

MARCOS VINÍCIUS MARQUES PINHEIRO

**POTENCIAL FOTOAUTOTRÓFICO EM *Etilingera elatior* 'Porcelana' E
EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM *Anthurium andraeanum* 'Eidibel':
CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA E DA EXPRESSÃO DO GENE *SERK***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA

MINAS GERAIS - BRASIL

2014

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e Classificação da
Biblioteca Central da UFV

T

P654p
2014
Pinheiro, Marcos Vinícius Marques, 1982-
Potencial fotoautotrófico em *Etilingera elatior* 'Porcelana' e
embriogênese somática em *Anthurium andraeanum* 'Eidibel' :
caracterização anatômica e da expressão do gene *SERK* / Marcos Vinícius
Marques Pinheiro. - Viçosa, MG, 2014.
xii, 115f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Wagner Campos Otoni.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Plantas ornamentais. 2. *Etilingera elatior*. 3. *Anthurium
andraeanum*. 4. Plantas - Anatomia. 5. Regulação de expressão gênica.
6. Hibridação vegetal. 7. Histoquímica. 8. Plantas - Propagação.
9. Embriogênese somática. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Biologia Vegetal. Programa de Pós-Graduação em
Botânica. II. Título.

CDD 22. ed. 635.9

MARCOS VINÍCIUS MARQUES PINHEIRO

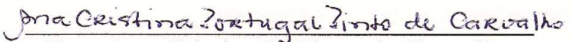
**POTENCIAL FOTOAUTOTRÓFICO EM *Etilingera elatior* 'Porcelana' E
EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM *Anthurium andraeanum* 'Eidibel':
CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA E DA EXPRESSÃO DO GENE *SERK***

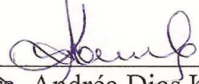
Tese apresentada à Universidade Federal de
Viçosa, como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em Botânica,
para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

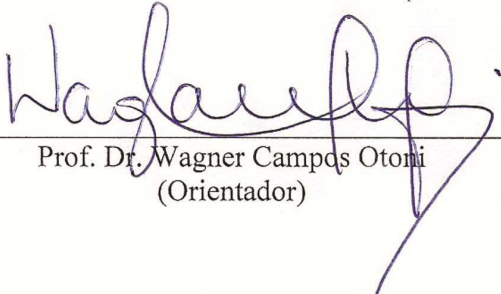
APROVADA: 18 de fevereiro de 2014


Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Santos


Prof.ª. Dra. Renata Maria S. Alves Meira


Dra. Ana Cristina P. Pinto de Carvalho


Dra. Andréa Dias Koehler
(Co-orientadora)


Prof. Dr. Wagner Campos Ottoni
(Orientador)

*Aos meus pais Dion e Celina, e a
minha esposa Fabrina,
pelas orações, pelo amor e
apoio irrestrito,*

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), ao Programa de Pós-Graduação em Botânica e ao Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), pela realização do curso de doutorado e deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro ao trabalho desenvolvido.

Aos meus orientadores Wagner Campos Otoni e Ana Cristina P. P. de Carvalho pelos ensinamentos, pela confiança e pela amizade. Serei eternamente grato.

Aos professores Marcelo de Oliveira Santos e Renata Maria Strozi Alves Meira, e a Dra. Andréa Dias Koehler, por aceitarem participar como membros da banca examinadora, pelos ensinamentos e valiosas sugestões/críticas dadas aos trabalhos.

Ao professor Francisco A. O. Tanaka pela amizade, co-orientação e por abrir as portas do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada à Agricultura (NAP/MEPA – ESALQ/USP).

À Ana Claudia Ferreira da Cruz, pela amizade e importante auxílio no Laboratório de Anatomia Vegetal.

Ao grupo “SERK” pela amizade e ajuda mútua.

Ao amigo Wagner Campos Otoni, pelo exemplo de caráter, competência e profissionalismo.

Aos meus pais, Dion e Celina, pela educação, pelas orações, por me ensinarem o valor do trabalho e pelo exemplo de vida

Aos irmãos, pelo amor, apoio, e por entenderem a busca dos meus sonhos tão longe de casa.

À minha esposa Fabrina, pelo amor, dedicação e paciência, e pelo auxílio nas estatísticas e confecções de gráficos dos trabalhos.

Aos colegas do LCTII pela amizade, companheirismo e brincadeiras.

Aos inesquecíveis amigos do curso de Fisiologia Vegetal (Mestrado), por terem feito essa etapa em Viçosa tão divertida e menos estressante.

A todos aqueles que não foram mencionadas, mas colaboraram de alguma forma, para o desenvolvimento deste trabalho.

BIOGRAFIA

MARCOS VINÍCIUS MARQUES PINHEIRO, filho de Dion Pinheiro Filho e de Celina Maria Marques Pinheiro, nasceu em 25 de setembro de 1982, em Ubajara, Ceará.

Concluiu o 1º grau em 1997, e o 2º grau em 2001, no Colégio Christus, em Fortaleza, Ceará.

Em março de 2003, ingressou no Curso de Agronomia da Universidade Federal do Ceará, concluindo o curso em dezembro de 2007.

Em março de 2008, ingressou no Curso de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, em nível de Mestrado, na Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais, concluindo os requisitos necessários à obtenção do título de *Magister Scientiae* em 23 de fevereiro de 2010.

Em março de 2010, iniciou o Curso de Pós-Graduação em Botânica, em nível de Doutorado, na Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais, concluindo os requisitos necessários à obtenção do título de *Doctor Scientiae* em 18 de fevereiro de 2014.

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	6
CAPÍTULO I	
Propagação fotoautotrófica de bastão-do-imperador [<i>Etilingera elatior</i> (Jack) R. M. Smith cv. Porcelana] (Zingiberaceae)	12
Resumo.....	12
Abstract	13
INTRODUÇÃO	14
MATERIAL E MÉTODOS	17
<i>Material vegetal e condições de cultivo</i>	17
<i>Alongamento e enraizamento de bastão-do-imperador em caixas de ventilação forçada de ar</i>	17
<i>Parâmetros de crescimento</i>	17
<i>Quantificação de pigmentos fotossintéticos</i>	18
<i>Caracterização anatômica, histoquímica e densidade estomática das folhas</i>	18
<i>Aclimatização das plantas</i>	19
<i>Delineamento experimental e análise estatística</i>	19
RESULTADOS	21
<i>A atmosfera enriquecida com CO₂ melhora o desenvolvimento plantas de <i>Etilingera elatior</i> cv. Porcelana durante a fase de alongamento e enraizamento in vitro?</i>	21
<i>Atmosfera enriquecida com CO₂ aumenta os pigmentos fotossintéticos de plantas de <i>Etilingera elatior</i> cv. Porcelana durante a fase de alongamento e enraizamento in vitro?</i>	24
<i>Características morfológicas, anatômicas e histoquímicas das folhas de plantas de <i>Etilingera elatior</i> cv. Porcelana, diferem entre os tratamentos</i>	25
<i>Atmosfera enriquecida com CO₂ aumenta a sobrevivência de plantas de <i>Etilingera elatior</i> cv. Porcelana em condições ex vitro</i>	31
DISCUSSÃO	34
<i>A atmosfera enriquecida com CO₂ melhora o crescimento in vitro de plantas de <i>Etilingera elatior</i> cv. Porcelana, durante a fase de alongamento e enraizamento in vitro</i>	34

<i>Atmosfera enriquecida com CO₂ aumenta os pigmentos fotossintéticos de plantas de Etilingera elatior cv. Porcelana durante a fase de alongamento e enraizamento in vitro</i>	35
<i>Características morfológicas, anatômicas e histoquímicas das folhas de plantas de Etilingera elatior cv. Porcelana, diferem entre os tratamentos</i>	36
<i>Atmosfera enriquecida com CO₂ aumenta a sobrevivência de plantas de Etilingera elatior cv. Porcelana em condições ex vitro</i>	38
AGRADECIMENTOS	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
CAPÍTULO II	
Caracterização anatômica da embriogênese somática de antúrio ‘Eidibel’ [Anthurium andraeanum (Linden ex André)] (Araceae)	47
Resumo	47
Abstract	48
INTRODUÇÃO	49
MATERIAL E MÉTODOS	52
<i>Material vegetal e condições de cultivo</i>	52
<i>Indução de embriogênese somática</i>	52
<i>Preparo das amostras para análises histológicas</i>	53
<i>Microscopia de luz</i>	53
<i>Microscopia eletrônica de varredura</i>	53
<i>Microscopia eletrônica de transmissão</i>	54
RESULTADOS	55
<i>Alterações morfohistológicas dos segmentos nodais durante a indução de embriogênese somática</i>	55
<i>Caracterização histoquímica da indução de embriogênese somática</i>	58
DISCUSSÃO	64
<i>Alterações estruturais da indução da embriogênese somática</i>	64
<i>Mobilização de reservas durante a embriogênese somática</i>	65
AGRADECIMENTOS	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
CAPÍTULO III	
Clonagem, caracterização molecular e análise da expressão do gene <i>SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE (SERK)</i> na embriogênese	

somática em antúrio [<i>Anthurium andraeanum</i> (Linden ex André) cv. Eidibel] (Araceae)	75
Resumo.....	75
Abstract	76
INTRODUÇÃO	77
MATERIAL E MÉTODOS	80
Material vegetal e condições de cultivo	80
<i>Indução de embriogênese somática</i>	80
<i>Maturação de embriões somáticos</i>	81
Microscopia de luz	81
Clonagem e caracterização do gene <i>SERK</i> de <i>Anthurium andraeanum</i>	81
<i>Extração, quantificação e verificação da integridade do RNA total</i>	81
<i>Síntese de cDNA fita simples (Superscript II – InvitrogenTM)</i>	82
<i>Amplificação, purificação e clonagem da sequência codificadora de <i>SERK</i></i>	82
<i>Sequenciamento dos clones e análise das sequências</i>	84
<i>Análise filogenética</i>	85
Análise da expressão espacial do gene <i>SERK</i> durante a embriogênese somática de <i>Anthurium andraeanum</i> por hibridização <i>in situ</i>	85
<i>Coleta e preparo dos tecidos</i>	85
<i>Síntese da sonda senso e anti-senso marcadas com digoxigenina</i>	86
<i>Reação de hibridização</i>	86
<i>Reação de pós-hibridização e detecção imunológica</i>	87
RESULTADOS	88
Alterações estruturais dos segmentos nodais durante a indução da embriogênese somática em <i>Anthurium andraeanum</i>	88
Clonagem da provável sequência codificadora de <i>SERK</i> em <i>Anthurium andraeanum</i>	90
Análise dos homólogos de <i>SERK</i> por meio das sequências de nucleotídeos	90
Análise da sequência de aminoácidos da proteína <i>SERK</i> de <i>Anthurium andraeanum</i>	91
Análise filogenética	94
Caracterização do padrão de expressão de <i>SERK</i> por hibridização <i>in situ</i>	96
DISCUSSÃO	99
Alterações estruturais dos segmentos nodais durante a indução da embriogênese somática em <i>Anthurium andraeanum</i>	99

Expressão do gene <i>SERK</i> na embriogênese somática de <i>Anthurium andraeanum</i>	100
Comparação entre AanSERK-like e SERK de outras espécies	102
AGRADECIMENTOS	104
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105
CONCLUSÕES GERAIS	114

RESUMO

PINHEIRO, Marcos Vinícius Marques, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2014. **Potencial fotoautotrófico em *Etilingera elatior* 'porcelana' e embriogênese somática em *Anthurium andraeanum* 'Eidibel': caracterização anatômica e da expressão do gene *SERK*.** Orientador: Wagner Campos Otoni. Co-orientadores: Andrea Dias Koehler e Francisco André Ossamu Tanaka

O uso da biotecnologia, especialmente com a utilização de técnicas da cultura de tecidos, proporciona uma forma alternativa de propagação das plantas, além de ser importante ferramenta para o melhoramento e conservação dos recursos genéticos. As espécies desse estudo, bastão-do-imperador [*Etilingera elatior* cv. Porcelana (Zingiberaceae)] e antúrio [*Anthurium andraeanum* cv. Eidibel (Araceae)] têm elevada importância econômica na floricultura tropical mundial, sendo fundamentais o domínio e o aprimoramento de técnicas biotecnológicas aplicadas à propagação *in vitro*. Nesse tipo de propagação, de modo especial aplicada às ornamentais, prima-se pela otimização dos sistemas de propagação em larga escala. Na propagação *in vitro* convencional, o sistema de vedação dos frascos restringe, entre outros fatores, as trocas gasosas, além de dificultar a absorção de água e nutrientes, aumentando as perdas do material vegetal durante a aclimatização. No presente trabalho, para bastão-do-imperador, realizou-se a propagação fotoautotrófica associada ao enriquecimento da atmosfera dos frascos com CO₂, com o intuito de rusticar as vitroplantas ainda em condições *in vitro*, com grandes benefícios à sobrevivência, com o aumento da tolerância aos estresses impostos às plantas na fase de aclimatização, aproximando-as daquelas produzidas em condições de campo. Para o antúrio, o desenvolvimento de técnicas eficientes de propagação *in vitro* proporcionou perspectivas novas e promissoras para o melhoramento do antúrio, capazes de ampliar a produção comercial e o abastecimento do mercado brasileiro e mundial. Dentre essas técnicas destaca-se a embriogênese somática, pois pode ser aplicada com sucesso na produção de plantas em larga escala, além de ser um modelo para estudos anatômicos, estruturais e moleculares envolvidos na aquisição de competência embriogênica e de grupos de genes especificamente expressos durante a embriogênese somática. O presente trabalho contribuiu para a geração de conhecimentos a cerca da propagação *in vitro* das espécies a partir das técnicas de propagação fotoautotrófica, em bastão-do-imperador, caracterizando as respostas

morfofisiológicas das plantas submetidas a condições de crescimento heterotrófico, fotomixotrófico e fotoautotrófico; e da propagação *in vitro* do antúrio via embriogênese somática, abordando alterações estruturais e o acúmulo de reservas envolvidas durante a ontogênese dos calos embriogênicos, além de caracterizar e analisar a expressão do gene *SERK* nessa espécie.

ABSTRACT

PINHEIRO, Marcos Vinícius Marques, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2014. **Photoautotrophic potential of *Etinglera elatior* 'Porcelana' and somatic embryogenesis in *Anthurium andraeanum* 'Eidibel': anatomical characterization and expression of gene *SERK***. Adviser: Wagner Campos Otoni. Co-Advisers: Andrea Dias Koehler and Francisco André Ossamu Tanaka

The use of biotechnology, particularly with the use of tissue culture techniques, provides an alternative way of plant propagation, as well as being an important tool for breeding and genetic resources conservation. The species of this study, torch ginger [*Etinglera elatior* cv. Porcelana (Zingiberaceae)] and anthurium [*Anthurium andraeanum* cv. Eidibel (Araceae)] present a high economic importance in the global tropical floriculture, being fundamental the domain and enhancement of biotechnological techniques applied to *in vitro* propagation. This kind of propagation, especially applied to ornamentals, stands out for the optimization of large-scale propagation. In conventional *in vitro* propagation, the flasks sealing system restricts, among other things, gas exchange, and hinders water and nutrients absorption, increasing losses in the plant material during acclimatization. In the present study, with torch ginger, the photoautotrophic propagation was performed associated with CO₂-enriched atmosphere flasks, with the aim of hardening the plantlets even *in vitro*, with great benefits to survival and increase tolerance to stresses imposed on plants during the acclimatization phase, approaching those produced in the field. To anthurium, the development of efficient *in vitro* propagation techniques provided new and promising perspectives for the breeding of this specie, able to expand commercial production and supply Brazilian and worldwide market. Among these techniques highlights the somatic embryogenesis, which can be successfully applied in plant production system for large-scale, besides being an ideal system for anatomical, structural and molecular studies involved in the acquisition of embryogenic competence and clusters of genes specifically expressed during somatic embryogenesis. This work contributed to the generation of knowledge about *in vitro* propagation of the species from photoautotrophic propagation techniques, in torch ginger, characterizing the morphophysiological responses of plants submitted to heterotrophic, photomixotrophic and photoautotrophic growth conditions; and *in vitro* propagation of anthurium via

somatic embryogenesis, addressing structural changes and the accumulation of reserves involved during ontogeny of embryogenic callus, besides characterizing and analyze the expression of *SERK* gene in this species.

INTRODUÇÃO GERAL

A indústria da floricultura compreende o cultivo e a comercialização de flores de corte, folhagens, e plantas de vaso; neste último caso, as plantas podem ser vendidas para fins de paisagismo e urbanismo (Van Huylenbroeck, 2010; Chandler & Brugliera, 2011). Tradicionalmente, a Europa tem sido importante centro de produção, comercialização e consumo de plantas ornamentais, caracterizando-se ainda por uma elevada diversidade de produtos. Dentre os principais produtores estão Holanda, Itália, Alemanha, Espanha, Reino Unido e França; com destaque para a Holanda, o principal país exportador de flores do mundo, produzindo flores de corte, plantas de vaso, bulbos, plantas anuais e perenes, dentre outras (Barros et al., 2008; Van Huylenbroeck, 2010).

Com a globalização, o mercado mundial de flores, antes dominado apenas por países europeus, abriu espaços para novos pólos de produção, com destaque para Índia, China, Quênia, Etiópia, Colômbia, Equador e Costa Rica (Van Huylenbroeck, 2010; Chandler & Brugliera, 2011). Na Colômbia e no Equador, 90% da produção interna são exportadas para outros países, diferentemente do que ocorre no Brasil, em que a produção atende prioritariamente o mercado interno devido o consumo *per capita* ser relativamente elevado em determinadas regiões brasileiras (Barros et al., 2008).

A produção brasileira está distribuída principalmente nos Estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Santa Catarina, Pernambuco e Rio Grande do Sul (Sologuren & Juliatti, 2007). Dentre os indicativos que contribuem para a expansão da floricultura no Brasil estão às dimensões continentais e as condições climáticas, favorecendo tanto o cultivo de flores de famílias nativas de regiões temperadas quanto tropicais. Com isso, torna-se possível produzir flores e folhagens durante o ano inteiro a custos reduzidos e competitivos, conferindo ao produto brasileiro condições para se firmar no mercado mundial (França & Maia, 2008).

Destaca-se as espécies tropicais pertencentes às famílias Araceae, Bromeliaceae, Heliconiaceae, Musaceae, Orchidaceae e Zingiberaceae (Leme & Honório, 2004). Na família Araceae, o gênero *Anthurium* Schott, é considerado a segunda flor tropical mais comercializada no mercado mundial, superada apenas pelas espécies da família Orchidaceae (Castro et al., 2004; Tombolato et al., 2004). São plantas herbáceas tropicais, epífitas ou hemiepífitas e nativas de regiões quentes da América Tropical, destacando-se pela beleza de suas folhagens (Castro et al., 2004; Tombolato et al., 2004; Nhut et al., 2006; Liendo & Mogollón, 2009; Maira et al., 2010). Mais de 600 espécies

do gênero *Anthurium* são ornamentais e cerca de 130 espécies são encontradas no Brasil (Castro et al., 2004; Tombolato et al., 2004). Dentre estas destaca-se o *Anthurium andraeanum*, preferido pelo público devido ao tamanho e colorido das brácteas de suas inflorescências e pela grande durabilidade pós-colheita, por isso tem sido uma das espécies mais cultivadas como flor de corte e plantas de vaso (Castro et al., 2004).

Na família Zingiberaceae, destaca-se comercialmente *Etilingera elatior* (Jack) R. M. Smith, espécie tropical, nativa da Malásia e Indonésia (Yunus et al., 2012; Santos et al., 2013), conhecida popularmente como bastão-do-imperador. É ornamental e medicinal, herbácea, rizomatosa, ereta, florífera e perene, podendo atingir de 3 a 6 metros de altura, com folhas dispostas em espiral (Rescarolli & Zaffari, 2009; Chan et al., 2011a). Possui inflorescências grandes e atraentes, com brácteas vistosas, o que proporciona grande aceitação tanto no mercado interno quanto externo (Castro, 1998; Bezerra & Loges, 2005). Essa espécie possui quatro cultivares, ‘Porcelana’ (inflorescências com brácteas acetinadas de coloração rosa-claro); ‘Red Torch’ (brácteas vermelhas); ‘Pink Torch’ (brácteas de coloração rosa-escuro) e ‘Tulip Torch Ginger’ (brácteas rubras, em formato de tulipa) (Ribeiro et al., 2012), sendo consideradas plantas de elevado valor ornamental (Lins & Coelho, 2003; Chan et al., 2011b; Yunus et al., 2012). No Brasil, vem sendo cultivada há muitos anos, principalmente na região Nordeste, com destaque para os estados de Pernambuco e Alagoas que exportam suas flores para outros estados brasileiros (Bezerra & Loges, 2005), como também para os Estados Unidos da América, Canadá, Holanda, Alemanha, Dinamarca, Bélgica, França e Japão (Ribeiro et al., 2012).

No Sul da Ásia, o bastão-do-imperador é uma das plantas medicinais mais populares, pois possui muitos fitoquímicos de propriedades antimicrobianas e antissépticas (Abdelwahab et al., 2010), sendo utilizado contra funções citotóxicas, inibição da tirosinase (enzima que catalisa a oxidação de fenóis) e atividades hepatoprotetoras, anti-hipertensivas e antioxidantes (Abdelmageed et al., 2011; Chan et al., 2011a; Chan et al., 2011b; Karim & Munir, 2011). Vários componentes antioxidantes têm sido isolados a partir de *Etilingera elatior* (Chang et al., 2012), sendo que essas propriedades são mais expressas nas folhas, quando comparadas com as inflorescências ou os rizomas (Chan et al., 2011b).

A muda representa um dos principais insumos, tanto pelo custo na implantação do plantio, quanto pela garantia de sucesso esperado no investimento e na oferta de produtos de boa qualidade, para os mercados consumidores, nacional e internacional

(Cabral, 2004). Dessa forma, o uso de mudas de qualidade pode tornar-se um fator limitante no cultivo comercial das plantas tropicais.

O uso da biotecnologia, especialmente com o emprego de técnicas da cultura de tecidos, proporciona uma forma alternativa de propagação das plantas, além de ser importante para o melhoramento e a conservação dos recursos genéticos. Para *Etilingera elatior*, ainda são limitantes as informações a cerca da cultura de tecidos e propagação *in vitro* dessa espécie (Yunus et al., 2012).

Na propagação *in vitro*, a utilização do sistema de vedação convencional, previne a desidratação das culturas e do meio de cultura, além de evitar a contaminação. No entanto, nesse tipo de vedação ocorre elevada concentração de etileno e reduzida concentração de dióxido de carbono (CO₂); restrição do fluxo de fótons fotossinteticamente ativos e das trocas gasosas, diminuição das taxas de transpiração e de fotossíntese das plantas; dificuldade na absorção de água e nutrientes, causando redução da taxa de crescimento e desenvolvimento dos explantes, o que acarreta em elevadas perdas durante a aclimatização, devido à mortalidade das plantas (Nguyen & Kozai, 2005; Zobayed, 2006; Xiao et al., 2011). Entretanto, esses problemas podem ser minimizados por meio do uso de um sistema que proporcione o cultivo do material vegetal em condições fotoautotróficas.

Para isso, vêm sendo utilizadas membranas porosas permeáveis a gases (Saldanha et al., 2012), pois elas permitem maior eficiência das trocas gasosas, diminuindo o acúmulo de etileno e, assim, melhorando a aclimatização das plantas produzidas (Xiao et al., 2011). Essas mudanças no microambiente dos frascos de cultivo, promovidas pelas trocas gasosas, favorecem a manutenção da concentração de CO₂, estimulam a fotossíntese e reduzem a concentração de etileno e a umidade relativa dentro dos frascos (Kozai & Kubota, 2001). A propagação fotoautotrófica associada ao enriquecimento da atmosfera dos frascos com CO₂ tem como principal objetivo rustificar as vitroplantas ainda *in vitro*, com grandes benefícios à sobrevivência das mesmas pelo aumento da tolerância aos estresses impostos às plantas na fase de aclimatização, aproximando-as daquelas produzidas em condições de campo.

Para o antúrio, o desenvolvimento de técnicas eficientes de propagação *in vitro* tem proporcionado perspectivas novas e promissoras para o melhoramento dessa espécie, capazes de ampliar a produção e o abastecimento do mercado brasileiro. Atualmente, grande parte das mudas de antúrio comercializadas é produzida por técnicas de cultura de tecidos (Maira et al., 2010). Para o constante aprimoramento da

clonagem dos antúrios, vem se utilizando, como forma de propagação *in vitro*, a embriogênese somática.

Comparativamente às demais técnicas, a embriogênese somática permite a produção em larga escala de plantas, possibilitando reduzir significativamente o custo por unidade de muda produzida. Em condições apropriadas os embriões somáticos podem ser produzidos de forma sincronizada, com elevado grau de uniformização clonal e conformidade genética, o que torna a embriogênese somática uma importante ferramenta para o melhoramento genético de plantas (Von Arnold et al., 2002; Chen et al., 2010; Lu et al., 2011; Pinto et al., 2011; Sivanesan et al., 2011). Esta técnica possui outras aplicações, como: produção de sementes sintéticas; conservação de germoplasma, por criopreservação; manipulação genética, pelo desenvolvimento de plantas transgênicas (Quiroz-Figueroa et al., 2006; Bakhshaie et al., 2010; Capelo et al., 2010; Khan et al., 2010; Konieczny et al., 2010; Ming-Hua & Sen-Rong, 2010; Parimalan et al., 2010), entre outras. Além disso, a embriogênese somática é um sistema ideal para estudo das características morfológicas, fisiológicas, eventos moleculares e bioquímicos que ocorrem durante o processo de embriogênese em plantas superiores (Zakizadeh et al., 2010; You et al., 2011).

Durante a embriogênese, algumas alterações morfológicas e bioquímicas ocorrem em resposta às alterações nos padrões de expressão gênica (Santos et al., 2005). No entanto, a base molecular dos mecanismos genéticos e bioquímicos que regulam a propriedade de competência à embriogênese em células vegetais ainda não está completamente elucidada (Santa-Catarina et al., 2004; Pérez-Núñez et al., 2009; Ma et al., 2012).

A partir da utilização de marcadores moleculares e da localização de células competentes, foi possível complementar os métodos tradicionais de identificação de células envolvidas na formação de embriões somáticos (Schmidt et al., 1997), resultando na identificação de vários grupos de genes expressos durante a embriogênese somática (Ito et al., 2005; Pérez-Núñez et al., 2009). Com destaque para os genes da família *SERK* (*SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE*) (Schmidt et al., 1997), envolvidos em conferir competência às células embriogênicas em plantas (Ito et al., 2005; Santos et al., 2005; Santos et al., 2009).

A embriogênese somática tem sido relatada por vários autores para o gênero *Anthurium*, porém ainda não foram descritas as alterações histológicas e moleculares envolvidas na caracterização do potencial embriogênico de *Anthurium andraeanum*.

Considerando todos os aspectos apresentados anteriormente, para *Etilingera elatior* e *Anthurium andraeanum*, nota-se que há a necessidade de estudos mais aprofundados acerca dessas espécies ornamentais. Esse estudo, vislumbra-se contribuir na geração de conhecimentos acerca da propagação *in vitro* de *Etilingera elatior* cv. Porcelana a partir das técnicas de propagação fotoautotrófica, caracterizando as respostas morfofisiológicas das plantas submetidas a condições de crescimento heterotrófico, fotomixotrófico e fotoautotrófico. Além disso, pretende-se compreender os fatores que atuam diretamente ou indiretamente no processo de embriogênese somática de *Anthurium andraeanum* cv. Eidibel. Para isso, objetiva-se caracterizar a origem e o padrão de divisão celular durante a embriogênese somática indireta, determinando alterações estruturais e o acúmulo de reservas envolvidos durante a ontogênese dos calos embriogênicos, além de caracterizar a expressão do gene *SERK*, e analisar, via hibridização *in situ*, a possível função do gene *SERK* na marcação de células com competência embriogênica.

A tese foi organizada em três capítulos redigidos na forma de artigos científicos que serão futuramente submetidos.

Capítulo I – Propagação fotoautotrófica de bastão-do-imperador [*Etilingera elatior* (Jack) R. M. Smith cv. Porcelana] (Zingiberaceae)

Capítulo II - Embriogênese somática de antúrio [*Anthurium andraeanum* (Linden ex André) cv. Eidibel] (Araceae): caracterização histoquímica e estrutural

Capítulo III - Clonagem, caracterização molecular e análise da expressão do gene *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE (SERK)* na embriogênese somática em antúrio [*Anthurium andraeanum* (Linden ex André) cv. Eidibel] (Araceae)

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELMAGEED, A.H.A.; FARIDAH, Q.Z.; NUR AMALINA, A.; YAACOB, M. The influence of organ and post-harvest drying period on yield and chemical composition of the essential oils of *Etilingera elatior* (Zingiberaceae). **Journal of Medicinal Plants Research**, v.5, p.3432-3439, 2011.

ABDELWAHAB, S.I.; ZAMAN, F.Q.; MARIOD, A.A.; YAACOB, M.; ABDELMAGEED, A.H.; KHAMIS, S. Chemical composition, antioxidant and antibacterial properties of the essential oils of *Etilingera elatior* and *Cinnamomum pubescens* Kochummen. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.90, p.2682-2688, 2010.

BAKSHAIE, M.; BABALAR, M.; MIRMASOUMI, M.; KHALIGHI, A. Somatic embryogenesis and plant regeneration of *Lilium ledebourii* (Baker) Boiss., an endangered species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.102, p.229-235, 2010.

BARROS, L.M.; CARVALHO, A.C.P.P.; BONGERS, F.J.G.; BAIMA, S. O agronegócio da floricultura no Brasil. In: ALBUQUERQUE, A.C.S.; SILVA, A.G. (Ed.). **Agricultura Tropical: quatro décadas de inovações tecnológicas, institucionais e políticas**. Brasília: DF: Embrapa Informações Tecnológicas, 2008. p.881-904.

BEZERRA, F.C.; LOGES, V. Zingiberaceae. In: TERAPO, D.; CARVALHO, A.C.P.P.; BARROSO, T.C.S.F. (Eds.). **Flores tropicais**. Brasília: Embrapa Informações Tecnológicas, 2005. p.1103-127.

CABRAL, J.B. Controle de produção industrial de plantas *in vitro*. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v.10, p.22-23, 2004.

CAPELO, A.M.; SILVA, S.; BRITO, G.; SANTOS, C. Somatic embryogenesis induction in leaves and petioles of a mature wild olive. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.103, p.237-242, 2010.

CASTRO, A.C.; RESENDE, L.V.; GUIMARÃES, W.N.R.; LOGES, V. Uso de técnicas moleculares em estudo de diversidade genética em antúrio. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v.10, p.6-9, 2004.

CASTRO, C.E.F. Cadeia produtiva de flores e plantas ornamentais. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v.4, p.1-46, 1998.

CHAN, E.W.C.; LIM, Y.Y.; WONG, S.K. Phytochemistry and pharmacological properties of *Etilingera elatior*: A review. **Pharmacognosy Journal**, v.3, p.6-10, 2011a.

CHAN, E.W.C.; NG, V.P.; TAN, V.V.; LOW, Y.Y. Antioxidant and antibacterial properties of *Alpinia galanga*, *Curcuma longa*, and *Etilingera elatior* (Zingiberaceae). **Pharmacognosy Journal**, v.3, p.54-61, 2011b.

CHANDLER, S.; BRUGLIERA, F. Genetic modification in floriculture. **Biotechnology Letters**, v.33, p.207-214, 2011.

CHANG, Y.Q.; TAN, S.N.; YONG, J.W.H.; GE, L. Determination of flavonoids in *Costus speciosus* and *Etilingera elatior* by liquid chromatography-mass spectrometry. **Analytical Letters**, v.45, p.345-355, 2012.

CHEN, A.H.; YANG, J.L.; NIU, Y.D.; YANG, C.P.; LIU, G.F.; YU, C.Y.; LI, C.H. High-frequency somatic embryogenesis from germinated zygotic embryos of *Schisandra chinensis* and evaluation of the effects of medium strength, sucrose, GA₃, and BA on somatic embryo development. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** v.102, p.357-364, 2010.

FRANÇA, C.A.M.; MAIA, M.B.R. **Panorama do agronegócio de flores e plantas ornamentais no Brasil**. 2008. Disponível em: <www.fit.ufsc.br/disciplinas_download.php?cod=954>. Acesso em: 12 de dezembro de 2011.

ITO, Y.; TAKAYA, K.; KURATA, N. Expression of SERK family receptor-like protein kinase genes in rice. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression**, v.1730, p.253-258, 2005.

KARIM, A.; MUNIR, S. A newly developed method for rapid propagation of an important culinary and medicinal herb (*Etilingera elatior*). **Insight Ethnopharmacology**, v.1, p.3-4, 2011.

KHAN, T.; REDDY, V.S.; LEELAVATHI, S. High-frequency regeneration via somatic embryogenesis of an elite recalcitrant cotton genotype (*Gossypium hirsutum* L.) and

efficient *Agrobacterium*-mediated transformation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** v.101, p.323-330, 2010.

KONIECZNY, R.; PILARSKA, M.; TULEJA, M.; SALAJ, T.; ILNICKI, T. Somatic embryogenesis and plant regeneration in zygotic embryos of *Trifolium nigrescens* (Viv.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.100, p.123-130, 2010.

KOZAI, T.; KUBOTA, C. Development a photoautotrophic micropropagation system for woody plants. **Journal of Plant Research** v.114, p.525-537, 2001.

LEME, J.M.; HONÓRIO, S.L. Padronização e qualidade de antúrio. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v.10, p.48-50, 2004.

LIENDO, M.; MOGOLLÓN, N. Multiplicación clonal *in vitro* del anturio (*Anthurium andraeanum* Lind. cv. Nicoya). **Bioagro**, v.21, p.179-182, 2009.

LINS, S.R.O.; COELHO, R.S.B. Antracnose em inflorescências de bastão do imperador (*Etilingera elatior*): Ocorrência e métodos de inoculação. **Summa Phytopatológica**, v.29, p.355-358, 2003.

LU, J.; VAHALA, J.; PAPPINEN, A. Involvement of ethylene in somatic embryogenesis in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, p.1-9, 2011.

MA, J.; HE, Y.; WU, C.; LIU, H.; HU, Z.; SUN, G. Cloning and molecular characterization of a SERK gene transcriptionally induced during somatic embryogenesis in *Ananas comosus* cv. Shenwan. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.30, p.195-203, 2012.

MAIRA, O.; ALEXANDER, M.; VARGAS, T.E. Micropropagation and organogenesis of *Anthurium andreanum* Lind cv Rubrun. In: JAIN, S.M.; OCHATT, S.J. (Ed.). **Protocols for in vitro propagation of ornamental plants, methods in molecular biology**. Totowa, New Jersey: Humana Press Edition, 2010. p.3-14.

MING-HUA, Y.; SEN-RONG, H. A simple cryopreservation protocol of *Dioscorea bulbifera* L. embryogenic calli by encapsulation-vitrification. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.101, p.349-358, 2010.

NGUYEN, Q.T.; KOZAI, T. Photoautotrophic micropropagation of woody species. In: KOZAI, T.; AFREEN, F.; ZOBAYED, S.M.A. (Ed.). **Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation as a new micropropagation and transplant production system**. Dordrecht: Springer, 2005. p.123-146.

NHUT, D.T.; NGUYEN, D.; VY, N.N.H.; KHUE, C.D.; KHIEM, D.V.; VINH, D.N. Impact of *Anthurium* spp. genotype on callus induction derived from leaf explants, and shoot and root regeneration capacity from callus. **Journal of Applied Horticulture**, v.8, p.135-137, 2006.

PARIMALAN, R.; GIRIDHAR, P.; RAVISHANKAR, G.A. Enhanced shoot organogenesis in *Bixa orellana* L. in the presence of putrescine and silver nitrate. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.105, p.285-290, 2010.

PÉREZ-NÚÑEZ, M.T.; SOUZA, R.; SÁENZ, L.; CHAN, J.L.; ZÚÑIGA-AGUILAR, J.J.; OROPEZA, C. Detection of a *SERK*-like gene in coconut and analysis of its expression during the formation of embryogenic callus and somatic embryos. **Plant Cell Reports**, v.28, p.11-19, 2009.

PINHEIRO, M.V.M.; MARTINS, F.B.; XAVIER, A.; OTONI, W.C. Trocas gasosas influenciam na morfogênese *in vitro* de duas cultivares de oliveira (*Olea europaea* L.). **Revista Árvore**, v.37, p.19-29, 2013.

PINTO, D.L.P.; ALMEIDA, A.M.R.; RÊGO, M.M.; SILVA, M.L.; OLIVEIRA, E.J.; OTONI, W.C. Somatic embryogenesis from mature zygotic embryos of commercial passionfruit (*Passiflora edulis* Sims) genotypes. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.107, p.521-530, 2011.

QUIROZ-FIGUEROA, F.R.; ROJAS-HERRERA, R.; GALAZ-AVALOS, R.M.; LOYOLA-VARGAS, V.M. Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.86, p.285-301, 2006.

RESCAROLLI, C.L.S.; ZAFFARI, G.R. Produção de mudas de *Etilingera elatior* (Jack) R.M. Sm. através da cultura de tecidos vegetais *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.11, p.190-195, 2009.

RIBEIRO, T.R.; ALMEIDA, E.F.A.; FRAZÃO, J.E.M.; CARVALHO, J.G. Bastão-do-imperador. In: PAIVA, P.D.O.; ALMEIDA, E.F. (Ed.). **Produção de flores de corte**. Lavras: UFLA, 2012. p.90-103.

SALDANHA, C.W.; OTONI, C.G.; DE AZEVEDO, J.L.F.; DIAS, L.L.C.; DO RÊGO, M.M.; OTONI, W.C. A low-cost alternative membrane system that promotes growth in nodal cultures of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.110, p.413-422, 2012.

SANTA-CATARINA, C.; HANAI, L.R.; DORNELAS, M.C.; VIANA, A.M.; FLOH, E.I.S. *SERK* gene homolog expression, polyamines and amino acids associated with somatic embryogenic competence of *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.79, p.53-61, 2004.

SANTOS, E.M.; AZEVEDO, B.M.; MARINHO, A.B.; CARVALHO, A.C.P.P.; SARAIVA, K.R. Aclimatização de mudas micropropagadas de bastão do imperador em diferentes volumes de recipientes. **Revista Ceres**, v.60, p.134-137, 2013.

SANTOS, M.D.O.; ROMANO, E.; YOTOKO, K.S.C.; TINOCO, M.L.P.; DIAS, B.B.A.; ARAGÃO, F.J.L. Characterisation of the cacao *somatic embryogenesis receptor-like kinase (SERK)* gene expressed during somatic embryogenesis. **Plant Science**, v.168, p.723-729, 2005.

SANTOS, M.O.; ROMANO, E.; VIEIRA, L.S.; BALDONI, A.B.; ARAGÃO, F.J.L. Suppression of *SERK* gene expression affects fungus tolerance and somatic embryogenesis in transgenic lettuce. **Plant Biology**, v.11, p.83-89, 2009.

SCHMIDT, E.D.L.; GUZZO, F.; TOONEN, M.A.J.; DE VRIES, S.C. A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. **Development**, v.124, p.2049-2062, 1997.

SIVANESAN, I.; LIM, M.Y.; JEONG, B.R. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf and petiole explants of *Campanula punctata* Lam. var. *rubriflora* Makino. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.107, p.365-369, 2011.

SOLOGUREN, F.J.; JULIATTI, F.C. Doenças fúngicas em plantas ornamentais em Uberlândia-MG. **Bioscience Journal**, v.23, p.42-52, 2007.

TOMBOLATO, A.F.C.; UZZO, R.P.; CASTRO, A.C.R.; SAKAI, M.; SAES, L.A. Recursos genéticos e melhoramento do antúrio (*Anthurium andraeanum* Linden) no IAC–APTA. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v.10, p.1-5, 2004.

VAN HUYLENBROECK, J. Status of Floriculture in Europe. In: JAIN, S.M.; OCHATT, S.J. (Ed.). **Protocols for in vitro propagation of ornamental plants, methods in molecular biology**. New York: Humana Press, 2010. p.365-376.

VON ARNOLD, S.; SABALA, I.; BOZHKO, P.; DYACHOK, J.; FILONOVA, L. Developmental pathways of somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.69, p.233-249, 2002.

XIAO, Y.; NIU, G.; KOZAI, T. Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.105, p.149-158, 2011.

YOU, C.; FAN, T.; GONG, X.; BIAN, F.; LIANG, L.; QU, F. A high-frequency cyclic secondary somatic embryogenesis system for *Cyclamen persicum* Mill. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.107, p.233-242, 2011.

YUNUS, M.F.; AZIZ, M.A.; KADIR, M.A.; RASHID, A.A. In vitro propagation of *Etilingera elatior* (Jack) (torch ginger). **Scientia Horticulturae**, v.135, p.145-150, 2012.

ZAKIZADEH, H.; STUMMANN, B.M.; LÜTKEN, H.; MÜLLER, R. Isolation and characterization of four somatic embryogenesis receptor-like kinase (*RhSERK*) genes from miniature potted rose (*Rosa hybrida* cv. Linda). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.101, p.331-338, 2010.

ZOBAYED, S. Aeration in plant tissue culture. In: DUTTA GUPTA, S.; IBARAKI, Y. (Ed.). **Plant tissue culture engineering**. Dordrecht: Springer, 2006. p.313-327.

CAPÍTULO I

Propagação fotoautotrófica de bastão-do-imperador [*Etilingera elatior* (Jack) R. M. Smith cv. Porcelana] (Zingiberaceae)

Resumo - *Etilingera elatior*, popularmente conhecida como bastão-do-imperador é cultivada principalmente para a produção de flores de corte e como planta medicinal. Novas técnicas de cultura de tecidos proporcionam alternativas de propagação para essa espécie, além de otimizar a qualidade das mudas produzidas. A propagação fotoautotrófica associada ao enriquecimento com dióxido de carbono (CO₂), é uma das técnicas utilizadas para aproximar as condições de cultivo *in vitro* daquelas em campo. O objetivo do trabalho foi analisar o potencial fotoautotrófico de mudas de *Etilingera elatior* cv. Porcelana, propagadas *in vitro* em sistema de enriquecimento com CO₂, caracterizando as respostas morfofisiológicas das plantas submetidas a condições de crescimento heterotrófico, fotomixotrófico e fotoautotófico. Como explantes, foram utilizados brotações estabelecidas *in vitro* (~3 cm de altura), inoculadas em frascos contendo 60 mL de MS + 0,54 µM de ácido naftalenoacético (ANA), três concentrações de sacarose (0; 15 ou 30 g L⁻¹), e 6,5 g L⁻¹ de ágar Merck®, vedados com tampas rígidas sem membranas ou com orifícios cobertos com membranas. Após 45 dias em caixas de ventilação forçada de ar (360 ou 1000 µmol mol⁻¹ de CO₂) em sala de crescimento (25 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 horas e irradiância de 60 µmol m⁻²s⁻¹), foram avaliadas altura da planta, porcentagem de oxidação, número de brotos, massas fresca e seca da planta, pigmentos fotossintéticos (clorofila *a* e *b*, clorofilas totais e carotenoides), densidade estomática, porcentagem de sobrevivência à aclimatização, e características anatômicas das folhas. A adição de 30 g L⁻¹ de sacarose produziu plantas com maior altura. A massa fresca foi maior no sistema de 1000 µmol mol⁻¹ de CO₂ com tampas com membranas. A massa seca da planta foi maior quando adicionado 15 ou 30 g L⁻¹ de sacarose. Para pigmentos fotossintéticos, o uso de membranas e 15 g L⁻¹ de sacarose foi superior em 1000, quando comparado a 360 µmol mol⁻¹ de CO₂; já para 30 g L⁻¹ de sacarose, foi superior em 360 µmol mol⁻¹ de CO₂. O uso de tampas com membranas, o aumento da concentração de CO₂ (1000 µmol mol⁻¹ de CO₂) e a adição de sacarose (15 g L⁻¹) favoreceram a sobrevivência das plantas. Para a propagação da espécie deve-se utilizar o sistema fotomixotrófico.

Palavras-chave: Trocas gasosas, enriquecimento de CO₂, crescimento fotomixotrófico, sacarose

**Photoautotrophic propagation of torch ginger [*Etilingera elatior* (Jack) R. M. Smith
cv. Porcelana] (Zingiberaceae)**

Abstract – The torch ginger are cultivated principally for the production of cut flowers and medicinal plants. For this, new techniques of tissue culture propagation provide alternatives for this species, in addition to optimizing quality of plantlets. Among them, is the photoautotrophic propagation associated with the enrichment with carbon dioxide (CO₂), technique used to approximate the environment of *in vitro* cultivation of those produced under field conditions. The objective was to evaluate the effect of CO₂ enrichment, type of sealing and concentration of sucrose in *Etilingera elatior* cv. Porcelana. Plants grown *in vitro* (~ 3 cm of length) were used as explants, inoculated into flasks containing 60 mL of MS + 0.54 μM naphthaleneacetic acid (NAA), three concentrations of sucrose (0, 15 and 30 g L⁻¹) and 6.5 g L⁻¹ agar Merck™, sealed with lids without holes or with membranes. After 45 days in plexiglass boxes with forced air ventilation (360 or 1000 μmol mol⁻¹ of CO₂) in growth room (25 ± 2 °C, 16h of photoperiod and 60 μmol m⁻² s⁻¹ of irradiance), plant height, percentage of oxidation, number of shoots, fresh and dry weight, photosynthetic pigments (chlorophyll *a* and *b*, total chlorophylls and carotenoids), stomatal density, percentage of survival during the acclimatization and anatomical characteristics of the leaves were evaluated. The addition of 30 g L⁻¹ of sucrose produced plants with higher height. The fresh weight was higher in 1000 μmol mol⁻¹ of CO₂ system with lids with membranes. The total plants dry weight was higher with addition of 15 or 30 g L⁻¹ of sucrose. When used membranes and 15 g L⁻¹ of sucrose, photosynthetic pigments level was higher at 1000 μmol mol⁻¹ of CO₂, compared to 360; while for 30 g L⁻¹ of sucrose was higher at 360 μmol mol⁻¹ of CO₂. The use of lids with membranes, the CO₂ concentration (1000 μmol mol⁻¹ of CO₂) and the addition of sucrose (15 g L⁻¹) favored the survival of plants. For the propagation of the species, photomixotrophic system should be used.

Key words: Gas exchange, CO₂ enrichment, photomixotrophic growth, sucrose

INTRODUÇÃO

O mercado de plantas ornamentais tropicais vem manifestando grande interesse em representantes da família Zingiberaceae, tanto para a produção de flores de corte quanto produção de mudas para paisagismo. Além de fornecer produtos na área ornamental, espécies dessa família apresentam também produtos úteis na área de alimentos, condimentos, medicamentos, perfumes, corantes, óleos essenciais, produtos de estética (Jaafar et al., 2007; Yunus et al., 2012), entre outros.

Etilingera elatior (Jack) R. M. Smith, destaca-se dentre as Zingiberaceae como uma espécie tropical tropical, ornamental e medicinal, herbácea, rizomatosa, ereta, florífera e perene (Rescarolli & Zaffari, 2009; Chan et al., 2011a). A espécie é nativa da Malásia e Indonésia (Yunus et al., 2012; Santos et al., 2013) e conhecida popularmente como bastão-do-imperador. Possui quatro cultivares, ‘Porcelana’ (inflorescências com brácteas acetinadas de coloração rosa-claro); ‘Pink Torch’ (brácteas de coloração rosa-escura); ‘Red Torch’ (brácteas vermelhas); e ‘Tulip Torch Ginger’ (brácteas rubras, em formato de tulipa) (Lins & Coelho, 2003; Chan et al., 2011b; Ribeiro et al., 2012; Yunus et al., 2012).

Atualmente, *Etilingera elatior* é uma das 30 plantas medicinais mais populares na indústria farmacêutica, com elevada demanda na Malásia e recentemente tem cultivada em escala comercial na Austrália, Havaí, Tailândia e Costa Rica para a produção de flores de corte (Chan et al., 2011a; Yunus et al., 2012). No Brasil, vem sendo cultivada apenas para suprir a demanda da floricultura nacional, como flores de corte ou para paisagismo.

O bastão-do-imperador possui muitos fitoquímicos de propriedades antimicrobianas e antissépticas (Abdelwahab et al., 2010), sendo utilizado contra atividades citotóxicas, inibição da tirosinase (enzima que catalisa a oxidação de fenóis), atividades hepatoprotetoras, anti-hipertensivas e antioxidantes (Abdelmageed et al., 2011; Chan et al., 2011a; Chan et al., 2011b; Karim & Munir, 2011).

A cultura de tecidos é uma técnica alternativa de propagação das plantas e uma importante ferramenta para o melhoramento genético de bastão-do-imperador, no entanto, ainda são limitadas as informações tanto da cultura de tecidos quanto da propagação *in vitro* dessa espécie (Yunus et al., 2012).

Na propagação *in vitro*, o sistema de vedação convencional previne a desidratação das culturas e do meio de cultivo, além de evitar a contaminação (Zobayed,

2006; Pinheiro et al., 2013; Saldanha et al., 2013). Esse método tradicional, em que as plantas são produzidas em frascos vedados com reduzidas trocas gasosas, pode resultar em plantas com características peculiares, tais como parte aérea pouco desenvolvida, menor quantidade de cera cuticular e epicuticular nas folhas, redução nos tecidos com resistência mecânica (colênquima e esclerênquima), maior conteúdo de água, estômatos não funcionais e folhas delgadas e pequenas, com baixa atividade fotoautotrófica (Kozai & Kubota, 2001; Xiao et al., 2011). Nesse sistema convencional ocorre ainda elevada concentração de etileno e de outros gases voláteis no interior dos frascos; reduzida concentração de CO₂; elevadas concentrações de açúcares; restrita absorção de água e nutrientes; reduzido fluxo de fótons fotossinteticamente ativos e diminuição das trocas gasosas. Em consequência ocorre redução na taxa de crescimento e desenvolvimento, acarretando assim, elevadas perdas durante a aclimatização devido à mortalidade das plantas (Nguyen & Kozai, 2005; Zobayed, 2006; Kozai, 2010; Xiao et al., 2011). A pequena concentração de CO₂ no interior dos frascos associada à baixa incidência luminosa causa ainda redução nas taxas de transpiração e fotossíntese das plantas, forçando o crescimento heterotrófico ou fotomixotrófico, uma vez que a absorção da principal fonte de carbono disponível para a planta, se dá pela adição de açúcares ao meio de cultura (Nguyen & Kozai, 2005).

A produção *in vitro* de mudas sob baixa atividade fotossintética decorre principalmente da adição de concentrações elevadas de açúcares exógenos. Entretanto, destaca-se que a redução de açúcares no meio de cultivo pode ser vantajoso pois previne o rápido crescimento de bactérias e de fungos no meio de cultivo, reduz os custos e aumenta a sobrevivência das plantas durante o estágio de aclimatização (Kozai & Kubota, 2001). A redução do teor de sacarose ou mesmo a eliminação por completo, a utilização de luz natural, o aumento da concentração de CO₂, bem como a redução nas concentrações de O₂ *in vitro* são alternativas que visam melhorar o crescimento e a competência fotossintética de várias espécies.

Dessa forma, seria ideal para a propagação *in vitro* manter as mesmas condições ambientais de cultivo no campo, como: fluxo de fótons fotossinteticamente ativos, concentração de CO₂, manutenção das trocas gasosas, entre outras (Xiao et al., 2011). Para isso, vem sendo utilizadas membranas porosas permeáveis a gases (Kozai, 2010; Saldanha et al., 2012), pois elas permitem a maior eficiência das trocas gasosas, diminuindo o acúmulo de etileno no interior dos frascos de cultivo e, assim, facilitando a aclimatização das plantas produzidas (Xiao et al., 2011). O uso de tampas com

membranas porosas tem ainda influência positiva sobre estabelecimento das culturas, além de aumentar a qualidade e quantidade de brotos e diminuir a ocorrência de clorose e senescência foliar (Rodrigues et al., 2012). Assim, a aplicação de técnicas alternativas no processo de propagação *in vitro* convencional, e as consequências desfavoráveis ao desenvolvimento das plantas resultantes deste ambiente, poderiam ser minimizadas ou evitadas pela modificação do sistema convencional, aproximando-o ao máximo das condições de campo.

O objetivo desse estudo foi avaliar o potencial fotoautotrófico durante o alongamento e enraizamento de mudas de *Etilingera elatior* cv. Porcelana, propagadas *in vitro* em sistema de enriquecimento com CO₂, caracterizando as respostas morfofisiológicas das plantas submetidas a condições de crescimento heterotrófico, fotomixotrófico e fotoautotófico.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e condições de cultivo

Brotações de *Etilingera elatior* cv. Porcelana previamente estabelecidas *in vitro*, a partir de rizomas, foram subcultivadas a cada 30 dias, em condições heterotróficas, em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) acrescido com 6,66 μM de 6-benziladenina (BA), 0,54 μM de ANA, 3% de sacarose, 100 mg L^{-1} de mio-inositol e solidificado com 6,5 g L^{-1} de ágar Merck® (Darmstadt, Alemanha). O pH foi ajustado para 5,8, anteriormente à autoclavagem a 121 °C e 1,5 atm, por 15 minutos. O material vegetal foi mantido em sala de crescimento, com temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 horas, com irradiância luminosa de 36 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a partir de duas lâmpadas fluorescentes (Luz do Dia Especial, 40 W, Osram, Brazil).

Alongamento e enraizamento de bastão-do-imperador em caixas de ventilação forçada de ar

Os explantes utilizados foram brotações, com aproximadamente 3 cm de altura, contendo de três a quatro folhas, sem presença de raízes. Os explantes foram inoculados em frascos de vidro de 300 mL vedados com tampas rígidas de polipropileno sem orifício; e tampa rígida de polipropileno com dois orifícios cobertos por membranas porosas a gases, segundo proposto na metodologia de Saldanha et al. (2012). Foram adicionados aos frascos, 60 mL de meio MS acrescido com 0,54 μM de ANA, três doses de sacarose (0; 15 ou 30 g L^{-1}), 100 mg L^{-1} de mio-inositol e solidificado com 6,5 g L^{-1} de Agar Merck®, e o pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121 °C e 1,5 atm por 15 minutos. As culturas foram mantidas em sala de crescimento, por 45 dias, em duas caixas de ventilação forçada de ar (360 e 1000 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO_2), seguindo metodologia proposta por Saldanha et al. (2013) e Saldanha et al. (2014), com temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 horas e 60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de irradiância luminosa a partir de duas lâmpadas fluorescentes (Sylvania HO T12, Luz do Dia, 110 W, São Paulo, Brazil).

Parâmetros de crescimento

Aos 45 dias de cultivo foram avaliadas as seguintes características: altura da planta (cm), porcentagem de oxidação, número de brotos e massa fresca e seca da planta

(g). As amostras de massa seca foram determinadas após peso constante, alcançado em estufa a 70 °C, por 48 horas.

Quantificação de pigmentos fotossintéticos

Para a determinação dos pigmentos fotossintéticos, clorofila *a* e *b*, clorofilas totais e carotenoides, foi seguida a metodologia proposta por Wellburn (1994). Dois discos foliares (de uma folha do segundo e terceiro nó de folhas alternas completamente expandidas), com 6 mm de diâmetro cada, foram incubadas em 2 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) saturado com CaCO₃ (Santos et al., 2008), permanecendo em tubos mantidos no escuro por 48 horas, à temperatura ambiente. Após o período de incubação, foi determinada a absorvância das amostras em espectrofotômetro Genesys 10 UV/Visible (Thermo Scientific, Madison, WI) utilizando cubeta de quartzo de 10 mm de caminho ótico. Os comprimentos de ondas e as equações para o cálculo das concentrações de clorofilas *a*, *b*, clorofilas totais e carotenoides também foram baseados pela metodologia descrita por Wellburn (1994).

Caracterização anatômica, histoquímica e densidade estomática das folhas

Para os estudos anatômicos e histoquímicos, utilizou-se a porção média das folhas completamente expandidas (de uma folha do segundo e terceiro nó de folhas alternas em que foi utilizado para a variável de pigmentos fotossintéticos), sendo fixada em solução de Karnovsky (glutaraldeído 2,5% + paraformaldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,05 M, pH 7,2) (Karnovsky, 1965). Posteriormente, as amostras foram desidratadas em série etílica e incluídas em metacrilato (Historesin, Leica Instruments, Heidelberg, Alemanha). Para montagem das lâminas, cortes transversais da porção média das folhas, com 5 µm de espessura, foram obtidos em micrótomo rotativo de avanço automático (RM2155, Leica Microsystems Inc., Deerfield, EUA). Para a caracterização estrutural, as amostras foram coradas por 10 minutos em azul de toluidina pH 4,0 (O'brien & McCully, 1981). Para a caracterização histoquímica, secções transversais da porção média das folhas foram submetidas ao sudan black B, para evidenciar a presença de corpos lipídicos; ao ácido periódico/reagente de Schiff (PAS), para caracterizar a presença de amido, mucilagens, polissacarídeos; a dupla coloração com azul de toluidina e lugol, para evidenciar amido; e xylydine Ponceau (XP), para detecção de proteínas totais. As lâminas foram montadas com Permound e as

imagens capturadas utilizando fotomicroscópio (AX70TRF, Olympus Optical, Tóquio, Japão) equipado com o sistema U-Photo.

Para a variável densidade estomática (número de estômatos por mm² de área foliar), foi realizada a impressão das epidermes abaxial e adaxial, segundo Segatto et al. (2004). Para tal, utilizaram-se folhas (do segundo e terceiro nó de folhas alternas em que foi utilizado para as variáveis de pigmentos fotossintéticos e estudos anatômicos e histoquímicos), no qual foram coladas com cola instantânea sobre lâminas de vidro, técnica conhecida por impressão de epiderme. A densidade estomática foi calculada a partir de imagens realizadas utilizando o mesmo fotomicroscópio citado anteriormente.

Aclimatização das plantas

Aos 45 dias de cultivo *in vitro*, as plantas foram submetidas à etapa de aclimatização em condições *ex vitro*, transferindo-se para recipientes plásticos (de capacidade de 300 mL) contendo aproximadamente 260 cm³ de substrato comercial Plantmax[®], permanecendo em bancada, sob condições de temperatura ambiente (cerca de 28 ± 2 °C), luminosidade artificial de 50 μmol m⁻² s⁻¹ e luz natural indireta. Após esse período, realizou-se avaliação da variável porcentagem de sobrevivência à aclimatização.

Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 2 x 2 x 3, sendo duas concentrações de CO₂ (360 e 1000 μmol mol⁻¹), dois tipos de vedação (com tampas rígidas de polipropileno sem orifício sem membranas porosas; e tampa rígida de polipropileno com dois orifícios cobertos por membranas porosas a gases) e três concentrações de sacarose (0; 15 e 30 g L⁻¹). Para as variáveis altura da planta (cm), porcentagem de oxidação, número de brotos, massas fresca e seca da planta (g), foi realizado o DIC com 12 tratamentos, seis repetições cada, e a unidade experimental composta por um frasco contendo quatro plantas/repetição. (Tabela 1). Para pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*, *b*, clorofilas totais e carotenoides) também foi realizado com 12 tratamentos, com três repetições, e cada repetição composta por dois discos foliares. Já para a variável densidade estomática, também foi realizado DIC, com 12 tratamentos, três repetições, sendo cada repetição constituída de três áreas em mm². Já para a variável porcentagem de sobrevivência das plantas à aclimatização, realizou-se com 12 tratamentos, quatro repetições, e unidade experimental composta por

uma planta/repetição. Todas as variáveis avaliadas foram submetidas ao teste de Shapiro-Wilk, para verificar a normalidade dos dados.

Tabela 1. Tratamentos utilizados na caracterização das fases de alongamento e enraizamento *in vitro*, em caixas de ventilação forçada de ar, e de aclimatização de bastão-do-imperador, *Etilingera elatior* cv. Porcelana.

Código	Tratamento
T1	360 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ CO ₂ + tampa sem membrana + MS com 0 g L ⁻¹ sacarose
T2	360 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ CO ₂ + tampa sem membrana + MS com 15 g L ⁻¹ sacarose
T3	360 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ CO ₂ + tampa sem membrana + MS com 30 g L ⁻¹ sacarose
T4	360 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ CO ₂ + tampa com membrana MS com + 0 g L ⁻¹ sacarose
T5	360 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ CO ₂ + tampa com membrana MS com + 15 g L ⁻¹ sacarose
T6	360 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ CO ₂ + tampa com membrana + MS com 30 g L ⁻¹ sacarose
T7	1000 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ CO ₂ + tampa sem membrana + MS com 0 g L ⁻¹ sacarose
T8	1000 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ CO ₂ + tampa sem membrana + MS com 15 g L ⁻¹ sacarose
T9	1000 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ CO ₂ + tampa sem membrana + MS com 30 g L ⁻¹ sacarose
T10	1000 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ CO ₂ + tampa com membrana + MS com 0 g L ⁻¹ sacarose
T11	1000 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ CO ₂ + tampa com membrana + MS com 15 g L ⁻¹ sacarose
T12	1000 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ CO ₂ + tampa com membrana + MS com 30 g L ⁻¹ sacarose

Por não seguirem as pressuposições da normalidade, as variáveis porcentagens de oxidação e porcentagem de sobrevivência de plantas à aclimatização foram transformadas para \sqrt{x} ; e número de brotos para $\sqrt{x+0,5}$. Todas as variáveis foram submetidas à análise de variância, comparando-se as médias dos tratamentos pelo teste de Tukey ($p<0,05$), com exceção da variável porcentagem de sobrevivência das plantas à aclimatização, na qual utilizou-se o teste de Scott Knott, com 5% de significância. Os gráficos foram apresentados com médias não transformadas. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GENES (Cruz, 2013).

RESULTADOS

A atmosfera enriquecida com CO₂ melhora o desenvolvimento plantas de Etilingera elatior cv. Porcelana durante a fase de alongamento e enraizamento in vitro?

Pela análise de variância, as variáveis altura da planta e porcentagem de oxidação, diferiram ($p < 0,05$) apenas para a interação tipos de vedação e concentrações de sacarose, a 5% de probabilidade, pelo teste F. Para a variável número de brotos, ocorreram diferenças ($p < 0,05$) nas interações tipos de vedação e concentrações de sacarose; e concentrações de CO₂ e tipos de vedação. Já para a variável massa fresca da planta, houve diferença apenas para a interação concentrações de CO₂ e tipos de vedação. Para a massa seca da planta, houve diferença estatística, pelo teste F, apenas para concentrações de sacarose.

Para a variável porcentagem de oxidação observou-se que a utilização de membranas nas tampas dos frascos reduz a oxidação das plantas, com exceção da adição de 30 g L⁻¹ de sacarose ao meio de cultura, em que não houve diferença estatística entre os sistemas de vedação, tampa rígida sem membrana e tampa com membranas. A ausência de sacarose no meio de cultura, e o uso de frascos com tampa sem membrana resultou em 70,8% de plantas oxidadas. No entanto, o emprego de tampas com membranas resultou em menor porcentagem de oxidação das plantas, não apresentando diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 1A).

Com base nos resultados, constatou-se que para a variável altura da planta, observou-se que no sistema de vedação houve diferença significativa apenas para o tratamento sem adição de sacarose, em que o uso de tampa com membranas (5,82 cm) foi superior estatisticamente quando comparado a tampa sem membranas (3,73 cm). Para as concentrações de sacarose, 30 g L⁻¹ (5,37 cm) foi superior estatisticamente apenas quando comparado ao tratamento sem adição de sacarose em frascos com tampa sem membranas (3,73 cm). Quando utilizado tampa com membranas, não houve diferença significativa entre as concentrações de sacarose (Figura 1B).

Para o número de brotos, não houve diferença estatística entre os dois sistemas de vedação (tampa rígida sem membranas e com membranas) na atmosfera com 360 μmol mol⁻¹ de CO₂, diferente do observado sob enriquecimento de 1000 μmol mol⁻¹ de CO₂, em que o uso de tampa com membranas (1,521) foi superior estatisticamente quando comparado à tampa rígida sem membranas (0,9167). Quando comparadas as duas concentrações de CO₂, não houve diferença estatística quando se utilizou tampa

sem membranas. Diferente de quando se utilizou tampa com membranas, em que 1000 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO_2 (1,521) foi significativamente superior ao 360 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO_2 (0,494) (Figura 1C). Para o tipo de vedação, houve diferença estatística apenas para o tratamento sem adição de sacarose, em que o uso de tampa sem membranas inibiu a produção de novos brotos. Isso pode estar associado à elevada porcentagem de oxidação constatada nas plantas submetidas a essas condições. Para as concentrações de sacarose, no sistema de vedação com tampa sem membrana, 15 e 30 g L^{-1} , o número de brotos foi superior estatisticamente aos tratamentos sem adição de sacarose. Já para o sistema de vedação tampa com membranas, houve diferença estatística apenas para 15 g L^{-1} de sacarose, em que foi superior estatisticamente quando comparado aos tratamentos sem adição de sacarose (Figura 1D).

Para massa fresca da planta, quando foram comparadas as duas concentrações de CO_2 (360 e 1000 $\mu\text{mol mol}^{-1}$), verificou-se que não houve diferença significativa quando se utilizou a tampa sem membranas. Já quando se utilizou tampa com membranas, a atmosfera enriquecida com 1000 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO_2 (2,66 g) foi superior estatisticamente à de 360 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO_2 (1,80 g). Não houve diferença estatística entre os dois sistemas de vedação, tampa com e sem membranas, quando foi empregada atmosfera de 360 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO_2 . Já para 1000 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO_2 o uso de tampa com membranas (2,66 g) foi superior estatisticamente quando comparado a tampa rígida (1,96 g) (Figura 1E). Para a massa seca da planta, foi possível observar que as concentrações de sacarose 15 e 30 g L^{-1} (0,145 e 0,162 g, respectivamente) foram superiores estatisticamente aos tratamentos sem adição de sacarose ao meio de cultura (0,067 g) (Figura 1F).

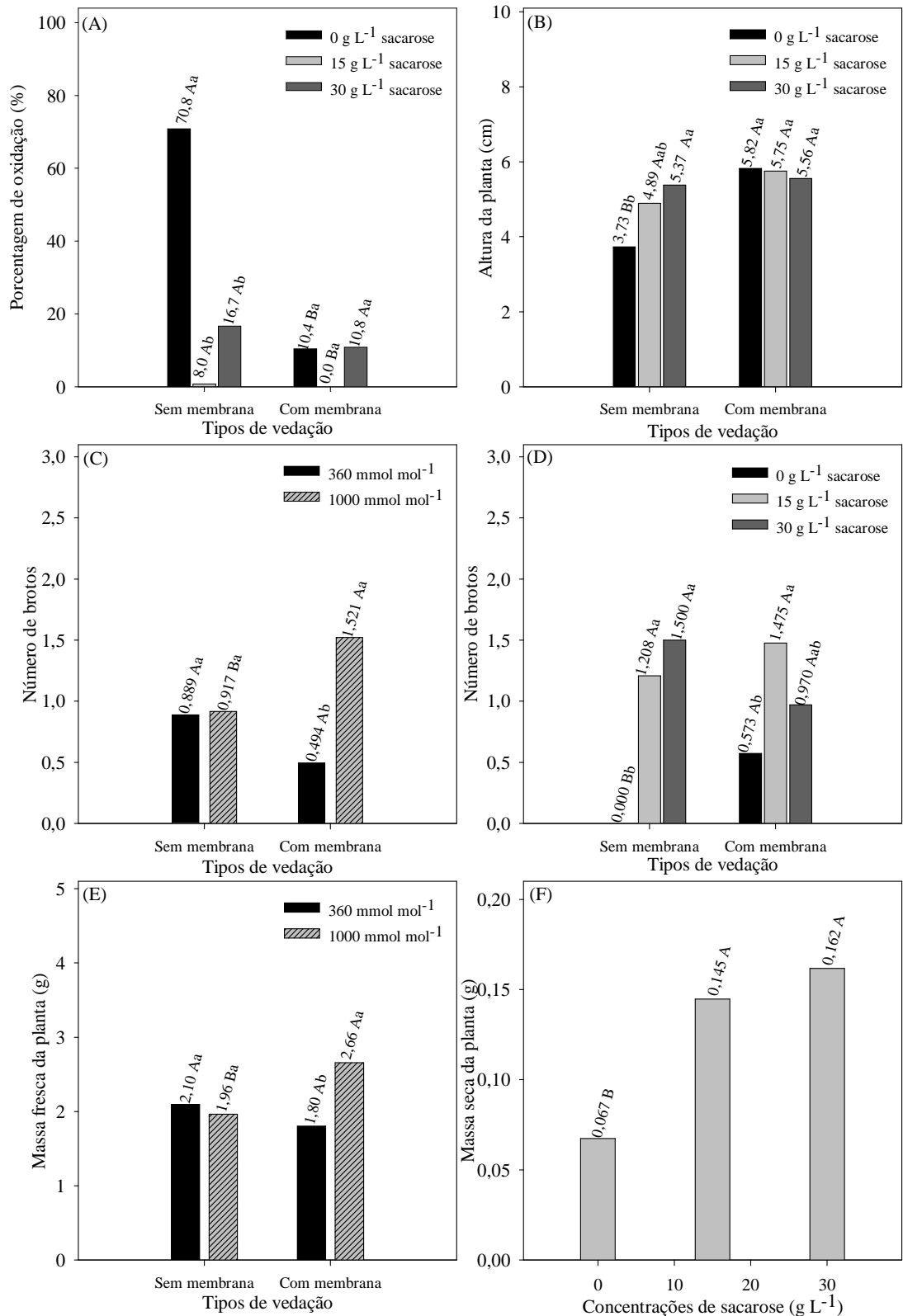


Figura 1. Variáveis de crescimento de plantas de *Etilingera elatior* cv. Porcelana, alongadas e enraizadas *in vitro* por 45 dias em diferentes concentrações de CO₂ e de sacarose no meio de cultura, e tipos de vedação dos frascos. Porcentagem de oxidação das plantas na interação tipos de vedação x concentrações de sacarose (A); Altura das

plantas na interação tipos de vedação x concentrações de sacarose (**B**); número de brotos nas interações concentrações de CO₂ x tipos de vedação (**C**) e tipos de vedação x concentrações de sacarose (**D**); massas fresca da planta, na interação concentrações de CO₂ x tipos de vedação (**E**) e seca da planta (**F**). (**A**; **B**; **D**) Médias na interação tipos de vedação x concentrações de sacarose: letras minúsculas em sacarose (0; 15 ou 30 g L⁻¹) e maiúsculas em tipos de vedação (sem ou com membrana) não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. (**C**; **E**) Médias na interação concentrações de CO₂ x tipos de vedação: letras minúsculas em concentrações de CO₂ (360 ou 1000 μmol mol⁻¹) e maiúsculas em tipos de vedação (sem ou com membrana) não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

*Atmosfera enriquecida com CO₂ aumenta os pigmentos fotossintéticos de plantas de *Etilingera elatior* cv. Porcelana durante a fase de alongamento e enraizamento in vitro?*

Os níveis de clorofila *a* e *b*, clorofilas totais e carotenoides (pigmentos fotossintéticos) foram afetados pelas condições de crescimento do presente trabalho, no qual ocorreram diferenças significativas ($p < 0,05$) na interação tripla da variável pigmentos fotossintéticos, entre concentrações de CO₂, tipos de vedação e concentrações de sacarose.

Para os pigmentos fotossintéticos, houve diferença estatística apenas para o tratamento tampa com membranas e 15 g L⁻¹ de sacarose, no qual 1000 μmol mol⁻¹ de CO₂ (65,04; 25,64; 90,68; 9,86 μM, para clorofila *a* e *b*, clorofilas totais e carotenoides, respectivamente) foi significativamente superior quando comparado ao mesmo tratamento na concentração 360 μmol mol⁻¹ de CO₂ (44,14; 17,49; 61,63; 6,17, respectivamente). O oposto foi observado no tratamento tampa com membranas e 30 g L⁻¹ de sacarose, no qual 360 μmol mol⁻¹ de CO₂ (58,81; 22,80; 81,61, para clorofila *a*, *b*, e clorofilas totais, respectivamente) no qual foi significativamente superior ao 1000 μmol mol⁻¹ de CO₂ (41,28; 15,68; 59,95, respectivamente). Já para carotenoides não houve diferença estatística para o tratamento tampa com membranas e 30 g L⁻¹ de sacarose (Figura 2).

Para a densidade estomática, não houve diferença significativa tanto para a face abaxial quanto para adaxial das folhas, a 5% de probabilidade pelo teste F. ou seja, mesmo nos tratamentos submetidos à atmosfera enriquecida com CO₂ não houve redução da densidade estomática de *Etilingera elatior* cv. Porcelana. Foram encontrados

estômatos em ambas as faces da folha, no entanto, foi constatado menor número de estômatos na porção adaxial, quando comparado a porção abaxial.

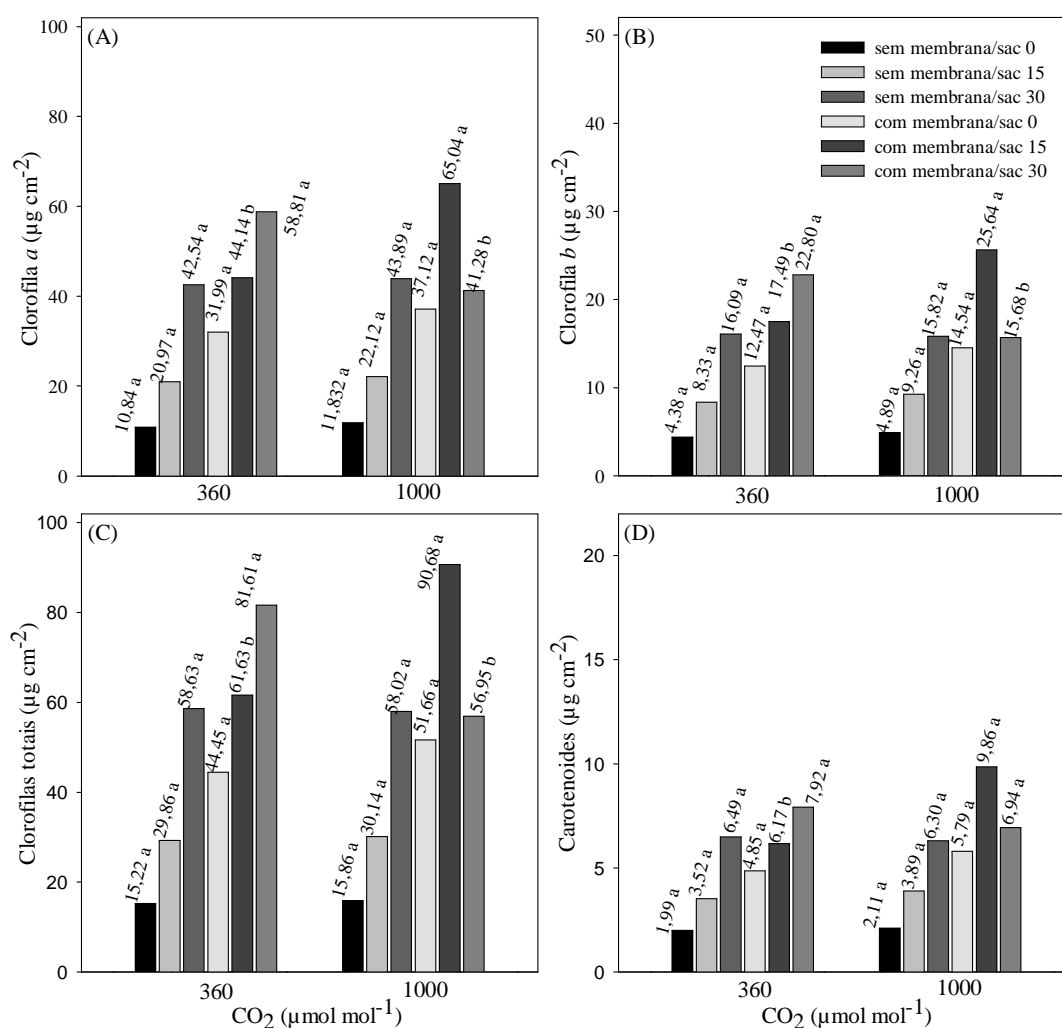


Figura 2. Pigmentos fotossintéticos em folhas de plantas de *Etilingera elatior* cv. Porcelana alongadas e enraizadas *in vitro* aos 45 dias em diferentes concentrações de CO₂ e condições de crescimento (tampas com e sem membranas e concentrações de sacarose). (A) clorofila a; (B) clorofila b; (C) clorofilas totais; (D) carotenoides. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Características morfológicas, anatômicas e histoquímicas das folhas de plantas de Etilingera elatior cv. Porcelana, diferem entre os tratamentos

O enriquecimento de CO₂, o tipo de vedação e a concentração de sacarose, ocasionaram mudanças significativas nas características de crescimento das plantas de

Etilingera elatior (Figura 3). Quando se utilizou membranas permeáveis a gases, juntamente com o aumento da concentração interna de CO₂ na atmosfera interna dos frascos, houve incremento do crescimento tanto em condições fotoautotróficas quanto em fotomixotróficas.

Foi possível observar, que nas plantas cultivadas em frascos vedados com tampa sem membranas (Figura 3A; 3B), apesar da formação de raízes, suas folhas não desenvolveram nervuras proeminentes quando comparadas aquelas mantidas em condições fotomixotróficas ou fotoautotróficas. Já em condições fotoautotróficas, com enriquecimento de CO₂ (360 ou 1000 μmol mol⁻¹ de CO₂) e ausência de sacarose, foi possível observar menor enraizamento nas plantas cultivadas sob condições fotoautotróficas (Figura 3C; 3D). Em direção oposta, em condições fotomixotróficas, sob enriquecimento de CO₂ e na presença de sacarose, foi possível observar plantas com maior enraizamento e com nervuras mais aparentes em suas folhas (Figura 3E-3H).

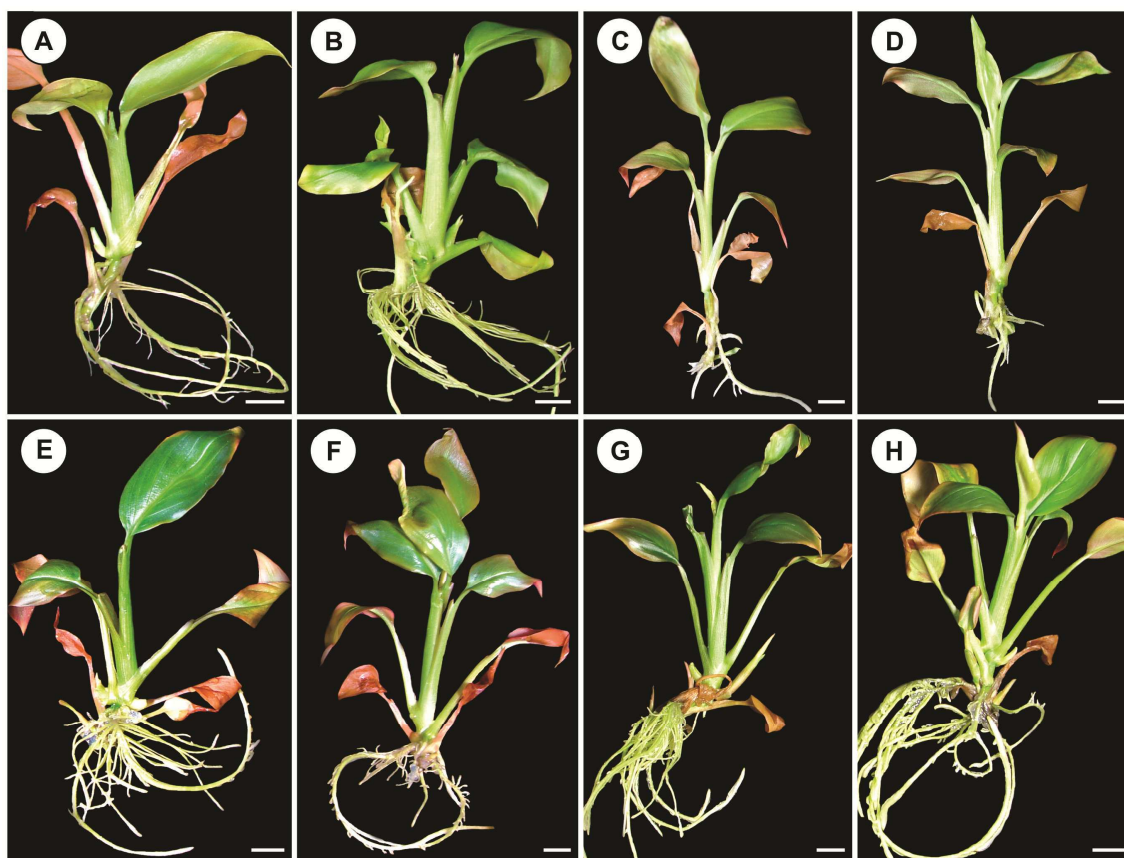


Figura 3. Plantas de *Etilingera elatior* cv. Porcelana aos 45 dias de cultivo *in vitro* durante alongamento e enraizamento em diferentes concentrações de CO₂ (360 e 1000 μmol mol⁻¹) e condições de crescimento (tipos de vedação e concentrações de sascarose). (A) Tampa sem membranas + 15 g L⁻¹ de sacarose; (B) Tampa sem

membranas + 30 g L⁻¹ de sacarose; (C) T4 - 360 μmol mol⁻¹ CO₂ + tampa com membranas + 0 g L⁻¹ sacarose; (D) T10 - 1000 μmol mol⁻¹ CO₂ + tampa com membranas + 0 g L⁻¹ sacarose; (E) T5 - 360 μmol mol⁻¹ CO₂ + tampa com membranas + 15 g L⁻¹ sacarose; (F) T11 - 1000 μmol mol⁻¹ CO₂ + tampa com membranas + 15 g L⁻¹ sacarose; (G) T6 - 360 μmol mol⁻¹ CO₂ + tampa com membranas + 30 g L⁻¹ sacarose; (H) T12 - 1000 μmol mol⁻¹ CO₂ + tampa com membranas + 30 g L⁻¹ sacarose. Barras: A-H: 10 mm.

Constatou-se epidermes abaxial e adaxial, parênquimas clorofilianos paliçádico e lacunoso, estômatos, câmaras subestomáticas, tecidos vasculares (floema e xilema) e idioblastos nas folhas das plantas de *Etilingera elatior* cv. Porcelana submetidas a todos os tratamentos (Figura 4). Entretanto, foi possível observar diferenças entre os tratamentos, demonstrando mudanças anatômicas na estrutura foliar das plantas. O enriquecimento da atmosfera com CO₂ e a utilização de tampas com membranas permeáveis a gases, ocasionaram diferenças no sistema vascular das folhas de *Etilingera elatior*. Quando foram utilizadas tampas sem membranas e sem a adição de sacarose, houve reduzida sobrevivência das plantas, devido à elevada porcentagem de oxidação observada nesses tratamentos.

No sistema convencional de cultivo, com a adição de sacarose ao meio de cultura em frascos com tampas sem membranas (Figura 4A-4D), no mesofilo são observados maiores espaços intercelulares, maior desorganização dos parênquimas clorofilianos (sem diferenciação aparente entre os parênquimas paliçádico e lacunoso), reduzida nervura mediana, quando comparado com as mesmas células de plantas cultivadas em frascos contendo meio de cultura com sacarose e vedados com tampas com membranas (Figura 4E-4P). Em frascos vedados com tampas com membranas e na ausência de sacarose ao meio de cultura, também foram detectadas desorganização dos parênquimas clorofilianos, espaços intercelulares aparentes, embora com nervura mediana desenvolvida e elevada vascularização (Figura 4E-4H). O enriquecimento de CO₂ (360 ou 1000 μmol mol⁻¹) resultou na produção de folhas com elevada vascularização, nervura mediana bem proeminente, elevado grau de organização e diferenciação dos parênquimas clorofilianos, e reduzidos espaços intercelulares, em comparação com plantas cultivadas no sistema convencional de propagação *in vitro* (Figura 4I-4P). Com exceção de plantas cultivadas em recipientes com meio de cultura

acrescido de 30 g L^{-1} de sacarose, com tampas com membranas e $1000 \mu\text{mol mol}^{-1} \text{ CO}_2$, em que foi observada nervura mediana menor, em comparação com as folhas de plantas cultivadas em $360 \mu\text{mol mol}^{-1} \text{ CO}_2$ (Figura 4P), sendo semelhante aos tratamentos convencionais de cultivos com tampa rígida e presença de sacarose (Figura 4A-4D).

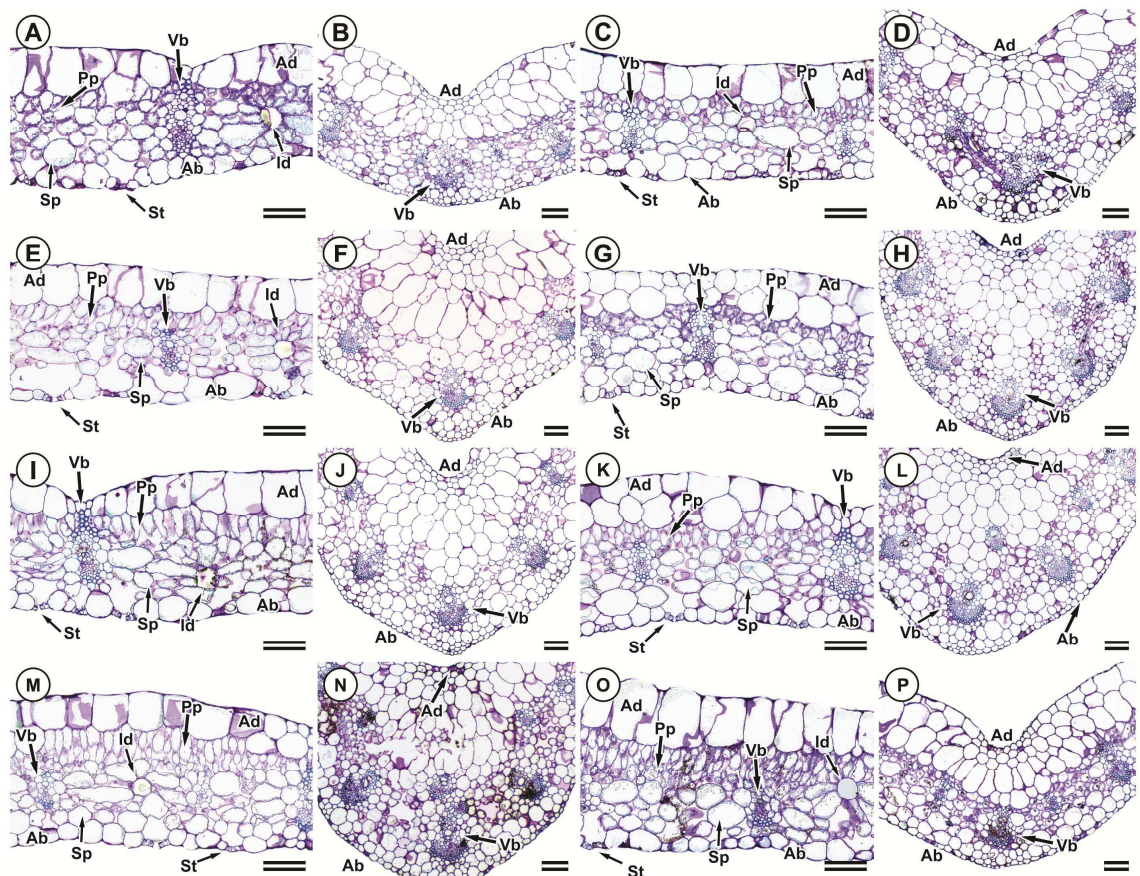


Figura 4. Secções transversais da porção mediana de folhas de plantas de *Etilingera elatior* cv. Porcelana durante a fase de alongamento e enraizamento aos 45 dias de cultivo *in vitro*, em diferentes concentrações de CO_2 (360 e $1000 \mu\text{mol mol}^{-1}$) e condições de crescimento (tipos de vedação e concentrações de sacarose) (A-B) Tampa sem membranas + 15 g L^{-1} de sacarose; (C-D) Tampa sem membranas + 30 g L^{-1} de sacarose; (E-F) T4 - $360 \mu\text{mol mol}^{-1} \text{ CO}_2$ + tampa com membranas + 0 g L^{-1} sacarose; (G-H) T10 - $1000 \mu\text{mol mol}^{-1} \text{ CO}_2$ + tampa com membranas + 0 g L^{-1} sacarose; (I-J) T5 - $360 \mu\text{mol mol}^{-1} \text{ CO}_2$ + tampa com membranas + 15 g L^{-1} sacarose; (K-L) T11 - $1000 \mu\text{mol mol}^{-1} \text{ CO}_2$ + tampa com membranas + 15 g L^{-1} sacarose; (M-N) T6 - $360 \mu\text{mol mol}^{-1} \text{ CO}_2$ + tampa com membranas + 30 g L^{-1} sacarose; (O-P) T12 - $1000 \mu\text{mol mol}^{-1} \text{ CO}_2$ + tampa com membranas + 30 g L^{-1} sacarose. A, C, E, G, I, J detalhes das

lâminas foliares; **B, D, F, H, J, L** detalhe da nervura mediana. Ab: face abaxial da epiderme; Ad: face adaxial da epiderme; Id: idioblasto; Pp: parênquima paliçádico; St: estômato; Sp: parênquima lacunoso; Vb: sistema vascular. Barras: A-P: 100 µm.

Testes histoquímicos indicaram a presença de compostos de reserva nas células do mesofilo das folhas de *Etilingera elatior*. No teste de azul de toluidina e lugol (Figura 5.1; 5.5; 5.9; 5.13; 5.17; 5.21; 5.25; 5.29), foram evidenciados grãos de amido no mesofilo, principalmente ao redor dos feixes vasculares, sendo possível observar apenas nos tratamentos T6, T11 e T12 (Figura 5.21; 5.25; 5.29, respectivamente). No entanto, para o tratamento T11, também foram observados grãos de amido distribuídos nos parênquimas paliçádico e lacunoso (Figura 5.25).

Confirmou-se a presença de corpos lipídicos armazenados no interior dos idioblastos, a partir do teste de sudan Black, sendo encontrados nas folhas de todos os tratamentos (Figura 5.2; 5.6; 5.10; 5.14; 5.18; 5.22; 5.26; 5.30). Corpos protéicos foram evidenciados pela reação positiva para o teste de XP, no qual foram corados de vermelho e se encontravam distribuídos no mesofilo, principalmente nas células ao redor dos feixes vasculares e no parênquima paliçádico (Figura 5.3; 5.7; 5.11; 5.15; 5.19; 5.23; 5.27; 5.31). Foi possível observar reação negativa para carboidratos gerais nas folhas de *Etilingera elatior*, a partir do teste de PAS em todos os tratamentos (Figura 5.4; 5.8; 5.12; 5.16; 5.20; 5.24; 5.28; 5.32).

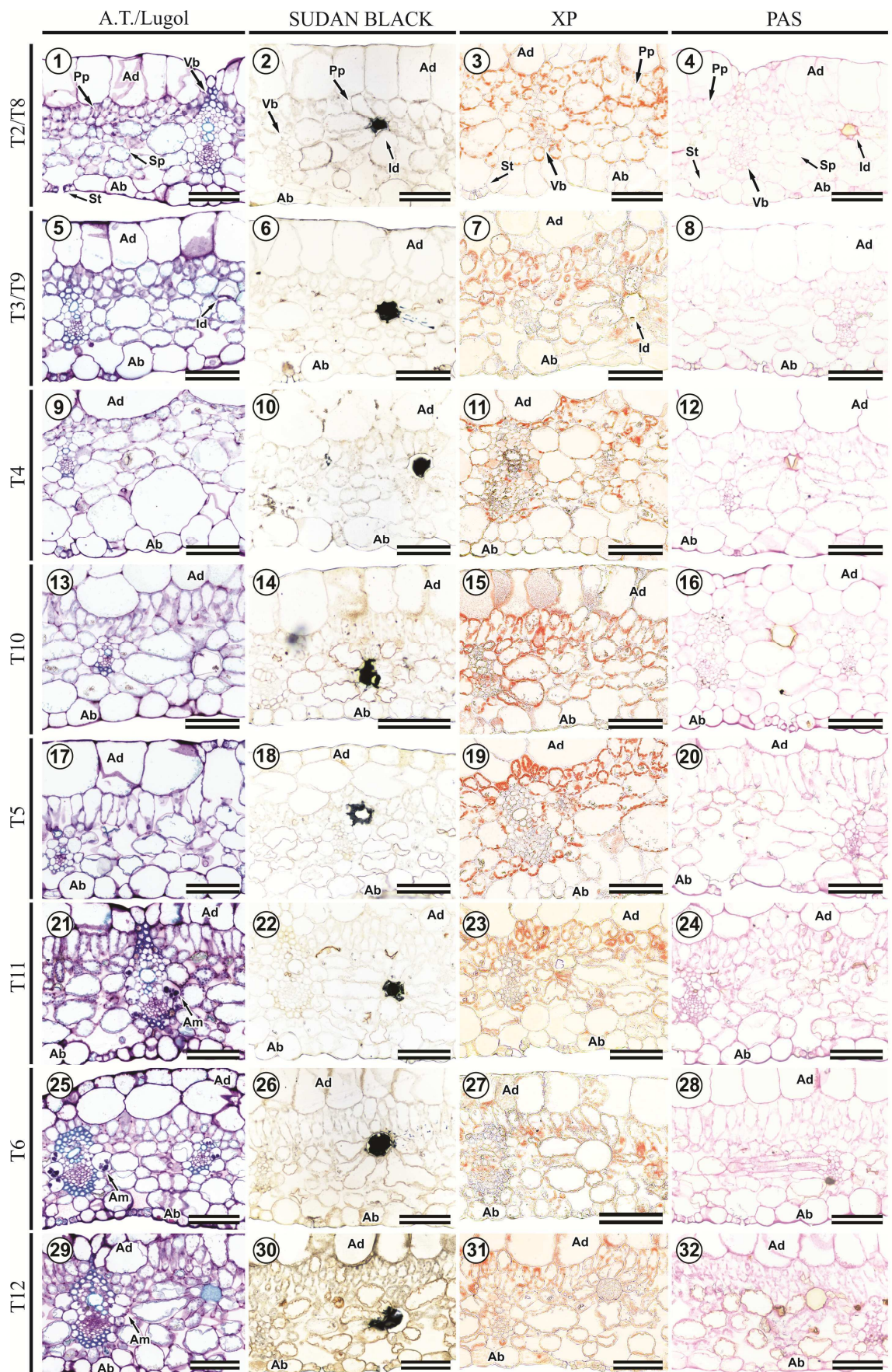


Figura 5. Estudo histoquímico de secções de folhas de plantas de *Etlingera elatior* cv. Porcelana, aos 45 dias de cultivo *in vitro*, durante alongamento e enraizamento em caixas de ventilação forçada de ar (360 e 1000 $\mu\text{mol mol}^{-1}$) em diferentes sistemas de vedação e concentrações de sacarose. Secções transversais da porção média de folhas submetidas ao azul de toluidina e lugol (1; 5; 9; 13; 17; 21; 25; 29), 21, 25 e 29 reação positiva para amido, evidenciada pela coloração roxa; sudan Black, reação positiva para lipídios pela coloração enegrecida dos idioblastos (2; 6; 10; 14; 18; 22; 26; 30); xylidine Ponceau, evidenciando reação positiva com corpos protéicos corados de vermelho (3; 7; 11; 15; 19; 23; 27; 31); e PAS, com reação negativa para carboidratos gerais (4; 8; 12; 16; 20; 24; 28; 32). Ab: face abaxial da epiderme; Ad: face adaxial da epiderme; Am: amido; Id: idioblasto; Pp: parênquima paliçádico; St: estômato; Sp: parênquima lacunoso; Vb: sistema vascular. Barras: 1-32: 100 μm .

Atmosfera enriquecida com CO₂ aumenta a sobrevivência de plantas de Etlingera elatior cv. Porcelana em condições ex vitro

Para a variável porcentagem de sobrevivência das plantas à aclimatização, foi possível observar que plantas submetidas aos tratamentos T6 (360 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ CO₂ + tampa com membrana + 30 g L⁻¹ sacarose); T11 (1000 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ CO₂ + tampa com membrana + 15 g L⁻¹ sacarose); e T12 (1000 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ CO₂ + tampa com membrana + 30 g L⁻¹ sacarose) não diferiram entre si a 5% de significância, alcançando médias de 50; 75 e 75% de sobrevivência, respectivamente (Figura 6; Figura 7). No entanto, os demais tratamentos não sobreviveram às condições submetidas de aclimatização.

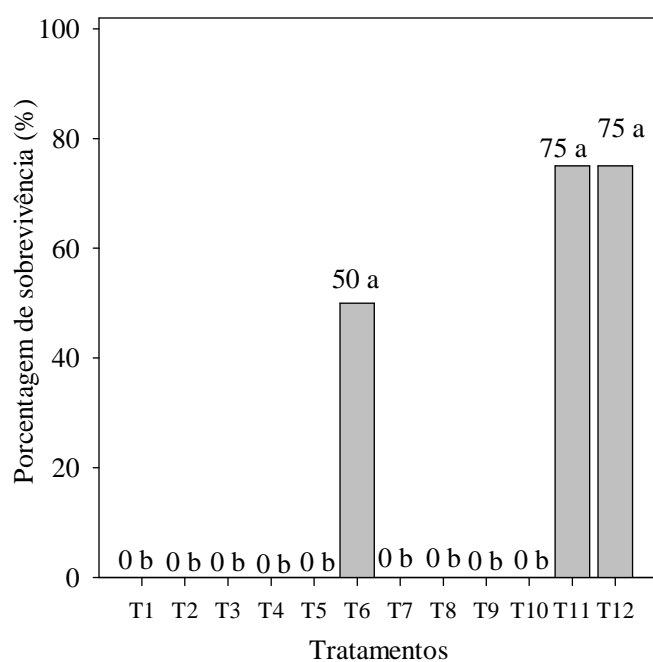


Figura 6. Porcentagem de sobrevivência à aclimatização das plantas de *Etilingera elatior* cv. Porcelana, após 45 dias de cultivo *in vitro* em diferentes concentrações de CO₂ e condições de crescimento (tipos de vedação e concentração de sacarose). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade.



Figura 7. Plantas de *Etilingera elatior* cv. Porcelana provenientes de cultivo *in vitro* durante 45 dias de alongamento e enraizamento em diferentes concentrações de CO₂ (360 e 1000 $\mu\text{mol mol}^{-1}$) e condições de crescimento (tipos de vedação e concentrações

de sacarose), aos 30 dias de aclimatização em casa de vegetação. **(A)** T6 - 360 $\mu\text{mol mol}^{-1} \text{CO}_2$ + tampa com membranas + 30 g L^{-1} sacarose; **(B)** T11 - 1000 $\mu\text{mol mol}^{-1} \text{CO}_2$ + tampa com membranas + 15 g L^{-1} sacarose; **(C)** T12 - 1000 $\mu\text{mol mol}^{-1} \text{CO}_2$ + tampa com membranas + 30 g L^{-1} sacarose. Barras: 10 mm.

DISCUSSÃO

A atmosfera enriquecida com CO₂ melhora o crescimento in vitro de plantas de Etilingera elatior cv. Porcelana, durante a fase de alongamento e enraizamento in vitro

Esse trabalho descreve pela primeira vez o efeito do enriquecimento de CO₂, sob ventilação forçada de ar, na propagação *in vitro* de *Etilingera elatior* cv. Porcelana. O emprego de concentrações de CO₂, com ou sem sacarose no meio de cultura, e o tipo de vedação dos frascos (com ou sem membranas permeáveis a gases), resultou em plantas com diferenças evidentes nos parâmetros de crescimento. Quando se utilizou membranas permeáveis a gases associada ao enriquecimento de CO₂ (principalmente 1000 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO₂), constatou-se melhora no crescimento das plantas em condições fotomixotróficas, principalmente quando foram propagadas em meio MS suplementado com 15 g L⁻¹ de sacarose (Figura 1, 6 e 7).

O ideal para a propagação *in vitro* seria produzir plantas sob as mesmas condições ambientais *ex vitro*, com a manutenção das trocas gasosas, níveis ideais de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos e concentração adequada de CO₂ (Xiao et al., 2011; Pinheiro et al., 2013). Para isso são utilizadas membranas porosas a gases, pois favorecem a manutenção da concentração adequada de CO₂; diminuem o acúmulo de etileno e reduzem a umidade relativa no interior dos frascos. Essas mudanças ocorrem devido a maior eficiência das trocas gasosas, que estimulam a fotossíntese, influenciando positivamente tanto o desempenho das plantas nas etapas *in vitro* quanto na aclimatização (Kozai & Kubota, 2001; Xiao et al., 2011).

O crescimento e desenvolvimento das plantas produzidas *in vitro* são afetados pela trocas gasosas entre o meio interno e externo dos frascos (Zobayed, 2006; Saldanha et al., 2012; Saldanha et al., 2013). O uso de membranas porosas a gases no cultivo *in vitro*, resulta em plantas maiores e mais vigorosas, com maior altura e acúmulo de biomassa, taxas de crescimento e fotossintética mais elevadas, estômatos normais e funcionais, folhas e raízes maiores e mais desenvolvidas, além de aumentar a absorção de nutrientes e estimular o metabolismo secundário (Ribeiro et al., 2009; Arigita et al., 2010; Kozai, 2010; Badr et al., 2011; Iarema et al., 2012; Saldanha et al., 2013; Saldanha et al., 2014).

Quando as plantas são produzidas sob elevadas trocas gasosas, pode-se induzir a um aumento de duas vezes da massa seca, quando comparada a produção de plantas em sistema convencional de cultivo *in vitro* (Nguyen et al., 1999). O mesmo foi observado

no presente trabalho, em que a massa fresca das plantas foi superior sob concentração de $1000 \mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO_2 com o uso de membranas permeáveis a gases. Já a massa seca das plantas foi maior sob suplementação de 15 e 30 g L^{-1} de sacarose ao meio de cultura, independente do tipo de vedação utilizado. Diferente do observado por Saldanha et al. (2012), em que o uso de membranas porosas a gases aumentou o peso seco da parte aérea de *Pfaffia glomerata*. Para Mohamed e Alsdon (2010) o maior peso seco das plantas de *Capsicum annum* foi observado sob enriquecimento de CO_2 que pode ter aumentado a atividade fotossintética das plantas.

No presente trabalho, o uso de membranas porosas a gases favoreceu o crescimento das plantas, tanto em condições fotomixotróficas quanto em fotoautotróficas sob elevadas concentrações de CO_2 , sendo o mesmo observado para *Pfaffia glomerata*, por Iarema et al. (2012) e Saldanha et al. (2013). No entanto, o sistema fotomixotrófico, em condições de enriquecimento de CO_2 associado à adição de carboidrato (15 ou 30 g L^{-1} de sacarose), favoreceu o melhor desenvolvimento morfo-fisiológico de plantas de bastão-do-imperador.

Atmosfera enriquecida com CO_2 aumenta os pigmentos fotossintéticos de plantas de Etlintera elatior cv. Porcelana durante a fase de alongamento e enraizamento in vitro

A variável pigmentos fotossintéticos é um bom indicador do estado funcional do aparato fotossintético das plantas (Alvarez et al., 2012). No presente trabalho, atmosfera enriquecida com 360 e $1000 \mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO_2 , uso de tampas com membranas porosas e meio de cultura suplementado com 15 e 30 g L^{-1} de sacarose promoveram elevados valores de pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*, *b*, clorofilas totais e carotenoides). O mesmo foi observado para *Persea americana*, no qual a redução de sacarose juntamente com o enriquecimento de CO_2 ($1000 \mu\text{mol mol}^{-1}$), promoveram elevação dos pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*, *b*, totais e carotenoides), aumentando a taxa fotossintética das plantas produzidas (De La Viña et al., 1999). Em *Pfaffia glomerata*, também foi observado maior teor de pigmentos em atmosfera enriquecida com CO_2 , indicando que essa condição estimula o crescimento fotoautotrófico das plantas (Saldanha et al., 2013; Saldanha et al., 2014). Para *Solanum tuberosum*, o estímulo da fotossíntese em condições fotomixotróficas proporcionou aumento dos pigmentos fotossintéticos, sendo dependente do enriquecimento da atmosfera com CO_2 , da redução da concentração de sacarose no meio de cultura (20 g L^{-1}) e da utilização de membranas permeáveis a gases (Mohamed & Alsdon, 2010). Em

Coffea arabusta também foi observado maior teor de clorofila em condições fotomixotróficas (Afreen et al., 2002).

Alguns autores relatam que em condições fotoautotróficas, o uso da concentração ideal de CO₂ associada à utilização de membranas porosas a gases, resulta em aumento da taxa fotossintética e conseqüentemente do crescimento das plantas (Kozai, 2010; Cha-Um et al., 2011). O aumento das trocas gasosas proporciona aumento na biossíntese de pigmentos das folhas produzidas *in vitro* (Ivanova & Staden, 2010; Mohamed & Alsadon, 2011; Saldanha et al., 2012). Por outro lado, em frascos com trocas gasosas reduzidas ocorre decréscimo dos pigmentos fotossintéticos, sendo observadas menores perdas de umidade e acúmulo de etileno (Zobayed et al., 1999; Chanemougasoundharam et al., 2004; Saldanha et al., 2012). Com isso, o reduzido teor de pigmentos fotossintéticos pode comprometer o desempenho das plantas durante a aclimatização *ex vitro*.

Características morfológicas, anatômicas e histoquímicas das folhas de plantas de Etilingera elatior cv. Porcelana, diferem entre os tratamentos

Para bastão-do-imperador, foram observadas mudanças na anatomia foliar no processo de alongamento e enraizamento *in vitro* em diferentes concentrações de CO₂, sacarose e tipos de vedação. Em condições fotomixotróficas, com enriquecimento de CO₂, presença de sacarose (15 ou 30 g L⁻¹) e frascos com tampas contendo membranas permeáveis a gases, foram produzidas plantas mais vigorosas, com maior enraizamento e folhas mais desenvolvidas e com nervuras mais aparentes. Saldanha et al. (2013), relataram que a concentração de CO₂, a presença de membranas porosas e a adição de sacarose no meio de cultura, levaram importantes alterações anatômicas nas folhas de *Pfaffia glomerata*. Nas condições de trocas gasosas, são produzidas plantas vigorosas com estruturas anatômicas diferenciadas, quando comparadas àquelas obtidas no sistema convencional de propagação *in vitro* (Ribeiro et al., 2009), em que são produzidas plantas de morfologia, anatomia e fisiologia anormais (Mohamed & Alsadon, 2010).

A utilização de membranas porosas associada às trocas gasosas produz células e tecidos mais diferenciados e organizados (Zobayed et al., 2001a) conduz maior deposição de parede celular na superfície das folhas, sistema vascular mais desenvolvido (Mills et al., 2004), parênquimas paliçádico e lacunoso mais definidos (Zobayed et al., 2001b), beneficiando a morfogênese *in vitro* das plantas, aumentando

assim, a taxa de sobrevivência durante o processo de aclimatização *ex vitro*. Ao contrário, na propagação *in vitro* convencional, são produzidas plantas com epiderme irregular; espaços intercelulares no mesofilo e na câmara subestomática, reduzida diferenciação do mesofilo e dos tecidos vasculares; associada à pequena deposição de cutícula e parede celular, resultando em uma estrutura mais delgada, portanto mais fácil de sofrer danos mecânicos (Ribeiro et al., 2009; Alvarez et al., 2012; Saldanha et al., 2013). Dessa forma, folhas anatomicamente bem desenvolvidas, oriundas de mudas cultivadas em frascos com membranas e em meio MS acrescido de reduzida concentração de sacarose aumentarão a sobrevivência das plantas durante a aclimatização *ex vitro* (Mohamed & Alsadon, 2010), devido também a maior deposição de cera epicuticular em ambas as superfícies da folha e melhor funcionamento dos estômatos (Yoon et al., 2009). Isso por que, em sistemas fotoautotrófico ou fotomixotrófico, o enriquecimento de CO₂ potencializa a produção em larga escala das plantas, reduzindo as perdas devido à desidratação, aumentando assim, a porcentagem de sobrevivência em condições *ex vitro* (Saldanha et al., 2013).

Semelhante ao descrito no presente trabalho, nas folhas de espécies de Zingiberaceae é comum a presença de idioblastos contendo compostos lipofílicos, dispostos no parênquima clorofiliano. Essas estruturas também foram observadas em *Alpinia zerumbet* (Albuquerque & Neves, 2004; Victorio et al., 2011) e em *Hedychium coronarium* (Martins et al., 2010), cultivadas em condições de campo.

O número de estômatos e o funcionamento estomático normal são características importantes para a sobrevivência das plantas no processo de aclimatização (Ribeiro et al., 2009). No presente trabalho, não houve diferença estatística para a variável densidade estomática entre os tratamentos. No entanto, em muitos trabalhos, pode-se observar diferenças quanto a densidade estomática das diferentes espécies estudadas. Por exemplo, em *Solanum melongena* e *Solanum tuberosum*, a maior densidade estomática foi constatada em frascos completamente vedados (Ribeiro et al., 2009; Mohamed & Alsadon, 2010). Já em *Brassica oleracea*, observaram-se densidade estomática 1,3 maior nas folhas das plantas cultivadas em frascos com membranas porosas a gases (Zobayed et al., 2001b). Para *Pfaffia glomerata*, ocorreu redução da densidade estomática em condições de enriquecimento de CO₂ e membranas porosas a gases (Saldanha et al., 2013). Já Saldanha et al. (2014) relatam que notavelmente a epiderme abaxial foi mais responsiva aos tratamentos de CO₂ (360 e 1000 $\mu\text{mol mol}^{-1}$).

A propagação *in vitro* de plantas em sistema convencional, sob elevada umidade relativa e baixa concentração de CO₂, pode proporcionar maior produção de estômatos, no entanto esses não são funcionais (Zobayed et al., 2000; Mohamed & Alsadon, 2010). Sob condições de enriquecimento de CO₂ o crescimento das plantas pode modificar a densidade estomática, podendo aumentar, diminuir ou permanecer inalterada, em comparação com plantas cultivadas em concentrações de CO₂ ambiente (Saldanha et al., 2013).

Atmosfera enriquecida com CO₂ aumenta a sobrevivência de plantas de Etilingera elatior cv. Porcelana em condições ex vitro

Plantas de bastão-do-imperador submetidas a condições *ex vitro*, foram aclimatizadas apenas em recipientes plásticos contendo substrato, sem qualquer prevenção da perda de umidade. Esse procedimento foi realizado com o objetivo de observar se as plantas que estavam submetidas àquelas condições tiveram algum ganho morfofisiológico, e assim, serem capazes de suportar ao estresse quando transferidas das condições *in vitro* para *ex vitro*. Nessas condições, apenas as plantas submetidas aos tratamentos com enriquecimento de CO₂ (360 ou 1000 $\mu\text{mol mol}^{-1}$) e adição de sacarose ao meio de cultura e uso de tampas com membranas (T6, T11 e T12) sobreviveram as condições de aclimatização *ex vitro*. O uso de tampas com membranas porosas a gases tem efeito positivo durante a aclimatização das plantas *ex vitro*, aumentando a taxa de sobrevivência (Shim et al., 2003; Zobayed, 2006; Alvarez et al., 2012), devido ao estímulo da capacidade fotossintética das plantas (Kozai, 2010; Xiao et al., 2011; Alvarez et al., 2012).

No presente trabalho, nesses mesmos tratamentos (T6, T11 e T12) os testes histoquímicos evidenciaram grãos de amido distribuídos no mesofilo e ao redor dos feixes vasculares, resultado da fotossíntese realizada já durante as condições *in vitro* sob enriquecimento de CO₂, sendo os mesmos tratamentos que sobreviveram as condições de aclimatização *ex vitro*. Outros autores relatam a presença de amido apenas durante a aclimatização *ex vitro* de plantas que passaram pelo enriquecimento de CO₂ (Yoon et al., 2009). Em muitas plantas o enriquecimento de CO₂ está associado ao aumento da atividade fotossintética, comprovado a partir da maior quantidade de clorofila *a*, *b* e totais (Suthar et al., 2009), com isso, ocorre a formação de grãos de amido nas folhas das plantas (Yoon et al., 2009), aumentando o teor de carboidratos. A suplementação exógena de sacarose aumenta a produção de reservas de amido em plantas propagadas

in vitro, favorecendo a transferência para condições *ex vitro*, e assim, acelerando adaptações fisiológicas e o sucesso da aclimatização (Yoon et al., 2009).

Em *Azadirachta indica*, o uso de membranas porosas a gases possibilitou o aumento da qualidade de brotos, pois diminuiu a ocorrência de clorose e senescência foliar, elevou o enraizamento das mudas, aumentando, assim, a taxa de sobrevivência na aclimatização para 80% (Rodrigues et al., 2012). O mesmo foi observado no presente trabalho, em que foram observadas porcentagem de sobrevivência de plantas de bastão-do-imperador de 50, 75 e 75% (T6, T11 e T12, respectivamente).

No sistema convencional de propagação *in vitro*, pode ocorrer elevadas taxas de mortalidade das plantas durante a fase de aclimatização. A elevada adição de sacarose adicionada ao meio de cultura é uma das causas para que isso ocorra (Badr et al., 2011). Por essa razão, a utilização de plantas de *Etlingera elatior* cv. Porcelana cultivadas sob enriquecimento de CO₂ (1000 μmol mol⁻¹), utilização de membranas permeáveis a gases e meio de cultura suplementado com 15 g L⁻¹ é ideal para fase de alongamento e enraizamento *in vitro* das plantas, o que irá aumentar a sobrevivência delas durante a aclimatização *ex vitro*.

Após o estabelecimento de protocolo de fotomixotrofia de *Etlingera elatior* cv. Porcelana espera-se melhorar o desempenho da capacidade fotossintética e o crescimento das plantas produzidas, e a partir daí promover maior da sobrevivência das plantas após a transferência das condições de *in vitro* para *ex vitro*.

Este é o primeiro estudo sobre a produção de mudas de *Etlingera elatior* cv. Porcelana sob atmosfera enriquecida com CO₂, em diferentes concentrações de sacarose e tipos de vedação dos frascos de cultivo, sendo observadas mudanças primordiais na anatomia das folhas das plantas produzidas em cada um desses tratamentos, buscando identificar quais características as plantas devem apresentar para se aproximarem daquelas produzidas sob condições naturais de campo.

Os resultados do presente estudo revelam que o crescimento fotomixotrófico do bastão-do-imperador 'Porcelana' pode ser realizado sob enriquecimento de CO₂ (1000 μmol mol⁻¹), vedados com membranas porosas a gases e submetidos em meio MS acrescido de 15 g L⁻¹ de sacarose, sendo alcançadas as melhores respostas para alongamento e enraizamento *in vitro* das plantas, o que irá aumentar a sobrevivência das plantas durante aclimatização *ex vitro*.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos; e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELMAGEED, A.H.A.; FARIDAH, Q.Z.; NUR AMALINA, A.; YAACOB, M. The influence of organ and post-harvest drying period on yield and chemical composition of the essential oils of *Etilingera elatior* (Zingiberaceae). **Journal of Medicinal Plants Research**, v.5, p.3432-3439, 2011.

ABDELWAHAB, S.I.; ZAMAN, F.Q.; MARIOD, A.A.; YAACOB, M.; ABDELMAGEED, A.H.; KHAMIS, S. Chemical composition, antioxidant and antibacterial properties of the essential oils of *Etilingera elatior* and *Cinnamomum pubescens* Kochummen. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.90, p.2682-2688, 2010.

AFREEN, F.; ZOBAYED, S.M.A.; KOZAI, T. Photoautotrophic culture of *Coffea arabusta* somatic embryos photosynthetic ability and growth of different stage embryos. **Annals of Botany**, v.90, p.11-19, 2002.

ALBUQUERQUE, E.S.B.; NEVES, L.J. Anatomia foliar de *Alpinia zerumbet* (Pers.) Burt & Smith (Zingiberaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v.18, p.109-121, 2004.

ALVAREZ, C.; SÁEZ, P.; SÁEZ, K.; SÁNCHEZ-OLATE, M.; RÍOS, D. Effects of light and ventilation on physiological parameters during in vitro acclimatization of *Gevuina avellana* mol. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.110, p.93-101, 2012.

ARIGITA, L.; CAÑAL, M.J.; TAMÉS, R.S.; GONZÁLEZ, A. CO₂-enriched microenvironment affects sucrose and macronutrients absorption and promotes autotrophy in the *in vitro* culture of kiwi (*Actinidia deliciosa* Chev. Liang and Ferguson). **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v.46, p.312-322, 2010.

BADR, A.; ANGERS, P.; DESJARDINS, Y. Metabolic profiling of photoautotrophic and photomixotrophic potato plantlets (*Solanum tuberosum*) provides new insights into acclimatization. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.107, p.13-24, 2011.

CHA-UM, S.; CHANSEETIS, C.; CHINTAKOVID, W.; PICCHAKUM, A.; SUPAIBULWATANA, K. Promoting root induction and growth of in vitro macadamia

(*Macadamia tetraphylla* L. 'Keaau') plantlets using CO₂-enriched photoautotrophic conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.106, p.435-444, 2011.

CHAN, E.W.C.; LIM, Y.Y.; WONG, S.K. Phytochemistry and pharmacological properties of *Etilingera elatior*: A review. **Pharmacognosy Journal**, v.3, p.6-10, 2011a.

CHAN, E.W.C.; NG, V.P.; TAN, V.V.; LOW, Y.Y. Antioxidant and antibacterial properties of *Alpinia galanga*, *Curcuma longa*, and *Etilingera elatior* (Zingiberaceae). **Pharmacognosy Journal**, v.3, p.54-61, 2011b.

CHANEMOUGASOUNDHARAM, A.; SARKAR, D.; PANDEY, S.K.; AL-BISKI, F.; HELALI, O.; MINHAS, J.S. Culture tube closure-type affects potato plantlets growth and chlorophyll contents. **Biologia Plantarum**, v.48, p.7-11, 2004.

CRUZ, C.D. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v.35, p.271-276, 2013.

DE LA VIÑA, G.; PLIEGO-ALFARO, F.; DRISCOLL, S.P.; MITCHELL, V.J.; PARRY, M.A.; LAWLOR, D.W. Effects of CO₂ and sugars on photosynthesis and composition of avocado leaves grown in vitro. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.37, p.587-595, 1999.

IAREMA, L.; DA CRUZ, A.C.F.; SALDANHA, C.W.; DIAS, L.L.C.; VIEIRA, R.F.; DE OLIVEIRA, E.J.; OTONI, W.C. Photoautotrophic propagation of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.110, p.227-238, 2012.

IVANOVA, M.; STADEN, J. Natural ventilation effectively reduces hyperhydricity in shoot cultures of *Aloe polyphylla* Schönland ex Pillans. **Plant Growth Regulation**, v.60, p.143-150, 2010.

JAAFAR, F.M.; OSMAN, C.P.; ISMAIL, N.H.; AWANG, K. Analysis of essential oils of leaves, stems, flowers and rhizomes of *Etilingera elatior* (Jack) R.M. **The Malaysian Journal of Analytical Sciences**, v.11, p.269-273, 2007.

KARIM, A.; MUNIR, S. A newly developed method for rapid propagation of an important culinary and medicinal herb (*Etilingera elatior*). **Insight Ethnopharmacology**, v.1, p.3-4, 2011.

- KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde–glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. **The Journal of Cell Biology**, v.27, p.127-128, 1965.
- KOZAI, T. Photoautotrophic micropropagation—environmental control for promoting photosynthesis. **Propagation of Ornamental Plants**, v.10, p.188-204, 2010.
- KOZAI, T.; KUBOTA, C. Development a photoautotrophic micropropagation system for woody plants. **Journal of Plant Research** v.114, p.525-537, 2001.
- LINS, S.R.O.; COELHO, R.S.B. Antracnose em inflorescências de bastão do imperador (*Etilingera elatior*): Ocorrência e métodos de inoculação. **Summa Phytopatológica**, v.29, p.355-358, 2003.
- MARTINS, M.B.G.; CARAVANTE, A.L.C.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; SOARES, M.K.M.; MOREIRA, R.R.D.; SANTOS, L.E. Caracterização anatômica e fitoquímica de folhas e rizomas de *Hedychium coronarium* J. König (Zingiberaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.12, p.179-187, 2010.
- MILLS, D.; YANQING, Z.; BENZONI, A. Improvement of jojoba shoot multiplication *in vitro* by ventilation. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v.40, p.386-402, 2004.
- MOHAMED, M.A.H.; ALSADON, A.A. Influence of ventilation and sucrose on growth and leaf anatomy of micropropagated potato plantlets. **Scientia Horticulturae**, v.123, p.295-300, 2010.
- MOHAMED, M.A.H.; ALSADON, A.A. Effect of vessel type and growth regulators on micropropagation of *Capsicum annuum*. **Biologia Plantarum**, v.55, p.370-374, 2011.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.
- NGUYEN, Q.T.; KOZAI, T. Photoautotrophic micropropagation of woody species. In: KOZAI, T.; AFREEN, F.; ZOBAYED, S.M.A. (Ed.). **Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation as a new micropropagation and transplant production system**. Dordrecht: Springer, 2005. p.123-146.

NGUYEN, Q.T.; KOZAI, T.; NIU, G.; NGUYEN, U.V. Photosynthetic characteristics of coffee (*Coffea arabusta*) plantlets *in vitro* in response to different CO₂ concentrations and light intensities. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.55, p.133-139, 1999.

O'BRIEN, T.P.; MCCULLY, M.E. **The study of plant structure principles and select methods**. Melbourne: Termarcarphi Pty Ltd, 1981 45p.

PINHEIRO, M.V.M.; MARTINS, F.B.; XAVIER, A.; OTONI, W.C. Trocas gasosas influenciam na morfogênese *in vitro* de duas cultivares de oliveira (*Olea europaea* L.). **Revista Árvore**, v.37, p.19-29, 2013.

RESCAROLLI, C.L.S.; ZAFFARI, G.R. Produção de mudas de *Etilingera elatior* (Jack) R.M. Sm. através da cultura de tecidos vegetais *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.11, p.190-195, 2009.

RIBEIRO, A.P.O.; PICOLI, E.A.T.; LANI, E.R.G.; VENDRAME, W.A.; OTONI, W.C. The influence of flask sealing on *in vitro* morphogenesis of eggplant (*Solanum melongena* L.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v.45, p.421-428, 2009.

RIBEIRO, T.R.; ALMEIDA, E.F.A.; FRAZÃO, J.E.M.; CARVALHO, J.G. Bastão-do-imperador. In: PAIVA, P.D.O.; ALMEIDA, E.F. (Ed.). **Produção de flores de corte**. Lavras: UFLA, 2012. p.90-103.

RODRIGUES, M.; COSTA, T.H.F.; FESTUCCI-BUSELLI, R.A.; SILVA, L.C.; OTONI, W.C. Effects of flask sealing and growth regulators on *in vitro* propagation of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v.48, p.67-72, 2012.

SALDANHA, C.W.; OTONI, C.G.; DE AZEVEDO, J.L.F.; DIAS, L.L.C.; DO RÊGO, M.M.; OTONI, W.C. A low-cost alternative membrane system that promotes growth in nodal cultures of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.110, p.413-422, 2012.

SALDANHA, C.W.; OTONI, C.G.; NOTINI, M.M.; KUKI, K.N.; CRUZ, A.C.F.; RUBIO NETO, A.; DIAS, L.L.C.; OTONI, W.C. A CO₂-enriched atmosphere improves *in vitro* growth of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v.49, p.433-444, 2013.

- SALDANHA, C.W.; OTONI, C.G.; ROCHA, D.I.; CAVATTE, P.C.; DETMANN, K.D.S.C.; TANAKA, F.A.O.; DIAS, L.L.C.; DAMATTA, F.M.; OTONI, W.C. CO₂-enriched atmosphere and supporting material impact the growth, morphophysiology and ultrastructure of *in vitro* Brazilian-ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] plantlets. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (In Press)**, 2014.
- SANTOS, E.M.; AZEVEDO, B.M.; MARINHO, A.B.; CARVALHO, A.C.P.P.; SARAIVA, K.R. Aclimatização de mudas micropropagadas de bastão do imperador em diferentes volumes de recipientes. **Revista Ceres**, v.60, p.134-137, 2013.
- SANTOS, R.P.; CRUZ, A.C.F.D.; IAREMA, L.; KUKI, K.N.; OTONI, W.C. Protocolo para extração de pigmentos foliares em porta-enxertos de videira micropropagados. **Revista Ceres**, v.55, p.356-364, 2008.
- SEGATTO, F.B.; BISOGNIN, D.A.; BENEDETTI, M.; COSTA, L.C.; RAMPELOTTO, M.V.; NICOLOSO, F.T. Técnica para o estudo da anatomia da epiderme foliar de batata. **Ciência Rural**, v.34, p.1597-1601, 2004.
- SHIM, S.-W.; HAHN, E.-J.; PAEK, K.-Y. *In vitro* and *ex vitro* growth of grapevine rootstock '5BB' as influenced by number of air exchanges and the presence or absence of sucrose in culture media **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.75, p.57-62, 2003.
- SUTHAR, R.K.; RATHORE, P.; PUROHIT, S.D. *In vitro* growth and shoot multiplication in *Terminalia bellerica* Roxb under controlled carbon dioxide environment. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.47, p.204-209, 2009.
- VICTORIO, C.P.; ARRUDA, R.C.O.; RIEHL, C.A.S.; LAGE, C.L.S. Leaf volatiles and secretory cells of *Alpinia zerumbet* (Pers.) Burtt et Smith (Zingiberaceae). **Natural Product Research**, v.25, p.939-948, 2011.
- WELLBURN, A.R. The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **Journal of Plant Physiology**, v.144, p.307-313, 1994.
- XIAO, Y.; NIU, G.; KOZAI, T. Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.105, p.149-158, 2011.

YOON, Y.-J.; MOBIN, M.; HAHN, E.-J.; PAEK, K.-Y. Impact of *in vitro* CO₂ enrichment and sugar deprivation on acclimatory responses of *Phalaenopsis* plantlets to *ex vitro* conditions. **Environmental and Experimental Botany**, v.65, p.183-188, 2009.

YUNUS, M.F.; AZIZ, M.A.; KADIR, M.A.; RASHID, A.A. In vitro propagation of *Etilingera elatior* (Jack) (torch ginger). **Scientia Horticulturae**, v.135, p.145-150, 2012.

ZOBAYED, S. Aeration in plant tissue culture. In: DUTTA GUPTA, S.; IBARAKI, Y. (Ed.). **Plant tissue culture engineering**. Dordrecht: Springer, 2006. p.313-327.

ZOBAYED, S.M.A.; AFREEN-ZOBAYED, F.; KUBOTA, C.; KOZAI, T. Mass propagation of *Eucalyptus camaldulensis* in a scaled-up vessel under *in vitro* photoautotrophic condition. **Annals of Botany**, v.85, p.587-592, 2000.

ZOBAYED, S.M.A.; AFREEN, F.; KOZAI, T. Physiology of *Eucalyptus* plantlets grown photoautotrophically in a scaled-up vessel. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v.37, p.807-813, 2001a.

ZOBAYED, S.M.A.; ARMSTRONG, J.; ARMSTRONG, W. Evaluation of a closed system, diffusive and humidity-induced convective throughflow ventilation on the growth and physiology of cauliflower *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.59, p.113-123, 1999.

ZOBAYED, S.M.A.; ARMSTRONG, J.; ARMSTRONG, W. Leaf anatomy of *in vitro* tobacco and cauliflower plantlets as affected by different types of ventilation. **Plant Science**, v.161, p.537-548, 2001b.

CAPÍTULO II

Caracterização anatômica da embriogênese somática de antúrio ‘Eidibel’ [*Anthurium andraeanum* (Linden ex André)] (Araceae)

Resumo - A caracterização das alterações cito-histológicas ocorrentes em explantes cultivados *in vitro* tem permitido melhor entendimento e elucidação da aquisição de competência e indução de eventos morfogênicos *in vitro*. Todavia, para *Anthurium* (antúrio) essa informação ainda é inexistente na literatura. Desta forma, objetivou-se a caracterização estrutural e histoquímica da origem e do padrão de divisão celular durante a indução da embriogênese somática indireta em antúrio. Como explantes, foram utilizados segmentos nodais cultivados em meio Pierik, com 10 µM de ANA, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 2% de sacarose e solidificado com 6,5 g L⁻¹ de ágar Merck®. As culturas foram mantidas em sala de crescimento à temperatura de 25 ± 2 °C, por 90 dias no escuro. A embriogênese somática ocorreu a partir de células do meristema axilar. Aos 15 dias de cultivo, observaram-se início da divisão celular. Aos 30 dias observaram-se divisões celulares no sentido periclinal da protoderme e periclinais e anticlinais do meristema axilar. A partir dos 40 dias também foi possível observar divisões celulares periclinais e anticlinais no meristema axilar, e formação do procâmbio nos calos embriogênicos. Aos 55 dias foi visualizada a formação de embriões somáticos, com protoderme bem delimitada e calos embriogênicos com presença de procâmbio. Aos 90 dias, foram evidenciados embriões somáticos com estrutura completamente definida (protoderme e procâmbio). Os testes histoquímicos indicaram presença de grãos de amido apenas nas células do meristema axilar quando começaram as divisões celulares no meristema axilar. Nos calos embriogênicos observaram-se corpos protéicos e grãos de amido. Esses resultados revelaram a origem embriogênica e as mudanças que ocorrem durante as diferentes etapas da indução de embriogênese somática em antúrio.

Palavras-chave: Morfogênese, anatomia vegetal, histoquímica, ultraestrutura, mobilização de reservas

Anatomical characterization of somatic embryogenesis of anthurium 'Eidibel'

[*Anthurium andraeanum* (Linden ex André)] (Araceae)

Abstract – Characterization of cytohistological changes occurring in explants cultured *in vitro* has been elucidated the acquisition of competence and the induction of morphogenic events *in vitro*. However, for anthurium this information is still lacking in the literature. Therefore, it was aimed the structural and histochemical characterization of the origin and pattern of cell division during indirect somatic embryogenesis induction in anthurium. Nodal segments were used as explants and cultured on Pierik medium with 10 μM NAA, 100 mg L^{-1} myo-inositol, 2% of sucrose and solidified with 6.5 g L^{-1} agar MerckTM. Cultures were maintained in growth room at 25 ± 2 °C for 90 days in the dark. Somatic embryogenesis occurred from cells of the axillary meristem. After 15 days of culture, was observed the beginning of cell division. At 30 days, were observed cell divisions in the periclinal direction in protoderm and in periclinal and anticlinal direction in axillary meristem. From 40 days, was also observed periclinal and anticlinal cell divisions in axillary meristem, and procambium formation in embryogenic callus. At 55 days, the formation of somatic embryos with well-defined protoderm and embryogenic callus with the presence of procambium were observed. At 90 days, somatic embryos with completely defined structure (protoderm and procambium) were detected. The histochemical tests indicated the presence of starch grains only when started cell divisions started in there. In embryogenic callus there were proteic bodies and starch grains. These results show the embryogenic origin and the changes that occur during different stages of somatic embryogenesis induction in anthurium.

Keywords: Morphogenesis, plant anatomy, histochemistry, ultrastructure, reserve mobilization

INTRODUÇÃO

O gênero *Anthurium* Schott. (Araceae) é constituído por plantas herbáceas tropicais, epífitas ou hemiepífitas e nativas de regiões quentes da América Tropical (Castro et al., 2004; Tombolato et al., 2004; Nhut et al., 2006; Liendo & Mogollón, 2009; Maira et al., 2010). A maioria das 600 espécies do gênero *Anthurium* é ornamental e, dentre essas, cerca de 130 ocorrem no Brasil (Castro et al., 2004; Tombolato et al., 2004; Pinheiro et al., 2014). As principais espécies cultivadas pelo elevado valor das hastes florais são o *Anthurium andraeanum* e o *A. scherzerianum* (Martin et al., 2003), sendo importante fonte de renda em diversos países.

O *Anthurium andraeanum* sobrepuja as demais espécies do seu gênero pela preferência do público devido ao tamanho e à coloração das brácteas de suas inflorescências, bem como pela durabilidade pós-colheita (em média de 20 a 30 dias, podendo alcançar 40 dias), tornando-se uma das espécies desse gênero mais cultivadas como flor de corte e plantas de vaso (Castro et al., 2004; Junqueira & Peetz, 2008; Assis et al., 2011). O *Anthurium andraeanum* cv. Eidibel é uma planta vigorosa, de porte médio, crescimento rápido, com espata cordiforme de tamanho médio, com textura grossa e boa enervação, de coloração vermelho forte e espádice branca (Tombolato et al., 2004). Tais características possibilitaram que a cultivar Eidibel se tornasse a mais cultivada em todo o Brasil (Tombolato et al., 2004; Junqueira & Peetz, 2008).

Grande parte das mudas de antúrio disponíveis no mercado é produzida por técnicas de cultura de tecidos (Maira et al., 2010), sendo principalmente propagado por organogênese indireta a partir de segmentos foliares (Pierik et al., 1974; Pierik, 1975; Tombolato & Quirino, 1996; Nhut et al., 2006; Atak & Çelik, 2009; Liendo & Mogollón, 2009). A embriogênese somática de *Anthurium* foi descrita a partir da década de 90, em explantes de folha (Kuehnle et al., 1992; Weijie et al., 2006; Duquenne et al., 2007; Bautista et al., 2008; Beyramizade et al., 2008; Pinheiro et al., 2014), pecíolo, raiz, segmento nodal e internodal (Fitch et al., 2011; Pinheiro et al., 2014). O segmento nodal é o explante mais indicado para a indução de embriogênese somática em *Anthurium andraeanum* cv. Eidibel (Pinheiro et al., 2014).

A embriogênese somática é uma técnica por meio da qual uma única célula vegetal ou grupo de células dá origem ao embrião somático, uma estrutura bipolar organizada, sem conexões com o tecido materno, sendo morfológicamente semelhante ao embrião zigótico (Gaj, 2004; Ma et al., 2012; Alcantara et al., 2014). Além de ser

uma ferramenta bastante útil em sistemas de propagação *in vitro*, a embriogênese somática apresenta grandes vantagens para o desenvolvimento de diferentes pesquisas em plantas (Ninković et al., 2010), como: produção de sementes sintéticas; conservação de germoplasma por criopreservação; manipulação genética, pelo desenvolvimento de plantas transgênicas, entre outras (Quiroz-Figueroa et al., 2006; Bakhshaie et al., 2010; Capelo et al., 2010; Khan et al., 2010; Ming-Hua & Sen-Rong, 2010; Parimalan et al., 2010; Sen-Rong & Ming-Hua, 2012). A produção de plantas pela técnica da embriogênese somática é aplicada com sucesso na regeneração de muitas espécies (Yang et al., 2010), devido ao eficiente sistema de produção de plantas em larga escala (Pinto et al., 2011; Rocha et al., 2012). Além disso, a embriogênese somática é um sistema ideal para estudo das características morfológicas, fisiológicas, moleculares e bioquímicas envolvidas durante a diferenciação celular (Zakizadeh et al., 2010; You et al., 2011; Rocha et al., 2012).

A descrição das alterações celulares que ocorrem durante a embriogênese somática pode levar a conhecimentos relevantes, gerando importante base para os estudos citados anteriormente. Existe a necessidade de confirmar a morfologia das células a fim de distinguir células competentes daquelas que falharam durante a resposta embriogênica (Jalil et al., 2008). Estudos anatômicos e ultraestruturais têm contribuído para a compreensão dos mecanismos básicos envolvidos na aquisição de competência embriogênica e no progresso das fases específicas da embriogênese somática (Jalil et al., 2008; Maciel et al., 2010; Rocha et al., 2012). Já os testes histoquímicos têm permitido observar a mobilização das reservas durante a embriogênese somática (Rocha et al., 2012).

Estudos histológicos têm sido utilizados para descrever a transição de células somáticas em embriogênicas de muitas espécies, como *Camellia japonica* (Barciela & Vieitez, 1993), *Carica papaya* (Fernando et al., 2001), *Glycine max* (Fernando et al., 2002), *Vitis vinifera* (Jayasankar et al., 2003), *Cocos nucifera* (Sáenz et al., 2006), *Phoenix dactylifera* (Sané et al., 2006), *Capsicum chinense* (Santana-Buzzy et al., 2009), *Acrocomia aculeata* (Moura et al., 2008; Moura et al., 2010), *Musa* spp. (Jalil et al., 2008; Xu et al., 2011), *Passiflora cincinnata* (Rocha et al., 2012), entre outras.

Dados sobre as características estruturais da indução de embriogênese somática de *Anthurium andraeanum* e suas características ainda são escassos, especialmente quanto as características anatômicas, histoquímicas e ultraestruturais. Esses

conhecimentos fornecerão informações relevantes do processo de diferenciação celular e da formação dos embriões somáticos de *Anthurium*.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a origem e o padrão de divisão celular durante a indução da embriogênese somática indireta a partir de segmentos nodais de *Anthurium andraeanum* cv. Eidibel, para determinar as alterações estruturais e o acúmulo de reservas envolvidos durante a ontogênese dos calos embriogênicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e condições de cultivo

Como material vegetal, foram utilizados segmentos nodais de *Anthurium andraeanum* cv. Eidibel previamente estabelecidas *in vitro* a partir da organogênese indireta de folhas jovens, seguindo a metodologia proposta por Tombolato et al. (1998), sendo cedidas pelo Instituto Agronômico (IAC), em Campinas.

Após o estabelecimento *in vitro* da cultura, as plantas foram subcultivadas a cada 30 dias, em meio contendo macro, micronutrientes e vitaminas Pierik (Pierik, 1976), acrescido de 4,44 μM de 6-benziladenina (BA), 0,54 μM de ácido α -naftalenoacético (ANA), 2% de sacarose, 100 mg L^{-1} de mio-inositol e solidificado com 6,5 g L^{-1} de ágar Merck[®] (Darmstadt, Alemanha). O pH foi ajustado para 5,8, anteriormente à autoclavagem a 121 °C e 1,5 atm por 15 minutos. O material vegetal foi mantido em sala de crescimento, com temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 horas e irradiância de 36 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a partir de duas lâmpadas fluorescentes (Luz do Dia Especial, 40 W, Osram, Brazil).

Indução de embriogênese somática

Seguindo a metodologia proposta por Pinheiro et al. (2014) para a indução de embriogênese somática em *Anthurium andraeanum* cv. Eidibel, segmentos nodais com aproximadamente 1,0 cm de comprimento contendo uma gema (meristema axilar) (Figura 1A), foram inoculados, sob condições assépticas, em placas de Petri de 90 x 15 mm (J. Prolab, Curitiba, Brazil) contendo 25 mL de meio Pierik acrescido de 10 μM de ANA, 2% de sacarose, 100 mg L^{-1} de mio-inositol e solidificado com 6,5 g L^{-1} de ágar Merck[®] e o pH ajustado para 5,8, e autoclavado a 121 °C e 1,5 atm, por 15 minutos. Em cada placa de Petri foram inoculados nove segmentos nodais dispostos horizontalmente na superfície do meio. As culturas foram mantidas em sala de crescimento no escuro, à temperatura de 25 ± 2 °C, por 90 dias.

Os registros fotográficos de segmentos nodais e calos embriogênicos foram obtidos em microscópio estereoscópio (modelo Olympus SZX) com sistema de captura de imagens acoplado (modelo Olympus E-330).

Preparo das amostras para análises histológicas

Para os estudos anatômicos e ultraestruturais da embriogênese somática em *Anthurium andraeanum*, explantes de segmentos nodais foram coletados a cada cinco dias após a inoculação em meio de indução da embriogênese somática. As amostras foram fixadas em solução de Karnovsky modificado (glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,05 M, pH 7,2) (Karnovsky, 1965).

Microscopia de luz

Para os estudos anatômicos e histoquímicos amostras fixadas aos 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 e 90 dias (três amostras por data) foram desidratadas em série etílica e incluídas em metacrilato (Historesin, Leica Instruments, Heidelberg, Alemanha). Para montagem das lâminas, cortes longitudinais de 5 µm foram obtidos em micrótomo rotativo de avanço automático (RM2255, Leica Microsystems Inc., Deerfield, EUA). Para a caracterização estrutural, as amostras foram mantidas por 10 minutos e coradas com azul de toluidina pH 4,4 (O'Brien & McCully, 1981). Para a caracterização histoquímica, os cortes longitudinais das amostras fixadas foram submetidos ao sudan black B, para evidenciar a presença de corpos lipídicos; ao ácido periódico/reagente de Schiff (PAS), para caracterizar a presença de polissacarídeos gerais (Feder & O'Brien, 1968); lugol, para evidenciar amido; xylydine Ponceau (XP), para detecção de proteínas totais (Vidal, 1977); e vermelho de rutênio para comprovar a presença de substâncias pécticas (Rawlins & Takahashi, 1952).

A captura de imagens foi realizada utilizando fotomicroscópio (AX70TRF, Olympus Optical, Tóquio, Japão) equipado com o sistema U-Photo.

Microscopia eletrônica de varredura

As amostras, fixadas aos 0, 15, 30, 55 e 90 dias (três amostras por data) após indução da embriogênese somática, foram desidratadas em série acetônica até acetona 100%. Os fragmentos foram secos ao ponto crítico, utilizando-se CO₂ (CPD 030, Bal-Tec, Balzers, Alemanha) e, posteriormente, metalizadas com ouro (FDU 010 Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein). As observações e a documentação fotográfica foram conduzidas utilizando o microscópio eletrônico de varredura (Leo 1430 VP, Zeiss, Cambridge, Reino Unido), e todas as imagens foram processadas digitalmente.

Microscopia eletrônica de transmissão

Para análise ultraestrutural, três amostras de calos embriogênicos, fixadas aos 90 dias após indução da embriogênese somática, foram pós-fixadas com tetróxido de ósmio 1% em tampão fosfato 0,05 M, desidratadas em série acetônica até acetona 100%, infiltradas e polimerizadas em resina epóxi (Spurr, 1969). Secções ultrafinas de 70 nm de espessura foram obtidas em ultramicrotomo (Leica UC6, Leica Microsystems Inc., USA) e contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo (Reynolds, 1963). As observações e a documentação fotográfica foram conduzidas em microscópio eletrônico de transmissão (EM900, Zeiss, Germany) em 50 kV, e as amostras processadas digitalmente.

RESULTADOS

Alterações morfohistológicas dos segmentos nodais durante a indução de embriogênese somática

A embriogênese somática em *Anthurium andraeanum* ocorreu no meristema axilar, permanecendo intacta a epiderme dos segmentos nodais. Foi possível observar que a indução da embriogênese somática é assíncrona, pois observou-se o início da diferenciação celular do meristema axilar nos diferentes tempos de cultivo, possivelmente devido a constante produção de embriões somáticos provenientes do meristema axilar.

O segmento nodal possui uma bainha que reveste o meristema axilar (Figura 1A; 1B). Em secção longitudinal, no tempo zero foi possível observar que o segmento nodal possui meristema axilar e sistema vascular (Figura 1C). Sendo o mesmo observado aos 5 dias de cultivo (dados não ilustrados).

Aos 15 dias, em meio de indução de embriogênese somática, o meristema axilar apresentou intumescimento (Figura 1D). Nesse estágio, foi observado início da divisão celular (Figura 1E). O mesmo foi observado aos 10 e 20 dias (dados não ilustrados).

Aos 30 dias, observaram-se divisões celulares no sentido periclinal da protoderme e periclinais e anticlinais do meristema axilar, caracterizando o início da formação das massas embriogênicas (Figura 1F). Essas características também foram observadas aos 25 e 35 dias (dados não ilustrados).

Aos 40-45 dias também foi possível observar divisões celulares periclinais e anticlinais no meristema axilar. No entanto, com a formação inicial do procâmbio no interior da massa embriogênica, proveniente das células em diferenciação, e ráfides, que são inerentes à espécie (Figura 1G). Nessa etapa, os calos embriogênicos tornaram-se visíveis, após rompimento da epiderme do segmento nodal.

Aos 50-55 dias foi possível observar a formação de calos embriogênicos friáveis, a partir da diferenciação das células meristemáticas (Figura 1H). Foi visualizada a formação de embriões somáticos, com protoderme bem delimitada e calos embriogênicos com presença de procâmbio (Figura 1I).

Aos 90 dias de indução de embriogênese somática, ocorreram novas divisões celulares e aumento do tamanho dos calos embriogênicos de coloração amarela (Figura 1J), sendo evidenciados embriões somáticos (Figura 1K), com delimitação da protoderme, e presença de ráfides, inerente à espécie (Figura 1L), além de citoplasma

denso, núcleos volumosos, nucléolos proeminentes (Figura 1M), acúmulo de grãos de amido nos plastídios (amiloplastos), retículo endoplasmático rugoso, parede celular e mitocôndrias (Figura 1N).

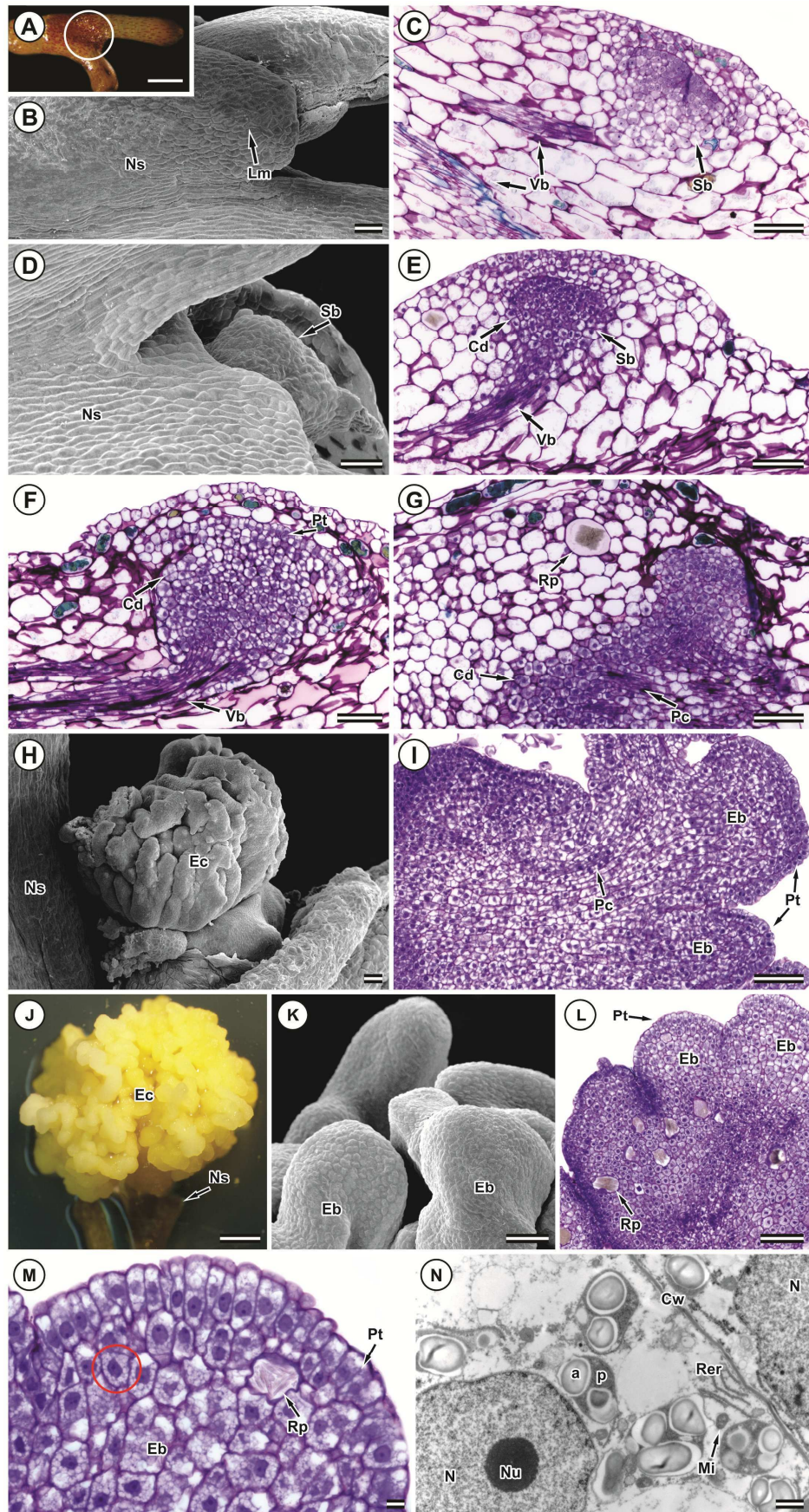


Figura 1. Indução de culturas embriogênicas em segmentos nodais de *Anthurium andraeanum* cv. Eidibel, caracterizada mediante microscopia de luz e eletrônica de

varredura e transmissão. **(A, B)** Segmento nodal com presença de meristema axilar (círculo) antes do cultivo *in vitro* em meio Pierik com 10 μM de ANA [tempo 0]; **(C)** Explante inicial, segmento nodal, evidenciando a presença de meristema axilar e tecido vascular [0 dias]; **(D)** Segmento nodal com intumescimento do meristema axilar [15 dias]; **(E)** Intumescimento do meristema axilar, evidenciando início das divisões celulares, com presença de tecido vascular [15 dias]; **(F)** Divisões periclinais na formação da protoderme e divisões celulares (periclinais e anticlinais) do meristema axilar, com tecido vascular evidente [30 dias]; **(G)** Aumento das divisões celulares e início da formação de procâmbio dos calos embriogênicos [40 dias]; **(H)** Segmento nodal com formação de calos embriogênicos a partir do meristema axilar [55 dias]; **(I)** Embriões globulares com protoderme bem delimitada e procâmbio evidente [55 dias]; **(J)** Segmento nodal formando calos embriogênico em meio Pierik com 10 μM de ANA [90 dias]; **(K)** Zona embriogênica [90 dias]; **(L)** Embriões globulares evidenciando protoderme e presença de ráfides [90 dias]; **(M)** Embrião globular com protoderme, núcleos maiores e nucléolos proeminentes (círculo), citoplasma denso [90 dias]; **(N)** Embrião compreendendo células com núcleo e nucléolo, citoplasma denso contendo mitocôndrias, retículo endoplasmático, parede celular, plastídio e grãos de amido [90 dias]. a: amido; Cd: divisões celulares; Cw: parede celular; Eb: calo embriogênico; Lm: bainha; Mi: mitocôndria; Ns: segmento nodal; Sb: meristema axilar intumescido; p: plastídio; Pc: procâmbio; Pt: protoderme; Rer: retículo endoplasmático rugoso; Rp: ráfide; N: núcleo; Nu: nucléolo; Vb: sistema vascular. Barras: A: 100 μm ; J: 1000 μm ; B-I: 100 μm ; K; L: 100 μm ; M: 10 μm ; N: 1 μm .

Caracterização histoquímica da indução de embriogênese somática

Testes histoquímicos indicaram a presença de compostos de reserva nas células do parênquima de preenchimento do segmento nodal, nas células em diferenciação do meristema axilar e em calos embriogênicos. Em todos os períodos analisados não houve intensificação dos reagentes sudan black B, para corpos lipídicos (Figura 2F-J), e vermelho de rutênio, para pectatos (Figura 3A-E), tanto no meristema axilar quanto nos calos embriogênicos. Observou-se a reação com vermelho de rutênio apenas associada ao tecido parenquimático dos segmentos nodais.

No tempo zero, antes da inoculação do explante em meio de indução de embriogênese somática, foi possível identificar a presença de grãos de amido nas

células do tecido parenquimático do segmento nodal. No entanto, não foram observados grãos de amido nas células do meristema axilar, confirmados pela reação negativa aos testes de lugol e PAS (Figura 2A; 3F, respectivamente). Não foi evidenciada a presença de proteínas totais pela reação negativa ao XP (Figura 2K).

O surgimento de grãos de amido no meristema axilar em divisão foi gradual, aumentando em quantidade e em tamanho durante todo o processo. Aos 15 dias, em meio de indução de embriogênese somática, foram identificadas células do tecido parenquimático com presença de grãos de amido e células em divisão do meristema axilar com pequenos grãos de amido, evidenciados pelos testes de lugol e PAS, confirmando a reação positiva (Figura 2B; 3G, respectivamente), e ausência de proteínas totais (Figura 2L).

Aos 30 dias, também foi possível observar a presença de grãos de amido nas células do tecido parenquimático do segmento nodal e pequenos grãos de amido no meristema axilar em divisão celular, evidenciado pela reação positiva do lugol e PAS (Figura 2C; 3H, respectivamente). Não foi detectada a presença de proteínas totais (Figura 2M).

Aos 55 dias, foi observada a presença de pequenos grãos de amido em elevada quantidade, nas células dos calos embriogênicos, confirmada pelos testes de lugol e PAS (Figura 2D; 3I, respectivamente). Constatou-se também reação positiva para proteínas totais nas células embriogênicas, em que as pequenas inclusões foram coradas com XP (Figura 2N).

Aos 90 dias, foram identificados grãos de amido de maior tamanho e em elevada quantidade nas células dos calos embriogênicos, quando comparados com os demais períodos de cultivo *in vitro* (Figura 2E; 3J, respectivamente). Neste período, proteínas totais foram evidenciadas na porção mais interna do calo embriogênico, quando evidenciados com XP (Figura 2O).

Nos calos embriogênicos, foram observados grãos de amido e grânulos na forma de proteínas totais, porém não foram identificados corpos lipídicos. A quantidade de grãos de amido foi aumentando gradativamente durante a indução de embriogênese somática, sendo iniciada durante as divisões celulares que ocorreram no meristema axilar no 15º dia. As proteínas totais foram identificadas apenas na fase de calo embriogênico, sendo gradativamente intensificadas aos 55 e 90 dias.

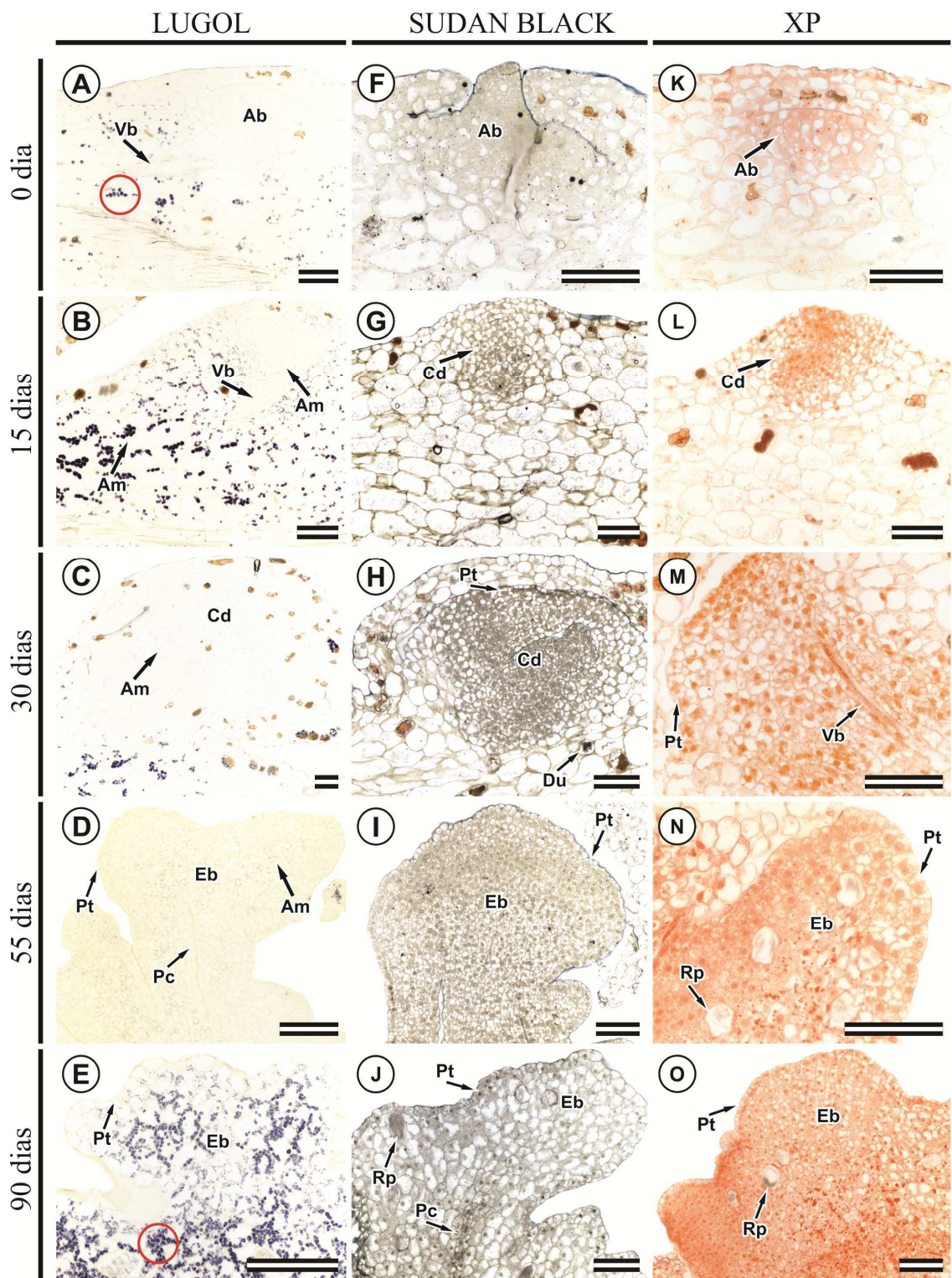


Figura 2. Estudo histoquímico durante a indução de culturas embriogênicas a partir de segmentos nodais de *Anthurium andraeanum* cv. Eidibel, analisados nos tempos 0 (A; F; K), 15 (B; G; L), 30 (C; H; M), 55 (D; I; N) e 90 dias (E; J; O). Seções longitudinais submetidas ao lugol (A; B; C; D; E), sudan black B, (F; G; H; I; J) e xylidine Ponceau - XP (K; L; M; N; O). (A) Reação positiva para células do tecido parenquimático do segmento nodal (circulo) e negativa para amido no meristema axilar;

(B-C) Reação positiva para amido no meristema axilar; **(D-E)** Reação positiva para amido nos calos embriogênicos; **(K; L; M)** Reação negativa para proteínas totais; **(N; O)** Reação positiva para proteínas totais corados de vermelho. Ab: meristema axilar; Am: grãos de amido; Eb: calo embriogênico; Cd: divisões celulares; Du: drusa; Pc: procâmbio; Pt: protoderme; Rp: ráfide; Vb: sistema vascular. Barras 100 μ m.

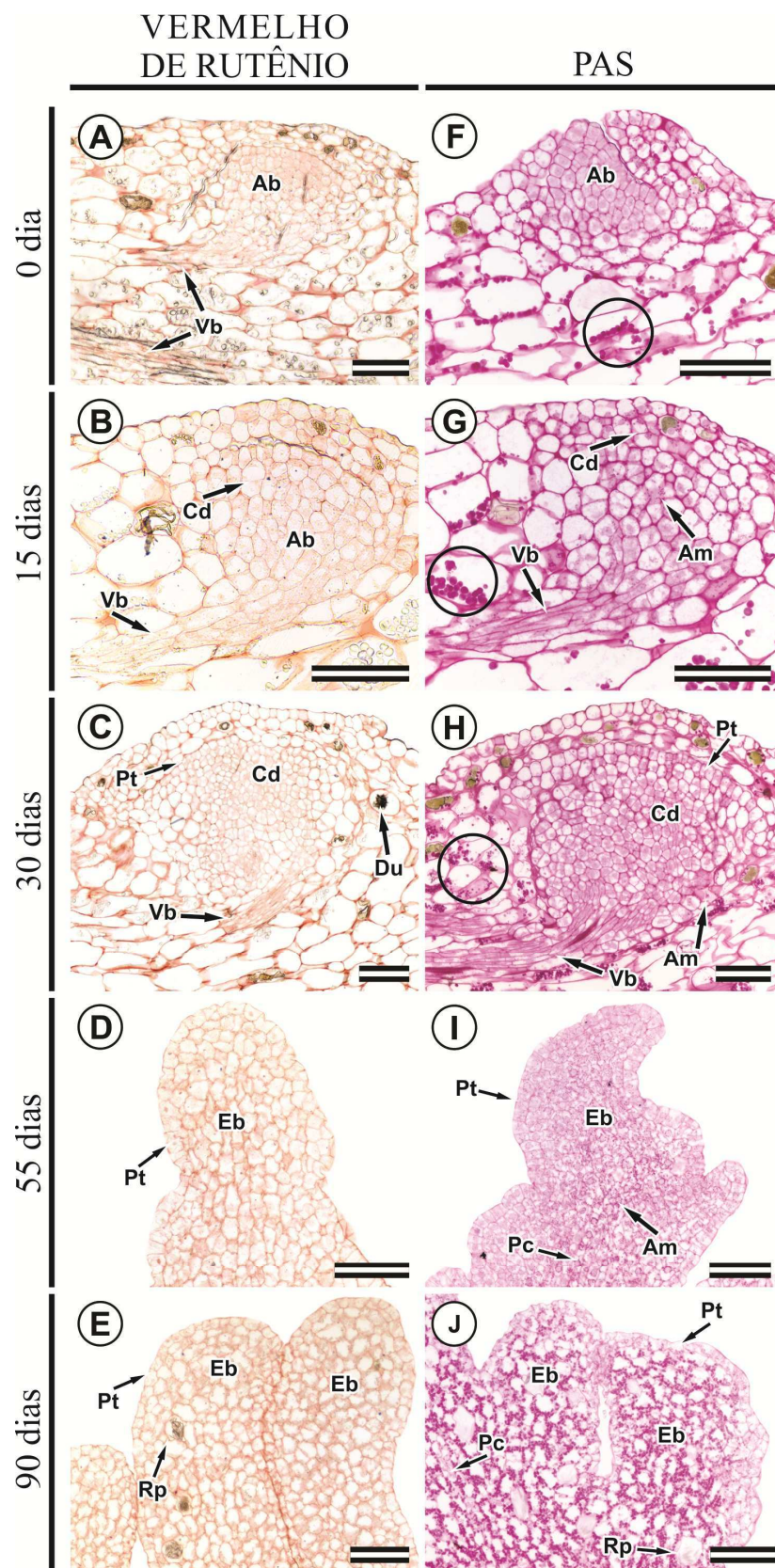


Figura 3. Estudo histoquímico durante a indução de culturas embriogênicas em segmentos nodais de *Anthurium andraeanum* cv. Eidibel, analisados nos tempos 0 (**A**; **F**), 15 (**B**; **G**), 30 (**C**; **H**), 55 (**D**; **I**) e 90 dias (**E**; **J**). Secções longitudinais submetidas

ao vermelho de rutênio, com reação negativa para pectinas (**A. B. C. D. E**) e ao ácido periódico/reagente de Schiff - PAS (**F, G, H, I. J**). (**F**) Reação positiva para grãos de amido nas células do tecido parenquimático (círculo) e negativa no meristema axilar; (**G-H**) Reação positiva para grãos de amido nas células do tecido parenquimático (círculo) e no meristema axilar, corados ao teste de PAS; (**I-J**) reação positiva para amido nos calos embriogênicos, corados ao teste de PAS. Ab: gema axilar; Am: grãos de amido; Eb: calo embriogênico; Cd: divisões celulares; Du: drusa; Pc: procâmbio; Pt: protoderme; Rp: ráfide; Vb: sistema vascular. Barras 100 µm.

DISCUSSÃO

Alterações estruturais da indução da embriogênese somática

Em *Anthurium andraeanum* cv. Eidibel, a utilização do meio Pierik com 10 μ M de ANA promoveu a indução de embriogênese somática em segmentos nodais (Pinheiro et al., 2014) com a possibilidade de maturação dos embriões somáticos (Pinheiro et al., 2013). No entanto, até o momento, a análise ontogênica da indução de embriogênese somática ainda não havia sido descrita, especialmente no que se refere aos aspectos estruturais e ultraestruturais.

No presente trabalho foi observado que a indução de embriogênese somática em *Anthurium andraeanum* é assincrônica, pois em todos os tempos de cultivo foi possível observar o início de desdiferenciação do meristema axilar para a formação de calos embriogênicos. O mesmo ocorreu durante o estudo ontogênico da embriogênese somática de *Euterpe oleracea*, a partir de embriões zigóticos, sendo observada a diferenciação de embriões somáticos em diferentes estágios de maturação, além da formação de embriogênese somática secundária (Scherwinski-Pereira et al., 2012), demonstrando assim, que as células podem adquirir competência em diferentes tempos de exposição dos tecidos ao meio de cultura acrescido de reguladores de crescimento, adquirindo atividade meristemática. Quando as células adquirem essa atividade, são chamadas de células competentes (Rocha et al., 2012).

A análise ontogênica indicou que o potencial embriogênico do segmento nodal ocorreu no meristema axilar do segmento nodal, quando esse sofreu divisões celulares. Com a sequência de eventos foi possível observar a formação de calos embriogênicos provenientes do meristema axilar. Essa formação tornou-se visível a partir dos 40 dias de cultivo, quando ocorreu rompimento da epiderme do explante inicial. Em embriões zigóticos de *Trifolium nigrescens*, a proliferação extensiva de células ocorreu dentro do explante inicial, resultando em intumescimento na periferia, seguido de ruptura da epiderme e proliferação dos calos embriogênicos para a região externa do explante (Konieczny et al., 2012).

A embriogênese somática é um processo no qual uma única célula vegetal ou um grupo de células dá origem ao embrião somático (Konieczny et al., 2012). Assim como no presente trabalho, em *Euterpe oleracea* foi observada a formação multicelular, evoluindo para calos embriogênicos e posterior formação de embriões somáticos (Scherwinski-Pereira et al., 2012). Isso ocorreu devido à diferenciação das células dos

calos embriogênicos e a sua rediferenciação em grupos de células, indicando padrão multicelular na origem dos embriões somáticos (Rocha et al., 2012).

Mobilização de reservas durante a embriogênese somática

Compostos de reserva, como carboidratos, lipídios e/ou proteínas podem ser espécie específica. Como fontes iniciais, em eudicotiledôneas são encontrados principalmente lipídios e proteínas, já em monocotiledôneas, normalmente são encontrados carboidratos e proteínas (Bewley & Black, 1994; Rocha et al., 2012). O que corrobora com os resultados do presente trabalho, nos calos embriogênicos foram encontrados amiloplastos e proteínas, características de monocotiledôneas.

O amido no interior celular tem a capacidade de fornecer energia para as células em divisão e posterior formação de calos embriogênicos (Barciela & Vieitez, 1993). No presente estudo, foram constatados amiloplastos com grãos de amido maiores nas células do tecido parenquimático próximas ao meristema axilar, e à medida que ocorreram divisões celulares, foram observados pequenos grãos de amido no interior das células em divisão. Barciela e Vieitez (1993) relataram também que em células embriogênicas ocorre acúmulo de amido, no entanto, em grãos menores, quando comparado àqueles presentes no parênquima, comprovados pela intensidade de reação do PAS. Em *Eutерpe oleracea* também foi observada a presença de grãos de amido em células sem características embriogênicas localizadas próximas àquelas regiões onde ocorriam divisões celulares (Scherwinski-Pereira et al., 2012). Em *Acrocomia aculeata*, o armazenamento de grãos de amido também ocorreu principalmente nas células internas do explante, próximas das regiões de intensa divisão celular (Moura et al., 2008). Os calos embriogênicos possuíam amiloplastos, no entanto, esses não eram abundantes nem distribuídos uniformemente por todas as células embriogênicas (Moura et al., 2010), diferentemente do presente trabalho, no qual foram observados amiloplastos em grande quantidade distribuídos uniformemente por todas as células dos calos embriogênicos. O armazenamento de amido em células embriogênicas ou em células adjacentes é um fenômeno que normalmente indica a aquisição de competência à embriogênese somática (Moura et al., 2008).

Em *Anthurium andraeanum* foi possível identificar a presença de proteínas totais apenas nos calos embriogênicos, e ausência desses grânulos durante as divisões celulares do meristema axilar. A proporção de células com níveis significativos de proteínas citoplasmática e nuclear pode ser aumentada durante a formação de células

embriogênicas (Barciela & Vieitez, 1993). Em calos embriogênicos de *Musa acuminata*, também foram observados, como reservas, grãos de amido e proteínas (Jalil et al., 2008). Em *Elaeis guineensis*, corpos proteicos foram acumulados mais precocemente e em quantidade reduzida durante o desenvolvimento do embrião somático, quando comparado ao embrião zigótico (Morcillo et al., 1998).

Sané et al. (2006) demonstraram que o acúmulo de grãos de amido e de proteínas foi reduzindo nas fases mais tardias da embriogênese. O mesmo foi observado em *Passiflora cincinnata*, no qual os corpos proteicos foram rapidamente consumidos durante o restante do processo embriogênico (Rocha et al., 2012). No presente trabalho, durante a indução da embriogênese somática, foram observadas proteínas totais apenas em fase de calos embriogênicos. Provavelmente também poderia ser observado consumo durante as etapas seguintes de maturação e germinação dos embriões somáticos.

Os testes com sudan black B e vermelho de rutênio foram utilizados para identificar corpos lipídicos e pectinas, respectivamente, durante a indução de embriogênese somática de *Anthurium andraeanum*. No entanto, não foram observados corpos lipídicos nem pectinas nas células em divisão ou mesmo em calos embriogênicos de *Anthurium andraeanum*. Observou-se a reação com vermelho de rutênio apenas associada ao tecido parenquimático dos segmentos nodais. Diferente do observado em *Musa* spp., no qual foram observados pectinas secretadas na mucilagem, cobrindo os calos embriogênicos bem como os embriões somáticos (Xu et al., 2011).

As análises realizadas revelaram a origem e as mudanças que ocorrem durante as diferentes etapas da indução de embriogênese somática em *Anthurium andraeanum*, ampliando a compreensão desse processo. Estes resultados fornecem contribuições importantes para futuros estudos, como a identificação de genes marcadores da embriogênese somática, indicando quais os tipos celulares que adquirem competência embriogênica em resposta às condições de cultivo e quais os genes são expressos durante a embriogênese somática.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos; e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro. Ao Núcleo de

Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica na Pesquisa Agropecuária (ESALQ/USP) e ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa (NMM/UFV), pelo auxílio no preparo das amostras e uso dos microscópios.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALCANTARA, G.B.; DIBAX, R.; OLIVEIRA, R.A.; BESPALHOK FILHO, J.C.; DAROS, E. Plant regeneration and histological study of the somatic embryogenesis of sugarcane (*Saccharum* spp.) cultivars RB855156 and RB72454. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v.36, p.63-72, 2014.
- ASSIS, A.M.D.; UNEMOTO, L.K.; FARIA, R.T.D.; DESTRO, D.; TAKAHASHI, L.S.A.; ROBERTO, S.R.; PRUDÊNCIO, S.H.; TOMBOLATO, A.F.C. Adaptation of anthurium cultivars as cut flowers in a subtropical area. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.46, p.161-166, 2011.
- ATAK, Ç.; ÇELIK, Ö. Micropropagation of *Anthurium andraeanum* from leaf explants. **Pakistan Journal of Botany**, v.41, p.1155-1161, 2009.
- BAKHSHAIE, M.; BABALAR, M.; MIRMASOUMI, M.; KHALIGHI, A. Somatic embryogenesis and plant regeneration of *Lilium ledebourii* (Baker) Boiss., an endangered species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.102, p.229-235, 2010.
- BARCIELA, J.; VIEITEZ, A.M. Anatomical sequence and morphometric analysis during somatic embryogenesis on cultured cotyledon explants of *Camellia japonica* L. **Annals of Botany**, v.71, p.395-404, 1993.
- BAUTISTA, N.D.R.; PEÑALVER, D.A.; RODRÍGUEZ, R.B.; CHIU, W.C.; LÓPEZ, R.C.; TERRY, F.J.; PERALTA, M.P.; MARTÍNEZ, O.G. Embriogénesis somática en (*Anthurium andraeanum* Lind.) variedad 'Lambada'. **Revista de Sociedad, Cultura y Desarrollo Sustentable**, v.4, p.135-149, 2008.
- BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. London: Springe, 1994. 445p.
- BEYRAMIZADE, E.; AZADI, P.; MII, M. Optimization of factors affecting organogenesis and somatic embryogenesis of *Anthurium andreanum* Lind. 'Tera'. **Propagation of Ornamental Plants**, v.8, p.198-203, 2008.
- CAPELO, A.M.; SILVA, S.; BRITO, G.; SANTOS, C. Somatic embryogenesis induction in leaves and petioles of a mature wild olive. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.103, p.237-242, 2010.

CASTRO, A.C.; RESENDE, L.V.; GUIMARÃES, W.N.R.; LOGES, V. Uso de técnicas moleculares em estudo de diversidade genética em antúrio. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v.10, p.6-9, 2004.

DUQUENNE, B.; EECKHAUT, T.; WERBROUCK, S.; HUYLENBROECK, J. Effect of enzyme concentrations on protoplast isolation and protoplast culture of *Spathiphyllum* and *Anthurium*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.91, p.165-173, 2007.

FEDER, N.; O'BRIEN, T.P. Plant microtechnique: some principles and new methods. **American Journal of Botany**, v.55, p.123-142, 1968.

FERNANDO, J.A.; MELO, M.; SOARES, M.K.M.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Anatomy of somatic embryogenesis in *Carica papaya* L. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.44, p.247-255, 2001.

FERNANDO, J.A.; VIEIRA, M.L.C.; GERALDI, I.O.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Anatomical study of somatic embryogenesis in *Glycine max* (L.) Merril. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.45, p.277-286, 2002.

FITCH, M.M.M.; LEONG, T.C.W.; HE, X.; MCCAFFERTY, H.R.K.; ZHU, Y.J.; MOORE, P.H.; GONSALVES, D.; ALDWINCKLE, H.S.; ATKINSON, H.J. Improved transformation of anthurium. **HortScience**, v.46, p.358-364, 2011.

GAJ, M.D. Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh **Plant Growth Regulation**, v.43, p.27-47, 2004.

JALIL, M.; CHEE, W.W.; OTHMAN, R.Y.; KHALID, N. Morphohistological examination on somatic embryogenesis of *Musa acuminata* cv. Mas (AA). **Scientia Horticulturae**, v.117, p.335-340, 2008.

JAYASANKAR, S.; BONDADA, B.R.; LI, Z.; GRAY, D.J. Comparative anatomy and morphology of *Vitis vinifera* (Vitaceae) somatic embryos from solid- and liquid-culture-derived proembryogenic masses. **American Journal of Botany**, v.90, p.973-979, 2003.

JUNQUEIRA, A.H.; PEETZ, M.D.S. Cultivares de Anthurium en el mercado brasileño. **Horticultura Internacional**, v.66, p.38-41, 2008.

KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde–glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. **The Journal of Cell Biology**, v.27, p.127-128, 1965.

KHAN, T.; REDDY, V.S.; LEELAVATHI, S. High-frequency regeneration via somatic embryogenesis of an elite recalcitrant cotton genotype (*Gossypium hirsutum* L.) and efficient *Agrobacterium*-mediated transformation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** v.101, p.323-330, 2010.

KONIECZNY, R.; SLIWINSKA, E.; PILARSKA, M.; TULEJA, M. Morphohistological and flow cytometric analyses of somatic embryogenesis in *Trifolium nigrescens* Viv. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.109, p.131-141, 2012.

KUEHNLE, A.R.; CHEN, F.-C.; SUGIL, N. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Anthurium andraeanum* hybrids. **Plant Cell Reports**, v.11, p.438-442, 1992.

LIENDO, M.; MOGOLLÓN, N. Multiplicación clonal *in vitro* del anturio (*Anthurium andraeanum* Lind. cv. Nicoya). **Bioagro**, v.21, p.179-182, 2009.

MA, J.; HE, Y.; WU, C.; LIU, H.; HU, Z.; SUN, G. Cloning and molecular characterization of a SERK gene transcriptionally induced during somatic embryogenesis in *Ananas comosus* cv. Shenwan. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.30, p.195-203, 2012.

MACIEL, S.A.; FERMINO JUNIOR, P.C.P.; SILVA, R.A.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E. Morpho-anatomical characterization of embryogenic calluses from immature zygotic embryo of peach palm during somatic embryogenesis. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v.32, p.263-267, 2010.

MAIRA, O.; ALEXANDER, M.; VARGAS, T.E. Micropropagation and organogenesis of *Anthurium andreanum* Lind cv Rubrun. In: JAIN, S.M.; OCHATT, S.J. (Ed.). **Protocols for in vitro propagation of ornamental plants, methods in molecular biology**. Totowa, New Jersey: Humana Press Edition, 2010. p.3-14.

MARTIN, K.; JOSEPH, D.; MADASSER, J.; PHILIP, V. Direct shoot regeneration from lamina explants of two commercial cut flower cultivars of *Anthurium andraeanum* Hort. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v.39, p.500-504, 2003.

MING-HUA, Y.; SEN-RONG, H. A simple cryopreservation protocol of *Dioscorea bulbifera* L. embryogenic calli by encapsulation-vitrification. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.101, p.349-358, 2010.

MORCILLO, F.; ABERLENC-BERTOSSI, F.; HAMON, S.; DUVAL, Y. Accumulation of storage protein and 7S globulins during zygotic and somatic embryo development in *Elaeis guineensis*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.36, p.509-514, 1998.

MOURA, E.F.; VENTRELLA, M.C.; MOTOIKE, S.Y. Anatomy, histochemistry and ultrastructure of seed and somatic embryo of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae). **Scientia Agricola**, v.67, p.399-407, 2010.

MOURA, E.F.; VENTRELLA, M.C.; MOTOIKE, S.Y.; DE SÁ JÚNIOR, A.Q.; CARVALHO, M.; MANFIO, C.E. Histological study of somatic embryogenesis induction on zygotic embryos of macaw palm (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Martius). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.95, p.175-184, 2008.

NHUT, D.T.; NGUYEN, D.; VY, N.N.H.; KHUE, C.D.; KHIEM, D.V.; VINH, D.N. Impact of *Anthurium* spp. genotype on callus induction derived from leaf explants, and shoot and root regeneration capacity from callus. **Journal of Applied Horticulture**, v.8, p.135-137, 2006.

NINKOVIĆ, S.; DJORDJEVIĆ, T.; VINTERHALTER, B.; UZELAC, B.; CINGEL, A.; SAVIĆ, J.; RADOVIĆ, S. Embryogenic responses of *Beta vulgaris* L. callus induced from transgenic hairy roots. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** v.103, p.81-91, 2010.

O'BRIEN, T.P.; MCCULLY, M.E. **The study of plant structure principles and select methods**. Melbourne: Termarcarphi Pty Ltd, 1981. 45p.

PARIMALAN, R.; VENUGOPALAN, A.; GIRIDHAR, P.; RAVISHANKAR, G.A. Somatic embryogenesis and *Agrobacterium*-mediated transformation in *Bixa orellana* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.105, p.317-328, 2010.

PIERIK, R.L.M. Callus multiplication of *Anthurium andraeanum* Lindl. in liquid media. **Netherlands Journal of Agricultural Science**, v.23, p.299-302, 1975.

- PIERIK, R.L.M. *Anthurium andraeanum* plantlets produced from callus tissues cultivated *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, v.37, p.80-82, 1976.
- PIERIK, R.L.M.; STEEGMANS, H.H.M.; VAN DER MEYS, J.A.J. Plantlet formation on callus tissues of *Anthurium andraeanum* Lind. **Scientia Horticulturae**, v.2, p.193-198, 1974.
- PINHEIRO, M.V.M.; MARTINS, F.B.; CRUZ, A.C.F.; CARVALHO, A.C.P.P.; OLIVEIRA, E.J.; OTONI, W.C. Somatic embryogenesis in anthurium (*Anthurium andraeanum* cv. Eidibel) as affected by different explants. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v.36, p.87-98, 2014.
- PINHEIRO, M.V.M.; MARTINS, F.B.; CRUZ, A.C.F.; CARVALHO, A.C.P.P.; VENTRELLA, M.C.; OTONI, W.C. Maturation of *Anthurium andraeanum* cv. Eidibel somatic embryos from explants of nodal segments. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v.49, p.304-312, 2013.
- PINTO, D.L.P.; ALMEIDA, A.M.R.; RÊGO, M.M.; SILVA, M.L.; OLIVEIRA, E.J.; OTONI, W.C. Somatic embryogenesis from mature zygotic embryos of commercial passionfruit (*Passiflora edulis* Sims) genotypes. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.107, p.521-530, 2011.
- QUIROZ-FIGUEROA, F.R.; ROJAS-HERRERA, R.; GALAZ-AVALOS, R.M.; LOYOLA-VARGAS, V.M. Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.86, p.285-301, 2006.
- RAWLINS, T.E.; TAKAHASHI, W.N. **Technics of plant histochemistry and virology**. Millbrae: The National Press, 1952. 125p.
- REYNOLDS, E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electronmicroscopy. **Journal of Cell Biology**, v.17, p.208-212, 1963.
- ROCHA, D.I.; VIEIRA, L.M.; TANAKA, F.A.O.; SILVA, L.C.; OTONI, W.C. Somatic embryogenesis of a wild passion fruit species *Passiflora cincinnata* Masters: histocytological and histochemical evidences. **Protoplasma**, v.249, p.747-758, 2012.

SÁENZ, L.; AZPEITIA, A.; CHUC-ARMENDARIZ, B.; CHAN, J.L.; VERDEIL, J.L.; HOCHER, V.; OROPEZA, C. Morphological and histological changes during somatic embryo formation from coconut plumule explants. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v.42, p.19-25, 2006.

SANÉ, D.; ABERLENC-BERTOSSI, F.; GASSAMA-DIA, Y.K.; SAGNA, M.; TROUSLOT, M.F.; DUVAL, Y.; BORGEL, A. Histocytological analysis of callogenesis and somatic embryogenesis from cell suspensions of date palm (*Phoenix dactylifera*). **Annals of Botany**, v.98, p.301-308, 2006.

SANTANA-BUZZY, N.; LÓPEZ-PUC, G.; CANTO-FLICK, A.; BARREDO-POOL, F.; BALAM-UC, E.; AVILÉS-VINÑAS, S.; SOLÍS-MARROQUÍN, D.; LECONA-GUZMÁN, C.; BELLO-BELLO, J.J.; GÓMEZ-UC, E.; MIJANGOS-CORTÉS, J.O. Ontogenesis of the somatic embryogenesis of habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). **HortScience**, v.44, p.113-118, 2009.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J.; DA SILVA GUEDES, R.; DA SILVA, R.; FERMINO, P.; LUIS, Z.; DE OLIVEIRA FREITAS, E. Somatic embryogenesis and plant regeneration in açai palm (*Euterpe oleracea*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.109, p.501-508, 2012.

SEN-RONG, H.; MING-HUA, Y. A simple and efficient protocol for cryopreservation of embryogenic calli of the medicinal plant *Anemarrhena asphodeloides* Bunge by vitrification. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, p.1-10, 2012.

SPURR, A.R. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. **Journal of Ultrastructural Research**, v.26, p.31-43, 1969.

TOMBOLATO, A.F.C.; QUIRINO, E.A. Multiplicação in vitro de novas seleções de *Anthurium andraeanum* Lindl. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v.2, p.37-46, 1996.

TOMBOLATO, A.F.C.; QUIRINO, E.A.; COSTA, A.M.M. Antúrio (*Anthurium andraeanum* Lindl.). In: TOMBOLATO, A.F.C.C., A. M. M (Ed.). **Micropropagação de plantas ornamentais**. Campinas: Instituto Agrônômico, 1998. p.18-21.

TOMBOLATO, A.F.C.; UZZO, R.P.; CASTRO, A.C.R.; SAKAI, M.; SAES, L.A. Recursos genéticos e melhoramento do antúrio (*Anthurium andraeanum* Linden) no IAC–APTA. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v.10, p.1-5, 2004.

VIDAL, B.C. Acid glycosaminoglycans and endochondral ossification microspectrophotometric evaluation and macromolecular orientation. **Cell and Molecular Biology**, v.22, p.45-64, 1977.

WEIJIE, X.; BIN, X.; GUANGDONG, W.; WEIMING, G.; FANGDE, W.; JIANPING, J. Somatic embryogenesis and plant regeneration of *Anthurium andraeanum*. **Acta Horticulturae Sinica**, v.33, p.1281-1286, 2006.

XU, C.; ZHAO, L.; PAN, X.; SAMAJ, J. Developmental localization and methylesterification of pectin epitopes during somatic embryogenesis of banana (*Musa* spp. AAA). **PLoS One**, v.6, p.e22992, 2011.

YANG, J.L.; SEONG, E.S.; KIM, M.J.; GHIMIRE, B.K.; KANG, W.H.; YU, C.Y.; LI, C.H. Direct somatic embryogenesis from pericycle cells of broccoli (*Brassica oleracea* L. var. italica) root explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.100, p.49-58, 2010.

YOU, C.; FAN, T.; GONG, X.; BIAN, F.; LIANG, L.; QU, F. A high-frequency cyclic secondary somatic embryogenesis system for *Cyclamen persicum* Mill. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.107, p.233-242, 2011.

ZAKIZADEH, H.; STUMMANN, B.M.; LÜTKEN, H.; MÜLLER, R. Isolation and characterization of four somatic embryogenesis receptor-like kinase (*RhSERK*) genes from miniature potted rose (*Rosa hybrida* cv. Linda). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.101, p.331-338, 2010.

CAPÍTULO III

Clonagem, caracterização molecular e análise da expressão do gene *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE (SERK)* na embriogênese somática em antúrio [*Anthurium andraeanum* (Linden ex André) cv. Eidibel] (Araceae)

Resumo - Os genes *SERK* (*SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE*), podem estar envolvidos em vários processos de desenvolvimento das plantas. O monitoramento da expressão de genes *SERK* pode fornecer informações tanto sobre a aquisição de competência dos tecidos quanto do estágio de desenvolvimento embriogênico. Dessa forma, o objetivo inicial desse estudo foi isolar e caracterizar transcritos de *SERK* expressos durante a embriogênese somática a partir de segmentos nodais e avaliar o padrão de expressão durante as fases de indução e maturação de calos embriogênicos de *Anthurium andraeanum* cv. Eidibel. Para isso, calos embriogênicos aos 55 dias em meio de indução, foram utilizados para extração do RNA total. O cDNA fita simples foi sintetizado e utilizado como molde para amplificação da sequência codante, utilizando-se seis combinações de primers degenerados. Os fragmentos amplificados de tamanhos esperados foram purificados do gel, ligados em vetor e inseridos em células ultracompetentes. A sequência deduzida, de aminoácidos de uma ORF contendo 382 aminoácidos, foi comparada com proteínas *SERK* de outras espécies depositadas no banco de dados NCBI, incluindo uma sequência parcial de *Anthurium andraeanum*, observada elevada similaridade, confirmada também pela análise filogenética. A análise em secções longitudinais dos cortes de segmentos nodais de antúrio hibridizados *in situ*, com sonda antisense (positivo), demonstrou que o sinal da expressão de *SERK* aumenta gradativamente, tendo sinal fraco nas células do meristema axilar e forte em células de calos embriogênicos. Já aos 65 dias de maturação, não houve sinal da expressão de *SERK*. Dessa forma, sugere-se que a expressão do gene *SERK* está associada com a indução de embriogênese somática, sugerindo que esse mecanismo seja conservado. Os resultados indicam que essas sequências podem ser utilizadas para monitorar a transição de células competentes em células e tecidos embriogênicos de *Anthurium andraeanum*.

Palavras-chave: Expressão gênica, filogenia, hibridização *in situ*.

Cloning, molecular characterization and analysis of gene *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE (SERK)* expression in somatic embryogenesis of anthurium [*Anthurium andraeanum* (Linden ex André) cv. Eidibel] (Araceae)

Abstract - The *SERK* (*SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE*) genes can be involved in various processes of plant development. The monitoring of expression *SERK* can provide information about the acquisition of competence of tissues or the stage of embryonic development. Therefore, the aim of this study was to isolate and characterize transcripts of *SERK* expressed during somatic embryogenesis from nodal segment and evaluate the expression pattern during induction and maturation of embryogenic callus of *Anthurium andraeanum* cv. Eidibel. For this, embryogenic callus 55 days on induction medium, were used for extraction of total RNA. The single-stranded cDNA was synthesized and used as template for the amplification of the coding sequence, using six combinations of degenerate primers. The amplified fragments of expected size were gel purified, linked in the vector and inserted into ultra-competent cells. The deduced sequence, of an open reading frame with 382 amino acids, was compared with *SERK* proteins of other species deposited in the NCBI database, including a partial sequence of *Anthurium andraeanum*, showing high similarity, which was also shown by phylogenetic analysis. The analysis on longitudinal sections of nodal segments of anthurium *in situ* hybridized with antisense probe (positive control), shown that the expression of *SERK* signal increases gradually with weak signal in axillary meristem cells and strong signal in cells of embryogenic callus. After 65 days of maturation, there was no sign of the expression of *SERK*. Thus, it is suggested that the expression of the *SERK* gene is related with the induction of somatic embryogenesis, suggesting that this mechanism is conserved. These results suggest that these sequences can be used to monitor the competent cells transition to embryogenic tissues and cells of *Anthurium andraeanum*.

Keywords: Gene expression, phylogeny, *in situ* hybridization.

INTRODUÇÃO

Plantas do gênero *Anthurium* Schott. são monocotiledôneas, herbáceas tropicais, epífitas ou hemiepífitas e nativas de regiões quentes da América Tropical (Castro et al., 2004; Tombolato et al., 2004; Nhut et al., 2006; Liendo & Mogollón, 2009; Maira et al., 2010). A maioria das espécies desse gênero é ornamental, e cerca de 130 são encontradas no Brasil (Castro et al., 2004; Tombolato et al., 2004). Dentre estas destaca-se o *Anthurium andraeanum* Linden, pois possui grande aceitação do público consumidor devido ao tamanho, coloração e longa durabilidade pós-colheita das inflorescências, tornando-se uma das espécies mais cultivadas no Brasil (Castro et al., 2004).

Dentre as principais cultivares de *Anthurium andraeanum*, destaca-se a 'Eidibel', sendo plantas produtivas, de crescimento rápido, com inflorescências de coloração vermelho forte e espádice branca, fatores esses que possibilitaram tornar esta cultivar como a mais cultivada em todo o Brasil (Tombolato et al., 2004; Junqueira & Peetz, 2008).

Atualmente, as mudas dos antúrios disponíveis no mercado são produzidos por técnicas de cultura de tecidos (Maira et al., 2010) e a partir da década de 90, vem se utilizando, como forma de propagação *in vitro*, a embriogênese somática. Para isso, tem sido utilizados como explantes, folhas, pecíolos, raízes, segmentos nodais e internodais (Kuehnle et al., 1992; Hamidah et al., 1997; Weijie et al., 2006; Duquenne et al., 2007; Bautista et al., 2008; Beyramizade et al., 2008; Fitch et al., 2011; Pinheiro et al. 2014), dependendo do genótipo. O segmento nodal é o explante mais indicado para a indução de embriogênese somática em *Anthurium andraeanum* cv. Eidibel (Pinheiro et al., 2014).

A embriogênese somática oferece grandes vantagens para o desenvolvimento de diferentes pesquisas em plantas (Ninković et al., 2010), sendo aplicada também com sucesso em sistemas de regeneração de diversas espécies (Yang et al., 2010). Comparativamente às demais técnicas de cultura de tecidos, a embriogênese somática permite a produção em larga escala de plantas, possibilitando reduzir significativamente o custo por unidade de muda produzida. Além disso, a embriogênese somática é um sistema ideal para estudo de eventos morfológicos, fisiológicos, bioquímicos e moleculares que ocorrem durante o processo de embriogênese em plantas superiores (Zakizadeh et al., 2010; You et al., 2011).

A embriogênese somática é um sistema de propagação *in vitro* de plantas, que requer sinalização hormonal para induzir a formação de embrião somático, com estrutura bipolar organizada, capaz de formar uma planta completa, sem fusão de gametas (Yang et al., 2010; Ma et al., 2012). Durante a embriogênese somática ocorrem alterações bioquímicas e morfológicas em resposta às alterações nos padrões de expressão gênica (Santos et al., 2005). No entanto, a base molecular dos mecanismos genéticos que regula a propriedade de competência à embriogênese em células vegetais ainda não está totalmente elucidada (Santa-Catarina et al., 2004; Pérez-Núñez et al., 2009; Ma et al., 2012).

A partir da utilização de marcadores moleculares e da localização de células competentes, foi possível complementar os métodos tradicionais de identificação de células envolvidas na formação de embriões somáticos (Schmidt et al., 1997).

Nos últimos anos, os estudos moleculares e genéticos, focados no desenvolvimento das plantas, resultaram na identificação de vários grupos de genes especificamente expressos durante a embriogênese (Ito et al., 2005; Pérez-Núñez et al., 2009). Entre os genes expressos na embriogênese zigótica e somática destacam-se os da família *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE (SERK)* (Schmidt et al., 1997; Hecht et al., 2001). Esses genes podem fornecer informações importantes sobre a competência dos tecidos ou mesmo sobre o estágio de desenvolvimento mais adequado para o cultivo *in vitro* (Santa-Catarina et al., 2004).

Os genes da família *SERK* têm, como produto, proteínas do tipo RLK (*Receptor-Like Protein Kinase*) com domínio extracelular rico em leucina (LRR - *Leucine-Rich Repeat*) (Li, 2010; Nolan et al., 2011). Essa subfamília de proteínas quinase, LRR-RLKs, é caracterizada por um domínio extracelular com pelo menos cinco motivos LRR, um domínio transmembrana e um domínio de proteína-quinase intracelular, que desempenha importante papel no controle de um amplo processo do desenvolvimento em plantas (Cock et al., 2002; Ma et al., 2012).

A família multigênica *SERK* foi definida com a presença de 11 éxons e a tendência de que cada éxon codifica um domínio de proteína específica (Nolan et al., 2011). A sequência de aminoácidos de *SERK* compõe uma ordem particular de domínios do N ao C terminal, sendo peptídeo sinal (SP), zíper de leucina (ZIP), cinco motivos repetitivos de leucina (*Leucine Rich Repeats* – LRRs), um domínio rico em prolina (SPP), um domínio transmembrana e um domínio quinase intracelular seguido da porção C-terminal (Nolan et al., 2011).

O primeiro homólogo de *SERK* foi isolado em culturas embriogênicas de *Daucus carota* (*DcSERK*), sendo caracterizado como um gene marcador de células com características embriogênicas (Schmidt et al., 1997). Em seguida, vários genes da família *SERK* foram isolados em outras espécies de gimnospermas, eudicotiledôneas e monocotiledôneas, como *AtSERK1* a *AtSERK5* de *Arabidopsis thaliana* (Hecht et al., 2001), *ZmSERK1* a *ZmSERK3* de *Zea mays* (Baudino et al., 2001; Zhang et al., 2011), *MtSERK1* a *MtSERK6* e *MtSERKL1* a *MtSERKL3* de *Medicago truncatula* (Nolan et al., 2003; Nolan et al., 2009; Nolan et al., 2011), *HaSERK* de *Helianthus annuus* (Thomas et al., 2004), *TcSERK* de *Theobroma cacao* (Santos et al., 2005), *CitSERK1* de *Citrus unshiu* (Shimada et al., 2005) *OsSERK1*, *OsSERK2* e *OsBISERK1* de *Oryza sativa* (Hu et al., 2005; Ito et al., 2005; Song et al., 2008; Park et al., 2011), *StSERK1* de *Solanum tuberosum* (Sharma et al., 2008), *TaSERK1* a *TaSERK3* de *Triticum aestivum* (Singla et al., 2008) *VvSERK1* a *VvSERK3* de *Vitis vinifera* (Schellenbaum et al., 2008; Maillot et al., 2009), *CnSERK* de *Cocos nucifera* (Pérez-Núñez et al., 2009), *MaSERK1* de *Musa acuminata* (Huang et al., 2010), *RhSERK1* a *RhSERK4* de *Rosa hybrida* (Zakizadeh et al., 2010), *CpSERK1* e *CpSERK2* de *Cyclamen persicum* (Savona et al. 2012), *AcSERK1* de *Ananas comosus* (Ma et al., 2012), *AaSERK1* de *Araucaria angustifolia* (Steiner et al., 2012), e *PiSERK3* de *Prunus incisa* (Ben Mahmoud et al., 2013).

No presente estudo, foi isolado e caracterizada a expressão de um homólogo de *SERK* durante a indução e maturação de calos embriogênicos de *Anthurium andraeanum* cv. Eidibel. O relacionamento filogenético com membros de outras espécies sugere que *AanSERK* seja um possível ortólogo desse gene relacionado com a embriogênese somática, podendo também estar envolvido em diferentes funções ao longo do desenvolvimento da planta.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e condições de cultivo

Utilizaram-se, como material vegetal, plantas de *Anthurium andraeanum* cv. Eidibel previamente estabelecidas *in vitro* por organogênese indireta a partir de folhas jovens, seguindo a metodologia proposta por Tombolato et al. (1998), sendo as culturas cedidas pelo Instituto Agronômico, em Campinas (IAC).

As culturas foram subcultivadas a cada 30 dias (Figura 2A), em meio contendo macro, micronutrientes e vitaminas Pierik (Pierik, 1976), acrescido de 4,44 μM de 6-benziladenina (BA), 0,54 μM de ácido naftalenoacético (ANA), 2% de sacarose, 100 mg L^{-1} de mio-inositol e solidificado com 6,5 g L^{-1} de ágar Merck® (Darmstadt, Alemanha). O pH foi ajustado para 5,8, anteriormente à autoclavagem a 121 °C e 1,5 atm por 15 minutos. O material vegetal foi mantido em sala de crescimento, com fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25 ± 2 °C, irradiância luminosa de 36 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Indução de embriogênese somática

Seguindo a metodologia proposta por Pinheiro et al. (2014) para a indução de embriogênese somática em *Anthurium andraeanum* cv. Eidibel, os explantes, segmentos nodais com aproximadamente 1,0 cm de comprimento contendo uma gema (meristema axilar) (Figura 2B), foram inoculados em placas de Petri 90 x 15 mm (J. Prolab, Curitiba, Brasil) contendo 25 mL de meio Pierik acrescido de 10 μM de ANA, 2% de sacarose, 100 mg L^{-1} de mio-inositol e solidificado com 6,5 g L^{-1} de ágar Merck® (Darmstadt, Alemanha) e o pH ajustado para 5,8, e autoclavado a 121 °C e 1,5 atm, por 15 minutos. Em cada placa de Petri foram inoculados, horizontalmente, nove segmentos nodais, sendo mantidos por 90 dias para a indução de calos embriogênicos (Figura 2C). As culturas foram mantidas em sala de crescimento, no escuro, com temperatura de 25 ± 2 °C.

Os registros fotográficos de segmentos nodais e calos embriogênicos foram obtidos em microscópio estereoscópio (modelo Olympus SZX) com sistema de captura de imagens acoplado (modelo Olympus E-330).

Maturação de embriões somáticos

Seguindo a metodologia de Pinheiro et al. (2013) para a maturação dos embriões somáticos de *Anthurium andraeanum*, após a indução de embriogênese somática cerca de 90 mg de calos embriogênicos foram transferidos, sob condições assépticas, para Erlenmeyers (125 mL), contendo 25 mL de meio líquido Pierik acrescido de 0,47 μM de 6-furfuril-aminopurina (cinetina), 2% de sacarose, 100 mg L^{-1} de mio-inositol e solidificado com 6,5 g L^{-1} de ágar Merck® (Darmstadt, Alemanha). O pH foi ajustado para 5,8, e autoclavado a 121 °C e 1,5 atm por 15 minutos. As culturas foram mantidas por 65 dias em mesa agitadora (100 rpm), no escuro, em sala de crescimento, com temperatura de 25 ± 2 °C.

Microscopia de luz

Para os estudos anatômicos, as amostras fixadas aos 0, 15, 25, 30, 35, 40, 55, 90 dias em meio de indução de embriogênese somática, foram desidratadas em série etílica e incluídas em metacrilato (Historesin, Leica Instruments, Heidelberg, Alemanha). Para montagem das lâminas, cortes longitudinais de 5 μm foram obtidos em micrótomo rotativo de avanço automático (RM2255, Leica Microsystems Inc., Deerfield, EUA). Para a caracterização estrutural, as amostras foram mantidas por 10 minutos e coradas com azul de toluidina pH 4,4 (O'Brien & McCully, 1981). A captura de imagens foi realizada utilizando fotomicroscópio (AX70TRF, Olympus Optical, Tóquio, Japão) equipado com o sistema de câmera U-Photo.

Clonagem e caracterização do gene *SERK* de *Anthurium andraeanum*

Extração, quantificação e verificação da integridade do RNA total

O RNA total foi extraído a partir de calos embriogênicos, com 55 dias em meio de indução de embriogênese, utilizando Tris-Reagent®. Cada amostra, com 500 mg de material, foi macerada em nitrogênio líquido, com o auxílio de gral e pistilo (livre de RNase) e imediatamente colocadas em tubos Eppendorf® de 1,5 mL contendo 500 μL de Tris-Reagent. Em seguida foram adicionados 50 μL da mistura de clorofórmio e álcool isoamílico (24:1, v/v). A amostra foi homogeneizada, seguindo-se de incubação em gelo por cinco minutos e centrifugação a 12.000 rpm por 20 minutos a 4 °C. Após centrifugação, o sobrenadante foi recolhido para um novo tubo Eppendorf®, adicionando o mesmo volume de isopropanol à amostra, para a precipitação do RNA.

Após uma hora de incubação a 4 °C, a amostra foi lavada em 1 mL de etanol 70% (livre de RNase) e centrifugada por 15 minutos a 12.000 rpm e 4 °C; o sobrenadante foi descartado e os tubos foram mantidos em capela de fluxo laminar, para a evaporação do excesso de etanol 70% e secagem do sedimento. Em seguida, o sedimento foi ressuspensionado em 300 µL de água com dietil pirocarbonato (DEPC, Sigma) e mantido em geladeira a 4 °C.

A quantificação do RNA foi realizada em NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies TM) com absorvância de 260 nm; e a integridade das amostras verificada por eletroforese em gel de agarose a 1,2% (livre de RNase).

Síntese de cDNA fita simples (Superscript II – InvitrogenTM)

Para a síntese de cDNA fita simples, 3 µg de RNA total e 1 µL de oligo(dT), 1 µL de dNTP e 10 µL de água DEPC, em volume total de 12 µL, foram incubados a 65 °C por cinco minutos, em seguida, mantidos em gelo por dois minutos. Posteriormente, foram adicionados 4 µL do tampão de síntese de primeira fita de DNA, 2 µL de mistura de dNTPs (10 mM, cada) e 1 µL (200U) da enzima transcriptase reversa (SuperScriptTM Reverse transcriptase, InvitrogenTM), conforme recomendações do fabricante. A reação ocorreu em ciclo de 42 °C durante 50 minutos, em seguida, por 15 minutos a 70 °C para a inativação da enzima, realizada no termociclador (Biocycler MJ25). O cDNA foi armazenado a -20 °C até o momento do uso.

Amplificação, purificação e clonagem da sequência codificadora de SERK

O cDNA sintetizado a partir de RNA total de calos embriogênicos, foi utilizado como molde para a amplificação das sequências codificadoras de *SERK* expresso durante a embriogênese somática em *Anthurium andraeanum*. Para amplificação, foram utilizadas combinações de iniciadores degenerados desenhados por Baudino et al. (2001) nas seguintes combinações: S5/S1; S5/S2; S4/S1; S4/S2; S3/S1 e S3/S2 (Tabela 1; Figura 1).

Tabela 1. Iniciadores degenerados utilizados para amplificação do gene *SERK* em cDNA de *Anthurium andraeanum*, a partir de calos embriogênicos com 55 dias em meio de indução da embriogênese somática, e a localização na proteína (Baudino et al., 2001).

Iniciadores	Sequência	Domínio estrutural
S1	5'TGTHACRTGGGTRTCCTTGTARTCCAT3'	Domínio quinase (exon VII)
S2	5'CGRTGMACWGCCATRCTIATCAT3'	Domínio quinase (exon III)
S3	5'GTGAAYCCTTGCACATGGTTYCATGT3'	Zíper de leucina
S4	5'CCMTGYCCIGGATCTCCCCITTT3'	SSP
S5	5'ATGCACTSACYAATATYACWACYCTTCAAG3'	LRR

W = A ou T; R = A ou G; M = A ou C; Y = C ou T; H = A ou C ou T; S = C ou G. S1 e S2 (iniciadores reversos); S3, S4 e S5 (Iniciadores diretos). LRR = Repetições ricas em leucina; SPP = Região rica em prolina.

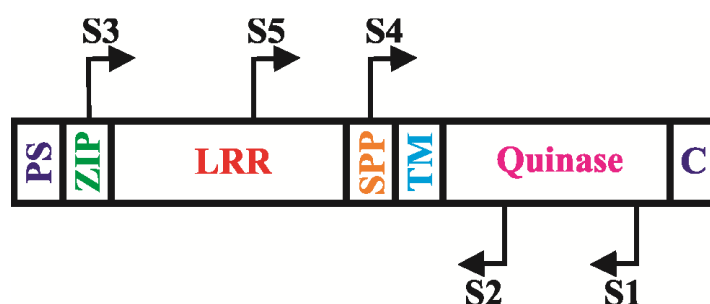


Figura 1. Estrutura geral de genes *SERK* e posição dos indicadores degenerados utilizados na amplificação. PS = Peptídeo sinal; ZIP = Zíper de leucina; LRR = Repetições ricas em leucina; SPP = Região rica em prolina; TM = domínio transmembrana; C = Região C terminal. Modificado de Baudino et al. (2001).

A reação de cadeia da polimerase (PCR - *Polymerase Chain Reaction*) ocorreu em volume final de 25 μ L, contendo 2,0 μ L de cDNA concentrado, 2,5 μ L de tampão 10x, 0,5 μ L de dNTPs (10 mM), 0,75 μ L de $MgCl_2$ (50 mM), 1 μ L de primer direto, 1 μ L de primer reverso, 0,2 μ L de Platinum[®] Taq DNA polimerase (InvitrogenTM) e 17,05 μ L de água milli-Q. Foi utilizado o seguinte programa de amplificação: desnaturação a 95 °C por cinco minutos, seguido de 35 ciclos a 95 °C (1 minuto), 50 °C (1 minuto), 72 °C (1 minuto), e uma extensão final a 72 °C por cinco minutos. Os produtos da amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,0%.

Os fragmentos amplificados foram purificados a partir do gel de agarose utilizando o Kit Wizard[®] SV Gel e PCR clean up (Promega[®], USA), de acordo com as instruções do fabricante.

Após quantificação em Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies TM), os fragmentos foram ligados no vetor pGEM[®]-T Easy Vector Systems (Promega[®], USA), na proporção de 3:1 de inserto:vetor, com a enzima T4 DNA ligase (Promega[®], USA), de acordo com as instruções do fabricante. A transformação em *Escherichia coli* (células ultracompetentes DH5 α), por choque térmico, foi realizada utilizando 2 μ L da ligação (inserto) e 40 μ L de células ultracompetentes (1×10^8). Após incubação a 37 °C por 1 hora, as células foram plaqueadas em meio seletivo LB (Sambrook & Russel, 2001) sólido contendo 100 μ g mL⁻¹ de ampicilina, 20 μ g mL⁻¹ de 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -d-galactopiranosídeo (X-Gal) (Promega[®], USA), 0,1 mM de isopropil-beta-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) (Promega[®], USA) e, posteriormente, incubadas a 37 °C por aproximadamente 14 horas. Para a confirmação da presença do inserto no vetor, o DNA plasmidial das colônias brancas foi clivado (digerido) com a enzima de restrição *EcoRI* e os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,0%, e posterior análise.

Sequenciamento dos clones e análise das sequências

Os clones confirmados pela análise de restrição foram sequenciados pela empresa Macrogen, na Coreia do Sul, nos sentidos senso e anti-senso com os iniciadores universais M13 e SP6, respectivamente.

Os cromatogramas obtidos foram processados e a montagem dos *consensus* executada no programa CodonCodeTM Aligner-Software (LI-COR, Inc., Lincoln, USA).

As sequências *consensus* obtidas foram comparadas com sequências já depositadas no banco de dados do NCBI utilizando-se do programa BLASTn (Altschul et al., 1997). O programa ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>) foi empregado para identificar a fase de leitura e tradução das proteínas. As sequências de nucleotídeos e aminoácidos foram alinhadas com sequências homólogas de proteínas SERK disponíveis no banco de dados do NCBI com maior identidade às sequências de *Anthurium andraeanum*, para análise dos domínios conservados.

Análise filogenética

O relacionamento filogenético da sequência de SERK de *Anthurium andraeanum* com as de outras espécies foi inferido mediante a construção de árvores filogenéticas. As sequências obtidas foram alinhadas com sequências de eudicotiledôneas, monocotiledôneas e gimnospermas, disponíveis no GenBank (<http://www.ncbi.nih.nlm.gov>).

Alinhamentos múltiplos das sequências foram obtidos utilizando-se o programa MUSCLE (Edgar, 2004) implementado no MEGA versão 5.0 (Tamura et al., 2011) disponível em <http://www.megasoftware.net/mega5>. Árvores filogenéticas foram obtidas utilizando o método de distância Neighbor-Joining (NJ) (Saitou & Nei, 1987) com o modelo de substituição JTT (Jones et al., 1992) e distribuição Gamma. A confiabilidade de cada ramo da árvore foi estimada via teste Bootstrap (Felsenstein, 1985) com 1.000 repetições.

Análise da expressão espacial do gene *SERK* durante a embriogênese somática de *Anthurium andraeanum* por hibridização *in situ*

Coleta e preparo dos tecidos

Foram coletados segmentos nodais com 0, 15, 25, 30, 35, 40, 55, 90 dias em meio de indução de embriogênese somática, e calos embriogênicos com 65 dias em meio de maturação dos embriões somáticos. Os explantes foram coletados em condições livres da ação de RNases e imersos imediatamente em solução fixadora (paraformaldeído 4% e glutaraldeído 0,25%, em tampão fosfato de sódio 0,01 M, pH 7,2). As amostras foram submetidas a vácuo por 1 hora, à temperatura ambiente. Em seguida a solução fixadora foi renovada e as amostras foram mantidas a 4 °C durante a noite.

No dia seguinte, as amostras foram lavadas em tampão fosfato de sódio 0,01 M, pH 7,2 e desidratadas em série etílica (30, 50, 70, 80, 85, 90, 95 e 100%), por 1 hora cada. As amostras foram infiltradas em parafina histológica (Dinâmica, Brasil), sendo desidratadas em séries crescentes de etanol:xilol nas proporções 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, v/v e xilol puro (duas trocas), sendo que cada etapa teve a duração de, pelo menos, 12 horas. Durante a etapa de xilol puro, as amostras foram mantidas em estufa a 65 °C, sendo acrescentado parafina. A cada troca foi descartado 30% da solução dos frascos e acrescentado parafina, até a substituição completa de xilol por parafina pura. As

amostras foram colocadas em formas de papel e, após a completa polimerização, foram aderidas a suportes de madeira e estocadas a 4 °C.

Secções de 10 µm foram obtidas em micrótomo rotativo de avanço manual Leica RM2255 (Alemanha) e colocadas em banho-maria contendo água tratada com DEPC, aquecida a 42 °C para distender as secções, sendo depois acondicionadas sobre lâminas Fisherbrand® (Fisher Scientific), livres de RNAses. Depois desse processo, as lâminas foram secas a temperatura ambiente e armazenadas a 4 °C, até o momento do uso.

Antes da hibridização, a parafina foi removida das lâminas em xilol 100% (duas trocas de cinco minutos, cada), xilol:etanol (1:1, v/v) por cinco minutos e etanol 100% (10 minutos). As lâminas foram secas à temperatura ambiente.

Síntese da sonda senso e anti-senso marcadas com digoxigenina

Para a síntese da sonda, foi utilizado como molde um fragmento de 626 bp, referente ao clone Aan3 (Tabela 2). O fragmento foi amplificado a partir de 10 ng do DNA plasmidial utilizando os iniciadores T7 e SP6, nas mesmas condições de amplificação já mencionada anteriormente para a reação de PCR. Os produtos amplificados foram purificados com fenol/clorofórmio (1:1), seguido de clorofórmio puro para remoção do fenol. A precipitação do DNA foi feita com acetato de sódio 3 M (1/10 volumes) e dois volumes de etanol absoluto. Os produtos foram quantificados em gel de agarose 1,0% com auxílio do marcador de peso molecular *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen®). Após análise da orientação do inserto na sequência, o clone escolhido para a síntese da sonda foi estocado em glicerol 20% a -80 °C. Para a síntese da sonda, foi utilizado 1 µg do produto purificado. A sonda de RNA, senso e anti-senso, foi sintetizada por transcrição *in vitro*, utilizando o *DIG RNA Labeling kit (SP6/T7)* (Roche®), de acordo com as instruções do fabricante. A concentração da sonda foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1,2%, utilizando 100 e 200 ng do controle positivo de RNA marcado do mesmo *kit*, e a marcação confirmada por dotblot.

Reação de hibridização

Para a reação de hibridização, 60 ng de tRNA de levedura (Invitrogen®) e 60 ng de sonda foram desnaturados a 80 °C por cinco minutos e adicionados a 100 µL de tampão de hibridização (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, NaCl 300 mM, formamida 50%, EDTA 1 mM pH 8.0; solução de Denhardt 1X). Para a hibridização, 120 µL do mix de hibridização foram colocados sobre cada lâmina e cobertas com Parafilm®. As lâminas

foram incubadas em câmara úmida, a 42 °C, no escuro, por período de aproximadamente 16 horas.

Reação de pós-hibridização e detecção imunológica

Após a hibridização, as lâminas foram lavadas em SSC 4x, 2x, 1x e 0,5x 5x (a partir de solução SSC 20X = NaCl 3M, Na₃-citrato 0,3M, pH 7,2), cada solução por 20 minutos. Em seguida, foram mantidas por cinco minutos em tampão de detecção 1 (0,1 M de Tris HCl - pH 7,5; 0,15 M de NaCl) e incubadas por 30 minutos em tampão bloqueadora 2 (tampão de detecção 1 acrescido de 1% de BSA). As secções foram novamente lavadas em tampão de detecção 1 por cinco minutos e incubadas durante uma hora com anticorpo *Anti-Digoxigenina-AP, Fab Fragments* (Roche®) diluído 1:1.000 em tampão de detecção 1. Após a sequência de duas lavagens, de 15 minutos cada, em tampão de detecção 1 e uma lavagem de cinco minutos em tampão de detecção 3 (0,1 M de Tris-HCl pH 7,5; 0,1 M de NaCl; 0,05 M de MgCl₂, com pH final ajustado para 9,5), as secções foram incubadas em solução de coloração contendo 4,5 µL de BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato) (Promega®, USA) (0,05 g mL⁻¹) e 4,5 µL de NBT (nitrobluetetrazólio) (Promega®, USA) (0,05 g mL⁻¹) em 1 mL de tampão 3 por aproximadamente 40 minutos, no escuro.

Para cessar a reação, as secções foram incubadas no tampão de detecção 4 (0,01 M de Tris HCl - pH 8,0; 1 mM EDTA) por dez minutos, em seguida foram lavadas duas vezes em água bidestilada. As lâminas foram montadas em água milli-Q.

As análises e captura de imagens foram realizadas em microscópio de luz modelo AX70 TRF, Olympus Optical) com sistema U-Photo, acoplado à câmera fotográfica digital (modelo Spot Insightcolour 3.2.0, Diagnostic Instruments Inc.) e microcomputador com o programa de captura de imagens Spot Basic 4.8.

RESULTADOS

Alterações estruturais dos segmentos nodais durante a indução da embriogênese somática em *Anthurium andraeanum*

A embriogênese somática em plantas de *Anthurium andraeanum* (Figura 2A) ocorreu no meristema axilar do segmento nodal (Figura 2B) com formação de calo embriogênico (Figura 2C), sem qualquer divisão aparente da epiderme ou das células do parênquima de preenchimento.

Em secções longitudinais, foi possível observar segmentos nodais com meristema axilar e sistema vascular (Figura 2D). Aos 15 dias em meio de indução, o meristema axilar apresentou intumescimento, com início de diferenciação das células da protoderme e divisão das células da região meristemática (Figura 2E). Aos 25 dias, foram observadas início das divisões da protoderme do calo embriogênico e no meristema axilar, tendo início da formação dos calos embriogênicos (Figura 2F). Aos 35 dias, observaram-se início de formação procambial no calo embriogênico (Figura 2G). Aos 55 dias, foi evidenciada a presença de calo embriogênico sem conexão com o tecido de origem, com presença de embrião somático, protoderme e procâmbio (Figura 2H). Aos 90 dias de indução, foi possível observar aumento do tamanho do calo embriogênico, devido as novas divisões celulares, evidenciando embriões com delimitação de protoderme, procâmbio, e a presença de ráfides inerente à espécie (Figura 2I).

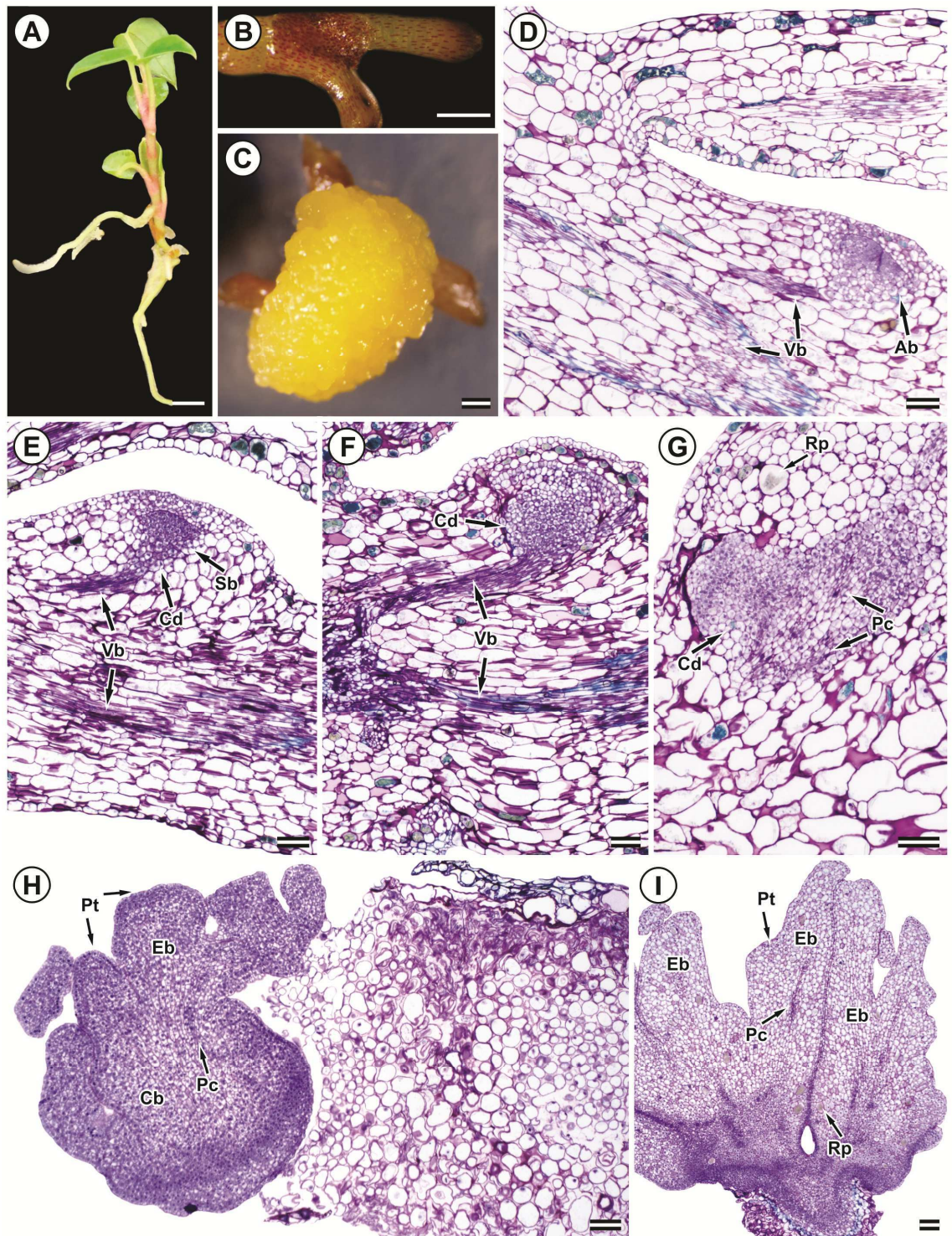


Figura 2. Indução de culturas embriogênicas a partir de segmentos nodais de *Anthurium andraeanum* cv. Eidibel. (A) Planta subcultivada a cada 30 dias; (B) Explante inicial: segmento nodal em tempo zero; (C) Explante final: calos embriogênicos aos 90 dias de cultivo em meio de indução; (D) Segmento nodal em tempo zero; Segmento nodal aos 15 (E), 25 (F) e 35 (G) dias de cultivo com intumescimento das gemas e células com intensa divisão na região meristemática; (H) Aos 55 dias, calos embriogênicos

formados, evidenciando embriões globulares com delimitação da protoderme; **(I)** Embrião somático aos 90 dias de cultivo com formação da protoderme, evidenciando procâmbio e protoderme. Ab: meristema axilar; Cb: calo embriogênico. Cd: divisões celulares; Eb: embrião somático; Pc: procâmbio; Pt: protoderme; Rp: ráfide; Sb: gema intumescida; Vb: sistema vascular. Barras: A-C: 500 μ M; D-I: 100 μ M.

Clonagem da provável sequência codificadora de *SERK* em *Anthurium andraeanum*

Todas as combinações de iniciadores degenerados utilizados para a amplificação do cDNA de *SERK* em *Anthurium andraeanum* (Tabela 1) geraram fragmentos com tamanho esperado no gel (Tabela 2). Esses fragmentos foram clonados, sendo identificados sete clones positivos das combinações S5/S1; S5/S2; S4/S1; S4/S2; S3/S1 e S3/S2, através da análise de restrição. Os clones foram numerados de 1 a 7. A combinação S3/S1 do clone Aan6, gerou a maior sequência, com cerca de, aproximadamente, 1.239 bp. Já a combinação S5/S2, do clone Aan3, gerou sequência de, aproximadamente, 626 pb (Tabela 2).

Tabela 2. Tamanho dos fragmentos dos clones positivos do cDNA de *Anthurium andraeanum* obtidos por PCR de acordo com a combinação de iniciadores.

Combinação dos iniciadores	Tamanho (kb)
S3/S1	1,2
S3/S2	0,9
S5/S1	0,9
S5/S2	0,6
S4/S1	0,7
S4/S2	0,4

Análise dos homólogos de *SERK* por meio das sequências de nucleotídeos

Na comparação das sequências nucleotídicas dos clones com aquelas depositadas no banco de dados do NCBI, constatou-se elevada identidade com os homólogos de *SERK*. As sequências dos nucleotídeos dos sete clones foram alinhadas, e para analisar a proximidade desses clones, foi construído um cladograma (dados não mostrados). Após análise, não foram encontradas diferenças no agrupamento dos clones. Dessa forma, foi selecionado o maior clone obtido (Aan6) da combinação

S3/S1, com, aproximadamente, 1.239 pb, que apresentou elevada identidade com SERK e SERK1 (82 a 84%), quando comparado com diferentes espécies, como: SERK de *Cocos nucifera* (84%), SERK1 *Malus hupehensis* (83%), SERK1 de *Rosa canina* (83%), SERK de *Dimocarpus longan* (83%) e SERK de *Theobroma cacao* (82%) (Tabela 4).

Tabela 4. Comparação da sequência nucleotídica do clone Aan6 (AanSERK) de *Anthurium andraeanum*, obtida a partir de cDNA amplificado com a combinação S3/S1 (1.239 pb), com as sequências de outras espécies depositadas no banco de dados do NCBI.

Acesso	Descrição	Cobertura (%)	E-valor	Identidade máxima (%)
AY791293.2	<i>Cocos nucifera</i> (SERK)	99	0,0	84
JQ231272.1	<i>Malus hupehensis</i> (SERK1)	100	0,0	83
HM802242.1	<i>Rosa canina</i> (SERK1)	100	0,0	83
FJ013227.3	<i>Dimocarpus longan</i> (SERK)	99	0,0	83
AY570507.1	<i>Theobroma cacao</i> (SERK)	100	0,0	82

Análise da sequência de aminoácidos da proteína SERK de *Anthurium andraeanum*

As sequências dos clones de *Anthurium andraeanum* foram analisadas pelo programa ORF Finder (NCBI). Depois disso, foi construído um cladograma apenas com as sequências de *Anthurium andraeanum*, em que foi demonstrada elevada similaridade entre as sequências de aminoácidos desses clones. Dessa forma, foi selecionado apenas um clone, o Aan6, com 1.239 pb, que possui uma *Open Read Frame* (ORF) de 382 aminoácidos.

Com o múltiplo alinhamento das sequências deduzidas de aminoácidos verificou-se que o clone Aan6 (AanSERK) apresenta domínios estruturais característicos de proteínas SERK de outras espécies, que inclui parte do domínio extracelular contendo parte do padrão repetitivo de leucina (LRR1) até LRR5, a região rica em prolina, o domínio transmembranar e parte do domínio quinase (Figura 3).

A sequência do clone Aan6 (AanSERK) foi alinhada com a sequência parcial de *Anthurium andraeanum* (AanSERK NCBI), com aproximadamente 1.003 pb, depositada no banco de dados da NCBI, no qual inicia-se em parte da região quinase e

finaliza na extremidade C terminal (Figura 3). Ainda assim, para maiores informações sobre essas regiões, faz-se necessário experimentos futuros de RACE 3' e 5', que dará extensão do clone a partir de iniciadores internos específicos.

de dados. As sequências deduzidas de aminoácidos de proteínas SERK de *Anthurium andraeanum* parcial (AanSERK NCBI); *Arabidopsis thaliana* (AtSERK1), *Oryza sativa* (OsSERK1), *Triticum aestivum* (TaSERK1), *Medicago truncatula* (MtSERK1) e *Zea mays* (ZmSERK1) foram alinhadas e os domínios estruturais foram indicados por retângulos abaixo do alinhamento. LRR1-LRR5: domínios contendo os motivos repetitivos de leucina; SPP: região rica em prolina; C-terminal: domínio carboxi-terminal. “Gaps” incluídos para otimização do alinhamento são indicados por “-”.

Análise filogenética

Realizou-se comparação filogenética da sequência proteica de *Anthurium andraeanum* (AanSERK) com seus homólogos de SERK em outras espécies vegetais, com o intuito de investigar a relação entre essas proteínas. A árvore filogenética foi construída considerando a sequência deduzida de aminoácidos do clone Aan6 (AanSERK), incluindo os motivos LRR ao domínio quinase.

Foi observada a formação de grupos bem sustentados pelo teste de Bootstrap (Figura 4). O clone Aan6 (AanSERK) se agrupou em um clado próximo aos diferentes membros de SERK de monocotiledôneas, como *Zea mays* (ZmSERK1, ZmSERK2 e ZmSERK3), *Triticum aestivum* (TaSERK2), *Brachypodium distachium* (BdSERK) e *Oryza sativa* (OsSERK1). As sequências de *Anthurium andraeanum* (AanSERK e AanSERK NCBI) agruparam-se no mesmo clado, sustentado com valor Bootstrap de 99%, de acordo com a análise comparativa de sequências (Figura 4).

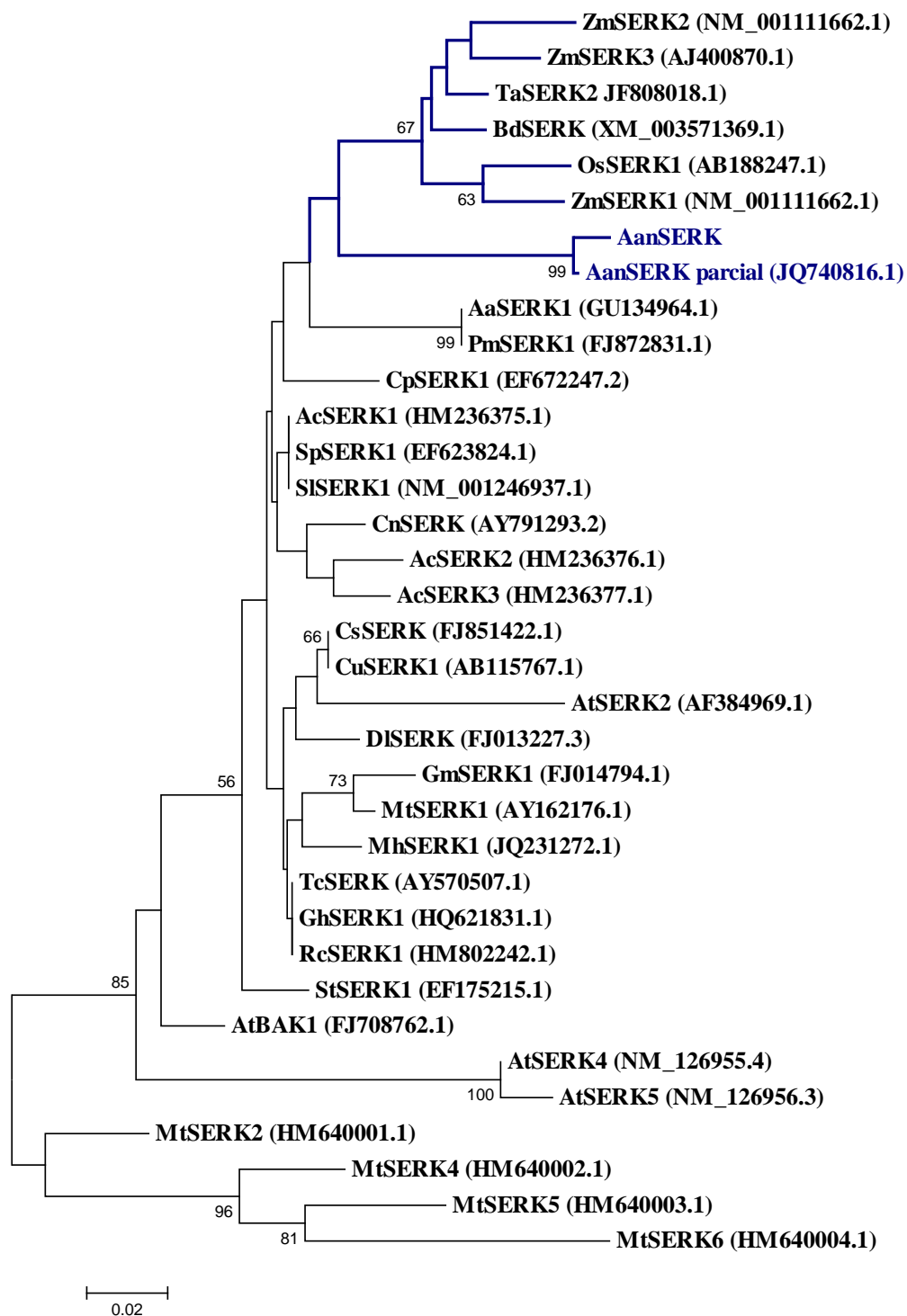


Figura 4. Inferência das relações filogenéticas entre homólogos da proteína SERK com base nas sequências parciais de aminoácidos deduzidas. Os diferentes homólogos foram alinhados e foi gerada uma matriz de distância para construção do cladograma por *Neighbor-Joining*. A barra indica 2% de substituições não-sinônimas. Os números indicam valores de *Bootstrap*, em porcentagem (1.000 repetições), sendo apresentados apenas valores acima de 50%. O clone de *Anthurium andraeanum* é destacado em azul,

Aan6 - AanSERK, juntamente com a sequência parcial da mesma espécie (AanSERK NCBI), depositada no banco de dados NCBI. Os ramos em azul indicam as sequências de plantas monocotiledôneas de clado próximo, com a sequência de AanSERK. As letras e números entre parênteses indicam o código de acesso no banco de dados do NCBI. ZmSERK1, ZmSERK2 e ZmSERK3 (*Zea mays*); TaSERK2 (*Triticum aestivum*), BdSERK (*Brachypodium distachyon*), OsSERK1 (*Oryza sativa*); AanSERK NCBI (*Anthurium andraeanum*); AaSERK1 (*Araucaria angustifolia*) PmSERK1 (*Pinus massoniana*); CpSERK1 (*Cyclamen persicum*); AcSERK1, AcSERK2 e AcSERK3 (*Ananas comosus*); SpSERK1 (*Solanum peruvianum*); SlSERK1 (*Solanum lycopersicum*); CnSERK (*Cocos nucifera*); CsSERK (*Citrus sinensis*); CuSERK1 (*Citrus unshiu*); AtBAK1, AtSERK2, AtSERK4 e AtSERK5 (*Arabidopsis thaliana*); DlSERK (*Dimocarpus longan*); GmSERK1 (*Glycine max*), MtSERK1, MtSERK2, MtSERK4, MtSERK5 e MtSERK6 (*Medicago truncatula*); MhSERK1 (*Malus hupehensis*); TcSERK (*Theobroma cacao*); GhSERK1 (*Gossypium hirsutum*); RcSERK1 (*Rosa canina*); StSERK1 (*Solanum tuberosum*).

Caracterização do padrão de expressão de *SERK* por hibridização *in situ*

Com a finalidade de determinar o padrão de expressão dos transcritos de *SERK*, realizou-se a hibridização *in situ* durante a indução e maturação de embriões somáticos em *Anthurium andraeanum*.

A análise em secções longitudinais com sonda antisense (positivo), demonstrou sinal fraco da expressão de *SERK* no meristema axilar dos segmentos nodais em tempo zero (Figura 5A). Aos 15 dias, foi possível observar que as células em divisão foram fortemente marcadas, juntamente com as células da protoderme e o sistema vascular (Figura 5B). Aos 25, 30 e 35 dias observou-se sinal forte da expressão de *SERK* na protoderme e nas células em divisão do meristema axilar (Figura 5C, 5D e 5E, respectivamente). Nenhum sinal foi observado nos tecidos meristemáticos em divisão, quando hibridizados com a sonda sense (controle negativo), apenas acúmulo de compostos fenólicos no tecido parenquimático do segmento nodal (Figura 5F). Aos 40 dias de cultivo, observou-se sinal forte para a expressão do gene *SERK*, nas células embriogênicas em constante divisão (Figura 5G). Aos 55 dias, foi possível observar embriões somáticos em estágio globular com forte reação positiva quando hibridizado com a sonda antisense (Figura 5H). Aos 90 dias, foi possível observar embriões somáticos com forte marcação na protoderme e nas células em divisão, principalmente

ao redor do núcleo (Figura 5I). Quando testada a sonda senso, foi possível observar a ausência da coloração característica da hibridização (Figura 5J).

Aos 65 dias em meio de maturação, foi possível observar a ausência de sinal da hibridização, tanto na sonda antisenso (Figura 5K), quanto na senso (Figura 5L).

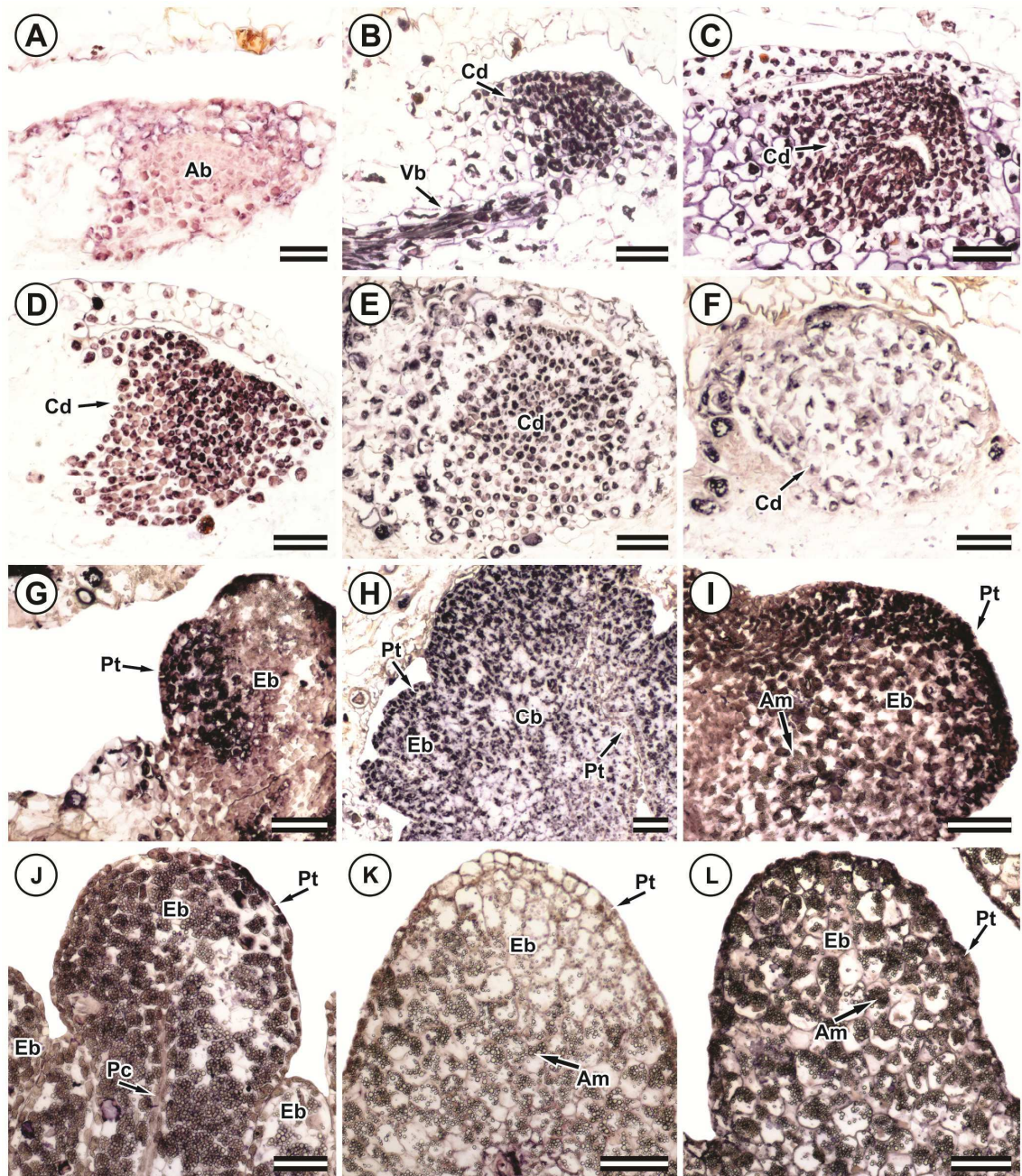


Figura 5. Localização dos transcritos do gene *SERK* por hibridização *in situ* durante a ontogenia da indução de embriogênese somática e maturação dos embriões maduros de *Anthurium andraeanum* cv. Eidibel, a partir de segmento nodais. (A) Meristema axilar do segmento nodal em tempo zero, hibridizado com sonda antisenso (controle positivo); Segmento nodal aos 15 (B), 25 (C), 30 (D), 35 (E) dias de cultivo com intumescimento

das gemas e divisões celulares na região meristemática; **(F)** Segmento nodal aos 35 dias, hibridizado com sonda senso (controle negativo); **(G)** Aos 40 dias de cultivo, segmento nodal evidenciando calos embriogênicos e protoderme; **(H)** Aos 55 dias, calos embriogênicos formados, evidenciando embriões somáticos com delimitação da protoderme; **(I)** Embrião somático aos 90 dias de cultivo com formação da protoderme, evidenciando amiloplastos; **(J)** Embriões somáticos aos 90 dias, com presença de protoderme, procâmbio e amiloplastos, hibridizado com sonda senso; Embrião maduro aos 65 dias de cultivo em meio de maturação, contendo protoderme e amiloplasto, hibridizado com sonda antisense **(K)** e senso **(L)**. Sondas antisense (A-E; G-I; K - SP6) e senso (F; J; L - T7). Ab: meristema axilar; Am: amiloplasto; Cb: Calo embriogênico; Cd: divisões celulares; Eb: Embrião somático; Pc: procâmbio; Pt: protoderme; Vb: sistema vascular. Barras: 100 µm.

DISCUSSÃO

Alterações estruturais dos segmentos nodais durante a indução da embriogênese somática em *Anthurium andraeanum*

Em *Anthurium andraeanum* cv. Eidbel, quando utilizado meio de indução (Pierik com a adição de 10 μ M de ANA), foi observada a indução de embriogênese somática a partir dos segmentos nodais (Pinheiro et al., 2014). No entanto, o presente estudo descreve pela primeira vez as alterações estruturais com modificações moleculares que ocorrem durante a embriogênese somática nessa espécie.

Uma das maneiras para investigar a progressão das fases específicas na embriogênese somática são os estudos histológicos (Jalil et al., 2008). No presente trabalho, a análise anatômica revelou a origem celular e o desenvolvimento da embriogênese somática a partir de segmentos nodais. Nesse sistema foi demonstrado que os calos embriogênicos de *Anthurium andraeanum* são de padrão multicelular, assim como observado em *Acrocomia aculeata* (Moura et al., 2008) *Euterpe oleracea* (Scherwinski-Pereira et al., 2012) e *Passiflora cincinnata* (Rocha et al., 2012). Isso devido à desdiferenciação das células dos calos embriogênicos e a sua rediferenciação em grupos de células, indicando padrão multicelular na origem dos embriões somáticos (Rocha et al., 2012).

O potencial embriogênico dos explantes ocorreu no meristema axilar dos segmentos nodais de *Anthurium andraeanum*. Os calos embriogênicos tornaram-se visíveis a partir dos 40 dias de cultivo em meio de indução.

A partir dos 30 dias de cultivo foram observadas tanto em células em divisão quanto em calos embriogênicos, grupos de células com núcleo grande, nucléolo proeminente, citoplasma denso, paredes celulares delgadas e presença de amido, características encontradas normalmente em células embriogênicas. Durante a indução de embriogênese somática, o tempo de exposição dos tecidos causa modificações celulares, e algumas células adquirem atividade meristemática (Fehér et al., 2003). Quando as células adquirem habilidade no desenvolvimento de embriões somáticos são chamadas de células competentes (Rocha et al., 2012). Essas modificações celulares também são observadas em regiões do embrião zigótico, o que caracteriza células com competência embriogênica (Scherwinski-Pereira et al., 2012).

Existe a necessidade de confirmar a morfologia das células para distinguir as células que são embriogênicas daquelas que falharam durante a resposta embriogênica

(Jalil et al., 2008). Nesse contexto, informações sobre células competentes são importantes para estudos sobre a regulação gênica durante a indução de embriogênese somática em plantas.

Expressão do gene *SERK* na embriogênese somática de *Anthurium andraeanum*

Foi realizada a análise molecular para obter melhor compreensão dos eventos-chave que ocorrem durante a indução da embriogênese somática em segmentos nodais de *Anthurium andraeanum*. Não existem relatos na literatura de genes relacionados com a embriogênese somática nessa espécie. Apesar disso, parte da região 3' do gene *SERK* em *Anthurium andraeanum* foi depositada no banco de dados NCBI.

Comparando o gene *SERK* de *Anthurium andraeanum* (AanSERK) com seus homólogos em outras espécies de plantas, depositadas no banco de dados NCBI, foi possível observar que houve elevada similaridade desses genes, sugerindo que eles podem desempenhar funções semelhantes. No presente estudo foi analisada a expressão do gene *SERK* na indução e maturação de embriões somáticos de *Anthurium andraeanum* e a sua função como marcador de embriogênese somática durante o cultivo *in vitro*.

Embora a expressão de *SERK* esteja extremamente relacionada com a indução de embriogênese, este gene pode desempenhar importante papel no amplo desenvolvimento das plantas (Ben Mahmoud et al., 2013). Ou seja, a expressão dos homólogos de *SERK* pode ocorrer em outros tecidos, tais como: em calos não embriogênicos (Baudino et al., 2001; Zakizadeh et al., 2010); em tecidos reprodutivos (Baudino et al., 2001); na organogênese *in vitro* da parte aérea (Thomas et al., 2004); na rizogênese *in vitro*, em meristemas primários, incluindo procâmbio (Nolan et al., 2009; Savona et al., 2012; Wang et al., 2011); em primórdios caulinares e radiculares (Ito et al., 2005; Savona et al., 2012); e em órgãos vegetais, como folhas, caule, cálice (Ito et al., 2005; Ma et al., 2012) e raízes (Ito et al., 2005). No presente trabalho, foi possível observar a presença de transcritos de *SERK* no meristema axilar do segmento nodal (tempo zero).

Os homólogos de *SERK* podem ser expressos também durante o desenvolvimento de plantas, na indução de resistência às doenças e aos patógenos (Santos et al., 2009; Huang et al., 2010; Yang et al., 2011). Isso ocorre por que os homólogos de *SERK* são capazes de mediar parcialmente a transdução de sinais de defesa (Hu et al., 2005; Song et al., 2008).

Os homólogos de *SERK* estão envolvidos não só no crescimento e desenvolvimento das plantas, mas também na sinalização de reguladores de crescimento e dos estádios de desenvolvimento do embrião durante a embriogênese (Santos et al., 2009; Zhang et al., 2011). Esses genes também atuam no mecanismo geral de percepção de estresse biótico e abiótico, provavelmente a uma resposta de estresse à dessecação e a outros fatores que podem estimular a embriogênese somática, quando se utiliza a auxina como molécula de sinalização (Nolan et al., 2003; Santos et al., 2009). Esses genes são induzidos também por outras moléculas do estresse de sinalização, como ácido jasmônico, benzotiadiazole, o ácido abscísico (Hu et al., 2005).

A expressão dos homólogos de *SERK* pode estar associada como marcador de pluripotência, pois possui amplo papel no crescimento e desenvolvimento de plantas, não sendo específico para a embriogênese somática (Nolan et al., 2003; Zakizadeh et al., 2010; Savona et al., 2012). Apesar disso, a expressão dos genes da família *SERK* está normalmente associada com a indução de embriogênese somática, podendo ser utilizada como potencial gene marcador para monitorar a transição das células de tecidos de calos para células competentes e embriogênicas (Pérez-Núñez et al., 2009; Zakizadeh et al., 2010; Ma et al., 2012).

No presente estudo, a partir da hibridização *in situ*, foi possível observar a presença de transcritos de *SERK* no meristema axilar sem início de divisões celulares (tempo zero), nos tecidos em divisões celulares, nos calos embriogênicos, e nos sistemas vasculares, durante a indução da embriogênese somática de *Anthurium andraeanum*. No entanto, aos 65 dias de maturação, não houve sinal nos embriões somáticos em estágio mais avançado. Este fato demonstra que a expressão do gene *SERK* em *Anthurium andraeanum* está relacionada apenas na fase de indução da embriogênese somática, cessando na etapa de maturação dos embriões somáticos.

A expressão de *SERK* em *Anthurium andraeanum* foi diferente da observada por outros autores, em que a marcação característica regrediu nos estádios mais tardios. Por exemplo, em *Citrus sinensis* foi observado a marcação característica de *SERK*, apesar de moderada nos embriões durante as fases de cordiforme para torpedo e mais fraca em embriões globulares (Ge et al., 2010). Em *Daucus carota* a expressão do gene *DcSERK* ocorreu até o estágio globular, mas nenhuma expressão foi constatada em culturas não embriogênicas (Schmidt et al., 1997; Shiu & Bleecker, 2001). Em *Arabidopsis thaliana*, a expressão do gene *AtSERK1* ocorreu em embriões globulares, e diminuiu rapidamente após a transição para o estágio de cordiforme (Tucker et al., 2003), não sendo expresso

no procâmbio (Kwaaitaal & De Vries, 2007). Em *Dactylis glomerata*, utilizando a técnica de hibridização *in situ*, foi possível observar a expressão do gene *SERK* durante o desenvolvimento embrionário até o estágio globular dos embriões somáticos (Somleva et al., 2000). No entanto, foi identificado também em fases posteriores do embrião, como no meristema apical, escutelo, coleóptilo e coleorriza (Somleva et al., 2000).

O gene *TcSERK*, em *Theobroma cacao*, foi expresso durante a indução de embriogênese somática e em embriões maduros tanto zigóticos quanto somáticos, tendo importante papel durante os estádios mais tardios da embriogênese somática (Santos et al., 2005). O mesmo foi observado em *Solanum tuberosum*, no qual o gene *StSERK* foi expresso durante a fase de indução de embriogênese somática e durante os demais estádios de desenvolvimento do embrião (Sharma et al., 2008). Em *Vitis vinifera*, o envolvimento dos genes *VvSERK1* e *VvSERK3* ocorre nos explantes desde o início da indução de calos embriogênicos (Schellenbaum et al., 2008). Em *Araucaria angustifolia*, o gene *AaSERK1* demonstrou similaridade com o seu homólogo *SERK1* em angiospermas, sendo este envolvido na formação inicial de embriões somáticos e zigóticos (Steiner et al., 2012).

Os trabalhos citados anteriormente, relataram sinal da expressão de *SERK* na indução de embriogênese somática e durante os demais estádios de desenvolvimento do embrião somático. Diferente do observado no presente trabalho, que o sinal da expressão do gene *SERK* em *Anthurium andraeanum* cessou durante a etapa de maturação dos embriões somáticos. De acordo com a condição fisiológica submetida, o gene *SERK* pode ser expresso de maneira diferenciada em diferentes espécies de eudicotiledôneas, monocotiledôneas e gimnospermas (Steiner et al., 2012).

Comparação entre AanSERK-like e SERK de outras espécies

A partir da análise da sequência do clone Aan6 de *Anthurium andraeanum* (AanSERK) foi possível observar que se trata de um possível ortólogo do gene *SERK*, expresso durante a indução da embriogênese somática nessa espécie, sendo confirmado devido a elevada similaridade com a sequência previamente depositada no banco de dados NCBI de *Anthurium andraeanum* (AanSERK NCBI).

Outros autores também relatam a associação do gene *SERK* como marcador de embriogênese somática em outras espécies de eudicotiledôneas, como *Daucus carota*

(Schmidt et al., 1997), *Arabidopsis thaliana* (Hecht et al., 2001), *Medicago truncatula* (Nolan et al., 2003; Nolan et al., 2009), *Solanum tuberosum* (Sharma et al., 2008), *Rosa hybrida* (Zakizadeh et al., 2010) e *Cyclamen persicum* (Savona et al., 2012); em monocotiledôneas, como *Zea mays* (Baudino et al., 2001; Zhang et al., 2011); *Helianthus annuus* (Thomas et al., 2004), *Dactylis glomerata* (Somleva et al., 2000), *Triticum aestivum* (Singla et al., 2008), *Oryza sativa* (Song et al., 2008), *Cocos nucifera* (Pérez-Núñez et al., 2009), *Ananas comosus* (Ma et al., 2012); e em gimnosperma, como *Araucaria angustifolia* (Steiner et al., 2012).

Foi possível observar elevada similaridade da sequência parcial de SERK de *Anthurium andraeanum* com domínio de outras proteínas SERK. Isso devido à similaridade entre a região rica em prolina (SPP), os domínios ricos em leucina (LRR), domínios transmembrana e quinase.

As LRR-RLKs estão relacionadas à percepção de sinais químicos do ambiente, por possuírem dois domínios: o domínio transmembrana de ancoragem de proteína na membrana plasmática e o domínio quinase-citoplasma, capazes de realizar a transdução de sinais extracelulares para o meio intracelular, processo esse realizado pela fosforilação da proteína (Shah, 2002; Li, 2010). A posição das RLKs, na membrana plasmática, torna essas proteínas fundamentais para a sinalização de uma percepção externa à célula, além da condução do sinal para o interior, elicitando uma resposta (Nolan et al., 2011). Com isso, os genes da família *SERK* atuam como correceptores em várias vias de sinalização, por meio de interações físicas distintas com ligantes de RLKs (Li, 2010). Estudos recentes ressaltam ainda que alguns membros de LRR-RLKs têm papel duplo ou múltiplo, é o caso da família *SERK* (Li, 2010). Com isso, a identificação de outros genes da família *SERK*, que interagem com RLKs, poderá ajudar a revelar funções adicionais desses genes (Li, 2010).

Na construção da árvore filogenética, foi possível observar a separação das espécies de monocotiledôneas, eudicotiledôneas e gimnospermas. O clone Aan6 de *Anthurium andraeanum* (AanSERK) agrupou-se junto a sequência já depositada da mesma espécie (AanSERK NCBI), com 99% de Bootstrap, estando também próxima de outras monocotiledôneas (gramíneas). Steiner et al. (2012) também relataram que houve separação entre as monocotiledôneas, eudicotiledôneas e gimnospermas em três grupos diferentes.

Os resultados obtidos corroboram aos já relatados por outros autores, no qual o processo de embriogênese somática inicia-se pela adição de reguladores de crescimento,

como as auxinas, conhecidos como moléculas de sinalização do estresse, capazes de estimular a indução de embriogênese a partir de células somáticas (Nolan et al., 2003; Santos et al., 2009), funcionando como moléculas de sinalização da indução de embriogênese somática.

As sequências de aminoácidos das proteínas SERK de *Anthurium andraeanum* (AanSERK e AanSERK NCBI) apresentam elevada similaridade com as de outras plantas, o que reforça a hipótese de que as funções são conservadas entre as espécies.

Com base nos resultados, sugere-se que a sequência *AanSERK* esteja associada com a indução de embriogênese somática, podendo ser utilizada para monitorar a transição de células competentes em células e tecidos embriogênicos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos; e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTSCHUL, S.; MADDEN, T.; SCHAFFER, A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v.25, p.3389-3402, 1997.

BAUDINO, S.; HANSEN, S.; BRETTSCHEIDER, R.; HECHT, V.F.G.; DRESSELHAUS, T.; LÖRZ, H.; DUMAS, C.; ROGOWSKY, P.M. Molecular characterisation of two novel maize LRR receptor-like kinases, which belong to the *SERK* gene family. **Planta**, v.213, p.1-10, 2001.

BAUTISTA, N.D.R.; PEÑALVER, D.A.; RODRÍGUEZ, R.B.; CHIU, W.C.; LÓPEZ, R.C.; TERRY, F.J.; PERALTA, M.P.; MARTÍNEZ, O.G. Embriogénesis somática en (*Anthurium andraeanum* Lind.) variedad 'Lambada'. **Revista de Sociedad, Cultura y Desarrollo Sustentable**, v.4, p.135-149, 2008.

BEN MAHMOUD, K.; DELPORTE, F.; MUHOVSKI, Y.; ELLOUMI, N.; JEMMALI, A.; DRUART, P. Expression of *PiABP19*, *Picdc2* and *PiSERK3* during induction of somatic embryogenesis in leaflets of *Prunus incisa* (Thunb.). **Molecular Biology Reports**, v.40, p.1569-1577, 2013.

BEYRAMIZADE, E.; AZADI, P.; MII, M. Optimization of factors affecting organogenesis and somatic embryogenesis of *Anthurium andreanum* Lind. 'Tera'. **Propagation of Ornamental Plants**, v.8, p.198-203, 2008.

CASTRO, A.C.; RESENDE, L.V.; GUIMARÃES, W.N.R.; LOGES, V. Uso de técnicas moleculares em estudo de diversidade genética em antúrio. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v.10, p.6-9, 2004.

COCK, J.M.; VANOOSTHUYSE, V.; GAUDE, T. Receptor kinase signalling in plants and animals: distinct molecular systems with mechanistic similarities. **Current Opinion in Cell Biology**, v.14, p.230-236, 2002.

DUQUENNE, B.; EECKHAUT, T.; WERBROUCK, S.; HUYLENBROECK, J. Effect of enzyme concentrations on protoplast isolation and protoplast culture of *Spathiphyllum* and *Anthurium*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.91, p.165-173, 2007.

EDGAR, R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, v.32, p.1792-1797, 2004.

FEHÉR, A.; PASTERNAK, T.P.; DUDITS, D. Transition of somatic cells to an embryogenic state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.74, p.201-228, 2003.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. **Evolution**, v.39, p.783-791, 1985.

FITCH, M.M.M.; LEONG, T.C.W.; HE, X.; MCCAFFERTY, H.R.K.; ZHU, Y.J.; MOORE, P.H.; GONSALVES, D.; ALDWINCKLE, H.S.; ATKINSON, H.J. Improved transformation of anthurium. **HortScience**, v.46, p.358-364, 2011.

GE, X.-X.; FAN, G.-E.; CHAI, L.-J.; GUO, W.-W. Cloning, molecular characterization and expression analysis of a *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE* gene (*CitSERKI-like*) in Valencia sweet orange. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.32, p.1197-1207, 2010.

HAMIDAH, M.; KARIM, A.G.A.; DEBERGH, P. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Anthurium scherzerianum*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.48, p.189-193, 1997.

HECHT, V.; VIELLE-CALZADA, J.P.; HARTOG, M.V.; SCHMIDT, E.D.L.; BOUTILIER, K.; GROSSNIKLAUS, U.; DE VRIES, S.C. The Arabidopsis *Somatic Embryogenesis Receptor Kinase 1* gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. **Plant Physiology**, v.127, p.803-816, 2001.

HU, H.; XIONG, L.; YANG, Y. Rice *SERKI* gene positively regulates somatic embryogenesis of cultured cell and host defense response against fungal infection. **Planta**, v.222, p.107-117, 2005.

HUANG, X.; LU, X.-Y.; ZHAO, J.-T.; CHEN, J.-K.; DAI, X.-M.; XIAO, W.; CHEN, Y.-P.; CHEN, Y.-F.; HUANG, X.-L. *MaSERKI* gene expression associated with somatic embryogenic competence and disease resistance response in banana (*Musa* spp.). **Plant Molecular Biology Reporter**, v.28, p.309-316, 2010.

- ITO, Y.; TAKAYA, K.; KURATA, N. Expression of SERK family receptor-like protein kinase genes in rice. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression**, v.1730, p.253-258, 2005.
- JALIL, M.; CHEE, W.W.; OTHMAN, R.Y.; KHALID, N. Morphohistological examination on somatic embryogenesis of *Musa acuminata* cv. Mas (AA). **Scientia Horticulturae**, v.117, p.335-340, 2008.
- JONES, D.T.; TAYLOR, W.R.; THORNTON, J.M. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. **Computer Applications in the Biosciences**, v.8, p.275-282, 1992.
- JUNQUEIRA, A.H.; PEETZ, M.D.S. Cultivares de Anthurium en el mercado brasileño. **Horticultura Internacional**, v.66, p.38-41, 2008.
- KUEHNLE, A.R.; CHEN, F.-C.; SUGIL, N. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Anthurium andraeanum* hybrids. **Plant Cell Reports**, v.11, p.438-442, 1992.
- KWAAITAAL, M.A.C.J.; DE VRIES, S.C. The *SERK1* gene is expressed in procambium and immature vascular cells. **Journal of Experimental Botany**, v.58, p.2887-2896, 2007.
- LI, J. Multi-tasking of somatic embryogenesis receptor-like protein kinases. **Current Opinion in Plant Biology**, v.13, p.509-514, 2010.
- LIENDO, M.; MOGOLLÓN, N. Multiplicación clonal *in vitro* del anturio (*Anthurium andraeanum* Lind. cv. Nicoya). **Bioagro**, v.21, p.179-182, 2009.
- MA, J.; HE, Y.; WU, C.; LIU, H.; HU, Z.; SUN, G. Cloning and molecular characterization of a SERK gene transcriptionally induced during somatic embryogenesis in *Ananas comosus* cv. Shenwan. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.30, p.195-203, 2012.
- MAILLOT, P.; LEBEL, S.; SCHELLENBAUM, P.; JACQUES, A.; WALTER, B. Differential regulation of *SERK*, *LEC1-Like* and *Pathogenesis-Related* genes during indirect secondary somatic embryogenesis in grapevine. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.47, p.743-752, 2009.

MAIRA, O.; ALEXANDER, M.; VARGAS, T.E. Micropropagation and organogenesis of *Anthurium andreanum* Lind cv Rubrun. In: JAIN, S.M.; OCHATT, S.J. (Ed.). **Protocols for in vitro propagation of ornamental plants, methods in molecular biology**. Totowa, New Jersey: Humana Press Edition, 2010. p.3-14.

MOURA, E.F.; VENTRELLA, M.C.; MOTOIKE, S.Y.; DE SÁ JÚNIOR, A.Q.; CARVALHO, M.; MANFIO, C.E. Histological study of somatic embryogenesis induction on zygotic embryos of macaw palm (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Martius). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.95, p.175-184, 2008.

NHUT, D.T.; NGUYEN, D.; VY, N.N.H.; KHUE, C.D.; KHIEM, D.V.; VINH, D.N. Impact of *Anthurium* spp. genotype on callus induction derived from leaf explants, and shoot and root regeneration capacity from callus. **Journal of Applied Horticulture**, v.8, p.135-137, 2006.

NINKOVIĆ, S.; DJORDJEVIĆ, T.; VINTERHALTER, B.; UZELAC, B.; CINGEL, A.; SAVIĆ, J.; RADOVIĆ, S. Embryogenic responses of *Beta vulgaris* L. callus induced from transgenic hairy roots. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** v.103, p.81-91, 2010.

NOLAN, K.E.; IRWANTO, R.R.; ROSE, R.J. Auxin up-regulates *MtSERK1* expression in both *Medicago truncatula* root-forming and embryogenic cultures. **Plant Physiology**, v.133, p.218-230, 2003.

NOLAN, K.E.; KURDYUKOV, S.; ROSE, R.J. Expression of the *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE1* (*SERK1*) gene is associated with developmental change in the life cycle of the model legume *Medicago truncatula*. **Journal of Experimental Botany**, v.60, p.1759-1771, 2009.

NOLAN, K.E.; KURDYUKOV, S.; ROSE, R.J. Characterisation of the legume *SERK-NIK* gene superfamily including splice variants: implications for development and defence. **BMC Plant Biology**, v.11, p.1-16, 2011.

O'BRIEN, T.P.; MCCULLY, M.E. **The study of plant structure principles and select methods**. Melbourne: Termarcarphi Pty Ltd, 1981. 45p.

PARK, H.; RYU, H.; KIM, B.; KIM, S.; YOON, I.; NAM, K. A subset of *OsSERK* genes, including *OsBAK1*, affects normal growth and leaf development of rice. **Molecules and Cells**, v.32, p.561-569, 2011.

PÉREZ-NÚÑEZ, M.T.; SOUZA, R.; SÁENZ, L.; CHAN, J.L.; ZÚÑIGA-AGUILAR, J.J.; OROPEZA, C. Detection of a *SERK*-like gene in coconut and analysis of its expression during the formation of embryogenic callus and somatic embryos. **Plant Cell Reports**, v.28, p.11-19, 2009.

PIERIK, R.L.M. *Anthurium andraeanum* plantlets produced from callus tissues cultivated *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, v.37, p.80-82, 1976.

PINHEIRO, M.V.M.; MARTINS, F.B.; CRUZ, A.C.F.; CARVALHO, A.C.P.P.; OLIVEIRA, E.J.; OTONI, W.C. Somatic embryogenesis in anthurium (*Anthurium andraeanum* cv. Eidibel) as affected by different explants. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v.36, p.87-98, 2014.

PINHEIRO, M.V.M.; MARTINS, F.B.; CRUZ, A.C.F.; CARVALHO, A.C.P.P.; VENTRELLA, M.C.; OTONI, W.C. Maturation of *Anthurium andraeanum* cv. Eidibel somatic embryos from explants of nodal segments. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v.49, p.304-312, 2013.

ROCHA, D.I.; VIEIRA, L.M.; TANAKA, F.A.O.; SILVA, L.C.; OTONI, W.C. Somatic embryogenesis of a wild passion fruit species *Passiflora cincinnata* Masters: histocytological and histochemical evidences. **Protoplasma**, v.249, p.747-758, 2012.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v.4, p.406-425, 1987.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular cloning - a laboratory manual**. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001. 2344p.

SANTA-CATARINA, C.; HANAI, L.R.; DORNELAS, M.C.; VIANA, A.M.; FLOH, E.I.S. *SERK* gene homolog expression, polyamines and amino acids associated with somatic embryogenic competence of *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.79, p.53-61, 2004.

SANTOS, M.D.O.; ROMANO, E.; YOTOKO, K.S.C.; TINOCO, M.L.P.; DIAS, B.B.A.; ARAGÃO, F.J.L. Characterisation of the cacao *somatic embryogenesis receptor-like kinase (SERK)* gene expressed during somatic embryogenesis. **Plant Science**, v.168, p.723-729, 2005.

SANTOS, M.O.; ROMANO, E.; VIEIRA, L.S.; BALDONI, A.B.; ARAGÃO, F.J.L. Suppression of *SERK* gene expression affects fungus tolerance and somatic embryogenesis in transgenic lettuce. **Plant Biology**, v.11, p.83-89, 2009.

SAVONA, M.; MATTIOLI, R.; NIGRO, S.; FALASCA, G.; DELLA ROVERE, F.; COSTANTINO, P.; DE VRIES, S.; RUFFONI, B.; TROVATO, M.; ALTAMURA, M.M. Two *SERK* genes are markers of pluripotency in *Cyclamen persicum* Mill. **Journal of Experimental Botany**, v.63, p.471-488, 2012.

SCHELLENBAUM, P.; JACQUES, A.; MAILLOT, P.; BERTSCH, C.; MAZET, F.; FARINE, S.; WALTER, B. Characterization of *VvSERK1*, *VvSERK2*, *VvSERK3* and *VvLIL* genes and their expression during somatic embryogenesis of grapevine (*Vitis vinifera* L.). **Plant Cell Reports**, v.27, p.1799-1809, 2008.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J.; DA SILVA GUEDES, R.; DA SILVA, R.; FERMINO, P.; LUIS, Z.; DE OLIVEIRA FREITAS, E. Somatic embryogenesis and plant regeneration in açai palm (*Euterpe oleracea*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.109, p.501-508, 2012.

SCHMIDT, E.D.L.; GUZZO, F.; TOONEN, M.A.J.; DE VRIES, S.C. A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. **Development**, v.124, p.2049-2062, 1997.

SHAH, K. The Arabidopsis kinase-associated protein phosphatase controls internalization of the somatic embryogenesis receptor kinase 1. **Genes & Development**, v.16, p.1707-1720, 2002.

SHARMA, S.K.; MILLAM, S.; HEIN, I.; BRYAN, G.J. Cloning and molecular characterisation of a potato *SERK* gene transcriptionally induced during initiation of somatic embryogenesis. **Planta**, v.228, p.319-330, 2008.

SHIMADA, T.; HIRABAYASHI, T.; ENDO, T.; FUJII, H.; KITA, M.; OMURA, M. Isolation and characterization of the somatic embryogenesis receptor-like kinase gene

homologue (CitSERK1) from *Citrus unshiu* Marc. **Scientia Horticulturae**, v.103, p.233-238, 2005.

SHIU, S.H.; BLEECKER, A.B. Plant receptor-like kinase gene family: diversity, function, and signaling. **Science's STKE**, v.2001, p.1-13, 2001.

SINGLA, B.; KHURANA, J.P.; KHURANA, P. Characterization of three somatic embryogenesis receptor kinase genes from wheat, *Triticum aestivum*. **Plant Cell Reports**, v.27, p.833-843, 2008.

SOMLEVA, M.N.; SCHMIDT, E.D.L.; DE VRIES, S.C. Embryogenic cells in *Dactylis glomerata* L. (Poaceae) explants identified by cell tracking and by SERK expression. **Plant Cell Reports**, v.19, p.718-726, 2000.

SONG, D.; LI, G.; SONG, F.; ZHENG, Z. Molecular characterization and expression analysis of *OsBISERK1*, a gene encoding a leucine-rich repeat receptor-like kinase, during disease resistance responses in rice. **Molecular Biology Reports**, v.35, p.275-283, 2008.

STEINER, N.; SANTA-CATARINA, C.; GUERRA, M.; CUTRI, L.; DORNELAS, M.; FLOH, E. A gymnosperm homolog of SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE-1 (*SERK1*) is expressed during somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.109, p.41-50, 2012.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v.28, p.2731-2739, 2011.

THOMAS, C.; MEYER, D.; HIMBER, C.; STEINMETZ, A. Spatial expression of a sunflower *SERK* gene during induction of somatic embryogenesis and shoot organogenesis. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.42, p.35-42, 2004.

TOMBOLATO, A.F.C.; QUIRINO, E.A.; COSTA, A.M.M. Antúrio (*Anthurium andraeanum* Lindl.). In: TOMBOLATO, A.F.C.C., A. M. M (Ed.). **Micropropagação de plantas ornamentais**. Campinas: Instituto Agrônômico, 1998. p.18-21.

TOMBOLATO, A.F.C.; UZZO, R.P.; CASTRO, A.C.R.; SAKAI, M.; SAES, L.A. Recursos genéticos e melhoramento do antúrio (*Anthurium andraeanum* Linden) no IAC–APTA. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v.10, p.1-5, 2004.

TUCKER, M.R.; ARAUJO, A.-C.G.; PAECH, N.A.; HECHT, V.; SCHMIDT, E.D.L.; ROSSELL, J.-B.; DE VRIES, S.C.; KOLTUNOW, A.M.G. Sexual and apomictic reproduction in *Hieracium* subgenus *Pilosella* are closely interrelated developmental pathways. **The Plant Cell Online**, v.15, p.1524-1537, 2003.

WANG, X.D.; NOLAN, K.E.; IRWANTO, R.R.; SHEAHAN, M.B.; ROSE, R.J. Ontogeny of embryogenic callus in *Medicago truncatula*: the fate of the pluripotent and totipotent stem cells. **Annals of Botany**, v.107, p.599-609, 2011.

WEIJIE, X.; BIN, X.; GUANGDONG, W.; WEIMING, G.; FANGDE, W.; JIANPING, J. Somatic embryogenesis and plant regeneration of *Anthurium andraeanum*. **Acta Horticulturae Sinica**, v.33, p.1281-1286, 2006.

YANG, C.; ZHAO, T.; YU, D.; GAI, J. Isolation and functional characterization of a SERK gene from soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). **Plant Molecular Biology Reporter**, v.29, p.334-344, 2011.

YANG, J.L.; SEONG, E.S.; KIM, M.J.; GHIMIRE, B.K.; KANG, W.H.; YU, C.Y.; LI, C.H. Direct somatic embryogenesis from pericycle cells of broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) root explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.100, p.49-58, 2010.

YOU, C.; FAN, T.; GONG, X.; BIAN, F.; LIANG, L.; QU, F. A high-frequency cyclic secondary somatic embryogenesis system for *Cyclamen persicum* Mill. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.107, p.233-242, 2011.

ZAKIZADEH, H.; STUMMANN, B.M.; LÜTKEN, H.; MÜLLER, R. Isolation and characterization of four somatic embryogenesis receptor-like kinase (*RhSERK*) genes from miniature potted rose (*Rosa hybrida* cv. Linda). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.101, p.331-338, 2010.

ZHANG, S.; LIU, X.; LIN, Y.; XIE, G.; FU, F.; LIU, H.; WANG, J.; GAO, S.; LAN, H.; RONG, T. Characterization of a *ZmSERK* gene and its relationship to somatic

embryogenesis in a maize culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.105, p.29-37, 2011.

CONCLUSÕES GERAIS

No presente trabalho constatou-se que as condições mais indicadas para a fase de alongamento e enraizamento *in vitro* de plantas de *Etilingera elatior* cv Porcelana, são as fotomixotróficas sob enriquecimento de CO₂ (1000 μmol mol⁻¹), em frascos vedados com membranas porosas a gases e mantidas em meio MS suplementado com 15 g L⁻¹ de sacarose. O enriquecimento da atmosfera com CO₂ associado à redução de sacarose adicionada ao meio de cultura promoveu a maior taxa de sobrevivência das plantas às condições *ex vitro*. Durante as condições *in vitro*, as alterações na anatomia da folha das plantas, podem estar relacionadas a melhoria do desenvolvimento das mudas durante a fase de aclimatização.

A indução de embriogênese somática em *Anthurium andraeanum* cv. Eidibel originou-se a partir do padrão multicelular, com divisões celulares do meristema axilar do segmento nodal; e com a sequência de eventos, foi possível observar a formação de calos embriogênicos provenientes do meristema axilar. Com relação à mobilização das reservas, constatou-se grãos de amido ao longo da etapa de diferenciação celular do meristema axilar, durante a indução da embriogênese somática; e de proteínas totais na fase de calos embriogênicos. Dessa forma, foi possível revelar tanto a origem quanto as mudanças que ocorrem durante as etapas da indução da embriogênese somática em *Anthurium andraeanum*, ampliando a compreensão de como esse processo ocorre.

O estudo de clonagem e caracterização molecular do gene *SERK* envolvido na embriogênese somática de *Anthurium andraeanum* permitiu isolar um possível membro dessa família. Devido à elevada similaridade entre as sequências de aminoácidos das proteínas SERK de *Anthurium andraeanum* com as de outras plantas, ratificou-se que esse mecanismo é bem conservado. Sendo assim, *SERK* pode ser utilizado para monitorar a transição de células competentes em células e tecidos embriogênicos de *Anthurium andraeanum*. Estudos de hibridização *in situ*, demonstraram sinal positivo tanto nas células em divisão da região do meristema axilar quanto em calos embriogênicos. No entanto, não foi observado sinal de transcritos do gene *SERK* durante a fase de maturação dos embriões somáticos.

O presente trabalho contribuiu na geração de conhecimentos acerca da propagação *in vitro* das espécies a partir das técnicas de propagação fotoautotrófica, em bastão-do-imperador, caracterizando as respostas morfofisiológicas das plantas submetidas às condições de crescimento heterotrófico, fotomixotrófico e

fotoautotrófico; e propagação *in vitro* do antúrio via embriogênese somática, abordando alterações estruturais e o acúmulo de reservas envolvidos durante a ontogênese dos calos embriogênicos, além de caracterizar e analisar a expressão do gene *SERK* nessa espécie.