: Série Botânica**, Porto Alegre, v. 59, n. 2, p.207-210, jul./dez. 2004. Disponível em: <<http://www.fzb.rs.gov.br/publicacoes/iheringia-botanica/Ih59-2-p207-212.pdf>>. Acesso em: 26 set. 2012.

FLORES, P. S. **Propagação in vitro e in vivo de Hippeastrum aulicum (Ker-Gawler) Herb. (Amaryllidaceae)**. 2003. 137 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC, 2003.

GALDIANO JÚNIOR, R.F. et al.. Concentrações de sacarose no desenvolvimento in vitro e na aclimatização de *Cattleya loddigesii* Lindley Semina: **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 2, p.583-592, mar-abr 2013.

GIULIETTI, A. M. et al. Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. **Megadiversidade**, Belo Horizonte, v. 1, n. 1, p.52-61, jul. 2005.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, A. M. Micropropagação. In: CULTURA de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa-SPI, 1998. p. 183-260. v. 1.

GUILARDUCI, V. V. S. et al. Adsorção de fenol sobre carvão ativado em meio alcalino. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 6, p.1226-1232, 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v29n6/14.pdf>>. Acesso em: 28 abr. 2014.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES, F. T. 15: Propagation by Specialized Stems and Roots: Bulbs. In: PLANT Propagation: principles and practices. 5th ed. Englewood Cliffs: Regents/Prentice Hall, 1990. Cap. 15, p. 429-445.

HAYASHI, I.; SUZUKI, M.. Studies on the growth and flowering of *Hippeastrum hybridum*. 1. (I) Effect of temperature on the growth of young seedlings and bulbs, (II) Growth and flowering out-of-doors and the effects of autumn temperature on growth. **Bulletin Of The Horticultural Branch (section), Kanagawa Agricultural Experiment Station**, [Kanagawa], n. 18, p.171-188, 1970.

HEINTZE, W. et al. Desinfestação de explantes de *Ruscus* sp. para propagação in-vitro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 18., CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 5., 2011, Joinville. **Anais do...** Joinville-SC, 2011. 1 CD-ROM.

HERRMANN, M. L. de P.; ROSA, R. de. O Relevo. In: IBGE. **Geografia do Brasil: região sul**. Rio de Janeiro, 1990. p. 55-84.

HONG, T. D.; ELLIS, R. H. **A protocol to determine seed storage behavior**. Rome, Italy: International Plant Genetic Resources Institute, 1996. 63 p. (IPGRI. Technical Bulletin n. 1)

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo Agropecuário**. 2006. Tabela: 817. Disponível em: < <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?z=t&c=817> >; Acesso em: 18 mar. 2014.

IBRAFLOR - Instituto Brasileiro de Floricultura (Holambra). **Uma visão do mercado de flores**. Disponível em: <<http://www.ibraflor.com/publicacoes/vw.php?cod=21>>. Acesso em: 12 ago. 2012.

JO, E. A.; et al. In vitro sucrose concentration affects growth and acclimatization of *Alocasia amazonica* plantlets. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 96, n. 3, p. 307-315, 2009.

JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, M. da S. **Exportações de Flores e Plantas Ornamentais Superam US\$ 35 Milhões em 2007**: recorde e novos desafios para o Brasil: Análise conjuntural da evolução das exportações de flores e plantas ornamentais do Brasil, janeiro a dezembro de 2007. Disponível em: <<http://www.ibraflor.com/publicacoes/vw.php?cod=10>>. Acesso em: 12 ago. 2012.

JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, M. da S. **Análise conjuntural do comércio exterior da floricultura brasileira**: Balanço 2009 e perspectivas 2010. Disponível em: <<http://www.ibraflor.com/publicacoes/vw.php?cod=8>>. Acesso em: 12 ago. 2012.

JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, M. da S. **Boletim de análise conjuntural do mercado de flores e plantas ornamentais no Brasil, março 2011a**: 2010: balanço do comércio exterior da floricultura brasileira. Disponível em: <<http://www.ibraflor.com/publicacoes/vw.php?cod=160>>. Acesso em: 12 ago. 2012.

JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, M. da S. **Boletim de análise conjuntural do mercado de flores e plantas ornamentais no Brasil, junho de 2011b**: 2011 (janeiro a maio): balanço do comércio exterior da floricultura brasileira. Disponível em: <<http://www.ibraflor.com/publicacoes/vw.php?cod=161>>. Acesso em: 12 ago 2012.

KÄMPF, A. N. **Produção comercial de plantas ornamentais**. 2. ed. Guaíba: Agropecuária, 2005. 256p.

KIYUNA, I. et al. A floricultura brasileira no início do século XXI: o perfil do produtor. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 8, n. 1, p.57-76, 2002.

KIYUNA, I. et al. Parceiros comerciais internacionais da floricultura brasileira, 1989-2002. **Informações Econômicas**. São Paulo, v.34, n.5, 2004. p.1-28.

KLERK, G. J. de. Rooting of microcuttings: theory and practice. **In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Wallingford, v. 38, n. 5, p. 415-422, set./out. 2002.

KOCH, K. E. Carbohydrate modulated gene expression in plants. **Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology**, Florida, Gainesville, v.1, n.47, p.509-540, jul. 1996.

LEAL, L.; BIONDI, D. Potencial ornamental de espécies nativas. **Revista Científica Eletrônica de Engenharia Florestal**, Graça-SP, v. 1, n. 8, p.1-16, 8 ago. 2006. Disponível em: <<http://www.revista.inf.br/florestal08/pages/artigos/artigo09.pdf>>. Acesso em: 16 ago. 2012.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M. **Plantas ornamentais no Brasil** – arbustivas, herbáceas e trepadeiras. 3. ed. Nova Odessa: Editora Instituto Plantarum Ltda, 2001.

MATEUS, C. de M. D. **Crescimento e absorção de nutrientes pelo amarílis (Hippeastrum x hybridum hort.)**. 2008. 85 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Produção Vegetal, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal-SP, 2008.

MEEROW, A. W.; SNIJMAN, D. A. Amaryllidaceae. In: KUBITZKI, K. (Org.). **The Families and Genera of Vascular Plants: Volume III-Flowering Plants, Monocotyledons: Lilianae (except Orchidaceae)**. Velag, Berlin, Heidelberg, New York: Springer, 1998. p. 88-89.

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

NARDI, C. et al. Vernalização afeta a mobilização de reservas de açúcares e nitrogênio e a emergência de plantas de lírio (*Lilium longiflorum* thunb.) ‘snow queen’. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 4, p.1027-1033, jul./ago. 2004.

OKUBO, H.; HUANG, C. W.; KISHIMOTO, F.. Effects of anti-auxins and basal plate on bulblet formation in scale propagation of amaryllis (*Hippeastrum X hybridum hort.*). **Journal Of The Japanese Society For Horticultural Science**, Tokio, v. 68, n. 3, p.513-518, 1999.

OLIVEIRA, A. A. P.; BRAINER, M. S. de C. P. **Floricultura: caracterização e mercado**. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, 2007. 180 p. (Série Documentos do ETENE , n. 16).

OPTIZ, R. (Org.). **IBRAFLOR-Instituto Brasileiro de Floricultura: gargalos da floricultura** 01.2013. Disponível em: <<http://www.ibraflor.com/publicacoes/vw.php?cod=194>>. Acesso em: 27 mai. 2013.

OZUDOGRU, E. A.; PREVIATI, A.; LAMBARDI, M. In vitro conservation and cryopreservation of ornamental plants: sample protocols. In: JAIN, S. M.; OCHATT, S. J.. **Protocols for in vitro propagation of ornamental plants**. New York: Humana Press, 2010. Cap. 28, p. 315-320. (Methods in Molecular Biology).

ROBERTS, E. H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.1, n.4, p.499-514, 1973.

RODRIGUES, B. M. et al. Micropropagação de cebola a partir de bulbinhos induzidos in vitro. **Bragantia**, Campinas, Sp, v. 55, n. 1, p.19-28, 16 jan. 1996.

RODRIGUES, B. R. M.; MEIADO, M. V.; SIMABUKURO, E. A. Influência da luz e do tegumento na germinação de *Hippeastrum stylosum* Herb. (Amaryllidaceae). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p.603-605, jul. 2007. (Nota Científica)

ROLLAND F., MOORE B., SHEEN J. Sugar sensing and signaling in plants. **The Plant Cell**, Rockville, v. 14, n. supplement 1, p.S185–S205, 2002.

SANTANA, D. G.; RANAL, M. A. **Análise da germinação – um enfoque estatístico**. Brasília: Editora da Universidade de Brasília. 2004, 248p.

SANTIAGO, G. et al. Variação somaclonal nos descritores mínimos de tubérculos de batata. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 2, p.197-202, fev. 2012.

SANTOS, C. C. C. dos; RODRIGUES, P. H. V.. Variação somaclonal em mudas micropropagadas de bananeira, cultivar Pacovan. **Bragantia**, Campinas, v. 63, n. 2, p.201-205, 2004.

SCHMIEDT, O. W. **Flores e plantas ornamentais: polos de produção**. Disponível em: <<http://www.aprendendoaexportar.gov.br/flores/>>. Acesso em: 16 ago. 2012.



SILVA, J. B. C.; NAKAGAWA, J. Estudos de fórmulas para cálculo de germinação. **Informativo ABRATES**, v. 5, n. 1, 1995, p. 62-73.

SILVA, M. C. da et al. Propagação in vitro de *Schlechtendalia luzulifolia* Less. (Asteraceae): termoterapia em sementes para controle de microorganismos contaminantes. In: SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 20. 2008, Porto Alegre. **Livro de resumos**. Porto Alegre: UFRGS, 2008. v. 246, p. 1 - 1. Disponível em: <[http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/50579/Resumo\\_200802115.pdf?sequence=1](http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/50579/Resumo_200802115.pdf?sequence=1)>. Acesso em: 26 set. 2012.

SOARES, A. L. C. **Multiplicação, enraizamento e conservação in vitro de maracujazeiro nativo**. 2013. 86 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Agronomia, Departamento de Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras – Mg, 2013.

STUMPF, E. R. T.; BARBIERI, R. L.; HEIDEN, G. **Cores e formas no Bioma Pampa plantas ornamentais nativas**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2009. 276p.

SULTANA, J. et al. In vitro bulb production in hippeastrum (*Hippeastrum hybridum*). **Journal Of Central European Agriculture**, [Zagreb], v. 11, n. 4, p.469-474, 2010.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719p.

TOMBOLATO, A. F. C.; AZEVEDO, C.; NAGAI, V.. Effects of auxin treatments on in vivo propagation of *Hippeastrum hybridum* Hort. by Twin Scaling. **HortScience**, Alexandria, v. 29, n. 8, p.922, aug. 1994.

TOMBOLATO, A. F. C.; COSTA, A. M. M.; EGLIT, A. C. Micropropagação de *Hippeastrum hybridum* ‘Apple Blossom’, mediante escamas duplas. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 7, n. 1, p.35-40, 2001.

TRAUB, H. P. **The Amaryllis Manual**. New York: The MacMillian Company, 1958. 338p.

VARGAS, T. E.; OROPEZA, M.; GARCÍA, E. de. Propagación in vitro de *Hippeastrum* sp. **Agronomía Tropical**, Maracay, v. 56, n. 4, p.621-626, dez. 2006.

VEIGA, R. F. A. et al.; Levantamento de plantas ornamentais nativas, mantidas sob conservação ex situ no Brasil. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v.15, n.1, p. 11-22, 2009.

VELTILARI, M. C. D.; QUISEN, R. Cultivo in vitro de espécies florestais tropicais – controle de contaminação e estabelecimento de castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa*). In: JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA AMAZÔNIA OCIDENTAL, 8., 2012, Manaus-AM. **Anais da...** Manaus-AM, 2012. p.39-50

WILKERSON, Don. **Texas Greenhouse Management Handbook**: Growing Media & pH. Disponível em: <<http://aggie-horticulture.tamu.edu/ornamental/greenhouse-management/growing-media-ph/>>. Acesso em: 25 mar. 2014.

WILLIAMS, J. et al. **Biodiversity**. Canberra : CSIRO. Publishing on behalf of the Department of the Environment and Heritage, 2001. (Australia State of the Environment Report 2001).

YURI, J. E. et al. Vernalização do alho para cultivo in vitro. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 3, p.585-588, jul./set. 2004.