

MARCOS VINÍCIUS MARQUES PINHEIRO

**PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE ANTÚRIO (*Anthurium andraeanum*
cv. Eidibel) VIA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2010

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

T

P654p
2010

Pinheiro, Marcos Vinícius Marques, 1982-
Propagação *in vitro* de antúrio (*Anthurium andraeanum*
cv. Eidibel) via embriogênese somática / Marcos Vinícius
Marques Pinheiro. – Viçosa, MG, 2010.
xiii, 67f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Wagner Campos Otoni.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 61-67.

1. Antúrio - Propagação *in vitro*. 2. Antúrio - Cultura e
meios de cultura. 3. Antúrio - Reguladores. 4. Embriogê-
nese somática. 5. Propagação vegetativa. 6. Plantas
ornamentais. 7. *Anthurium andraeanum*. I. Universidade
Federal de Viçosa. II. Título.

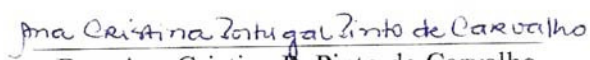
CDD 22.ed. 635.93464

MARCOS VINÍCIUS MARQUES PINHEIRO

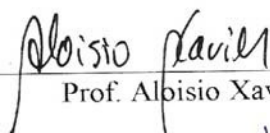
**PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE ANTÚRIO (*Anthurium andraeanum*
cv. Eidibel), VIA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA**

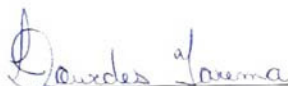
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

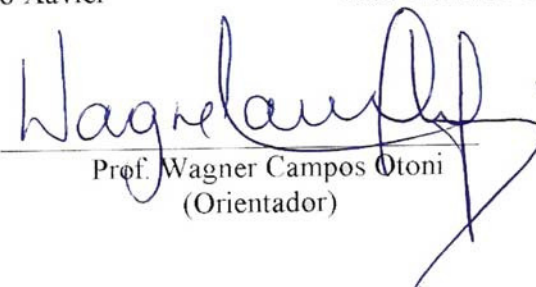
APROVADA: 23 de fevereiro de 2010


Dra. Ana Cristina P. Pinto de Carvalho
(Co-orientadora)


Prof. Marília Contim Ventrella
(Co-orientadora)


Prof. Albisio Xavier


Dra. Lourdes Iarema


Prof. Wagner Campos Ottoni
(Orientador)

“Ao aparecer em Fátima, Nossa Senhora faz-nos apelo aos valores esquecidos, ao futuro do homem em Deus, do qual somos parte ativa e responsável.”

*A Nossa Senhora de Fátima,
Agradeço.*

*Aos meus pais Dion e Celina, que,
mesmo distantes, nunca deixaram
de apoiar e rezar por mim.*

*À minha “alma gêmea”,
Fabrina Bolzan Martins, pelo
amor, carinho, paciência,
compreensão e apoio
irrestrito,
Dedico.*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), ao Departamento de Biologia Vegetal e ao BIOAGRO, pela realização do curso e deste trabalho.

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

Ao pesquisador Antônio Fernando Caetano Tombolato que, junto ao Instituto Agronômico (IAC), cedeu as mudas de Antúrio ‘IAC Eidibel’ utilizadas neste projeto.

Ao Orientador e amigo Wagner Campos Otoni, pela grande confiança em mim depositada, pelos ensinamentos e cumplicidade na realização deste projeto.

À pesquisadora Dra. Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho pela orientação, pelos momentos de apoio e pela grande amizade construída ao longo de seis anos.

Aos professores, Aloísio Xavier e Marília Contim Ventrella, e à Dra. Lourdes Iarema, pela amizade, ensinamentos, pela participação e sugestões na defesa de dissertação.

À Ana Claudia, pela amizade e força que me foi dada durante os meses de dedicação ao laboratório de Anatomia Vegetal, bem como, na confecção das pranchas. Ana, nem tenho como te agradecer, por toda a ajuda que me foi dada.

À minha Fabrina, pela dedicação, quase que exclusiva, a mim e a minha dissertação. Por ter me ajudado na maior parte das análises estatísticas.

Às amigas ‘Dya’ e ‘Day’ pela amizade e apoio durante os procedimentos de anatomia deste trabalho.

Aos meus irmãos (“Dionzinho”, Joana e Fábio), pelos momentos de apoio e alegria.

Aos meus pais (Dion e Celina), pelo amor e apoio incondicional.

À minha nova família, italiana de sangue, (quase uma família “Corleone”), Fabrina (meu grande amor, minha “Negrinha”, minha “Ninha” ou, simplesmente, “Bina”), Noara (Anjo da guarda), Gisene, Dona Tania, Seu Alci Pube, Seu Osiris e

“Tia” Sônia, pelo carinho, amizade, por me considerarem da família e pelos pensamentos positivos durante a defesa da dissertação.

Aos professores Fábio Murilo da Matta e Raimundo Santos Barros, pela amizade construída ao longo do curso.

Aos amigos de curso, Leandro (Baiano), Camilo, Jorge (peruano) por terem feito o período de disciplinas mais divertido e menos estressante.

Aos colegas do laboratório de cultura de tecidos, Lili, Joseila, Lourdes, Cleber, Ana Cláudia, Leandro, Diego, Elyabe, Marcela, Aline, Lorena, pela ajuda, companherismo, brincadeiras e pelas ótimas conversas jogadas fora durante o “cafezinho”.

A todas as pessoas que não foram mencionadas, porém, de alguma forma, colaboraram 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.

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Situação da floricultura no mundo e no Brasil.....	4
2.1. Descrição e importância da espécie.....	5
2.2. Métodos de propagação do antúrio.....	7
2.2.1. Propagação sexuada.....	7
2.2.2. Propagação assexuada.....	8
2.3. Aclimatização.....	9
2.4. Morfogêneses <i>in vitro</i>	10
3. OBJETIVOS	15
3.1. Objetivo geral.....	15
3.2. Objetivos específicos.....	15
4. MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1. Local de realização dos experimentos e material vegetal.....	16
4.2. Meio e condições de cultivo.....	17
4.2.1 Indução de culturas embriogênicas.....	17
4.2.2 Pré-maturação dos embriões somáticos.....	17
4.2.3 Maturação dos embriões somáticos e regeneração de plantas.....	19
4.3. Procedimentos histológicos.....	19
4.4. Procedimentos estatísticos.....	20
4.4.1. Experimento I: Indução de culturas embriogênicas.....	20
4.4.2. Experimento II: Pré-maturação dos embriões somáticos.....	21
4.4.3. Experimento III: Maturação dos embriões somáticos e regeneração de plantas.....	22
4.5. Aclimatização das plantas regeneradas.....	23
5. RESULTADOS	24
5.1. Experimento I: Indução de culturas embriogênicas	24
5.1.1 Análise dos dados.....	24
5.1.2 Aspectos morfo-histológicos.	33
5.2. Experimento II: Pré-maturação dos embriões somáticos.....	38
5.2.1 Análise dos dados.....	38
5.2.2 Aspectos morfo-histológicos.....	44
5.3. Experimento III: Maturação dos embriões somáticos e regeneração de plantas.....	47
5.3.1 Análise dos dados.....	47
5.3.2 Aspectos morfológicos.....	50
6. DISCUSSÃO	52
6.1. Experimento I: Indução de culturas embriogênicas.....	52
6.2. Experimento II: Pré-maturação dos embriões somáticos.....	56

6.3. Experimento III: Maturação dos embriões somáticos e regeneração de plantas.....	57
7. CONCLUSÃO.....	60
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61

RESUMO

PINHEIRO, Marcos Vinícius Marques, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2010. **Propagação *in vitro* de antúrio (*Anthurium andraeanum* cv. Eidibel) via embriogênese somática.** Orientador: Wagner Campos Otoni. Co-orientadores: Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho e Marília Contim Ventrella

O presente trabalho teve como objetivo estabelecer a propagação *in vitro* de *Anthurium andraeanum* cv. Eidibel via embriogênese somática, avaliando a indução das culturas embriogênicas (Experimento I); pré-maturação dos embriões somáticos (Experimento II); e maturação dos embriões somáticos e posterior regeneração das plantas (Experimento III). No experimento I, adotou-se a subdivisão de plantas de antúrio estabelecidas *in vitro*, para a obtenção das fontes de explante. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC), em disposição fatorial 5³, representados por cinco tipos de explantes (folhas inteiras e seccionadas ao meio; pecíolos; segmentos nodais com uma gema; e segmento de raiz sem o ápice radicular; cada explante com ~ 1,0 cm); cinco auxinas (AIA, ANA, AIB, 2,4-D e Picloram) em cinco concentrações (0,0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10 µM) e cinco testemunhas adicionais, ou seja, cada fonte de explante adicionada ao tratamento sem auxina. A repetição foi composta por cinco placas de Petri (90 x 15 mm), contendo 25 mL de meio Pierik, e cada unidade experimental nove explantes/placa, mantidas em sala de crescimento, a 25 ± 2 °C, no escuro. Após 60 dias de cultivo, avaliou-se a presença de calos embriogênicos, brotos, raízes e massa freca dos calos produzidos. A produção dos primeiros calos foi observada em explantes de pecíolo e segmento nodal, e a sua produção ocorreu, principalmente, nos meios acrescidos de ANA e Picloram, nas concentrações de 7,5 e 10,0 µM, respectivamente. Em 10,0 µM, não houve diferença estatística entre os tratamentos com as auxinas ANA, 2,4-D e Picloram, sendo superiores aos demais. Para a produção de brotos, o explante com a maior média foi o segmento nodal, em meio sem a adição de auxina. Observaram-se a proliferação de raízes em explantes de segmento nodal e radicular, principalmente em meio suplementado com AIB. A partir de análise histoquímica, determinaram-se, por meio da dupla coloração com carmim acético e azul de Evans e teste de lugol, características embriogênicas dos calos. No entanto, observou-se em cortes histológicos que os calos produzidos em meio Pierik acrescido de 10,0 µM de ANA apresentaram embriões bem desenvolvidos, com presença de procâmbio e protoderme, demonstrando sinais de polarização. Para a proliferação das culturas embriogênicas, foi adotada a subdivisão dos calos selecionados, e inoculados em placas de Petri com meio de cultura Pierik acrescido de 10,0 µM de ANA, em cinco subcultivos sucessivos, com 60 dias cada. No experimento II, foram inoculados os calos produzidos na fase de proliferação, com cerca de 90 mg, em Erlenmeyers de 125 mL, contendo 25 mL de meio de cultura líquido, Pierik e AA2,

com diferentes concentrações de 2,4-D (0,00; 4,52; 9,05 μM) e cinetina, (0,00; 0,47; 2,32 μM), analisados em DIC com fatorial 2 x 3 x 3, mantidos em sala de crescimento a 25 ± 2 °C, no escuro, permanecendo sob agitação orbital de 100 rpm. Avaliadas aos 45 dias de cultivo, quanto a: massa dos calos embriogênicos; produção de embriões somáticos; produção de embriogênese somática secundária; porcentagem de oxidação; coloração, textura dos calos embriogênicos e desenvolvimento dos embriões somáticos produzidos. A produção de embriões somáticos foi superior no meio Pierik acrescido de 0,47 μM de cinetina, observando-se a menor produção de embriogênese somática secundária, menor porcentagem de oxidação, com textura friável dos calos, sendo um dos tratamentos com maior desenvolvimento dos embriões, comprovado pelos cortes histológicos, no qual observaram embriões no estágio globular, com sinais de polarização, até embriões maturados, com a presença de folha primária e zona meristemática. No Experimento III, os calos produzidos na fase de pré-maturação foram inoculados, em Erlenmeyers contendo 25 mL de meio líquido e semi-sólido, Pierik e AA2, suplementados com as concentrações de cinetina (0,0; 1,16; 2,32; 4,64 μM), formando um DIC com fatorial 2 x 2 x 4, mantidos em sala de crescimento, a 25 ± 2 °C, sob fotoperíodo de 16 horas, irradiância luminosa de $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Os meios líquidos permaneceram sob agitação orbital de 100 rpm. Avaliou-se aos 45 dias de cultivo quanto ao número de calos com embriões maturados; porcentagem de conversão em plantas; porcentagem de oxidação; e número de embriões com maturação completa. Recomenda-se o meio Pierik suplementado com 2,32 μM de cinetina, no qual, foi superior para o número de calos embriogênicos com embriões maturados, número de embriões com maturação completa e principalmente pela melhor conversão em plantas. As plantas produzidas foram aclimatizadas *ex vitro* na bancada do laboratório e transferidas, no final de dois meses, para casa de vegetação. O presente estudo evidenciou que a indução e proliferação de calos embriogênicos a partir de segmentos nodais de antúrio foi dependente do tipo e da concentração das auxinas. Para as fases de pré-maturação e maturação dos embriões somáticos, é necessária a retirada ou a redução da auxina no meio de cultura, adicionando concentrações ideais de citocinina para cada fase, e assim, obtendo máxima conversão dos embriões somáticos em plantas, no final do processo.

ABSTRACT

PINHEIRO, Marcos Vinícius Marques, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2010. ***In vitro* propagation of anturio (*Anthurium andraeanum* cv. Eidibel) through somatic embryogenesis.** Adviser: Wagner Campos Otoni. Co-Advisers: Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho e Marília Contim Ventrella

In this work, the propagation *in vitro* of *Anthurium andraeanum* cv. Eidibel through somatic embryogenesis was investigated, evaluating the induction of the embryogenic cultures (Experiment I); pre-maturation of the somatic embryos (Experiment II); and maturation of the somatic embryos with subsequent regeneration of the plants (Experiment III). In Experiment I, the subdivision of plants of anturio established *in vitro* was used, to obtain the explant sources. Analyzed in DIC with factorial 5 x 5 x 5, with five explant types (whole leaves were cut across the midrib of leaves; petioles; stem segments with one bud; and root segment without the apex radicular; each explant was cut into pieces of about 1.0 cm); five auxins (Picloram, ANA, AIB, 2.4-D and Picloram) in five concentrations (0.0; 2.5; 5.0; 7.5 and 10.0 µM) and five additional witness, in other words, each explant source added to the treatment without auxin. The repetition was composed by five Petri dishes (90 x 15 mm), containing 25 mL of Pierik medium, and each unit experimental nine explant/placa. Cultures were maintained in growth room, at 25 ± 2 °C, in the darkness. After 60 days of cultivation, it was evaluated the presence of embryogenic cultures, shoots, roots and mass of the produced callus. The production of the first callus was observed in petioles and stem explants, and its production was in average containing 7.5 µM ANA and 10.0 µM Picloram. In the concentrations of 10.0 µM, there was no different statistics among the treatments with the auxins ANA, 2.4-D and Picloram, being superior to the others. For the production of shoots, the explant with the largest average was the stem segments, in average without the auxins. The proliferation of roots was observed in stem segments and roots explants, mainly in average with AIB. Histochemistry analysis were determined, through the double stained with acetocarmine and Evan's blue and lugol test. However, it was observed in histological cuts that the callus produced in Pierik medium containing 10.0 µM of ANA presented well developed embryos, with protoderm and procambium, with polarization signs. For the proliferation of the embryogenic cultures, the subdivision of the selected callus was accomplished, and inoculated in Petri dishes with Pierik medium containing 10.0 µM of ANA, in five successive subcultures, with 60 days each. In the experiment II, the callus was inoculated, produced in the proliferation of the embryogenic cultures, with about 90 mg weight, in Erlenmeyers of 125 mL, containing 25 mL of average liquid, Pierik and AA2, with different concentrations of 2.4-D (0.00; 4.52; 9.05 µM) and kinetin, (0.00; 0.47; 2.32 µM), analyzed in DIC with factorial 2 x 3 x 3, maintained at growth room at 25 ± 2 °C, in the darkness, staying under orbital agitation of 100 rpm. After 45 days of cultivation, it was evaluated a mass of the embryogenic callus; production of somatic embryos; production of secondary somatic

embryos; oxidation percentage; coloration, texture of the embryogenic callus and development of the somatic embryos produced. The production of somatic embryos was better in Pierik medium with 0.47 μM of kinetin, being observed a smaller production of secondary somatic embryos, smaller oxidation percentage, with friable texture of the callus, being one of the treatments with larger development of the embryos, proven for the histological cuts, in which it was observed embryos in the globular stadium, with polarization signs, even mature embryos, with the presence of primary leaf and meristematic zone. In the Experiment III, the callus produced were inoculated in Erlenmeyers containing 25 mL of liquid and semi-solid medium, Pierik and AA2, supplemented with the kinetin concentrations (0.0; 1.16; 2.32; 4.64 μM), analyzed in DIC with factorial $2 \times 2 \times 4$. Cultures were maintained under a 16 hours of light, photoperiod at $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ provided by cool white fluorescent lamps at $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. The liquid medium staying under orbital agitation of 100 rpm. After 45 days of cultivation, it was evaluated the number of callus with mature embryos; percentage of conversion of plants; oxidation percentage; and number of embryos with complete maturation. Pierik medium containing 2.32 μM of kinetin is recommended, in which, it was much better to the number of embryogenic callus with mature embryos, number of embryos with complete maturation and for the best conversion in plants. The plants were acclimatized *ex vitro* in the bench of the laboratory and transferred, in the end of two months to a greenhouse. The present study evidenced that the induction and proliferation of embryogenic cultures starting from stem segments were dependent on the type and concentration of the auxins. For the pre-maturation and maturation of the somatic embryos, it is necessary the retreat or the reduction of the auxin in the medium, adding ideal concentrations of cytokinins, and obtaining high conversion of the somatic embryos in plants, in the final process.

1. INTRODUÇÃO

Os antúrios pertencem à família Araceae e ao gênero *Anthurium* Schott., sendo ornamentais a maioria das 600 espécies compreendidas nesse gênero. Muitas delas herbáceas tropicais, epífitas e nativas de regiões quentes da América Tropical, destacando-se pela beleza de suas folhagens. Dentre estas, cerca de 130 são encontradas no Brasil (Castro *et al.*, 2004; Tombolato, 2004).

Embora sejam característicos de regiões tropicais, os antúrios são comercializados no mundo todo, com maior concentração na Holanda e nos Estados Unidos da América (Laws & Galinsky, 1996). São produzidos sob estufas na Holanda e aproximadamente 90% comercializados na Europa. No Brasil, a produção de antúrio concentra-se em regiões subtropicais, como na região Sudeste, no Vale do Ribeira, Holambra e Atibaia, em São Paulo, e tropicais, como na região Nordeste. Entre os estados nordestinos, destacam-se Pernambuco, Ceará e Bahia, que vêm, recentemente, apresentando maior expressão nessa atividade. Nos mercados interno e externo, a inflorescência de antúrio atinge o maior preço unitário, quando comparada com outras flores tropicais (Caldari Junior, 2004; Cuquel & Grossi, 2004; Terao *et al.*, 2005).

O *Anthurium andraeanum* Lindl. vem sendo largamente utilizado na floricultura e no paisagismo, sendo, entre as plantas tropicais, a segunda espécie mais comercializada no mundo, superada apenas pelas orquídeas (Castro *et al.*, 2004). É a principal espécie cultivada, devido ao tamanho, colorido e durabilidade pós-colheita de suas inflorescências, sendo considerada a espécie de maior preferência do público como planta ornamental (Tombolato, 2004; Tombolato *et al.* 2004). Sua produção comercial vem crescendo impulsionada pela demanda nacional e internacional, pela introdução de novas variedades importadas e pelo desenvolvimento de variedades nacionais, que levam vantagens em relação ao menor custo na aquisição das mudas, e por serem rústicas e mais adaptadas às nossas condições climáticas (Leme & Honório, 2004).

O *A. andraeanum* cv. Eidibel é uma variedade/cultivar nacional de flor de corte selecionada para plantio comercial. É uma planta altamente produtiva, possuindo inflorescência de formato e brilho comercialmente aceitos, e com longa durabilidade pós-colheita. Essas características tornam a cultivar atrativa aos olhos dos consumidores, pois o vermelho forte é a cor que possui maior demanda de mercado entre as flores de corte. Dessa forma, esses fatores possibilitaram que essa variedade se tornasse a mais cultivada em todo o Brasil (Leme, 2004).

A propagação do antúrio ocorre por via sexuada (sementes) e assexuada. A propagação vegetativa tradicional, por divisão de touceiras ou por estaquia, possibilita a disseminação de pragas e doenças, além de limitar a quantidade de mudas disponíveis, comprometendo a comercialização do produto final. A produção de novas plantas por sementes é um processo lento, além de gerar plantas sem uniformidade, isto é, variam em vigor, tamanho e produtividade, e as inflorescências variam nas cores, formas e tamanhos (Tombolato *et. al.*, 2004). Sendo assim, a propagação *in vitro* apresenta-se como técnica alternativa viável para solucionar esses problemas. Na área de plantas ornamentais, como por exemplo, nos antúrios, predominam as plantas híbridas, e a clonagem *in vitro* tem permitido a uniformização de características, tais como: época de floração, tamanho e forma das flores, entre outros aspectos (Fuzitani & Nomura, 2004). Dessa forma, a propagação *in vitro* tem sido bastante utilizada como um método alternativo para a produção massiva de plantas dessa espécie.

O antúrio tem sido propagado tradicionalmente mediante a organogênese indireta, por meio do cultivo *in vitro* de explantes foliares, indução de calos e posterior formação de gemas adventícias. Entretanto, esse método proporciona taxas de multiplicação relativamente baixas e inconsistentes, com a provável ocorrência de variação somaclonal nas mudas obtidas (Te-Chato *et al.*, 2006; Bautista *et al.*, 2008).

Na busca por novas tecnologias para o constante aprimoramento da clonagem de plantas, utiliza-se, atualmente, a embriogênese somática, uma das principais técnicas de propagação *in vitro*. A embriogênese somática é um processo de regeneração de plantas de estruturas bipolares, ou seja, constituídas de ápice caulinar e radicular, similares a embriões zigóticos, porém sem envolvimento com a fusão de gametas, com a presença de um sistema vascular fechado, ou seja, sem conexão vascular com os tecidos do explante inicial. Essas características tornam este modelo morfogênético distinto dos processos de organogênese (Zimmerman, 1993; Guerra *et al.*, 1998).

Existem dois padrões básicos de expressão da embriogênese somática, o modelo direto, no qual os embriões somáticos originam-se dos tecidos matrizes sem a formação de estágios intermediários de calos; e o modelo indireto, no qual os embriões somáticos se formam a partir de um tecido intermediário chamado calo, que apresenta células em diferentes estágios de diferenciação e, conseqüentemente, com diferentes graus de determinação (Guerra *et al.*, 1998).

Comparativamente às demais técnicas baseadas na organogênese, a embriogênese somática apresenta algumas vantagens, pois permite a propagação massiva de plantas e redução de custo e mão-de-obra; alto grau de automação (por biorreatores), possibilitando baixar os custos por unidade produzida; a produção de embriões somáticos de forma sincronizada, com alto grau de uniformização e conformidade clonal (Yeung, 1995); além de constituir uma técnica base para a obtenção de plantas transgênicas; preservação de germoplasma, por criopreservação; hibridação somática (Guerra *et al.*, 1998; Santos-Serejo *et al.*, 2006b); assim como a integração de técnicas associadas à tecnologia de sementes sintéticas.

Dessa forma, a embriogênese somática apresenta-se como alternativa viável e segura para a produção em larga escala de mudas de *Anthurium andraeanum* cv. Eidibel isentas de patógenos, além de ampliar a possibilidade de estudos para o melhoramento genético, como também para a obtenção de novas variedades.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Situação da floricultura no mundo e no Brasil

A floricultura abrange o cultivo de plantas ornamentais, desde flores de corte e plantas envasadas, floríferas ou não, até a produção de sementes, bulbos e mudas de árvores de grande porte. É um setor agrícola altamente competitivo, que exige a utilização de tecnologias avançadas, conhecimento técnico pelo produtor e, principalmente, um sistema eficiente de distribuição e comercialização de seus produtos (Silveira, 1993).

O mercado mundial de flores, antes dominado pela Holanda, Itália, Dinamarca e outros países europeus, com a globalização, abriu espaços para novos pólos de produção, com destaque para Colômbia, Equador, Costa Rica, Estados Unidos da América, Israel, África do Sul e Espanha. A Holanda e, atualmente, a Colômbia são os maiores exportadores. Na Colômbia e no Equador, 90% da produção interna são exportadas para outros países, diferente do que ocorre no Brasil, em que o consumo *per capita* é relativamente alto em determinadas regiões do País (Rocha, 2006; Barros *et al.*, 2008).

O agronegócio de flores e plantas ornamentais vem se expandindo no Brasil; e alguns dos indicativos que contribuem para essa expansão são suas dimensões continentais e condições climáticas, favorecendo o cultivo tanto de flores temperadas quanto tropicais. Além disso, o surgimento e a adoção de novas tecnologias, tanto nos sistemas de produção quanto nos de pós-colheita; além das extraordinárias condições de produção, que juntamente com a diversidade de solo e clima, torna possível produzir flores, folhagens e outros derivados, ao longo de todo ano a um custo reduzido, conferindo ao produto brasileiro condições para se firmar no mercado mundial (Graziano, 2003; França & Maia, 2008).

O Brasil vem apresentando ritmo crescente nas exportações de flores e plantas ornamentais, e o grupo de produtos que mais se destacou em 2007 foi o de mudas de plantas ornamentais, que respondem, na média dos últimos cinco anos, por 43,74% do total vendido no exterior e por 41,99% no período de janeiro a dezembro de 2007. O segmento de bulbos, tubérculos, rizomas e similares, por sua vez, continuou na segunda posição do ranking, acumulando, no geral, 28,30% nos últimos cinco anos e 29,79% em 2007. O terceiro grupo de importância na pauta de exportações foi o segmento de flores e botões frescos de corte para buquês e ornamentação, com participação de 19,05% na média dos últimos cinco anos e de 19,49% no período de janeiro a dezembro de 2007. E, em quarto lugar, o segmento de folhagens, folhas e ramos cortados frescos e secos, com 8,91% e 8,73% na média dos últimos cinco anos e em 2007, respectivamente (Junqueira & Peetz, 2008).

Outro motivo para o aumento das exportações de flores e plantas ornamentais é que a produção nacional antes estava concentrada nas regiões Sul e Sudeste, hoje se encontra em todas as regiões do País. Essa mudança comportamental foi devido ao aumento da oferta de flores, principalmente, da região Nordeste. Este fato tem ocorrido, principalmente, pela localização tropical e ao clima favorável da região, como também, à posição geográfica em relação aos grandes centros consumidores, Europa e Estados Unidos da América, permitindo assim, um custo menor de frete (Rocha, 2006).

Entre as espécies tropicais de maior demanda no Brasil estão os abacaxis ornamentais, as alpínias, os antúrios, os bastões do imperador, as bromélias, as helicônias, e as orquídeas (Leme & Honório, 2004). Sendo o antúrio a segunda flor tropical mais comercializada no mercado mundial, sendo superada apenas pelas orquídeas (Castro *et al.*, 2004).

2.1. Descrição e importância da espécie

Os antúrios pertencem à família Araceae e ao gênero *Anthurium* Schott., sendo ornamentais a maioria das 600 espécies do gênero, muitas delas herbáceas tropicais, originárias de regiões quentes da América Tropical. Dentre essas, cerca de 130 espécies são encontradas no Brasil. Do ponto de vista comercial, a principal espécie do gênero é o *Anthurium andraeanum* Linden, que sobrepuja às demais pela preferência do público devido ao tamanho e colorido de suas “flores” e pela grande durabilidade pós-colheita,

sendo bastante utilizado como flor de corte e planta de vaso. Essa espécie é originária da Venezuela e Colômbia, e desde 1886, vem sendo empregada em programas de melhoramento genético, através da realização de cruzamentos, de maneira que as plantas encontradas atualmente no comércio são muito diferentes das espécies nativas. É uma das espécies mais cultivadas do mundo, sendo largamente utilizada na floricultura e no paisagismo. Seu cultivo é realizado em várias partes do mundo e, no Brasil, intensifica-se a cada década. As variedades cultivadas possuem diferentes procedências, algumas melhoradas no Brasil e outras na Europa, além de materiais oriundos de coleções particulares (Castro *et al.*, 2004; Tombolato, s/d.).

O que normalmente se conhece por flor no antúrio é, na verdade, uma inflorescência em espiga, composta por inúmeras pequenas flores dispostas em espiral, denominada espádice, protegida por uma bráctea colorida denominada espata. Suas flores são andróginas, com órgãos reprodutores masculinos e femininos apresentando o fenômeno da protoginia, prevenindo a autofecundação e favorecendo o cruzamento natural entre plantas diferentes (Tombolato *et al.*, 2004).

A produção de antúrio no Brasil concentra-se, principalmente, em regiões subtropicais, como na região Sudeste, no Vale do Ribeira, Holambra e Atibaia, em São Paulo, e tropicais, como na região Nordeste. Entre os estados nordestinos, destacam-se Pernambuco, Ceará e Bahia, que vêm, recentemente, apresentando atividade de maior expressão, focando os mercados interno e externo (Caldari Junior, 2004; Cuquel & Grossi, 2004).

Produtores da região de Holambra, por sua vez, vêm introduzindo variedades selecionadas da Holanda, cujo padrão de qualidade das flores de corte vem causando grande impacto junto aos compradores de antúrio. Além do alto custo da muda, para sua aquisição é necessário estabelecer contrato particular com as empresas estrangeiras de melhoramento, que impedem sua multiplicação no Brasil (Tombolato, s/d.).

O programa de melhoramento do Instituto Agrônômico (IAC), em Campinas-SP, desenvolveu as primeiras variedades brasileiras de antúrio com o objetivo de criar plantas bem adaptadas às nossas condições climáticas, e que permitissem o cultivo e a exploração comercial para flor de corte e planta de vaso. Os primeiros resultados desse trabalho surgiram somente na década de 1990, quando os principais híbridos selecionados foram propagados *in vitro* e as primeiras mudas fornecidas aos produtores. A primeira cultivar criada no Brasil, lançada oficialmente pelo IAC, foi o antúrio cv.

Astral, tornando um marco histórico para a floricultura brasileira (Tombolato *et al.*, 2004).

Dessa forma, pode-se constatar a importância do desenvolvimento de novas variedades e seleções nacionais, as quais, além de competirem com as importadas, levam a vantagem de menor custo na aquisição das mudas, de serem rústicas e adaptadas às condições climáticas do país (Leme & Honório, 2004).

Dentre as principais cultivares de antúrio desenvolvidas pelo IAC, destaca-se a Eidibel, altamente produtiva, com inflorescência de formato, brilho e longevidade pós-colheita comercialmente aceitos, características estas que a tornaram muito atrativa aos consumidores. Além disso, sua inflorescência tem a coloração vermelho forte, cor de maior demanda de mercado entre as flores de corte. Esses fatores possibilitaram que essa cultivar se tornasse, atualmente, a mais cultivada em todo o Brasil (Leme, 2004). As cultivares com flores vermelhas e a espádice branca alcançam de 50 a 60 % de todo o mercado brasileiro de antúrio (Floraculture International, 2008).

2.2. Métodos de propagação do antúrio

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).

Segundo Afonso (1974), alguns fatores podem limitar o cultivo do antúrio, sendo um deles a obtenção de mudas. No cultivo menos tecnificado ainda é muito comum a produção de plantas pelo próprio produtor, uma vez que a aquisição de mudas representa um insumo de custo significativo. Além disso, as mudas adquiridas de outra origem podem apresentar problemas de adaptação às novas condições de cultivo. O produtor que produz suas próprias mudas faz por meio da propagação sexuada (sementes) ou assexuada (divisão de touceiras ou estaquia).

2.2.1. Propagação sexuada

A produção de novas plantas por sementes é um processo lento, levando, geralmente, três anos para iniciar o florescimento e cinco anos para a exploração

comercial. Como consequência, as progênies são bastante heterogêneas, gerando plantas sem uniformidade em todas as suas características, isto é, as plantas variam em vigor, tamanho e produtividade, e as “flores” nas cores, formas e tamanhos (Tombolato *et al.*, 2004). Entretanto, em programas de melhoramento, o uso de sementes é a única forma para a obtenção de novas variedades, tornando-se, por isso, muito atrativo (Lamas, 2002). Após este método, as novas progênies devem ser propagadas vegetativamente, visando a manutenção das características desejadas.

2.2.2. Propagação assexuada

A reprodução vegetativa é feita tradicionalmente por divisão de touceiras (rebentos) ou estaquia e, mais recentemente, por propagação *in vitro*. Esses métodos propiciam a obtenção de plantas idênticas à planta matriz, substituindo assim, a reprodução por sementes.

À exceção da propagação *in vitro*, os métodos de propagação assexuada apresentam como desvantagens o baixo número de mudas produzidas, ciclo reprodutivo longo (Martin *et al.*, 2003) e a possibilidade de disseminação de pragas e doenças, presentes nas plantas matrizes, às mudas propagadas.

2.2.2.1. Propagação *in vitro*

Várias fontes de explantes têm sido utilizadas para iniciar o cultivo *in vitro* do antúrio, incluindo tecidos meristemáticos, foliares e radiculares, além de embriões zigóticos. Os resultados relatados até o presente evidenciam que os explantes mais apropriados são secções do limbo da folha, sendo essas recém formadas e tenras, oriundas de plantas matrizes jovens de no máximo dois anos (Tombolato & Quirino, 1996), uma vez que a utilização de plantas com cinco anos acarreta em baixa capacidade de formação de brotos, na cultura *in vitro* (Pierik *et al.*, 1979).

O desenvolvimento recente de técnicas eficientes da propagação *in vitro* proporcionou perspectivas completamente novas e promissoras para o melhoramento do antúrio. Através do programa de melhoramento genético no Brasil, desenvolvido pelo IAC a partir dos anos 80, têm sido selecionadas algumas plantas híbridas, principalmente para flor de corte, de alto valor agrônômico, dada a perfeição das formas e cores das inflorescências, produtividade e tolerância a bacterioses. A produção de

grande quantidade dessas plantas só é possível pela cultura *in vitro*, uma vez que pelo método tradicional de propagação, são obtidas apenas algumas unidades de novas mudas anualmente, além da provável disseminação de pragas e doenças. (Tombolato *et al.*, 2004; Tombolato & Quirino, 1996).

2.3. Aclimatização

Para a última etapa da propagação *in vitro* é comum confundir os termos aclimatação e aclimatização. A aclimatação refere-se ao processo, em que, as plantas ou outros organismos vivos tornam-se ajustados a um novo clima ou situação, como resultado de um processo essencialmente natural. Aclimatização é conceituada como a transferência de um organismo, especialmente uma planta, para um novo ambiente, sendo todo o processo realizado artificialmente (Tombolato & Costa, 1998). George (1993) acrescenta que a aclimatação é um processo regulado pela natureza, enquanto a aclimatização é um processo controlado pelo homem.

A aclimatização pode ser considerada a fase final da propagação *in vitro*, e sua importância é tal que pode significar a limitação de todo o processo de propagação por cultura *in vitro*. É a etapa na qual a planta é transferida de condições de laboratório, chamada *in vitro* (um ambiente controlado, asséptico e com alta umidade), para as condições *ex vitro* (um ambiente hostil, com elevados níveis de estresse, como baixa umidade, luminosidade e temperatura elevadas, patógenos, entre outros). A adaptação das plantas produzidas *in vitro* para as condições *ex vitro* deve ser gradual e cercada de cuidados especiais, de maneira a reduzir os estresses que podem culminar na morte da planta (Souza *et al.*, 2006), devido a grande mudança proporcionada pelo transplante para a casa de vegetação. Portanto, a aclimatização tem como objetivo principal a redução do estresse causado pela enorme diferença entre as condições de cultivo *in vitro* e as condições externas de crescimento (Pasqual *et al.*, 2001).

2.4. Morfogênese *in vitro*

A expressão da totipotência está ligada às propriedades de diferenciação/desdiferenciação da célula vegetal. E dessa forma, a célula vegetal pode resultar em um embrião somático, como também, em novos meristemas, tanto caulinares quanto radiculares, através do processo de organogênese adventícia. A expressão não é automática, o que significa que condições preliminares adequadas devem ser fornecidas às culturas. Assim, antes que qualquer modo de regeneração esteja iniciado (organogênese ou embriogênese somática), uma mudança na determinação, ou seja, no destino de algumas células do explante (células, tecidos, órgãos) necessita acontecer (Ammirato, 1987).

Segundo Peres (2002), a reorientação de uma célula (desdiferenciação) a capacita para reagir a sinais específicos do meio de cultivo ou sinais físicos do meio ambiente, como luz, temperatura e umidade relativa. Nessas condições, a célula adquire competência para organogênese. Mas, na prática, nem todo explante é capaz de manifestar potencial morfogênico, pois a regeneração depende da sua competência. A competência pode ser entendida como a capacidade de responder ao estímulo hormonal com a indução da formação de órgãos (gemas ou raízes).

A regeneração de plantas *in vitro* pode ocorrer a partir da multiplicação de meristemas pré-existentes; a partir da neoformação de meristemas ou a partir de embriões somáticos. O processo mais comum é a primeira modalidade, visto que, os meristemas axilares, já estabelecidos, são a origem da multiplicação, resultando em uma maior estabilidade genética. As plantas regeneradas constituem um clone, ou seja, são todas iguais entre si e idênticas à planta mãe. A regeneração a partir da neoformação de meristemas utiliza explantes desprovidos destes. A propagação *in vitro*, nesse caso, pode ser direta ou indireta, através de processos de organogênese e embriogênese somática. Na regeneração indireta, meristemas e embriões somáticos são formados a partir de calos, constituindo uma fase intermediária entre o explante e os órgãos neoformados (Borges, 2002).

A embriogênese e a organogênese podem distinguir-se com base em critérios morfológicos e anatômicos. A princípio, a formação de embriões a partir de tecidos somáticos *in vitro* é semelhante à embriogênese zigótica que ocorre nos órgãos reprodutivos das plantas. As células somáticas são capazes de recapitular o desenvolvimento embriogênico sem fusão de gametas (Costa *et al.*, 2006). Entretanto, a

embriogênese zigótica difere em dicotiledôneas e monocotiledôneas. Os padrões de divisão celular em dicotiledôneas são relativamente simples e previsíveis. São descritos em quatro estádios, tais como: globular, coração, torpedo e maduro. No entanto, nas monocotiledôneas são descritos em globular, coleóptilo, vegetativo juvenil e maduro (Taiz & Zeiger, 2009). Os estádios de desenvolvimento da embriogênese nesses grupos de espermatófitas são facilmente encontrados em cortes anatômicos de culturas embriogênicas produzidas *in vitro*. Dessa forma, a embriogênese, tanto na forma somática quanto na zigótica culminam na formação de uma planta completa a partir de uma única célula. Anatomicamente, são formadas estruturas bipolares, constituídas de ápices caulinar e radicular, que permanecem conectados pelo procâmbio, dando origem ao tecido vascular. Além disso, o ápice radicular é fechado, sem conexão com os tecidos do explante inicial ou materno. Ao contrário, a organogênese implica na formação de estruturas monopolares que estabelecem conexão vascular com o tecido inicial. É de origem multicelular, e, normalmente, os caules e as raízes se formam de modo independente, sendo usual a ausência de conexão vascular entre ambas as estruturas (Costa *et al.*, 2006).

Existem dois padrões básicos de expressão da embriogênese somática, o modelo direto, no qual os embriões somáticos originam-se dos tecidos matrizes sem a formação de estágios intermediários de calos; e o modelo indireto, no qual os embriões somáticos se formam a partir de um tecido intermediário chamado calo, que apresenta células em diferentes estágios de diferenciação e, conseqüentemente, com diferentes graus de determinação (Guerra *et al.*, 1998).

A embriogênese somática, além de ser utilizada para a propagação massal clonal de plantas (com redução de estádios de cultura), possibilidade de automação (por biorreatores), redução de custo e mão-de-obra, e é também uma técnica de grande aplicabilidade para os estudos relacionados com a fisiologia, genética e bioquímica do desenvolvimento embrionário (Yeung, 1995), além de constituir uma técnica base para a obtenção de plantas transgênicas; preservação de germoplasma, por criopreservação; hibridação somática; entre outras (Santos-Serejo *et al.*, 2006b).

Entre os fitorreguladores, as auxinas são as substâncias mais envolvidas na indução e iniciação de embriões somáticos. Normalmente, têm sido sugeridas, em vários sistemas experimentais, para a formação de agregados embriogênicos a partir de células individuais, expressando a totipotência das células competentes (Guerra *et al.*, 1998).

De um modo geral, o ácido indolacético (AIA), ácido indolbutírico (AIB) e ácido naftalenoacético (ANA), em altas concentrações, estimulam a indução de embriogênese somática, e em baixas concentrações induzem a formação de raízes (Nomura & Komamine, 1995). George *et al.* (2008) relatam a importância da adição da auxina sintética 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) ao meio de cultura, nas concentrações de 1 a 10 µM, para indução de embriogênese somática. Titon *et al.* (2007) acrescentam à esta lista de indutores, o ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico (Picloram), o qual vem sendo bastante utilizado para induzir culturas embriogênicas em várias espécies de importância econômica.

Segundo George *et al.* (2008) a regeneração de plantas via embriogênese somática ocorre em cinco etapas:

1) A indução de culturas embriogênicas a partir do cultivo inicial dos explantes em meio suplementado com reguladores de crescimento. Nessa fase, normalmente são utilizadas auxinas sintéticas em elevadas concentrações, como o 2,4-D. Pierik (1987) e Guerra *et al.* (1998) também mencionam a grande importância e utilização dessa auxina na fase de iniciação, na maioria dos sistemas experimentais, tanto para o processo de desdiferenciação (modelos indiretos) como para a rediferenciação (modelos diretos), alterando a determinação e conferindo novas competências às células responsivas presentes nos explantes. Entretanto, Nomura e Komamine (1995) e George *et al.* (2008) ressaltam que, para a proliferação da massa pro-embriogênica, é necessária a adição de auxina ao meio de cultura, porém, em elevadas concentrações pode tornar-se inibitório para o desenvolvimento dessas massas em embriões somáticos.

2) Proliferação das culturas embriogênicas em meio líquido ou semi-sólido, suplementado com as mesmas concentrações dos reguladores de crescimento usados no início das culturas embriogênicas;

3) Pré-maturação dos embriões somáticos em meio sem reguladores de crescimento; com isso, ocorre a inibição da proliferação das culturas embriogênicas e estimula a formação de embriões somáticos, como também, o seu desenvolvimento. As auxinas sintéticas, como o 2,4-D, promovem o estabelecimento e proliferação das culturas embriogênicas, não sendo normalmente metabolizadas pelas células, como são as auxinas naturais;

4) Maturação dos embriões somáticos em meio do cultivo suplementado com ácido abscísico e/ou com redução no potencial osmótico. Nomura e Komamine

(1995) relatam que a adição de ABA ao meio de cultura reduz a formação de embriões anormais, embora, diminua também o número total de embriões somáticos, no fim do processo;

5) Regeneração de plantas em meio desprovido de reguladores de crescimento. Nessa fase, para algumas espécies, o acréscimo de alguns componentes extras ao meio de cultura, como glutamina e caseína hidrolisada, pode ser necessário para a melhor aclimatização das plantas.

Em muitos casos foi demonstrado que plantas provenientes de embriões somáticos crescem de um modo semelhante às plantas derivadas de embriões zigóticos. Entretanto, para algumas espécies, a variação somaclonal pode se tornar um fator limitante (George *et al.*, 2008). De acordo com Srivastava (2002) esse fenômeno é comum quando as plantas são derivadas de calos mais velhos mantidos em meio de cultura por tempo prolongado. A razão para essa variação ainda não está clara, mas existem relatos de que ela estaria relacionada às mudanças citológicas e nucleares que precedem à formação das massas proembriogênicas. George *et al.* (2008) ressaltam que, em geral, o uso de 2,4-D e uma fase prolongada durante o estágio de calos pode ser responsável por uma possível variação epigenética nas plantas.

O explante é o segmento ou órgão vegetal retirado de alguma parte da planta e utilizado para iniciar o cultivo *in vitro*. Dos aspectos a serem considerados na seleção dos explantes, os que têm maior influência na resposta morfogenética são o seu nível de diferenciação e a fase de desenvolvimento em que se encontra no tecido (Souza & Junghans, 2006). Merkle *et al.* (1995) acrescentam também que esses dois aspectos são elementos chave na competência celular para a propagação *in vitro*.

A princípio, qualquer fonte de explante pode ser utilizada para iniciar um cultivo *in vitro*, porém, recomenda-se explantes que contenham maior proporção de tecidos meristemáticos (Junghans & Santos-Serejo, 2006). Para a indução de embriogênese somática, quase todas as partes das plantas podem ser empregadas, como: ápices caulinares, hipocótilos, folhas, inflorescências, raízes (Guerra *et al.*, 1998), cotilédones, talos, segmentos nodais, ápices radiculares (Souza *et al.*, 2006), entre outros. Entretanto, Srivastava (2002) ressalta que existem partes das plantas, nas quais as células apresentam a parede bastante lignificada, o que pode tornar uma barreira para o sucesso de regeneração, ou seja, as células são capazes de se dividir, porém, incapazes de apresentar alguma resposta morfogenética. Guerra *et al.* (1998) relatam que, de acordo

com a espécie, a fonte de explante pode ser mais ou menos responsiva às condições de cultivo.

Utilizando como explantes folhas seccionadas e pecíolos, Kuehnle *et al.* (1992) induziram embriogênese somática em híbridos de *Anthurium andraeanum*, com a adição de 2,4-D ao meio de cultura. Hamidah *et al.* (1997) inocularam folhas, obtidas a partir de mudas micropropagadas, ao meio de cultura suplementado com 2,4-D, para induzir a formação de calos embriogênicos na cultura de *Anthurium scherzerianum*. Te-Chato *et al.* (2006) utilizaram, como fonte de explantes, segmentos nodais, segmentos caulinares, e folhas em meio de cultura com doses equivalentes de auxina e citocinina para a indução de embriões somáticos em *Anthurium* spp. Bautista *et al.* (2008) induziram embriogênese somática a partir de folhas de *Anthurium andraeanum* Lind em meio de cultura contendo 2,4-D.

Dessa forma, esforços para induzir a embriogênese somática têm sido descritos, por vários autores, para essa espécie de interesse econômico, cujas metodologias utilizadas envolvem diversas fontes de explantes, mudanças na composição do meio de cultura, suplementação com diferentes tipos e concentrações de fitorreguladores, e alterações nas condições de cultivo, como fotoperíodo e irradiância.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Estabelecer a propagação *in vitro* de *Anthurium andraeanum* cv. Eidibel via embriogênese somática, avaliando-se as fases de indução das culturas embriogênicas, pré-maturação e maturação dos embriões somáticos com posterior regeneração das plantas, analisando histologicamente o desenvolvimento dos embriões somáticos produzidos *in vitro*.

3.2. Objetivos específicos

Avaliar a resposta morfogênica em relação à fonte de explante, ao tipo e a concentração de auxinas, para culturas embriogênicas de *Anthurium andraeanum* cv. Eidibel.

Avaliar a formação de embriões somáticos a partir de culturas embriogênicas cultivadas em meio de cultura Pierik (Pierik, 1976) e AA2 (Abdullah *et al.*, 1986) em diferentes combinações de 2,4-D e 6-furfurilaminopurina (cinetina).

Avaliar a maturação completa dos embriões somáticos em plantas produzidos em meio de cultivo Pierik e AA2 em diferentes concentrações de cinetina e posterior aclimatização *ex vitro*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Local de realização dos experimentos e material vegetal

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos II do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), da Universidade Federal de Viçosa (UFV), localizado no Município de Viçosa, Minas Gerais, no período de março de 2008 a dezembro de 2009.

Utilizaram-se, como material vegetal, mudas estabelecidas *in vitro* de *Anthurium andraeanum* cv. Eidibel, obtidas inicialmente a partir da organogênese indireta de folhas tenras. Estas mudas foram cedidas pelo Instituto Agronômico (IAC), em Campinas, São Paulo.

As mudas foram propagadas *in vitro* por subcultivos sucessivos, sob condições assépticas, visando à obtenção de um número ideal de explantes para iniciar os experimentos. Para esta fase, foi adotada a subdivisão dos segmentos nodais contendo uma gema, os quais foram inoculados cinco segmentos, cultivados a cada 30 dias, em frascos com capacidade de 220 mL, contendo 30 mL de meio de cultura Pierik modificado (Tabela 1), acrescido de 4,44 μM de 6-benzilaminopurina (BAP) e 0,54 μM de ácido naftalenoacético (ANA) e solidificado com 6,5 g L de Ágar (Merck[®], Germany), mantidas em sala de crescimento, à temperatura de 25 ± 2 °C, sob fotoperíodo de 16 horas com irradiância de $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

4.2. Meio e condições de cultivo

4.2.1 Indução de culturas embriogênicas

O meio de cultura utilizado foi o Pierik (Pierik, 1976) suplementado com 20 g L⁻¹ de sacarose, solidificado com 6,5 g L⁻¹ de ágar Merck®, e o pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, a 121 °C, por 15 minutos.

Os explantes foram obtidos a partir do seccionamento de mudas de *A. andraeanum* cv. Eidibel estabelecidas *in vitro* (Figura 1A). Foram utilizados, como explantes, segmentos nodais (contendo uma gema, cada) (Figura 1B); pecíolos (Figura 1C); segmentos de raiz sem o ápice radicular (Figura 1D); folhas inteiras (Figura 1E) e seccionadas ao meio (Figura 1F), os cinco explantes com, aproximadamente, 1,0 cm cada; a folha foi medida acompanhando a nervura principal. Em câmara de fluxo laminar, sob condições assépticas, as folhas inteiras e seccionadas foram cultivadas com a face adaxial para cima, enquanto segmentos de pecíolo, nodais e de raízes, inoculados horizontalmente. Foram utilizadas placas de Petri de 90 x 15 mm (J. Prolab, Brasil), contendo 25 mL de meio de cultura, suplementado com diferentes concentrações (0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0 µM) das auxinas AIA; AIB; ANA; 2,4-D e Picloram. O material foi mantido em sala de crescimento, a 25 ± 2 °C, no escuro, e avaliados aos 60 dias de cultivo.

4.2.2 Pré-maturação dos embriões somáticos

Para o experimento de pré-maturação, utilizou-se a proliferação de culturas embriogênicas formadas a partir de segmentos nodais do cultivar Eidibel, cultivados em meio Pierik suplementado com 10,0 µM de ANA.

Para a fase de proliferação de culturas embriogênicas, adotou-se a subdivisão dos calos embriogênicos e transferência em condições assépticas, de nove calos embriogênicos em placas de Petri de 90 x 15 mm, contendo 25 mL de meio de cultura Pierik acrescido de 10,0 µM de ANA e 20 g L⁻¹ de sacarose, com o pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, a 121°C, por 15 minutos. As culturas permaneceram em sala de crescimento, à temperatura de 25 ± 2 °C, no escuro. Buscando-se a estabilização da capacidade embriogênica e de proliferação das linhagens celulares, foram realizados cinco subcultivos sucessivos de 60 dias cada conforme sugerido por Guerra *et al.* (1998).

Para iniciar o experimento de pré-maturação dos embriões somáticos, os calos embriogênicos, com cerca de 90 mg de massa fresca, foram inoculados, sob condições assépticas, em Erlenmeyers de 125 mL, contendo 25 mL de meio de cultura líquido Pierik e AA2 (Tabela 1) com diferentes concentrações de 2,4-D (0,00; 4,52; 9,05 μM) e de cinetina (0,00; 0,47; 2,32 μM). As culturas foram mantidas em sala de crescimento, a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, no escuro, sob agitação orbital a 100 rpm. A avaliação ocorreu aos 45 dias de cultivo *in vitro*.

Tabela 1. Composição dos meios de cultura Pierik e AA2 modificados

Composição	Meio nutritivo (mg L^{-1})	
	Pierik	AA2
Macronutrientes		
NH_4NO_3	825	0,0
KNO_3	950	0,0
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	220	440
KCl	0,0	2940
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	185	370
KH_2PO_4	85	170
Micronutrientes		
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,3	22,3
$\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	8,6	8,6
H_3BO_4	6,2	6,2
KI	0,83	0,83
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25	0,25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,025
$\text{CoCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,025	0,025
FeEDTA		
$\text{Na}_2 \text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37,3	37,3
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,8	27,8
Vitaminas e aminoácidos		
L-asparagina	0,0	266
L-Glutamina*	0,0	300
Glicina	2,0	75
Ácido nicotínico . HCl	0,5	0,5
Piridoxina . HCl	0,5	0,1
Tiamina . HCl	0,1	0,5
Mio-inositol	100	100
Sacarose	20.000	20.000

* L-Glutamina modificada, concentração original de 877 mg L^{-1} .

4.2.3 Maturação dos embriões somáticos e regeneração de plantas

Em câmara de fluxo laminar, os embriões somáticos pré-maturados foram inoculados em meios nutritivos AA2 e Pierik, suplementados com 0,54 μM de ANA, 20 g L^{-1} de sacarose e o pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem.

Sob condições assépticas, os embriões somáticos foram cultivados em Erlenmeyers de 125 mL, contendo 25 mL de meio nutritivo (AA2 e Pierik), líquido e semi-sólido, suplementados com as concentrações de cinetina (0,0; 1,16; 2,32; 4,64 μM). Nessa fase, as culturas foram mantidas em sala de crescimento a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, sob fotoperíodo de 16 horas e irradiância de $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Os meios líquidos permaneceram sob agitação constante, em mesa agitadora orbital, a 100 rpm. A avaliação ocorreu aos 45 dias de cultivo.

4.3. Procedimentos histológicos

As análises anatômicas foram realizadas no Laboratório de Anatomia Vegetal, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Federal de Viçosa (UFV), localizado no Município de Viçosa, Minas Gerais.

Para o experimento de indução de culturas embriogênicas, foi avaliada a natureza embriogênica dos calos mediante aspectos histoquímicos, por meio da dupla coloração com carmim acético (2%) e azul de Evans (0,1%) (Durzan, 1988). Ou seja, as estruturas que reagirem ao carmim acético revelam características embriogênicas. Também realizou-se o teste de lugol (0,1%) para detectar a presença de amido (Jensen, 1962). Pois células embrionárias possuem muitos grãos de amido, que se colorem de azul a preto-azulado, na reação com lugol.

Calos embriogênicos, provenientes dos explantes, foram fixados em Karnovsky, composto por 2,5 % de glutaraldeído, 4,0 % de paraformaldeído, 3,0 % de sacarose, 5 mM de CaCl_2 , em tampão de cacodilato a 0,1M (pH 6,8), permanecendo em refrigeração. Posteriormente, as amostras foram desidratadas em série alcoólica (10 a 95%) e incluídas em metacrilato (Historesin, Leica Instruments, Heidelberg, Alemanha). Cortes seriados de 5 a 8 μm de espessura foram obtidos utilizando-se micrótomo rotativo de avanço automático (modelo RM2155, Leica Microsystems Inc., Deerfield, USA), com utilização de navalhas de aço descartáveis. Os cortes foram

corados com Azul de Toluidina pH 4,0 (O'Brien & McCully, 1981), por 10 minutos, e as lâminas montadas em Permount.

A análise estrutural do material e a captura de imagens foram realizadas em microscópio de luz (modelo Olympus AX70TRF, Olympus Optical, Tóquio, Japão) com sistema U-Photo, com câmara digital acoplada (modelo Spot Insightcolour 3.2.0, Diagnostic Instruments inc. New York, USA). Os demais registros fotográficos foram obtidos em microscópio estereoscópio (modelo Olympus SZX) com sistema de captura de imagens acoplado (modelo Olympus E-330).

4.4. Procedimentos estatísticos

4.4.1. Experimento I: Indução de culturas embriogênicas

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 5 x 5 x 5, cinco fontes de explante (folha inteira; folha seccionada; pecíolo; segmento nodal e segmento radicular), cinco auxinas (ANA; AIA; AIB; 2,4-D e Picloram) e cinco concentrações (0,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0 μ M), além de cinco testemunhas adicionais (constituídas das fontes de explantes em meio de cultura sem regulador). A repetição foi composta de cinco placas de Petri, sendo cada unidade experimental constituída por nove explantes/placa, totalizando 45 explantes/tratamento. Todos os resultados foram analisados no programa estatístico SAS e confirmados no programa SISVAR 5.0 (Ferreira, 2003). Cada experimento foi repetido pelo menos uma vez.

As respostas morfogenéticas dos explantes foram avaliadas aos 60 dias quanto à presença de calos embriogênicos; brotos; raízes e peso fresco dos calos embriogênicos.

Os tratamentos que produziram calos embriogênicos foram avaliados quanto ao peso fresco dos calos, o qual foi dividido pela quantidade de calos que surgiram em cada repetição. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, os dados foram submetidos à análise de variância pelo software SISVAR versão 5.0, e na comparação das médias dos tratamentos utilizou-se do teste Tukey, a 5% de probabilidade.

Para verificar as pressuposições de homogeneidade, normalidade e independência dos dados realizaram-se os seguintes testes: teste de Bartlett (homogeneidade); Kolmogorov Smirnov (normalidade) e Durbin Watson (independência). Para todos os testes acima a hipótese nula (H_0) é referente à

homogeneidade de variância, normalidade e independência dos erros. A hipótese alternativa é a rejeição de H_0 , ou seja, para atender os pressupostos, todos os valores dos testes devem ser não significativos (Schneider, 1998).

Utilizou-se a análise de variância, comparando as médias pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Os dados de contagem, como calos embriogênicos, brotos e raízes, foram transformados para $\sqrt{x + 0,5}$ (Centeno, 1990) e submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de significância. Nas demais avaliações.

4.4.2. Experimento II: Pré-maturação dos embriões somáticos

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 2 x 3 x 3, sendo dois meios nutritivos (Pierik e AA2); três concentrações de 2,4-D (0,00; 4,52; 9,05 μM); e três concentrações de cinetina (0,00; 0,47; 2,32 μM). A repetição foi composta de cinco Erlenmeyers, sendo cada unidade experimental constituída de cinco calos/Erlenmeyer, totalizando 25 explantes/tratamento. Todos os resultados foram analisados no programa estatístico SISVAR. Cada experimento foi repetido pelo menos uma vez.

As respostas morfogênicas dos explantes foram avaliadas aos 45 de cultivo, quanto à massa dos calos embriogênicos; produção de embriões somáticos; produção de embriogênese somática secundária (quando as culturas embriogênicas pré-formadas induziram novos calos embriogênicos); porcentagem de oxidação; coloração, textura dos calos embriogênicos e desenvolvimento dos embriões somáticos produzidos.

Para as avaliações não-paramétricas nos 18 tratamentos para a pré-maturação dos embriões somáticos (T1 – Pierik sem regulador de crescimento; T2 – Pierik + 0,47 μM de cinetina (CIN); T3 – Pierik + 2,32 μM de CIN; T4 – Pierik + 4,52 μM de 2,4-D; T5 – Pierik + 4,52 μM de 2,4-D + 0,47 μM de CIN; T6 – Pierik + 4,52 μM de 2,4-D + 2,32 μM de CIN; T7 – Pierik + 9,05 μM de 2,4-D; T8 – Pierik + 9,05 μM de 2,4-D + 0,47 μM de CIN; T9 – Pierik + 9,05 μM de 2,4-D + 2,32 μM de CIN; T10 – AA2 sem regulador de crescimento; T11 – AA2 + 0,47 μM de CIN; T12 – AA2 + 2,32 μM de CIN; T13 – AA2 + 4,52 μM de 2,4-D; T14 – AA2 + 4,52 μM de 2,4-D + 0,47 μM de CIN; T15 – AA2 + 4,52 μM de 2,4-D + 2,32 μM de CIN; T16 – AA2 + 9,05 μM de 2,4-D; T17 – AA2 + 9,05 μM de 2,4-D + 0,47 μM de CIN; T18 – AA2 + 9,05 μM de 2,4-D + 2,32 μM de CIN), foram aplicadas notas de 1 a 3, referentes ao score (nota) da

coloração dos calos, em que o 1 correspondia à cor amarelo-claro, 2 à cor amarelo escuro e 3 marrom. Do mesmo modo, foram dadas notas de 1 a 4 para a textura dos calos embriogênicos (1 = friável; 2 = semi-friável; 3 = compacto; 4 = altamente compacto). E notas de 1 a 3 para o desenvolvimento dos embriões somáticos (1 = sem resposta; 2 = embriões maduros; 3 = germinados),

Os dados de contagem, como produção de embriões somáticos e produção de embriogênese somática secundária, foram transformados para $\sqrt{x + 0,5}$ (Centeno, 1990), e a porcentagem de oxidação transformada para $\arcsen \sqrt{x}$ (Ledo & Faria, 2006), submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de significância. Nas demais avaliações foram utilizadas apenas a análise de variância, comparando-se as médias pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Para as variáveis das avaliações não-paramétricas, coloração, textura e desenvolvimento dos embriões somáticos, utilizaram-se o teste de Kruskal-Wallis (Pimentel Gomes, 1985; Cargnelutti Filho *et al.*, 2001) a 5% de probabilidade.

4.4.3. Experimento III: Maturação dos embriões somáticos e regeneração de plantas

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 2 x 2 x 4, com dois meios de cultivo (líquido e semi-sólido); dois meios nutritivos (Pierik e AA2); e quatro concentrações de cinetina (0,00; 1,16; 2,32; 4,64 μM). A repetição foi composta de cinco Erlenmeyers, sendo cada unidade experimental constituída de cinco calos/Erlenmeyer, totalizando 25 explantes/tratamento. Todos os resultados foram analisados no programa estatístico SISVAR.

As respostas morfogenéticas dos explantes foram avaliadas aos 45 dias de cultivo, quanto ao número de calos com embriões maturados; porcentagem de conversão em plantas (realizada a partir do número de calos com regeneração em plantas); porcentagem de oxidação por calo; e número de embriões com maturação completa (a partir da contagem de calos com presença de embriões germinados).

Os dados de contagem, como número de calos com embriões maturados e número de embriões germinados, foram transformados para $\sqrt{x + 0,5}$ (Centeno, 1990), e a porcentagem de conversão em plantas e porcentagem de oxidação transformadas para $\arcsen \sqrt{x}$ (Ledo & Faria, 2006). Submetidos à análise de variância, sendo as médias

comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de significância. Nas demais avaliações foram utilizadas apenas a análise de variância, comparando-se as médias pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

4.5. Aclimatização *ex vitro* das plantas regeneradas

Para esta fase, utilizaram-se plantas regeneradas de antúrio (*Anthurium andraeanum* cv. Eidibel) provenientes do experimento de maturação dos embriões somáticos. As plantas foram retiradas dos Erlenmeyers e lavadas em água corrente para a retirada do excesso de meio de cultura. Na ocasião, foram dispostas cinco mudas por copo de 50 cm³ com tampas de 90 cm³ para manter a umidade elevada, e assim, iniciar a aclimatização, em substrato comercial Plantmax®, e mantidas na bancada do laboratório de Cultura de Tecidos II, do BIOAGRO, à temperatura ambiente, sob luz artificial, por 60 dias.

Após esse período, as plantas aclimatizadas foram transferidas para copos plásticos (uma unidade por copo) de 300 cm³ contendo substrato comercial Plantmax®, mantidas em casa de vegetação com ventilação forçada e elevada umidade relativa, do Departamento de Microbiologia da UFV.

5. RESULTADOS

5.1. Experimento I: Indução de culturas embriogênicas

5.1.1 Análise dos dados

Na fase de iniciação das culturas embriogênicas, alguns explantes apresentaram o desenvolvimento de calos embriogênicos, brotos e raízes. Pela análise de variância, as interações das fontes de variação: tipo de auxina (AS); concentração da auxina (CA); e a fonte de explante (FE), foram estatisticamente significativas, pelo teste F, para as variáveis analisadas: calos embriogênicos (CE); produção de brotos (PB); e produção de raízes (PR) (Tabela 2).

Para a variável produção de brotos, os testes de Bartlett (χ^2) e Kolmogorov Smirnov (D_{cal}) foram significativos a 5% de erro, ou seja, rejeita-se a hipótese nula de homogeneidade da variância e de normalidade, respectivamente. Verificou-se que os erros atendiam a pressuposição da independência, uma vez que não foram significativos a estatística de Durbin Watson (DW_{cal}), a 5% (Tabela 3). Sendo assim, uma vez que duas das pressuposições não foram atendidas, optou-se por transformar os dados, utilizando-se a fórmula $\sqrt{x+0,5}$. Realizou-se a análise de variância dos dados transformados, confirmando sua significância a 5% de probabilidade (Tabela 4).

Para a produção de raízes e calos embriogênicos, todos os testes foram significativos a 5% de erro, ou seja, rejeita-se a hipótese nula de homogeneidade da variância, normalidade e independência, respectivamente (Tabela 3). Dessa forma, os dados foram transformados para $\sqrt{x+0,5}$, uma vez que as três pressuposições não foram atendidas. Realizou-se a análise de variância dos dados transformados, constatando sua significância, a 5% de probabilidade (Tabela 4).

Tabela 2. Análise de variância dos dados obtidos da iniciação de culturas embriogênicas de antúrio (*Anthurium andraeanum* cv. Eidibel), quanto aos fatores: fonte de explante (FE); tipos de auxinas (AS) e concentração da auxina (CA) para as características analisadas: calos embriogênicos (CE), produção de brotos (PB) e de raízes (PR), avaliadas aos 60 dias de cultivo *in vitro*. Viçosa, MG, 2009

FV	GL	Quadrados médios		
		CE	PB	PR
AS	4	2,0043*	4,0221*	2,9009*
CA	4	0,5038*	0,2115*	0,1169 ^{ns}
FE	4	6,5746*	29,5659*	5,1342*
AS*CA	16	0,1923*	0,1159*	0,3056*
AS*FE	16	1,2314*	3,5313*	0,9872*
CA*FE	16	0,3492*	0,2877*	0,0669 ^{ns}
AS*CA*FE	64	0,0626 ^{ns}	0,1158*	0,1399*
Resíduo	400	0,0565	0,0416	0,0787
CV (%)		27,29	20,71	31,37

* e ^{ns} significativo e não significativo, a 5% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 3. Verificação das pressuposições de homogeneidade, pelo Teste de Bartlett (χ^2); normalidade, pelo Teste de Kolmogorov-Smirnov (D_{cal}); e independência, pelo teste de Durbin-Watson (DW_{cal}) das variáveis produção de brotos, produção de raízes e calos embriogênicos, avaliadas aos 60 dias de cultivo *in vitro*. Viçosa, MG, 2009

Variáveis	χ^2	D_{cal}	DW_{cal}
Produção de brotos (PB)	24,85*	36,5*	0,365 ^{ns}
Produção de raízes (PR)	33,08*	49,20*	1,01*
Calos embriogênicos (CE)	18,35*	15,89*	0,821*

* e ^{ns} significativo e não significativo, a 5% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 4. Análise de variância dos dados transformados para as variáveis: produção de brotos, produção de raiz e calos embriogênicos, aos 60 dias de cultivo *in vitro*. Viçosa, MG, 2009

Variáveis					
FV	Produção de brotos (PB)				
	GL	SQ	QM	F	
Trat	104	200,7279	1,9301	37,73*	CV(%) = 22,9636
Resíduo	420	21,4848	0,0511		Média = 0,9849
Total	524	222,2129			Desvio padrão = 0,2262
Produção de raízes (PR)					
Trat	104	63,0099	0,6058	8,01*	CV(%) = 30,7588
Resíduo	420	31,7680	0,0756		Média = 0,8941
Total	524	94,7779			Desvio Padrão = 0,2750
Calos embriogênicos (CE)					
Trat	104	71,9044	0,6914	12,97*	CV(%) = 26,5109
Resíduo	420	22,3896	0,0533		Média = 0,8709
Total	524	94,2940			Desvio Padrão = 0,2309

* significativo, a 5% de probabilidade pelo teste F.

A indução de culturas embriogênicas foi influenciada pela interação entre os tipos e as concentrações das auxinas e a fonte de explante. Dessa forma, a produção de calos foi inicialmente observada, principalmente, nos meios contendo ANA e Picloram, na concentração de 10,0 μM , não diferindo de 7,5 μM , sendo superior estatisticamente às demais. Dentro da concentração de 10,0 μM , não houve diferença estatística entre os tratamentos com as auxinas ANA (0,341), 2,4-D (0,380) e Picloram (0,380), sendo superiores as auxinas nesta concentração (Tabela 5).

O explante mais responsivo para a indução de calos embriogênicos foi o segmento nodal, para as auxinas ANA, Picloram e 2,4-D, apresentando maior média nesses tratamentos, diferindo estatisticamente dos demais. Entretanto, verificou-se sua superioridade apenas quando inoculado em meio de cultivo acrescido das auxinas ANA e Picloram, com 1,228 e 1,122, respectivamente, (Tabela 6), na concentração de 10 μM , com 0,949 (Tabela 7).

Tabela 5. Calos embriogênicos formados em diferentes fontes de explantes de *Anthurium andraeanum* cv. Eidibel, em função do tipo e da concentração da auxina, aos 60 dias de cultivo *in vitro*. Viçosa, MG, 2009

Auxinas	Concentração da auxina (μM)					Média
	0,0	2,5	5,0	7,5	10,0	
ANA	0,000 a B	0,377 a A	0,294 a A	0,225 a AB	0,341 a A	0,247 A
AIA	0,000 a A	0,000 c A	0,041 b A	0,000 c A	0,021 b A	0,012 C
AIB	0,000 a A	0,000 c A	0,021 b A	0,077 bc A	0,105 b A	0,040 C
2,4-D	0,000 a B	0,021 bc B	0,042 b B	0,168 bc AB	0,380 a A	0,122 B
Picloram	0,000 a C	0,190 b BC	0,259 a AB	0,502 a A	0,380 a AB	0,266 A
Média	0,000 c	0,118 b	0,131 b	0,194 ab	0,245 a	

Médias seguidas de letras diferentes minúsculas, nas colunas, e maiúsculas, nas linhas, diferem entre si, pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Houve a maior proliferação de calos embriogênicos quando inoculado pecíolo (Figura 1I) e segmento nodal aos meios de cultura com ANA, Picloram ou 2,4-D. Entretanto, o segmento nodal inoculado em meio Pierik acrescido de 10,0 μM de ANA (Figura 1K) induziu maior número de calos embriogênicos, quando comparado aos demais tratamentos.

Tabela 6. Número de calos embriogênicos formados em *Anthurium andraeanum* cv. Eidibel, considerando tipo de auxina e fonte de explante, aos 60 dias de cultivo *in vitro*. Viçosa, MG, 2009

Auxinas	Fonte de explante					Média
	Folha inteira	Folha seccionada	Pecíolo	Segmento nodal	Raiz	
ANA	0,000 a C	0,000 a C	0,245 a B	1,228 a A	0,000 a C	0,295 A
AIA	0,000 a A	0,000 a A	0,025 b A	0,049 c A	0,000 a A	0,015 C
AIB	0,000 a A	0,000 a A	0,157 ab A	0,083 c A	0,000 a A	0,048 C
2,4-D	0,025 a B	0,000 a B	0,165 ab B	0,470 b A	0,066 a B	0,140 B
Picloram	0,000 a C	0,000 a C	0,339 a B	1,122 a A	0,122 a C	0,322 A
Média	0,005 c	0,000 c	0,186 b	0,590 a	0,038 c	

Médias seguidas de letras diferentes minúsculas, nas colunas, e maiúsculas, nas linhas, diferem entre si, pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 7. Número de calos embriogênicos formados em *Anthurium andraeanum* cv. Eidibel, em função das concentração da auxina e da fonte de explante, aos 60 dias de cultivo *in vitro*. Viçosa, MG, 2009

Conc. da auxina (μ M)	Fonte de explante					Média
	Folha inteira	Folha seccionada	Pecíolo	Segmento nodal	Raiz	
0,0	0,000 a A	0,000 a A	0,000 a A	0,000 d A	0,000 a A	0,000 c
2,5	0,000 a B	0,000 a B	0,220 a A	0,367 c A	0,000 a B	0,117 b
5,0	0,000 a C	0,000 a C	0,194 a B	0,462 bc A	0,000 a C	0,131 b
7,5	0,000 a B	0,000 a B	0,132 a B	0,702 b A	0,021 a B	0,171 ab
10,0	0,021 a C	0,000 a C	0,236 a B	0,949 a A	0,137 a C	0,269 a
Média	0,004 c	0,000 c	0,156 b	0,496 a	0,032 c	

Médias seguidas de letras diferentes minúsculas, nas colunas, e maiúsculas, nas linhas, diferem entre si, pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os tratamentos responsivos para produção de calos foram comparados entre si, analisando a característica peso fresco dos calos embriogênicos. No entanto, tais tratamentos não diferiram entre si, a 5% de probabilidade. Os maiores valores numéricos foram encontrados nos tratamentos com Picloram, sendo mais evidenciado na concentração de 7,5 μ M (Tabela 8).

Tabela 8. Massa fresca de calos embriogênicos formados a partir de segmentos nodais de *Anthurium andraeanum* cv. Eidibel, em função do tipo e da concentração da auxina (tratamentos mais responsivos), aos 60 dias de cultivo *in vitro*. Viçosa, MG, 2009

Tratamentos (μ M)	Peso fresco dos calos embriogênicos (mg)
	Média
5,0 ANA	2,60 a
10,0 ANA	2,20 a
7,5 Picloram	4,00 a
10,0 Picloram	3,20 a
10,0 2,4-D	2,80 a

Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Outra característica analisada foi a presença de brotações, sendo que a maioria dos brotos ocorreu nas concentrações mais baixas das auxinas. Constatou-se também que a produção de brotos foi decrescendo à medida que houve um aumento nas

concentrações das auxinas, favorecendo a produção de calos embriogênicos ou a produção de raízes.

Para a produção de brotos, em todas as concentrações, as auxinas ANA e Picloram apresentaram-se inferiores, quando comparados aos demais tratamentos. No entanto, nas concentrações de 2,5 e 5,0 μM das auxinas AIA, AIB e 2,4-D e nas concentrações de 7,5 e 10 μM para AIA e AIB, foram estatisticamente superiores aos demais a 5% de probabilidade (Tabela 9).

Tabela 9. Número médio da produção de brotos em diferentes fontes de explantes de *Anthurium andraeanum* cv. Eidibel, em função do tipo e da concentração da auxina, aos 60 dias de cultivo *in vitro*. Viçosa, MG, 2009

Auxinas	Concentração da auxina (μM)					Média
	0,0	2,5	5,0	7,5	10,0	
ANA	0,507 a A	0,123 b B	0,021 b B	0,153 cd B	0,091 bc B	0,179 C
AIA	0,507 a A	0,503 a A	0,404 a A	0,519 a A	0,497 a A	0,486 A
AIB	0,475 a A	0,496 a A	0,401 a A	0,396 ab A	0,468 a A	0,447 A
2,4-D	0,475 a A	0,426 a A	0,354 a AB	0,272 bc AB	0,163 b B	0,338 B
Picloram	0,000 b A	0,077 b A	0,083 b A	0,000 d A	0,000 c A	0,032 D
Média	0,393 a	0,325 ab	0,252 b	0,268 b	0,244 b	

Médias seguidas de letras diferentes minúsculas, nas colunas, e maiúsculas, nas linhas, diferem entre si, pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O explante com a maior média de produção de brotos foi o segmento nodal (1,218), apresentando-se superior aos demais explantes. Dessa forma, os tratamentos com o acréscimo de AIA (2,244) diferiram a 5% de probabilidade das demais auxinas (Tabela 10), nesta fonte de explante. Entretanto, no meio de cultivo sem a adição de reguladores de crescimento (1,964) ocorreu aumento na produção de brotos em relação às demais concentrações, utilizando-se o segmento nodal. Enquanto que, quando utilizado pecíolo, como fonte de explante, o número de brotos foi reduzido (na ausência de auxina), para as demais fontes de explantes, não houve resposta (Tabela 11).

Constatou-se uma queda acentuada na produção de brotos à medida que se aumentou a concentração das auxinas (Tabela 11). As auxinas ANA, 2,4-D e Picloram, promoveram menor produção de brotos, quando comparadas às auxinas AIA e AIB, devido ao aumento na produção de calos embriogênicos ou mesmo na produção de raízes, em suas maiores concentrações (7,5 e 10,0 μM). Dessa forma, o meio Pierik sem

regulador de crescimento induziu maior proliferação de brotos, quando comparado aos demais tratamentos, nos explantes de segmento nodal.

Tabela 10. Número médio da produção de brotos de *Anthurium andraeanum* cv. Eidibel, em função do tipo de auxina e da fonte de explante, aos 60 dias de cultivo *in vitro*. Viçosa, MG, 2009

Auxinas	Fonte de explante					Média
	Folha inteira	Folha seccionada	Pecíolo	Segmento nodal	Raiz	
ANA	0,000 a B	0,000 a B	0,116 b B	0,466 d A	0,000 a B	0,116 C
AIA	0,000 a B	0,000 a B	0,165 ab B	2,244 a A	0,000 a B	0,482 A
AIB	0,000 a C	0,000 a C	0,304 a B	1,905 b A	0,000 a C	0,442 A
2,4-D	0,000 a B	0,000 a B	0,157 ab B	1,400 c A	0,000 a B	0,311 B
Picloram	0,000 a A	0,000 a A	0,116 b A	0,074 e A	0,000 a A	0,038 D
Média	0,000 c	0,000 c	0,171 b	1,218 a	0,000 c	

Médias seguidas de letras diferentes minúsculas, nas colunas, e maiúsculas, nas linhas, diferem entre si, pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 11. Número médio da produção de brotos de *Anthurium andraeanum* cv. Eidibel, em função da concentração da auxina e da fonte de explante, aos 60 dias de cultivo *in vitro*. Viçosa, MG, 2009

Conc. da auxina (μ M)	Fonte de explante					Média
	Folha inteira	Folha seccionada	Pecíolo	Segmento nodal	Raiz	
0,0	0,000 a B	0,000 a B	0,000 b B	1,964 a A	0,000 a B	0,393 a
2,5	0,000 a C	0,000 a C	0,255 a B	1,369 b A	0,000 a C	0,325 ab
5,0	0,000 a C	0,000 a C	0,174 ab B	1,088 cd A	0,000 a C	0,252 b
7,5	0,000 a B	0,000 a B	0,083 ab B	1,257 bc A	0,000 a B	0,268 b
10,0	0,000 a C	0,000 a C	0,209 ab B	1,009 d A	0,000 a C	0,244 b
Média	0,000 c	0,000 c	0,144 b	1,337 a	0,000 c	

Médias seguidas de letras diferentes minúsculas, nas colunas, e maiúsculas, nas linhas, diferem entre si, pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para a produção de raízes, pode-se observar que o meio Pierik acrescido de AIB (0,391) foi superior estatisticamente às demais auxinas, e as concentrações 2,5, 5,0, 7,5 e 10,0 μ M, diferiram, apenas, do meio sem regulador (Tabela 12).

Os explantes com a maior média de produção de raízes foram o segmento nodal e segmento de raiz, com 0,415 e 0,438, respectivamente, sendo estatisticamente superiores aos demais (Tabela 13). Dos tratamentos com segmento nodal, o acréscimo de AIB ao meio de cultura (0,871) foi estatisticamente superior aos demais reguladores de crescimento (Figura 1J). O mesmo ocorreu com o explante de segmento de raiz, no qual, o acréscimo de AIB (1,256) também diferiu estatisticamente aos demais tratamentos (Figura 1L; Tabela 13). Para o segmento nodal, não houve diferença significativa entre as concentrações das auxinas testadas. Entretanto, verificou-se que para o segmento de raiz, é necessária a adição de auxinas para a proliferação de raízes. (Tabela 14).

Tabela 12. Produção de raízes em fontes de explantes de *Anthurium andraeanum* cv. Eidibel, em função do tipo e da concentração da auxina, aos 60 dias de cultivo *in vitro*. Viçosa, MG, 2009

Auxinas	Concentração da auxina (μM)					Média
	0,0	2,5	5,0	7,5	10,0	
ANA	0,104 a A	0,257 ab A	0,000 c A	0,091 b A	0,042 b A	0,099 C
AIA	0,104 a AB	0,092 bc B	0,296 ab AB	0,077 b B	0,389 a A	0,191 B
AIB	0,000 a B	0,389 a A	0,445 a A	0,668 a A	0,452 a A	0,391 A
2,4-D	0,104 a A	0,185 abc A	0,083 bc A	0,140 b A	0,077 b A	0,118 BC
Picloram	0,000 a A	0,000 c A	0,083 bc A	0,062 b A	0,042 b A	0,037 C
Média	0,062 b	0,185 ab	0,181 ab	0,207 a	0,200 a	

Médias seguidas de letras diferentes minúsculas, nas colunas, e maiúsculas, nas linhas, diferem entre si, pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 13. Raízes formadas em *Anthurium andraeanum* cv. Eidibel, em função do tipo de auxina e da fonte de explante, aos 60 dias de cultivo *in vitro*. Viçosa, MG, 2009

Auxinas	Fonte de explante					Média
	Folha inteira	Folha seccionada	Pecíolo	Segmento nodal	Raiz	
ANA	0,000 a B	0,000 a B	0,049 a AB	0,257 bc A	0,182 c AB	0,098 C
AIA	0,000 a B	0,000 a B	0,042 a A	0,486 b A	0,512 b B	0,208 B
AIB	0,000 a C	0,000 a C	0,199 a C	0,871 a B	1,256 a A	0,465 A
2,4-D	0,000 a B	0,000 a B	0,074 a B	0,363 b A	0,165 c AB	0,120 BC
Picloram	0,000 a A	0,000 a A	0,049 a A	0,099 c A	0,074 c A	0,044 C
Média	0,000 b	0,000 b	0,082 b	0,415 a	0,438 a	

Médias seguidas de letras diferentes minúsculas, nas colunas, e maiúsculas, nas linhas, diferem entre si, pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 14. Raízes formadas em *Anthurium andraeanum* cv. Eidibel, em função da concentração da auxina e da fonte de explante, aos 60 dias de cultivo *in vitro*. Viçosa, MG, 2009

Conc. da auxina (μ M)	Fonte de explante					Média
	Folha inteira	Folha seccionada	Pecíolo	Segmento nodal	Raiz	
0,0	0,000 a A	0,000 a A	0,000 a A	0,311 a A	0,000 b A	0,062 b
2,5	0,000 a C	0,000 a C	0,139 a BC	0,336 a AB	0,448 a A	0,185 ab
5,0	0,000 a B	0,000 a B	0,042 a B	0,436 a A	0,429 a A	0,181 ab
7,5	0,000 a B	0,000 a B	0,077 a B	0,478 a A	0,482 a A	0,207 a
10,0	0,000 a B	0,000 a B	0,091 a B	0,431 a A	0,479 a A	0,200 a
Média	0,000 b	0,000 b	0,070 b	0,398 a	0,368 a	

Médias seguidas de letras diferentes minúsculas, nas colunas, e maiúsculas, nas linhas, diferem entre si, pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para a produção de brotos, o meio de cultura sem adição de auxinas foi adequado, desde que o explante a ser utilizado seja o segmento nodal. Para pecíolo há a necessidade de adição de auxina. Entretanto, para a produção de raízes, como também para a indução de culturas embriogênicas, faz-se necessário a adição de auxina, ao meio de cultura. Com isso, é necessário adicionar as auxinas recomendadas para se obter uma maior produção de raízes ou calos embriogênicos. Portanto, para a produção de calos embriogênicos as auxinas ANA e Picloram são indicadas, apesar de 2,4-D também ter

tido elevada produção, quando se utiliza explante de segmento nodal. Entretanto, em segmentos radiculares, a auxina mais indicada é AIB para a produção de raízes.

5.1.2 Aspectos morfo-histológicos

Os explantes, folha inteira, folha seccionada e segmento de raiz, inoculados em meio para indução de culturas embriogênicas, não produziram calos nem brotos. Muitos deles sofreram amarelecimento e/ou oxidação, a partir da quinta semana de cultivo *in vitro* (Figura 1G-H). Apesar disso, no meio de indução contendo 10 μ M de 2,4-D, ocorreu a formação de uma massa calosa de coloração amarelo-esbranquiçado em alguns explantes de folha inteira, aos 60 dias de cultivo *in vitro*. Entretanto, esses calos não desenvolveram embriões somáticos ou mesmo formaram brotos.

Em explantes de segmento nodal, observou-se um intumescimento das gemas e o desenvolvimento de raízes (Fig. 1J) e a proliferação de raízes em explantes de segmento de raiz (Fig. 1L).

Após a quinta semana de cultivo, ocorreu intumescimento e oxidação nos explantes de segmento nodal e pecíolo, resultando na formação de calos primários. Estes calos eram semi-friáveis, de coloração amarela e crescimento radial (Fig. 1I; 1K).

Na análise histoquímica, foi observada a natureza embriogênica dos calos produzidos (Fig. 2B) a partir da dupla coloração com carmim acético e azul de Evans. Dessa forma, observou-se que os calos produzidos a partir de segmento nodal, inoculado em meio acrescido de 10 μ M de ANA, reagiram fortemente ao carmim acético, revelando possuírem características embriogênicas, e não apenas massas calosas (Fig. 2C). Posteriormente, com as mesmas estruturas, realizou-se o teste de lugol, para a detecção de amido, constatando-se que os calos produzidos possuíam grande quantidade de grãos de amido, ratificando assim, que estes calos realmente possuem características de culturas embriogênicas (Fig. 2D).

Aos 60 dias de cultivo, pode-se observar, por meio dos cortes histológicos, que os calos produzidos com a utilização de segmento nodal em meio suplementado com ANA, Picloram e 2,4-D, se desenvolveram de forma e em tempos diferentes. Pode-se observar características de embriões somáticos com a presença de procâmbio e delimitações da protoderme bem definidas, nos meio contendo 10 μ M de 2,4-D (Fig. 2E) e 10 μ M de ANA (Fig. 2F). Em calos embriogênicos formados a partir de 10 μ M de Picloram (Fig. 2G), observam-se embriões com início de formação, apenas com

protoderme bem definida, sem sinais de vascularização dos embriões somáticos. Entretanto, os embriões somáticos produzidos em 10 μ M de ANA, apresentaram melhor desenvolvimento, além da presença de procâmbio e protoderme, demonstram início de sinais de polarização dos embriões formados (Fig. 2F).

Dessa forma, para iniciar o experimento de pré-maturação dos embriões somáticos, calos embriogênicos, produzidos em meio acrescido 10 μ M de ANA, foram selecionados e subcultivados no mesmo meio de cultura. O critério de seleção foi a presença de setores com grande capacidade de proliferação, e crescimento embrionário com sinais de polarização.

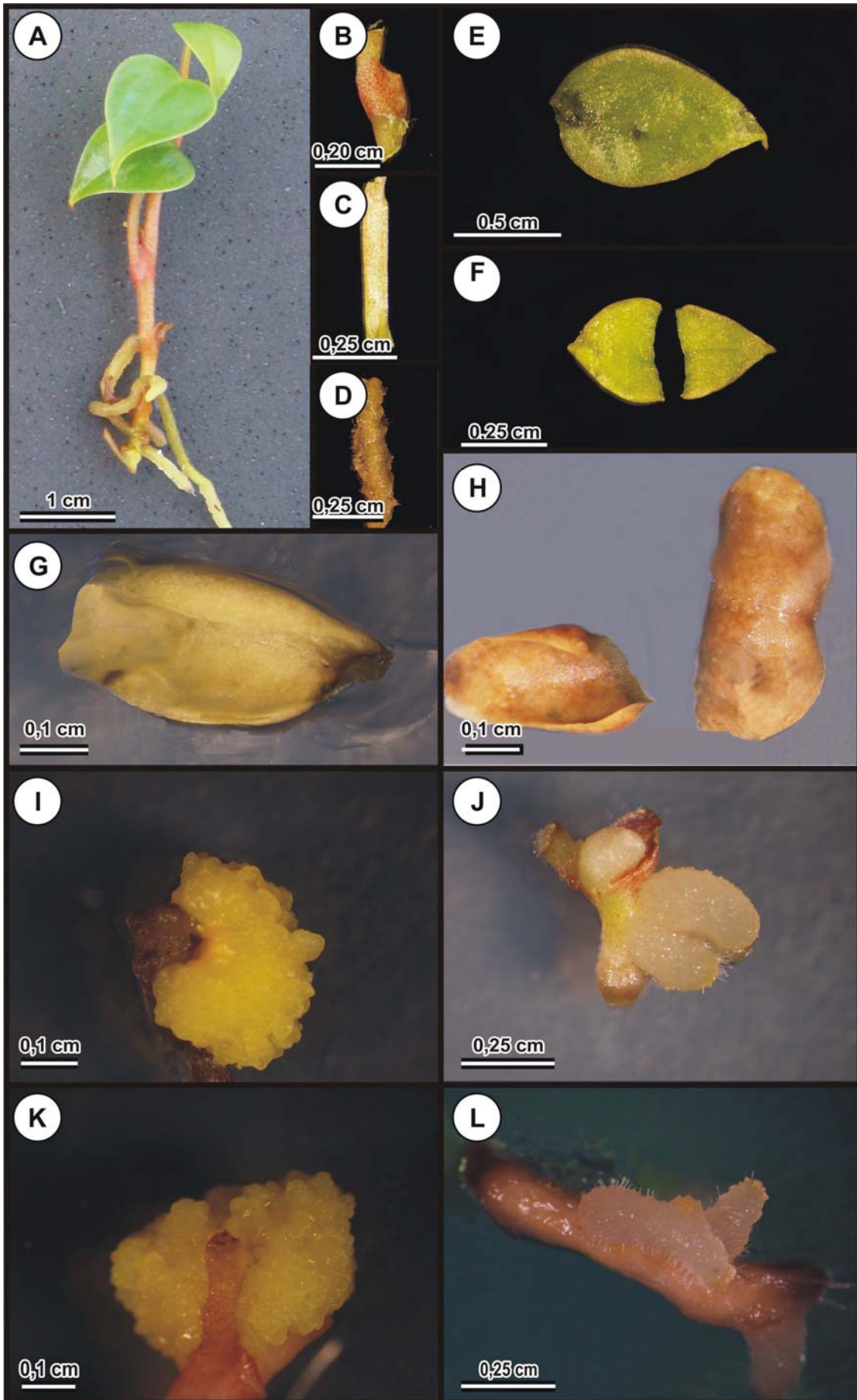


Figura 1. Propagação *in vitro* de *Anthurium andraeanum* cv. Eidibel cultivado em meio Pierik, após 60 dias de cultivo. (A) Planta desenvolvida *in vitro*, a partir da qual, os explantes foram excisados. (B) Explante de segmento nodal. (C) Explante de pecíolo. (D) Explante de segmento de raiz. (E) Explante de folha inteira. (F) Explante de folha seccionada. (G) Folha inteira com início de oxidação. (H) Folha seccionada ao meio com início de oxidação. (I) Pecíolo com formação de calos embriogênicos em meio contendo 10 μM de ANA. (J) Segmento nodal com formação de raízes e de brotos em meio adicionado de 7,5 μM de AIB. (K) Segmento nodal com formação de calos embriogênicos em meio suplementado com 10 μM de ANA. (L) Segmento de raiz com formação de raízes, em meio com 10,0 μM de AIB.

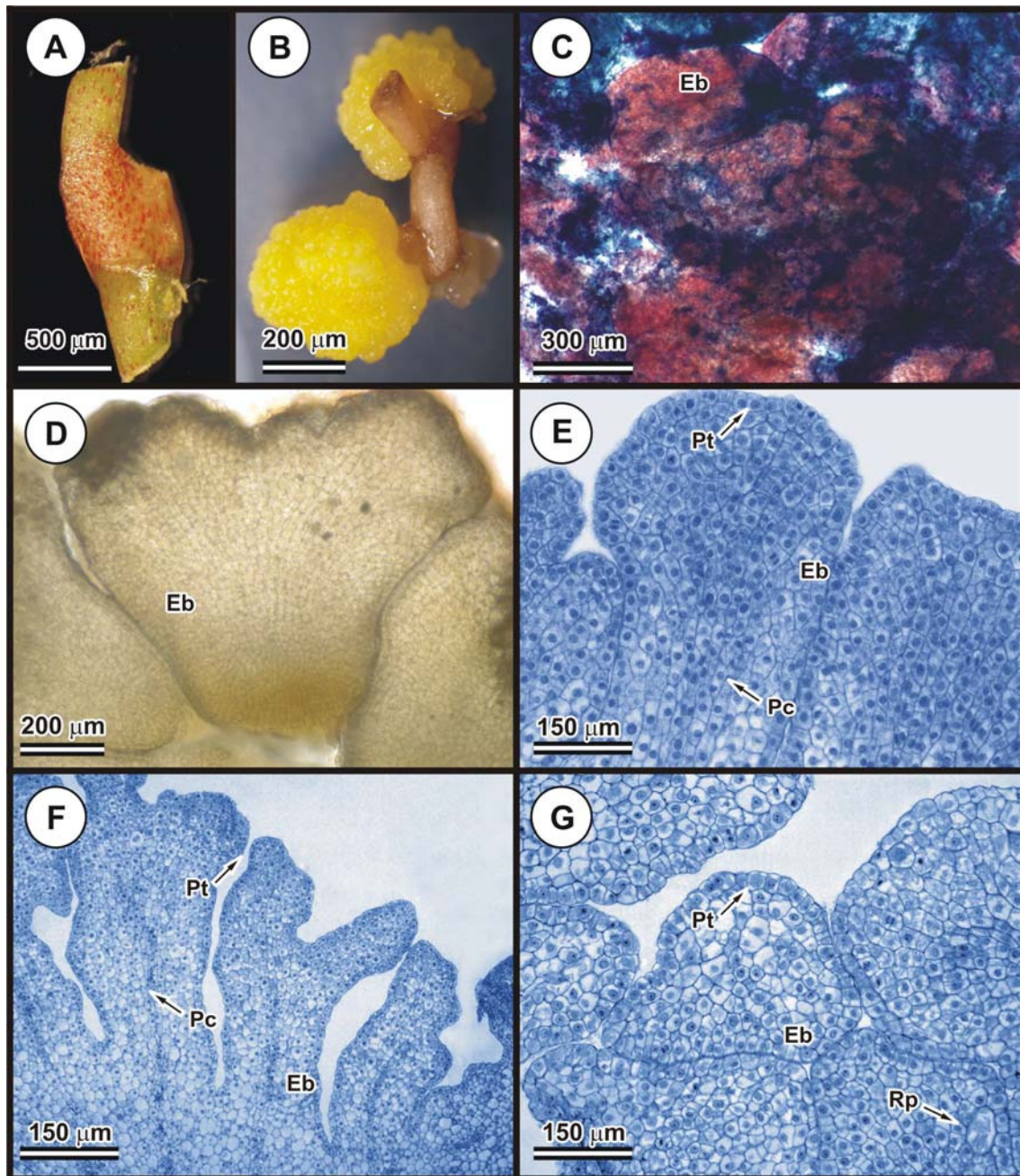


Figura 2. Indução de culturas embriogênicas em explantes de segmentos nodais de *Anthurium andraeanum* cv. Eidibel. (A) Explante inicial (0 dia): segmento nodal cultivado em meio contendo 10 μM de ANA. (B) Explante final (60 dias): Calos embriogênicos induzidos em 10 μM de ANA. (C) Culturas embriogênicas, em 10 μM de ANA, no qual as células de coloração vermelha revelam características embriogênicas. (D) Culturas embriogênicas, provenientes de 10 μM de ANA, corada com lugol para detecção de amido (reação positiva: coloração marrom). (E-G) Seções transversais de embriões somáticos aos 60 dias de cultivo. (E) Embriões somáticos formados em 10 μM de 2,4-D, com início da formação de procâmbio e protoderme. (F) Embriões somáticos em 10 μM de ANA, com início da formação de procâmbio e protoderme. (G) Início da formação de embriões somáticos em 10 μM de Picloram com protoderme e ráfide. Eb: embriões; Pc: procâmbio; Pt: protoderme; Rp: ráfide.

5.2. Experimento II: Pré-maturação dos embriões somáticos

5.2.1 Análise dos dados

Ao fim do experimento, apesar dos calos embriogênicos de *Anthurium andraeanum* cv. Eidibel permanecerem aglomerados, os embriões somáticos se desenvolveram normalmente, ou seja, não houve liberação dos embriões somáticos da massa embriogênica. Na fase de pré-maturação dos embriões somáticos, alguns calos apresentaram desenvolvimento embrionário para as sucessivas fases da embriogênese, de globular a maduros. No entanto, devido ao tratamento, alguns calos continuaram na fase de indução de culturas embriogênicas, sendo definidos como embriogênese somática secundária.

Pela análise de variância, as interações das fontes de variação: meio nutritivos (MN); concentração de 2,4-D (2,4-D) e de cinetina (CIN) foram estatisticamente significativas, a 5% de probabilidade pelo teste F, para as variáveis analisadas: massa dos calos embriogênicos (MCE), no qual houve diferença apenas para o meio nutritivo; produção de embriões somáticos (PES), não houve diferença estatística nas interações; produção de embriogênese somática secundária (PESS), diferenças ocorreram para o meio nutritivo, concentração de cinetina e a interação MN*2,4-D; porcentagem de oxidação (%OX), não foi significativo apenas para meio nutritivo (Tabela 15).

Tabela 15. Análise de variância dos dados obtidos da pré-maturação dos embriões somáticos de *Anthurium andraeanum* cv. Eidibel, quanto aos fatores: meio nutritivo (MN); concentração de 2,4-D (2,4-D) e concentração de cinetina (CIN) para as características analisadas: massa dos calos embriogênicos (MCE); produção de embriões somáticos (PES); produção de embriogênese somática secundária (PESS); porcentagem de oxidação (%OX), avaliados aos 45 dias de cultivo *in vitro*. Viçosa, MG, 2009

FV	GL	Quadrados médios			
		MCE	PES	PESS	%OX
MN	1	4,1853*	5,1302*	3,9684*	468,0612 ^{ns}
2,4-D	3	0,0105 ^{ns}	1,1126*	0,4342 ^{ns}	7393,4280*
CIN	3	0,1219 ^{ns}	1,0799*	0,7060*	3912,9066*
MN*2,4-D	3	0,0102 ^{ns}	0,2414 ^{ns}	0,9009*	2368,9833*
MN*CIN	3	0,0305 ^{ns}	0,4974 ^{ns}	0,2867 ^{ns}	2810,4271*
2,4-D*CIN	3	0,0404 ^{ns}	0,0867 ^{ns}	0,2620 ^{ns}	2223,7865*
MN*2,4-D*CIN	3	0,0035 ^{ns}	0,9929 ^{ns}	0,4091 ^{ns}	1329,5493*
Resíduo	80	0,0535	0,1736	0,2235	397,8718
CV (%)		47,41	21,82	38,51	61,01

* e ^{ns} significativo e não significativo, a 5% de probabilidade pelo teste F.

Analisada aos 45 dias de cultivo, observa-se que o meio nutritivo influencia o desenvolvimento da massa dos calos. Maiores médias de massas frescas foram observadas em meio AA2 (0,704), no qual ocorreu elevada proliferação de calos (Tabela 16), além de visível intumescimento dos calos embriogênicos.

Tabela 16. Massa fresca dos calos embriogênicos de *Anthurium andraeanum* cv. Eidibel, em função do meio nutritivo, aos 45 dias de cultivo *in vitro*. Viçosa, MG, 2009

Meios nutritivos	Médias (g)
Pierik	0,273 b
AA2	0,704 a

Médias seguidas de letras diferentes, diferem entre si, pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Considerando a produção de embriões somáticos, o meio nutritivo mais indicado foi o Pierik (4,311), que foi superior estatisticamente ao meio AA2 (2,600). Da mesma forma, o meio sem a adição de 2,4-D (4,100) não foi superior estatisticamente quando

adicionado 4,52 μM de 2,4-D. Para as concentrações de cinetina, houve a maior pré-maturação dos embriões somáticos em meio acrescido com 0,47 μM de cinetina, sendo superior as demais, a 5% de significância (Tabela 17).

A produção de embriogênese somática secundária foi superior estatisticamente em meio Pierik (1,933), quando comparando ao meio AA2 (0,689). A concentração de 9,05 μM de 2,4-D (3,20), em meio Pierik, foi superior às demais concentrações, a 5% de significância (Tabela 18). Quando não houve adição de cinetina ao meio Pierik (3,067), a indução de embriogênese somática secundária apresentou-se mais elevada, quando comparado às demais concentrações (Tabela 19). Com isso, pode-se observar que a indução de culturas embriogênicas foi continuada quando adicionada elevadas concentrações de 2,4-D ao meio de cultura, resultando em aumento na produção de calos embriogênicos, e conseqüente redução na pré-maturação dos embriões somáticos. Dessa forma, na ausência de 2,4-D no meio de cultura (1,200) houve menor indução de embriogênese secundária, a 5% de significância (Tabela 18). Bem como, a adição ao meio Pierik tanto de 0,47 μM quanto de 2,32 μM de cinetina resultou em menor formação de embriogênese somática secundária (Tabela 19).

Tabela 17. Produção de embriões somáticos de *Anthurium andraeanum* cv. Eidibel, para o experimento de maturação, em função do meio nutritivo, da concentração de 2,4-D e de cinetina, aos 45 dias de cultivo *in vitro*. Viçosa, MG, 2009

Meio nutritivo	Médias
Pierik	4,311 a
AA2	2,600 b
Concentração de 2,4-D (μM)	
0,0	4,100 a
4,52	2,800 b
9,05	3,467 ab
Concentração de cinetina (μM)	
0,0	3,133 b
0,47	4,133 a
2,32	3,100 b

Médias seguidas de letras diferentes, diferem entre si, pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 18. Produção de embriogênese somática secundária em *Anthurium andraeanum* cv. Eidibel, em função dos fatores meio nutritivo e da concentração de 2,4-D, aos 45 dias de cultivo *in vitro*. Viçosa, MG, 2009

Meio nutritivo	Concentração de 2,4-D (μM)			Média
	0,0	4,52	9,05	
Pierik	1,200 a B	1,400 a B	3,200 a A	1,933 A
AA2	0,867 a A	0,667 a A	0,533 b A	0,689 B
Média	1,033 a	1,033 a	1,867 a	

Médias seguidas de letras diferentes minúsculas, nas colunas, e maiúsculas, nas linhas, diferem entre si, pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 19. Produção de embriogênese somática secundária em *Anthurium andraeanum* cv. Eidibel, em função do meio nutritivo e da concentração de cinetina, aos 45 dias de cultivo *in vitro*. Viçosa, MG, 2009

Meio nutritivo	Concentração de cinetina (μM)			Média
	0,0	0,47	2,32	
Pierik	3,067 a A	1,333 a B	1,400 a B	1,933 A
AA2	0,867 b A	0,467 a A	0,733 a A	0,689 B
Média	1,967 a	0,900 b	1,067 ab	

Médias seguidas de letras diferentes minúsculas, nas colunas, e maiúsculas, nas linhas, diferem entre si, pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Houve maior porcentagem de oxidação, quando utilizado o meio Pierik acrescido de 4,52 (63,3%) ou 9,05 μM (41,7%) de 2,4-D diferindo do meio sem adição do mesmo regulador de crescimento (4,3%), a 5% de significância (Tabela 20). O mesmo meio, acrescido de 2,32 μM de cinetina (47,2%), não diferiu estatisticamente apenas do meio sem a adição da citada citocinina (50,3%), no qual, observou-se no meio Pierik acrescido com 0,47 μM de cinetina a menor porcentagem de oxidação, 8% (Tabela 21). Ou seja, houve um aumento na porcentagem de oxidação nos calos embriogênicos quando adicionado ao meio de cultura as concentrações de 9,05 μM de 2,4-D + 2,32 μM de cinetina (69,6%), ou 4,52 μM de 2,4-D + 2,32 μM de cinetina (74,8%) (Tabela 22). Dessa forma, observa-se menor porcentagem de oxidação nos meios sem a adição de 2,4-D, independentemente da concentração de cinetina.

Tabela 20. Porcentagem de oxidação das culturas embriogênicas de *Anthurium andraeanum* cv. Eidibel, em função dos fatores meio nutritivo e da concentração de 2,4-D, aos 45 dias de cultivo *in vitro*. Viçosa, MG, 2009

Meio nutritivo	Concentração de 2,4-D (μM)			
	0,0	4,52	9,05	Média
Pierik	4,3 a B	63,3 a A	41,7 a A	36,4 A
AA2	8,9 a B	21,5 b B	52,3 a A	27,5 B
Média	6,6 b	42,4 a	47,0 a	

Médias seguidas de letras diferentes minúsculas, nas colunas, e maiúsculas, nas linhas, diferem entre si, pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 21. Porcentagem de oxidação das culturas embriogênicas de *Anthurium andraeanum* cv. Eidibel, em função dos fatores meio nutritivo e da concentração de cinetina, aos 45 dias de cultivo *in vitro*. Viçosa, MG, 2009

Meio nutritivo	Concentração de cinetina (μM)			
	0,0	0,47	2,32	Média
Pierik	50,3 a A	8,0 a B	47,2 a A	35,2 A
AA2	10,3 b B	20,5 a B	51,0 a A	27,3 B
Média	30,3 b	14,3 b	49,1 a	

Médias seguidas de letras diferentes minúsculas, nas colunas, e maiúsculas, nas linhas, diferem entre si, pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 22. Porcentagem de oxidação das culturas embriogênicas de *Anthurium andraeanum* cv. Eidibel, em função da concentração de 2,4-D e de cinetina, aos 45 dias de cultivo *in vitro*. Viçosa, MG, 2009

Concentração de 2,4-D (μM)	Concentração de cinetina (μM)			
	0,0	0,47	2,32	Média
0,0	9,6 b A	2,5 b A	8,5 b A	6,9 B
4,52	15,2 b B	37,3 a B	74,8 a A	42,4 A
9,05	67,1 a A	9,9 ab B	69,6 a A	48,9 A
Média	30,6 b	16,6 b	51,0 a	

Médias seguidas de letras diferentes minúsculas, nas colunas, e maiúsculas, nas linhas, diferem entre si, pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Quanto à coloração dos calos embriogênicos, houve maior somatório nos tratamentos T6 (Pierik acrescido de 4,52 μM de 2,4-D e 2,32 μM de cinetina) e T18 (AA2 acrescido de 9,05 μM de 2,4-D e 0,47 μM de cinetina), em que a coloração escura dos calos prevaleceu, devido à oxidação encontrada nesses tratamentos. Entretanto, o T7 (Pierik acrescido de 9,05 μM de 2,4-D) obteve o menor somatório, comparando-o aos

demais, no qual a coloração amarela prevaleceu, sendo essa a mesma observada em calos do experimento de indução de culturas embriogênicas (Figura 3A).

Dessa forma, a produção de embriões somáticos secundários foi estatisticamente superior no T7 (Pierik acrescido de 9,05 μM de 2,4-D) (Tabela 18 e 19). O mesmo aconteceu para a variável não-paramétrica coloração das culturas embriogênicas, no qual constatou-se a produção de calos de coloração amarela, mesma cor encontrada nos calos produzidos no experimento de indução de calos embriogênicas. Ou seja, a concentração de 9,05 μM de 2,4-D pode ser usada para a indução de calos embriogênicos em segmentos nodais do cultivar Eidibel.

A maior porcentagem de oxidação foi encontrada em meio Pierik suplementado com 4,52 e 9,05 μM de 2,4-D na combinação com 2,32 μM de cinetina ou sem acréscimo da citocinina. Para a variável não-paramétrica coloração, observou-se a cor marrom nesses tratamentos (T4; T5; T7; T9), comprovando a oxidação das culturas embriogênicas.

Para textura, os maiores somatórios foram encontrados nos tratamentos T17 (AA2 acrescido de 9,05 μM de 2,4-D e 0,47 μM de cinetina), T18 (AA2 acrescido de 9,05 μM de 2,4-D e 2,32 μM de cinetina) e T6 (Pierik acrescido de 4,52 μM de 2,4-D e 2,32 μM de cinetina), no qual os calos permaneceram com maior grau de compactação em comparação como os demais tratamentos. Nos tratamentos T2 (Pierik acrescido de 0,47 μM de cinetina), T3 (Pierik acrescido de 2,32 μM de cinetina) e T7 (Pierik acrescido de 9,05 μM de 2,4-D) foram encontrados os menores somatórios, indicando os tratamentos com os calos mais friáveis (Figura 3B).

Quanto ao desenvolvimento dos embriões, houve maior somatório nos tratamentos T11 (AA2 sem acréscimo de fitorregulador) e T12 (AA2 acrescido de 0,47 μM de cinetina), seguidos do T2 (Pierik acrescido de 0,47 μM de cinetina), em que houve desenvolvimento dos embriões, passando por pré-maturação até maturação (Figura 3C; Fig. 4E;F).

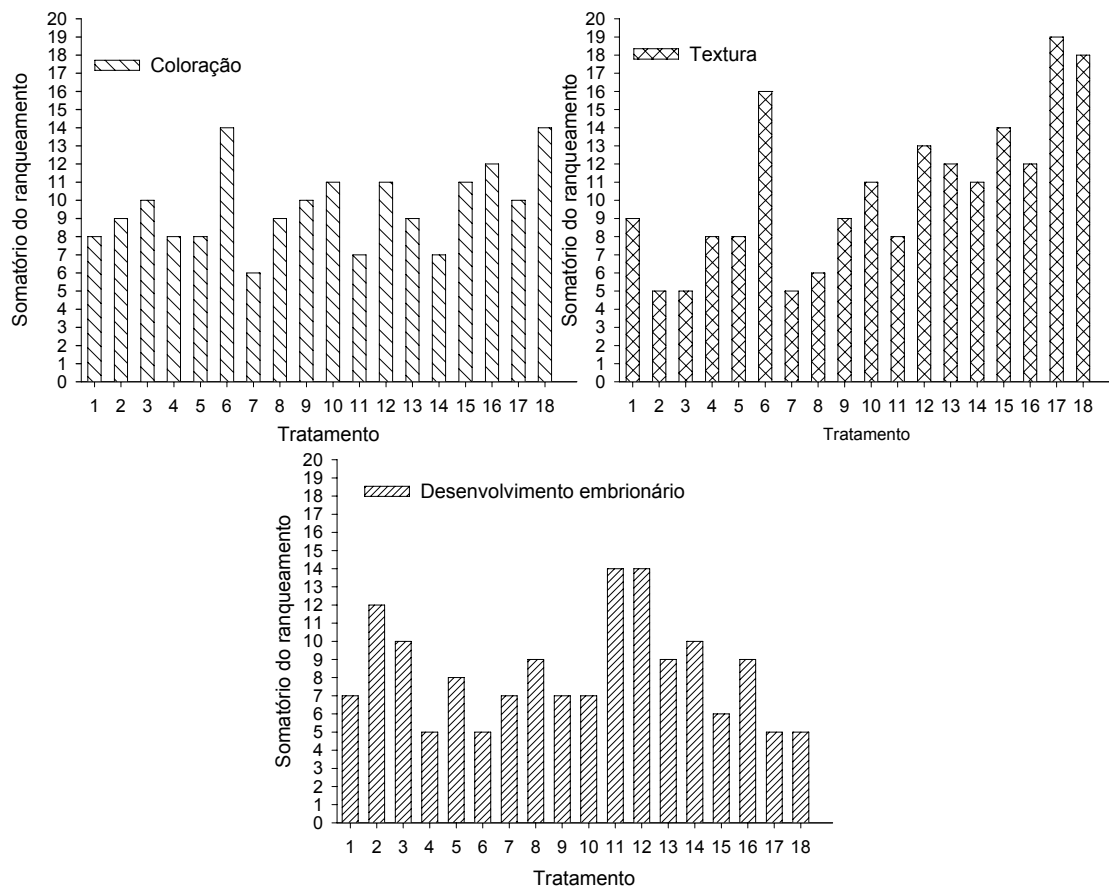


Figura 3. Teste de Kruskal-Wallis para dados ranqueados de coloração (A), textura (B) e desenvolvimento embrionário (C) de calos embriogênicos de *Anthurium andraeanum* cv. Eidibel, aos 45 dias de cultivo *in vitro*. Viçosa, MG, 2009.

5.2.2 Aspectos morfo-histológicos

Subseqüentemente à indução e proliferação de culturas embriogênicas, os calos produzidos em Pierik acrescido de 10,0 μM de ANA (Fig. 4A) foram inoculados em meio Pierik sem regulador de crescimento, e após 45 dias de cultivo, observou-se início de formação de embriões somáticos, a partir dos calos embriogênicos formados em meio Pierik sem regulador (Fig. 4B). Em meio Pierik acrescido com 0,47 μM de cinetina a análise histológica revelou estruturas globulares com protoderme bem delimitada, além da formação de meristemóides (Fig. 4C), como também, detalhes do desenvolvimento do embrião somático em estágio globular. Observa-se protoderme bem definida e presença de procâmbio, evidenciando a presença de um sistema vascular fechado, demonstrando assim, sinais de polarização (Fig. 4D).

A maioria dos embriões somáticos formados em meio Pierik acrescido de 0,47 μM de cinetina (Fig. 4E) desenvolveu-se com sinais de polarização completa, Entretanto, foram observados embriões em vários estádios de desenvolvimento (Fig. 4F). Em cortes histológicos realizados em embriões no último estágio de desenvolvimento, confirma-se a presença de folha primária, além da formação de zona meristemática (Fig. 4G).

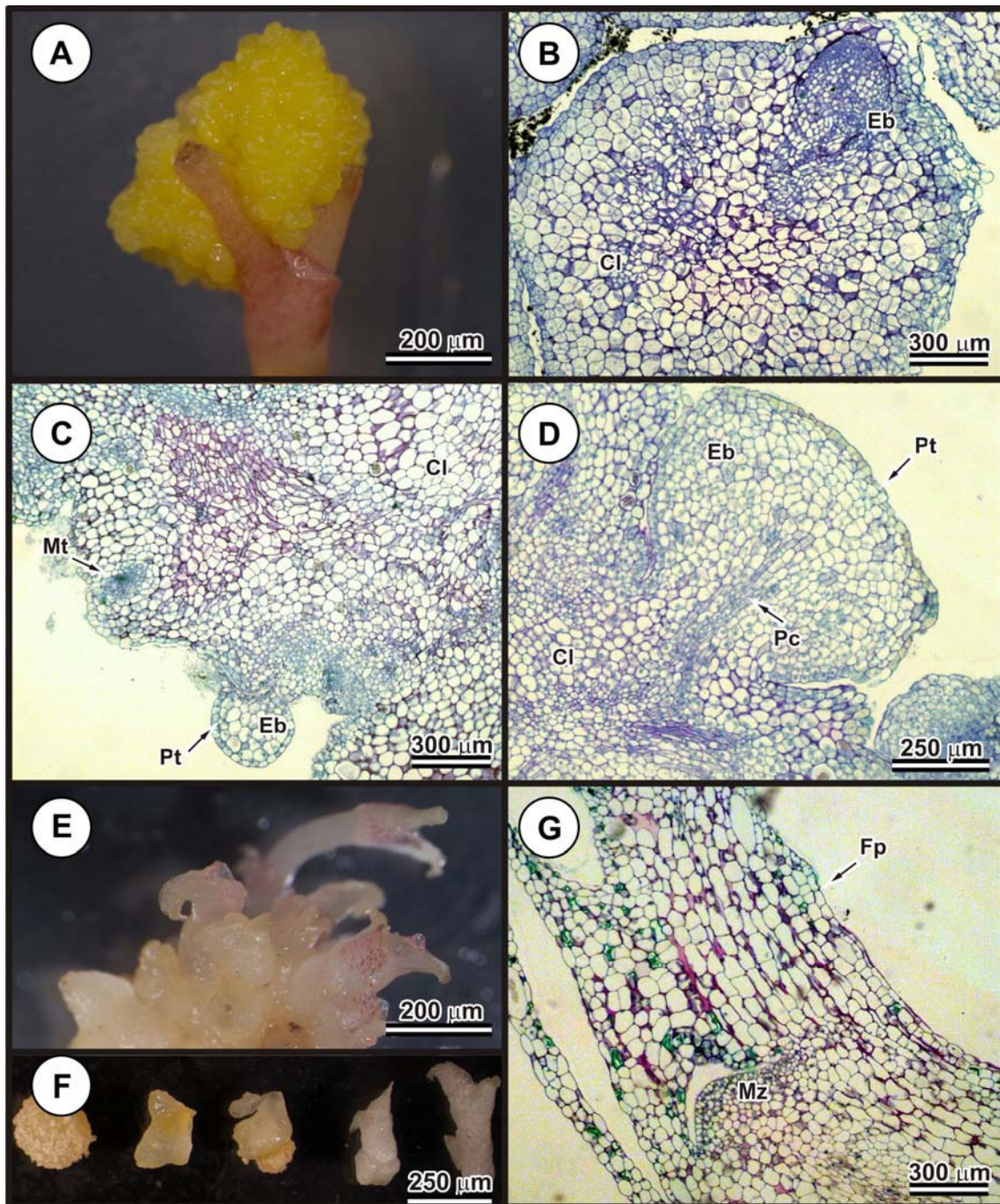


Figura 4. Pré-maturação de culturas embriogênicas de *Anthurium andraeanum* cv. Eidibel, cultivados em meio Pierik. (A) Explante inicial (0 dias): calo embriogênico cultivado com 10 μM de ANA. (B-G) 45 dias de cultivo. (B) Calos embriogênicos com início de formação de embrião somático. (C) Detalhes de meristemóide e embriões somáticos em estágio globular com protoderme bem definida. (D) Embriões somáticos em estágio avançado de desenvolvimento, com protoderme e procâmbio bem definidos. (E) Explante final: Calos embriogênicos com maturação completa. (F) Embriões somáticos nos estádios: globular, coleótilo, vegetativo juvenil e maturação. (G) Maturação completa dos embriões somáticos, demonstrando zona meristemática evidente. Eb: embriões; Pc: procâmbio; Pt: protoderme; Cl: calo; Mt: meristemóides; Mz: zona meristemática; Fp: folha primária.

5.3. Experimento III: Maturação dos embriões somáticos e regeneração de plantas

5.3.1 Análise dos dados

Na fase de maturação das culturas embriogênicas, alguns calos de embriões somáticos apresentaram-se com a completa conversão em plantas; outros com embriões com maturação incompleta; e alguns calos com oxidação. Pela análise de variância, não houve interações das fontes de variação: meio de cultivo, líquido ou semi-sólido (MC); meio nutritivo (MN); concentração de cinetina (CIN); foram estatisticamente significativas, a 5% de probabilidade pelo teste F, apenas para: número de calos com embriões maturados (NCEM) e porcentagem de conversão em plantas (%CP), na interação MC*CIN; porcentagem de oxidação (%OX), para MC e MN; e número de embriões germinados (NEG), para MN e CIN (Tabela 23).

Tabela 23. Quadrados médios dos dados obtidos do experimento de germinação de embriões somáticos de *Anthurium andraeanum* cv. Eidibel, representando os fatores testados: consistência do meio de cultivo, meio líquido ou semi-sólido (MC); meio nutritivo (MN); concentração de cinetina (CIN), suas respectivas interações e as variáveis analisadas: número de calos com embriões maturados (NCEM); porcentagem de conversão em planta (%CP); porcentagem de oxidação (%OX); número de embriões com maturação completa (NEMC), avaliados aos 45 dias de cultivo *in vitro*. Viçosa, MG, 2009

FV	GL	Quadrados médios			
		NCEM	%CP	%OX	NEMC
MC	1	0,6883 ^{ns}	699,9515 ^{ns}	2699,9651*	12,80 ^{ns}
MN	1	0,3700 ^{ns}	267,4035 ^{ns}	27131,8140*	245,00*
CIN	3	0,4729 ^{ns}	1369,1643 ^{ns}	508,1240 ^{ns}	209,10*
MC*MN	1	0,0003 ^{ns}	120,1260 ^{ns}	1352,8891 ^{ns}	192,20 ^{ns}
MC*CIN	3	0,7500*	2055,1978*	1048,2219 ^{ns}	125,30 ^{ns}
MN*CIN	3	0,1590 ^{ns}	377,7103 ^{ns}	638,1096 ^{ns}	69,90 ^{ns}
MC*MN*CIN	3	0,0074 ^{ns}	14,7657 ^{ns}	204,2719 ^{ns}	55,1667 ^{ns}
Resíduo	64	0,2303	501,8675	629,2866	59,5125
CV (%)		43,80	130,60	55,98	114,11

* e ^{ns} significativo e não significativo, a 5% de probabilidade pelo teste F.

As variáveis, número de calos embriogênicos com embriões maturados e porcentagem de conversão em plantas, comportaram-se de maneira semelhante. Para o número de calos embriogênicos com embriões maturados, observou-se que não houve diferenças estatísticas entre os meios líquido e semi-sólido. Entretanto, a concentração de 2,32 μM de cinetina diferiu apenas da concentração de 1,16 μM , a 5% de significância, quando utilizou-se o meio de cultivo líquido (Tabela 24). Para a porcentagem de conversão em plantas, o meio líquido (15,32%) não diferiu do meio semi-sólido (8,42%), a 5% de significância. Porém, o meio líquido acrescido de 2,32 μM de cinetina (41,18%) não diferiu apenas da concentração de 4,64 μM de cinetina (13,94%) (Tabela 25).

Tabela 24. Número de calos com embriões maturados de *Anthurium andraeanum* cv. Eidibel, em função da consistência do meio de cultivo e da concentração de cinetina, aos 45 dias de cultivo *in vitro*. Viçosa, MG, 2009

Consistência do meio de cultivo	Concentração de cinetina (μM)				Média
	0,0	1,16	2,32	4,64	
Líquido	0,700 a AB	0,500 a B	2,200 a A	1,200 a AB	1,150 A
Semi-sólido	0,100 a A	1,000 a A	0,400 b A	1,500 a A	0,750 A
Média	0,400 a	0,750 a	1,300 a	1,350 a	

Médias seguidas de letras diferentes minúsculas, nas colunas, e maiúsculas, nas linhas, diferem entre si, pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 25. Porcentagem de conversão em plantas por cultura embriogênica de *Anthurium andraeanum* cv. Eidibel, em função da consistência do meio de cultivo e concentração de cinetina, aos 45 dias de cultivo *in vitro*. Viçosa, MG, 2009

Consistência do meio de cultivo	Concentração de cinetina (μM)				Média
	0,0	1,16	2,32	4,64	
Líquido	5,28 a B	0,86 a B	41,18 a A	13,94 a AB	15,32 A
Semi-sólido	0,22 a A	11,02 a A	1,81 b A	20,62 a A	8,42 A
Média	2,75 a	5,94 a	21,50 a	17,28 a	

Médias seguidas de letras diferentes minúsculas, nas colunas, e maiúsculas, nas linhas, diferem entre si, pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para a porcentagem de oxidação das culturas com embriões somáticos, o meio de cultivo semi-sólido (56,89%) foi superior ao meio líquido (40,89%), a 5% de probabilidade. Porém, para o meio Pierik não houve diferença estatística entre os meios

de cultivo líquido (17,47%) e semi-sólido (22,17%), permanecendo valores baixos para essa variável. O meio nutritivo AA2 foi superior estatisticamente, quanto à oxidação, nas consistências líquida (64,31%) e semi-sólida (91,60%), comparando-o ao meio Pierik (Tabela 26).

Para o número de embriões com maturação completa da cultivar Eidibel houve diferença estatística entre os meios nutritivos, no qual o meio Pierik (6,35) foi superior ao AA2 (2,85), a 5% de probabilidade. Enquanto a concentração de 4,64 μM de cinetina (13,20) foi estatisticamente superior ao meio sem fitorregulador (1,70) (Tabela 27).

Tabela 26. Porcentagem de oxidação de *Anthurium andraeanum* cv. Eidibel, em função da consistência e da composição de meio de cultura, aos 45 dias de cultivo *in vitro*. Viçosa, MG, 2009

Consistência do meio de cultivo	Meios nutritivos			Média
	Pierik	AA2		
Líquido	17,47 a B	64,31 b A		40,89 B
Semi-sólido	22,17 a B	91,60 a A		56,89 A
Média	19,82 b	77,96 a		

Médias seguidas de letras diferentes minúsculas, nas colunas, e maiúsculas, nas linhas, diferem entre si, pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 27. Número de embriões com maturação completa de *Anthurium andraeanum* cv. Eidibel, em função do meio nutritivo e da concentração de cinetina, aos 45 dias de cultivo *in vitro*. Viçosa, MG, 2009

Meio nutritivo	Concentração de cinetina (μM)				Média
	0,0	1,16	2,32	4,64	
Pierik	1,70 a B	4,50 a AB	6,00 a AB	13,20 a A	6,35 A
AA2	1,20 a A	1,10 a A	4,70 a A	4,40 b A	2,85 B
Média	1,45 b	2,80 ab	5,35 ab	8,80 a	

Médias seguidas de letras diferentes minúsculas, nas colunas, e maiúsculas, nas linhas, diferem entre si, pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O número de calos embriogênicos com embriões maturados foi superior em meio líquido acrescido 2,32 μM de cinetina (Tabela 24); e no mesmo meio observou-se maior conversão em plantas (Tabela 25). Entretanto, para as duas variáveis, líquido (13,94) e semi-sólido (20,62), o meio acrescido de 4,64 μM de cinetina também demonstrou-se competente na conversão em plantas. Para o número de embriões com maturação completa, o meio Pierik acrescido de 4,64 μM de cinetina (13,20) foi o mais

indicado, ainda que o acréscimo de 2,32 μM (6,00) tenha sido satisfatório (Tabela 27). A oxidação ocorreu com menor frequência em meio Pierik líquido (17,47%) ou semi-sólido (22,17%) (Tabela 26). Diante do que foi exposto, recomenda-se, para a obtenção de embriões somáticos maduros e posterior conversão em plantas, a utilização do meio Pierik semi-sólido acrescido de 2,32 μM de cinetina, no qual, comportou-se com superioridade aos demais tratamentos, principalmente pela melhor conversão em plantas.

5.3.2 Aspectos morfológicos

Para investigar o procedimento de conversão dos embriões somáticos formados e subsequente regeneração em plantas, os tratamentos foram avaliados aos 45 dias de cultivo *in vitro*. Observou-se um desenvolvimento normal dos embriões somáticos em brotos, com posterior formação de planta completa, com parte aérea e radicular, em meio Pierik acrescido de 2,32 μM de cinetina (Fig. 5A). Resultados semelhantes foram observados neste mesmo meio, mas na consistência líquida (Fig. 5C). Entretanto, o desenvolvimento radicular foi maior quando as plantas foram produzidas em meio semi-sólido.

Em muitos casos observou-se a oxidação completa dos embriões somáticos, principalmente em meio AA2, como também, mudanças apenas na coloração, de amarelo para verde escuro, dos calos de embriões somáticos, sem posterior regeneração em plantas (Fig. 5B).

As plantas, regeneradas em meio Pierik acrescido de 2,32 μM de cinetina, foram retiradas do meio de cultura (Fig. 5D), separadas (Fig. 5E) e transplantadas em número de cinco plantas em frascos (Fig. 5F) com tampa, objetivando-se manter o ambiente bastante úmido, permanecendo nessas condições por dois meses. Após esse período, as mudas foram transplantadas individualmente para copos plásticos de 300 cm^3 , conservando o mesmo substrato, e mantidas em casa de vegetação com ventilação forçada, e umidade controlada (Fig. 5G).

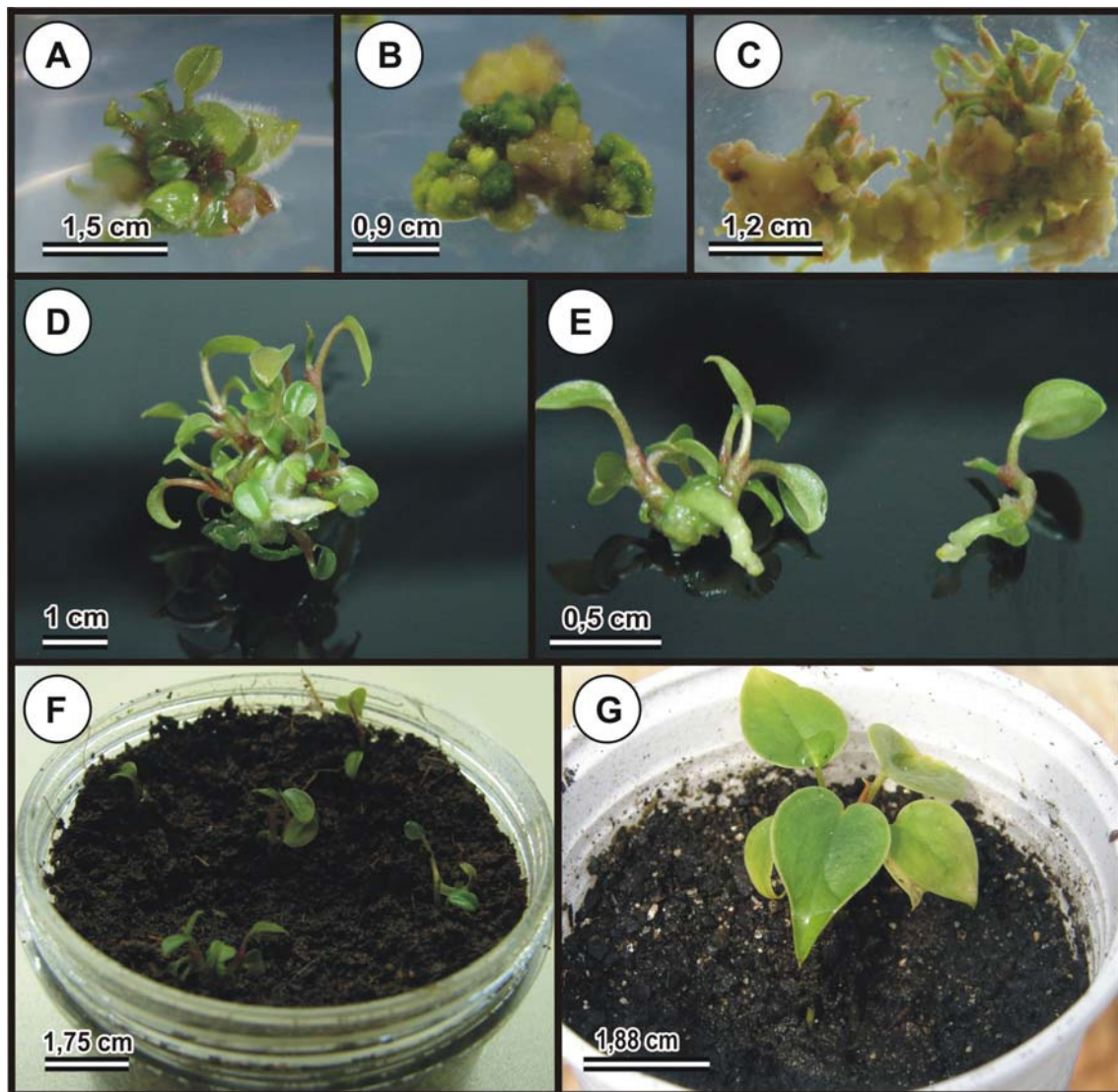


Figura 5. Maturação (A-E) e aclimatização (F-G) de *Anthurium andraeanum* cv. Eidibel a partir de embriões somáticos. (A) Embriões formados em meio semi-sólido Pierik, acrescido de 2,32 μM de cinetina. (B) Embriões em meio semi-sólido Pierik sem fitorregulador. (C) Embriões em meio Pierik líquido, acrescido de 2,32 μM de cinetina. (D e E) Plantas obtidas a partir da conversão de embriões somáticos. (F) Plantas aclimatizadas com luz artificial e temperatura ambiente, aos dois meses. (G) Planta com cinco meses de idade em casa de vegetação.

6. DISCUSSÃO

6.1. Experimento I: Indução de culturas embriogênicas

A indução da embriogênese somática em *Anthurium andraeanum* cv. Eidibel depende de uma série de fatores, entre os quais podem ser citados: o tipo e a concentração dos fitorreguladores auxinas e citocininas, e a fonte de explante. No presente estudo, os explantes de folha inteira, folha seccionada e segmento de raiz não produziram calos embriogênicos, oxidando a partir da quinta semana de cultivo *in vitro*. Entretanto, os explantes de pecíolo e, principalmente, os de segmento nodal, apresentaram-se como os mais responsivos para ‘Eidibel’.

Kuehnle e colaboradores (1992) induziram calos em explantes de folha e pecíolo de um híbrido de *Anthurium andraeanum*. Entretanto, os autores constataram que para o genótipo estudado, a produção de embriões somáticos, em explantes de pecíolo foi inferior, quando comparada ao explante de folha, diferente dos resultados observados para a cultivar Eidibel. Bautista *et al.* (2008), trabalhando com segmentos de folha de *Anthurium andraeanum* Lind. var. Lambada, observaram a presença de calos a partir da quarta semana de cultivo *in vitro*. Resultados semelhantes foram observados por Hamidah *et al.* (1997), no qual, testando três fontes de explantes (folhas, pecíolos e raízes) de *Anthurium scherzerianum*, constataram que explantes de folha foram mais responsivos, quando comparados aos de pecíolo e raiz. Entretanto, os mesmos autores relatam que em explantes de pecíolo, os calos produzidos foram observados em ambas as extremidades, de forma semelhante à verificada nos explantes de pecíolo e segmento nodal (Fig. 2B) da cultivar Eidibel em estudo.

No presente trabalho constatou-se diferenças entre as respostas morfogenéticas nas diferentes fontes testadas de explantes de ‘Eidibel’, em que pecíolo e segmento nodal foram os mais competentes para indução de culturas embriogênicas. Guerra *et al.*

(1998) ressaltam que as respostas às condições de cultivo podem variar quanto à fonte de explante, em função da espécie estudada. Krishnaraj e Vasil (1995) acrescentam que o genótipo é considerado um fator muito importante na resposta, ou seja, no desenvolvimento e na fisiologia dos explantes em cultura de tecidos. Foi o que ressaltou Pierik (1976), quando induziu a formação de calos em explantes de segmentos de folha em 38 genótipos de *Anthurium andraeanum*, destes, 31 apresentaram produção satisfatória de calos, quatro pouca formação de calos e três genótipos não produziram este tipo de estrutura. Portanto, em virtude da genótipo-dependência para as respostas morfogênicas, os procedimentos de propagação *in vitro* não podem ser aplicados para todas as espécies de *Anthurium*.

O presente estudo confirma que a auxina ANA, na concentração de 10,0 μM , foi o fitorregulador mais eficiente para o estabelecimento de calos embriogênicos em segmento nodal de antúrio 'Eidibel'. Entretanto, constatou-se que o uso das auxinas Picloram e 2,4-D também está envolvido na indução e iniciação de culturas embriogênicas neste cultivar. Guerra e colaboradores (1998) descrevem que culturas embriogênicas são geralmente iniciadas a partir do cultivo de explantes em meio semi-sólido, contendo altos níveis de auxinas (ANA, 2,4-D ou Picloram).

Vários estudos têm revelado o papel fundamental da aplicação de auxinas exógenas como indutores da embriogênese, principalmente o 2,4-D. Esta auxina tem sido considerada a mais indicada para a indução de embriogênese somática em antúrios. Kuehnle *et al.* (1992) e Matsumoto e Kuehnle (1996) induziram embriões somáticos nas concentrações de 4,52 a 18,00 μM de 2,4-D e de 1,39 a 4,56 μM de cinetina. Entretanto, Puchooa (2005), em variedades de *Anthurium andraeanum*, obteve maior formação de calos em explantes cultivados em meio de cultura contendo uma combinação 0,45 μM de 2,4-D e 4,44 μM de cinetina. Hamidah *et al.* (1997) testaram as auxinas AIA, AIB, ANA e 2,4-D para induzir embriões somáticos, no entanto, constataram que o meio acrescido com 18 μM de 2,4-D promoveu as maiores taxas de produção de calos embriogênicos. Bautista *et al.* (2008) obtiveram as maiores taxas de indução de calos embriogênicos em meio de cultura acrescido com 6,79 μM de 2,4-D. Krishnaraj e Vasil (1995) relatam que a melhor concentração de 2,4-D para induzir calos embriogênicos fica em torno de 4,52 a 18 μM .

Entretanto, Guerra *et al.* (1998) ressaltam que a manutenção prolongada das culturas embriogênicas em meio com 2,4-D pode induzir variações genéticas e epigenéticas afetando seu potencial embriogênico. Além disso, os autores vêm

observando que os embriões somáticos tornam-se habituados durante períodos prolongados de subcultivos em 2,4-D, resultando na perda de potencial de maturação, e consequentemente, da capacidade da conversão dos embriões em plantas. Cangahuala-Inocente (2007) também observou que a redução da conversão de plantas num sistema de embriogênese somática pode ser atribuída aos efeitos residuais da auxina forte 2,4-D empregada no processo de indução, e, provavelmente, estes efeitos podem ser minimizados com o uso da auxina Picloram.

O Picloram é normalmente a auxina recomendada para induzir e/ou manter calos embriogênicos, embora existam relatos que esta auxina seja mais efetiva e mais forte do que o 2,4-D. Em *Alstroemeria*, também uma monocotiledônea, Lin e colaboradores (2000), utilizando Picloram em meio de cultura, observaram a formação inicial de calos embriogênicos. Steinmacher et. al. (2007) observaram um aumento na indução de culturas embriogênicas em *Bactris gasipaes* quando adicionado Picloram ao meio de cultura. Moura et al. (2008) relatam que a indução de calos embriogênicos em *Acrocomia aculeata* foi mais indicada em meio suplementado com 9 µM de Picloram. Ptak (2010), em *Leucojum vernum* L., obtiveram culturas embriogênicas em meio acrescido com Picloram. No entanto, Hutchinson et al. (1997), em meio acrescido de Picloram, obtiveram calos compactos de *Alstroemeria*, entretanto, quando estes calos foram subcultivados em meio de cultura acrescido com ANA, se tornaram friáveis. Othmani et al. (2009), trabalhando com *Phoenix dactylifera* L., outra monocotiledônea, notaram que o Picloram não induziu calos embriogênicos, mas sim elevada frequência de hiperhidricidade e oxidação dos calos.

Diversos estudos têm demonstrado o efeito promotor de outras auxinas sintéticas, como o Picloram, na indução de embriogênese somática. No presente estudo, a suplementação desta auxina ao meio de cultura, promoveu a formação de culturas embriogênicas. Entretanto, em estudos anatômicos, os embriões somáticos produzidos com esta auxina apresentaram-se em fase inicial de desenvolvimento, quando comparados aos embriões produzidos com as auxinas ANA e 2,4-D, na mesma época de avaliação (Fig. 2E, 2F, 2G). Os embriões somáticos produzidos em meio de cultura suplementado com ANA apresentaram-se mais desenvolvidos, com protoderme bem definida, presença de procâmbio, demonstrando sinais de polarização, favorecendo assim, a conversão de plantas ao final do processo.

A polaridade dos embriões pode ser afetada em função do aumento nos níveis endógenos de auxina, acarretado devido ao aumento dos níveis exógenos aplicados ao

meio de cultura (Fischer & Neuhaus, 1996). Liu *et al.* (1993) acrescentam que o transporte polar, também chamado de transporte unidirecional das auxinas, é essencial para o estabelecimento da polaridade em embriões globulares. Taiz e Zeiger (2009) relatam que o transporte polar de auxinas, tanto naturais quanto sintéticas, afeta vários processos de desenvolvimento, incluindo o desenvolvimento do embrião. Filippi *et al.* (2001) produziram calos embriogênicos, em *Musa* spp., em meio suplementado com 5 e 10 μM de Picloram, porém, os embriões obtidos não foram funcionais, demonstrando que a qualidade dos embriões somáticos formados é essencial para a excelente conversão em plantas.

Alguns autores utilizaram a auxina ANA para a fase inicial da embriogênese somática, como: Nolan *et al.* (2009) que induziram embriogênese somática em explantes transformados de *Medicago truncatula* em meio suplementado com a combinação de 10 μM de ANA e 4,0 μM de BAP; e Aslam *et al.* (2008) que induziram e proliferaram calos de *Catharanthus roseus* na combinação de 6,72 μM de ANA e 5,37 μM de BAP. No presente trabalho, o fitorregulador ANA também se comportou como a auxina sintética mais indicada na indução e proliferação de calos embriogênicos de *Anthurium andraeanum* cv. Eidibel.

O genótipo, o explante, a fase de crescimento, o tipo e a concentração dos fitorreguladores exógenos tiveram efeitos marcantes na aquisição de competência embriogênica de *Acca sellowiana* (Guerra *et al.*, 2001). O presente estudo corrobora essa informação, demonstrando que na espécie estudada, a fonte de explante, a concentração e o tipo de fitorregulador podem ser primordiais para a indução de culturas embriogênicas.

Nos segmentos nodais de antúrio cv. Eidibel houve a proliferação de brotos a partir das gemas axilares pré-existentes, sem a necessidade da adição de auxina. Santos-Serejo *et al.* (2006a) relatam que quando o explante é cultivado em meio basal sem fitorregulador ocorre o desenvolvimento de uma única planta, em decorrência do efeito da dominância apical.

A proliferação de raízes da cultivar Eidibel foi obtida em explantes de segmento nodal e segmentos radiculares nas maiores concentrações de AIB. O enraizamento parece estar geralmente relacionado com o suprimento adequado de auxinas. Taiz e Zeiger (2009) relatam que embora o alongamento da raiz primária seja inibido por concentrações de auxinas maiores que 10^{-8}M , a iniciação de raízes laterais (ramificadas) e raízes adventícias é estimulada por altos níveis de auxinas. Ou seja, o tipo de auxina e

a concentração utilizada influenciam diretamente a resposta à rizogênese. Diversas auxinas podem ser utilizadas, isoladamente ou em combinação, para o enraizamento, e as mais empregadas são AIB, AIA e ANA. As demais auxinas podem induzir a formação de calos (Santos-Serejo *et al.*, 2006a). Grattapaglia e Machado (1998) confirmam que o 2,4-D, mesmo em baixas concentrações, estimulam a formação de calos, enquanto que o AIB é uma auxina muito eficaz para o enraizamento. A auxina ANA é bastante utilizada em meios de isolamento, no entanto, se adicionado em concentrações acima de alguns décimos de miligrama, tende a estimular a formação de calos, resultado observado na cultivar Eidibel.

No presente estudo, o aumento gradativo de AIB resultou em maior proliferação de raízes em segmentos de raiz de antúrio cv. Eidibel, corroborando tais informações.

6.2. Experimento II: Pré-maturação dos embriões somáticos

A pré-maturação dos embriões somáticos de *Anthurium andraeanum* cv. Eidibel depende de vários fatores, entre os quais: meios nutritivos e as concentrações de 2,4-D e cinetina.

A produção de embriões somáticos por culturas embriogênicas foi superior em meio de cultura Pierik acrescido de 0,47 μM de cinetina. Observou-se também menor produção de embriogênese somática secundária, demonstrando a competência na pré-maturação dos embriões, e não em induzir culturas embriogênicas, além da baixa porcentagem de oxidação dos explantes. Para os testes não-paramétricos de textura e desenvolvimento embrionário constataram-se embriões pré-maturados com textura friável, e desenvolvimento embrionário superior aos demais tratamentos, com exceção dos meios AA2 sem regulador e AA2 com 0,47 μM de cinetina (Fig. 3C).

Os parâmetros coloração e textura têm sido utilizados com indicativos de material vegetal com capacidade regenerativa. Ou seja, as culturas embriogênicas produzidas no experimento de indução, tinham a mesma coloração e textura dos calos observados no meio acrescido com 9,05 μM de 2,4-D para a pré-maturação. Comprovando os valores encontrados para a produção de embriogênese somática secundária, no determinado meio. Rai *et al.* (2007) observaram em *Psidium guajava*, nas concentrações de 4,52 e 9,05 μM de 2,4-D, um aumento na indução de calos embriogênicos. Winkelmann *et al.* (2006), em *Cyclamen persicum* Mill., induziram

embriões somáticos em meio suplementando com 9,05 μM de 2,4-D e 3,94 μM de isopenteniladenina (2iP).

Para a produção de embriões somáticos por culturas embriogênicas, Sané *et al.* (2006), em *Phoenix dactylifera* e Moura *et al.* (2008) em *Acrocomia aculeata*, utilizaram meio sem fitorregulador. No entanto, Bautista *et al.* (2008) observaram valores elevados de embriões somáticos pré-maturados em meio contendo 4,44 μM de BAP, na cultura do *Anthurium andraeanum* Lindl. Fujimura e Komamine (1980) e Tan *et al.* (2001) demonstraram que as citocininas são responsáveis pelo desenvolvimento de embriões somáticos. Foi o que demonstraram Kumari *et al.* (1999), trabalhando com *Hevea brasiliensis* (Muell.), onde observaram o máximo de embriões somáticos em desenvolvimento em meio de cultivo suplementado com 3,23 μM de cinetina e 1,07 μM de ANA. George (1993) relata que as citocininas promovem o crescimento dos embriões pré-formados quando são adicionados ao meio de cultivo para formação ou pré-maturação de embriões somáticos. No presente estudo, a menor concentração de citocinina, 0,47 μM de cinetina, foi superior aos demais tratamentos, demonstrando maior potencial morfogênético devido à textura friável e ao desenvolvimento embrionário superior.

A principal diferença entre os meios de cultura Pierik e AA2 é a fonte de nitrogênio. O meio Pierik, muito utilizado para *Anthurium*, possui composição modificada do MS (Murashige & Skoog, 1962), e a fonte de nitrogênio é inorgânica. No entanto, para o meio AA2, muito utilizado para embriogênese somática na cultura do arroz, a fonte de nitrogênio é orgânica (Tabela 1). Utilizou-se o meio AA2 modificado, com 300 mg L⁻¹ de L-glutamina. Pois, segundo Aslam *et al.* (2008), nas culturas de *Catharanthus roseus* L. (G.) Don, houve aumento de oxidação quando adicionado ao meio de cultura a concentração de 500 mg L⁻¹ de L-glutamina, sendo 300 mg L⁻¹ ideal para pré-maturação. No presente estudo a redução de L-glutamina no meio AA2 foi positiva, pois não foram encontradas elevadas taxas de oxidações. No entanto, em meio Pierik constatou-se os melhores resultados para a maturação dos embriões somáticos.

6.3. Experimento III: Maturação dos embriões somáticos e regeneração de plantas

Teng (1997) relata que o meio líquido pode impedir a formação de calos em *Anthurium*. Entretanto, existem poucos relatos na literatura referentes à regeneração de

plantas de antúrio em meio líquido, por ser mais usual a utilização de meio semi-sólido tanto para a produção de calos quanto para a regeneração de brotos. No entanto, em *Anthurium*, Pierik (1975) utilizou o meio líquido para a proliferação de calos e Teng (1997), propagando brotos em meio líquido e semi-sólido, observou que não houve diferença entre os meios. No presente estudo, o meio líquido também não diferiu do meio semi-sólido, no entanto, constatou-se conversão mais efetiva em plantas de antúrio ‘Eidibel’ no meio semi-sólido.

Os meios de cultura podem ser modificados e adequados de acordo com a necessidade de cada espécie (Souza *et al.*, 2006). A principal diferença entre os meios de cultura Pierik e AA2 é a fonte de nitrogênio. O meio Pierik, muito utilizado para *Anthurium*, possui composição similar ao MS. No entanto, as concentrações dos cinco macronutrientes são reduzidas à metade e a fonte de nitrogênio inorgânico; diferente do meio AA2, pois a fonte de nitrogênio é orgânica (Tabela 1). Guerra *et al.* (1998) relatam que a adição de aminoácidos favorece a produção de maior número de embriões somáticos e com melhor desenvolvimento, quando comparado com meio suplementado com o íon amônio.

No presente estudo, utilizou-se o meio AA2 modificado, com 300 mg L⁻¹ de L-glutamina, pois, segundo Aslam *et al.* (2008), nas culturas de *Catharanthus roseus* L. (G.) Don, observaram aumento de oxidação na concentração de 500 mg L⁻¹ de L-glutamina, sendo 300 mg L⁻¹ ideal para pré-maturação e 100 mg L⁻¹ para maturação das culturas embriogênicas. No presente estudo, constatou-se a necessidade de reduzir ainda mais a concentração de L-glutamina ao meio AA2, pois houve maior oxidação no referido meio, quando comparado ao meio Pierik. Dessa forma, faz-se necessário a obtenção de novas investigações para a melhor formulação do meio AA2 para a fase de maturação e conversão de plantas de *Anthurium andraeanum* cv. Eidibel.

Autores, como Rai *et al.* (2007) em cultivar de *Psidium guajava*, Moura *et al.* (2008) em *Acrocomia aculeata*, Nolan *et al.* (2009) em *Medicago truncatula* e Othmani *et al.* (2009) em *Phoenix dactylifera* induziram a maturação dos embriões somáticos produzidos em meio de cultura sem a adição de fitorregulador. No entanto, muitos autores trabalhando com *Anthurium* na fase de maturação de culturas embriogênicas, utilizaram a citocinina BAP (6-benzilaminopurina). Caldas e colaboradores (1998) relatam que o BAP é um fitorregulador que induz a formação de elevado número de brotações, e alta taxa de multiplicação, porém, induz o desenvolvimento concomitante de calos, enquanto a cinetina permite apenas o crescimento normal sem brotações

múltiplas. Geier (1986) trabalhando com *Anthurium scherzerianum*, induziu a proliferação de brotos nas concentrações de 0,88 a 2,22 μM de BAP, demonstrando ser mais efetivos do que cinetina na concentração de 2,32 μM e 2iP a 2,46 μM . Entretanto, a capacidade de enraizamento dos brotos formados em BAP decresceu progressivamente. Santos-Serejo *et al.* (2006) acrescentam que a concentração da citocinina utilizada deve induzir uma taxa de proliferação aceitável sem causar o amarelecimento ou malformação dos brotos, o que pode ser indesejável do ponto de vista da integridade clonal. Dessa forma, para evitar a regeneração dos embriões em plantas anormais, como também, a variação somaclonal das mudas produzidas de antúrio cv. Eidibel, utilizou-se a cinetina.

Bautista *et al.* (2008) observaram um elevado número de embriões somáticos maduros em meio de cultura acrescido de 1,78 μM de BAP, para a maturação dos embriões somáticos de *Anthurium andraeanum* Lindl. Porém, encontraram um aumento na produção de calos em meio suplementado com 2,66 μM de BAP. Kuehnle *et al.* (1992) observaram resultados parecidos em híbridos de *Anthurium andraeanum*, porém, na concentração de 0,89 μM de BAP. Entretanto, Hamidah *et al.* (1997), trabalhando com *Anthurium scherzerianum*, obtiveram a maturação de embriões somáticos e conversão em plantas, em meio suplementado com 0,47 μM de cinetina. No presente estudo, constatou-se que o meio Pierik semi-sólido suplementado com 2,32 μM de cinetina foi o mais indicado para o número de culturas embriogênicas com embriões maduros, número de embriões maduros e conversão em plantas de *Anthurium andraeanum* cv. Eidibel.

7. CONCLUSÃO

A realização deste trabalho possibilitou a obtenção de resultados importantes e inéditos sobre a embriogênese somática em *Anthurium andraeanum* cv. Eidibel.

A indução de embriogênese somática em *A. andraeanum* é genótipo dependente, comparando-se com relatos da literatura. Para a cultivar Eidibel, o tipo de explante é determinante na obtenção de culturas embriogênicas, sendo o segmento nodal o melhor explante para esse processo. O meio Pierik acrescido de 10,0 μM ANA promoveu a formação de culturas embriogênicas com melhor estágio de desenvolvimento dos embriões somáticos.

O meio nutritivo favorece a pré-maturação dos embriões somáticos de antúrio cv. Eidibel. A utilização de meio Pierik acrescido de 0,47 μM de cinetina favoreceu a produção de embriões somáticos com textura e desenvolvimento embrionário satisfatórios.

O meio de cultivo líquido favorece a maturação dos embriões somáticos da cultivar Eidibel. No entanto, a porcentagem de conversão em plantas foi favorecida pelo estágio semi-sólido do meio, no qual foram produzidas plantas completas. Dessa forma, para a fase de maturação dos embriões somáticos e conversão em plantas sugere-se o meio Pierik semi-sólido suplementado com 2,32 μM de cinetina, ou seja, a concentração que melhor desenvolveu estes embriões.

De posse disso, o procedimento em questão abre novas possibilidades para a transformação genética de plantas; preservação de germoplasma, por criopreservação; integração de técnicas associadas à tecnologia de sementes sintéticas; além da rápida propagação de plantas de *Anthurium andraeanum* cv. Eidibel, devido ao eficiente protocolo de embriogênese somática desenvolvido aqui para esta cultivar. Além disso, esse estudo fornece valiosas informações que podem ser utilizadas no futuro para melhorar a propagação *in vitro* da espécie produzida no Brasil, favorecendo a produção de mudas para produtores de antúrio em todas as regiões do País.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDULLAH, R.; COCKING, E. C.; THOMPSON, J. A. Efficient plant regeneration from rice protoplasts through somatic embryogenesis. **Bio Technology**, v. 4, p. 1087–1090, 1986.
- AFONSO, J. P. Production and marketing of *Anthurium* on the Canary Islands. **Acta Horticulturae**, v. 43, p. 275- 282, 1974.
- AMMIRATO, P. V. Organization events during somatic embryogenesis. In: LISS, A. R. (Ed.). **Plant tissue and cell culture**. New York. 1987. p. 57-81.
- 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. (Eds.). **Agricultura Tropical: Quatro décadas de inovações tecnológicas, institucionais e políticas**. Brasília, DF: Embrapa Informações Tecnológicas, 2008, p. 881-904.
- BAUTISTA, N. R. del; 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’. **Ra Ximhai: Revista Científica de Sociedad, Cultura y Desarrollo Sostenible**, v. 4, n. 1, p. 135-159, 2008.
- BORGES, N. S. S. **Respostas morfo genéticas em tomateiro e mamoeiro cultivado *in vitro***. 2002. 98 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.
- CABRAL, J. B. Controle de produção industrial de plantas *in vitro*. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 10, n. 1/2, p. 22-23, 2004.
- CALDARI JUNIOR, P. Técnicas de cultivo do antúrio. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 10, n. 1/2, p. 40-44, 2004.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa-CNPq, 1998. cap. 5, p. 87-132.
- CANGAHUALA-INOCENTE, G. C. **Caracterização morfofisiológica, bioquímica e proteômica da embriogênese zigótica e somática de goiabeira serrana (*Acca sellowiana* (O. Berg.) Burret)**. 2007. 256 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

CARGNELUTTI FILHO, A.; STORCK, L.; LÚCIO, A. D.; LOPES, S. J. **Testes não-paramétricos para pesquisas agrícolas**. Santa Maria: UFSM/CCR/Departamento de Fitotecnia, 2001. 87p.

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, n. 1/2, p. 6-9, 2004.

CENTENO, A. J. **Curso de estatística aplicada à biologia**. Goiânia: Centro Editorial e Gráfico/UFG, 1990. 188p.

COSTA, M. A. P. C.; SOUZA A. S.; ALMEIDA, W. A. B. Morfogênese *in vitro*. In: SOUZA, A. S. da; JUNGHANS, T. G. (Eds.). **Introdução à Micropropagação de Plantas**. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006, p. 141-153.

CUQUEL, F. L.; GROSSI, M. L. Produção de antúrio no litoral do Estado do Paraná. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 10, n. 1/2, p. 35-37, 2004.

DURZAN, D. J. Process control in somatic polyembryogenesis. In: HALLGREN, J. E. (Ed). **Frans Symposium Department of Forest Genetics and Plant Physiology**, Swedish. Proceedings... Swedish: University of Agricultural Sciences, v. 8, p. 147-186, 1988.

FERREIRA, D. F. **Sisvar 5.0**. 2003. Disponível em: <<http://www.dex.ufla.br/~danielff/software.htm>>, [acesso em: 18 de setembro de 2009].

FILIPPI, S. B.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; PINHEIRO, A.; RODRIGUEZ A. P. M. Histological changes in banana explants, cv. Nanicão (*Musa* spp. Group AAA), submitted to different auxins for somatic embryogenesis induction. **Revista Brasileira de Botânica**. v. 24, n. 4 (suplemento) p. 595-602, 2001.

FISCHER, C.; NEUHAUS, G. Influence of auxin on the establishment of bilateral symmetry in monocots. **The Plant Journal**. v. 9 p. 659-669, 1996.

Flora Culture International 2008. Disponível em: <<http://www.floracultureinternational.com/digizine/jan08/magazine.html>>. Acesso em: 15 de abril de 2009.

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 2009.

FUJIMURA, T.; KOMAMINE, A. The serial observation of embryogenesis in a carrot cell suspension culture. **New Phytologist**., v. 86, p. 213-218, 1980.

FUZITANI, E. J.; NOMURA, E. S. Produção de mudas *in vitro*. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 10, n. 1/2, p. 14-17, 2004.

GEIER, T. Factors affecting plant regeneration from leaf segments of *Anthurium andraeanum* Schott (Araceae) cultured in vitro. **Plant Cell, Tissue Organ Culture**. v. 6, p. 115-125, 1986.

GEORGE, E. F. **Plant Propagation by Tissue Culture: The Technology**. 2 ed. Edington: Exergetics, 1993. 574p.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. D. **Plant Propagation by Tissue Culture**. Netherlands. 2008. 508p.

GUERRA, M. P.; DAL VESCO, L. L.; DUCROQUET, J. P. H.; NODARI, R. O.; REIS, M. S. Somatic embryogenesis in *Feijoa sellowiana*: genotype response, auxinic shock and synthetic seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13, p. 117 – 128, 2001.

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese Somática e Sementes Sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília, Embrapa-CBAB. 1998. v. 2. p. 533-568.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI: Embrapa-CNPq, 1998. v. 1, p. 183-260.

GRAZIANO, T. T. **Melhoramento de plantas ornamentais**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 2, 2003, Porto Seguro. Mesa Redonda 3. Porto Seguro: Sociedade Brasileira de Genética, 2003.

HAMIDAH, M.; KARIN, A. G. A.; DEBERGH, P. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Anthurium scherzerianum*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 48, n. 3, p. 189-193, 1997.

HUTCHINSON, M. J.; SENARATNA, T.; TSUJITA, J. M.; SAXENA, P. K. Somatic embryogenesis in liquid cultures of a tetraploid *Alstroemeria*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 47, p. 293–297, 1997.

JENSEN, W. A. **Botanical histochemistry: principles and practice**. San Francisco: WH Freeman, 1962. 408p.

JUNGHANS, T. G.; SANTOS-SEREJO, J. A. Obtenção e Manuseio de Explantes. In: SOUZA, A. S.; JUNGHANS, T. G. (Eds.). **Introdução à Micropropagação de Plantas**. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006, p. 141-153.

JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, M. S. Exportações de flores e plantas ornamentais superam US\$ 35 milhões em 2007: recorde e novos desafios para o Brasil. **Horticultura Consultoria e Treinamento**, 2008. 8 p.

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

KUMARI, J. P.; ASOKAN, P. M.; SOBHA, S.; SANKARI, A. L.; REKHA, K.; KALA, G. R. JAYASREE, R.; THULASEEDHARAN, A. Somatic Embryogenesis and plant regeneration from immature anthers of *Hevea brasiliensis* (Muell.). **Current Science**, v. 76, p. 1242-1245, 1999.

KUNISAKI, J. T. In vitro propagation of *Anthurium andraeanum* Lind. **HortScience**. v. 15, p. 508-509, 1980.

KRISHNARAJ, S.; VASIL, I. K. Somatic Embryogenesis in Herbaceous Monocots. In: THORPE T. A. (Ed.). **In vitro embryogenesis in plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Press, 1995. p. 155-203.

KYUNA, I.; ÂNGELO, J. A.; COELHO, P. J. Floricultura: desempenho do comércio exterior em 2006. **Análises e Indicadores do Agronegócio**, v. 3, n. 2, 2007. Disponível em: <<http://www.iea.sp.gov.br/OUT/verTexto.php?codTexto=8748>>. Acesso em: 15 de abril de 2009.

LAMAS, A. M. **Floricultura tropical** - Técnicas de cultivo. Recife: SEBRAE/PE, 2002. 87 p.

LAWS, N.; GALINSKY, B. Anthurium world market survey. **FloraCulture International**, p.21-23, june, 1996.

LEDO, C. A. S.; FARIA, G. A. Experimentação em Cultura de Tecidos. In: SOUZA, A. S.; JUNGHANS, T. G. (Eds.). **Introdução à Micropropagação de Plantas**. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006, p. 141-153.

LEME, J. M.; HONÓRIO, S. L. Padronização e qualidade de antúrio. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 10, n. 1/2, p. 48-50, 2004.

LEME, J. M. **Resfriamento e conservação de antúrio 'IAC Eidibel'**. 2004. 119 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

LIN, H. S.; van der TOORN, C.; RAEMAKERS, K. J. J. M.; VISSER, R. G. F.; DE JEU, M. J.; JACOBSEN, E. Development of a plant regeneration system based on friable embryogenic callus in the ornamental *Alstroemeria*. **Plant Cell Reports**, v. 19, n. 5, p. 529-534, 2000.

LIU, C. M.; XU, Z. H.; CHUA, N. H. Auxin polar transport is essential for the establishment of bilateral symmetry during early plant embryogenesis. **Plant Cell**. v. 5 p. 621-630, 1993.

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

MERKLE S. A.; PARROTT W. R.; FLINN B. S. Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. In: THORPE T. A. (Ed.). **In vitro Embryogenesis in Plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Press, 1995. p. 155-203.

MOURA, E. F.; VENTRELLA, M. C.; MOTOIKE, S. Y.; SÁ JUNIOR, A. Q. de; 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, n. 2, p. 175-184, 2008.

MURASHIGE, T. SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 25, n. 3, p. 473-497, 1962.

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, n. 6, p. 1759-1771, 2009.

NOMURA, K.; KOMAMINE, A. Physiological and Biochemical Aspects of Somatic Embryogenesis. In: THORPE, T. A. (Ed.). **In vitro Embryogenesis in Plants**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers. 1995. p. 249-265.

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

OTHMANI, A.; BAYOUDH, C.; DRIRA, N.; MARRAKCHI, M.; TRIFI, M. Somatic embryogenesis and plant regeneration in date palm *Phœnix dactylifera* L., cv. Boufeggous is significantly improved by fine chopping and partial desiccation of embryogenic callus. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 97, n. 1, p. 71-79, 2009.

PASQUAL, M.; CHALFUN, N. N. J.; RAMOS, J. D. **Aplicações na propagação de plantas**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 81p.

PERES, L. E. P. Bases fisiológicas e genéticas da regeneração de plantas *in vitro*. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 25, p. 44-48, mar./abr. 2002.

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

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

PIERIK, R. L. M. **In vitro culture of higher plants**. Netherlands: Martinus Nijhoff Published, 1987. 582 p.

PIERIK, R. L. M.; LEEUWEN, P. V.; RIGTER, G. C. M. Regeneration of leaf explants of *Anthurium andraeanum* Lindl. *in vitro*. **Netherlands Journal of Agricultural Science**, v. 27, p. 221-226, 1979.

PIMENTEL GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. 11 ed. Piracicaba: ESALQ. 1985. 467p.

PTAK, A. Somatic Embryogenesis in In Vitro Culture of *Leucojum vernum* L. **Methods in Molecular Biology**. v. 589, p. 223-233, 2010.

PUCHOOA, D. In vitro mutation breeding of *Anthurium* by gamma radiation. **International Journal of Agriculture & Biology**, v. 7, n. 1, p. 11-20, 2005.

RAI, M. K.; AKHTAR, N.; JAISWAL, V. S. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Psidium guajava* L. cv. Banarasi local. **Scientia Horticulturae**, v. 113, p. 129-133, 2007.

ROCHA, L. B. **A produção de flores no estado do Ceará em Baturité, Redenção e São Benedito**. 2006. 143 f. Dissertação (Mestrado em Geografia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

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.

SANTOS-SEREJO, J. A.; JUNGHANS, T. G.; SOARES, T. L.; SILVA, K. M. da. Meios Nutritivos para Micropropagação de Plantas. In: SOUZA, A. S.; JUNGHANS, T. G. (Eds.). **Introdução à Micropropagação de Plantas**. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006a, p. 141-153.

SANTOS-SEREJO, J. A.; SOUZA, A. S.; MORAIS, L. S.; SOARES, T. L.; SOUZA, F. V. D.; KOBAYASHI, A. K.; FERREIRA, C. F.; SILVA, S. O. **Biotecnologia: algo mais que plantas transgênicas**. In: XVII Reunião Internacional ACORBAT, 2006, Joinville. Anais da XVII Reunião Internacional ACORBAT - Bananicultura: um negócio sustentável, 2006b. v. 01. p. 10-23.

SCHNEIDER, P. R. **Análise de regressão aplicada à Engenharia Florestal**. Santa Maria: UFSM, CEPEF, 1998. 236p.

SOUZA, A. S.; JUNGHANS, T. G. **Introdução à micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. 152p.

SOUZA, F. V. D.; COSTA, M. A. P. C.; SILVA NETO, H. P. da. Aclimatização. In: SOUZA, A. S.; JUNGHANS, T. G. (Eds.). **Introdução à Micropropagação de Plantas**. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006, p. 141-153.

SOUZA, F. V. D.; JUNGHANS, T. G.; SOUZA A. S.; SANTOS-SEREJO, J. A.; COSTA, M. A. P. C. Micropropagação. In: SOUZA, A. S.; JUNGHANS, T. G. (Eds.). **Introdução à Micropropagação de Plantas**. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006, p. 141-153.

SRIVASTAVA, L. **Plant Growth and Development: Hormones and Environment**. New York: Academic Press, 2002. 772p.

STEINMACHER, D. A.; KROHN N. G.; DANTAS, A. C. M.; STEFENON V. M.; CLEMENT, C. R.; GUERRA, M. P. Somatic embryogenesis in peach palm using the thin cell layer technique: induction, morpho-histological aspects and AFLP analysis of somaclonal variation. **Annals of Botany**, v. 100, p. 699-709, 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2009. 848p.

TAN, N. D.; VAN, L. B.; THANH, V. T. Manipulation of the morphogenetic pathways of *Lilium longiflorum* transverse thin cell layer explants by auxin and cytokinin. **In Vitro Cellular Development Biology-Plant**, v. 37, p. 44-49, 2001.

TE-CHATO, S.; SUSANON, T.; SONTIKUN, Y. Cultivar, explant type and culture medium influencing embryogenesis and organogenesis in *Anthurium* spp. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**. v. 28, n. 4, p. 717-722, 2006.

TENG, W.L. Regeneration of *Anthurium* adventitious shoots using liquid or raft culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 49, p. 153-156, 1997.

TERAO, D.; CARVALHO, A. C. P. P.; BARROSO, T. C. S. F. **Flores Tropicais (Tropical flowers)**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. 225p.

TITON, M.; XAVIER, A. OTONI, W. C.; MOTOIKE, S. Y. Efeito dos reguladores de crescimento dicamba e picloram na embriogênese somática em *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, v. 31, n. 3, p. 471-426, 2007.

TOMBOLATO, A. F. C. **Cultivo Comercial de Plantas Ornamentais**. Campinas: Instituto Agrônomo, 2004. 211p.

TOMBOLATO, A. F. C. **Seleção de variedades de antúrio (*Anthurium andraeanum* Lindl.) para flor de corte no Instituto Agrônomo**. s/d. Disponível em: <http://www.portaldoagrovvt.com.br/agro/seminario_internacional_de_cultivo_protegido/mg_anturio.pdf> acesso em: 21 abr. 2009.

TOMBOLATO, A. F. C.; COSTA, A. M. M. **Micropropagação de plantas ornamentais**. Campinas: Instituto Agrônomo, 1998, 72p. (Boletim Técnico, 174).

TOMBOLATO, A. F. C.; QUIRINO, E. A. Multiplicação *in vitro* de novas variedades de *Anthurium andraeanum* Lindl. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 2, n. 1, p. 37-46, 1996.

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, n. 1/2, p. 1-5, 2004.

YEUNG, E. C. Structural and developmental patterns in somatic embryogenesis. In: THORPE, T. A. (Ed.). **In vitro Embryogenesis in Plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995. p. 205-247.

ZIMMERMAN, J. L. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. **Plant Cell**, v. 5, p. 1411-1423, 1993.

WINKELMANN, T.; HEINTZ, D.; DORSSELAER, A. van; SEREK, M.; BRAUN H. P. Proteomic analyses of somatic and zygotic embryos of *Cyclamen persicum* Mill. reveal new insights into seed and germination physiology. **Planta**, v. 224, p. 508-519, 2006.