

Micropropagação via organogênese e indução de calos embriogênicos em *Anthurium plowmanii* e *Anthurium maricense*.

Maria Valnice de Souza Silveira¹, Fernanda Schneider¹, Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho²

¹Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira. Redenção, CE, Brasil. E-mail: valnicesilveira@gmail.com; fernanda.schneider@unilab.edu.br. ²Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, Brasil. E-mail: cristina.carvalho@embrapa.br.

Resumo

Objetivou-se avaliar a multiplicação via organogênese, de segmentos nodais *in vitro* de *A. plowmanii*, através de diferentes concentrações BAP e indução de calos embriogênicos em explantes de pecíolo e segmento nodal de *A. maricense* e *A. plowmanii* submetidos a concentrações de ANA. O delineamento experimental de organogênese e embriogênese foi o inteiramente casualizados. Para a organogênese utilizaram-se 6 concentrações de BAP: 0; 1,11; 2,22; 3,33; 4,44 e 5,55 μM , em 5 repetições, sendo cada unidade experimental constituída por seis tubos de ensaio contendo um segmento nodal/tubo. Já em embriogênese somática, o arranjo fatorial utilizado foi 2 x 2 x 5: duas espécies de antúrio (*A. plowmanii* e *A. maricense*); dois tipos de explante (segmento nodal e segmento de pecíolo) e cinco concentrações de ANA, (0; 5; 10; 15 e 20 μM) com cinco repetições, e cada unidade experimental constituída por cinco tubos de ensaio contendo um segmento/tubo. A quantidade adequada de BAP para o incremento na taxa de multiplicação *in vitro* de mudas em *A. plowmanii* é 3,33 μM . Para obtenção massiva de calos nas duas espécies nativas, o explante de segmento nodal é mais responsivo, desde que seja suplementado com o regulador de crescimento ANA, com pelo menos 5 μM .

Palavras-chave: cultura de tecidos; Araceae; multiplicação; espécies ornamentais

Micropropagation via organogenesis and induction of embryogenic callus in

Anthurium plowmanii and *Anthurium maricense*.

Abstract

The objectives of this study were to evaluate the *in vitro* multiplication rate of *Anthurium plowmanii* nodal segments of via organogenesis and somatic embryogenesis calli induction of *A. maricense* and *A. plowmanii* petiole and nodal segments explants. The experimental design of both experiments, organogenesis and embryogenesis, were completely randomized. For organogenesis, six BAP concentrations were used: 0; 1.11; 2.22; 3.33; 4.44 and 5.55 μM , in 5 replications, each experimental unit consisted of six test tubes containing a nodal segment/tube. For embryogenesis, factorial arrangement used was 2 x 2 x 5: two species of anthurium (*A. plowmanii* and *A. maricense*); two explants types (nodal segment and petiole segment) and five ANA concentrations (0; 5; 10; 15 and 20 μM) with five replications, each experimental unit consisted of five test tubes containing one explant/tube. For *A. plowmanii* *in vitro* multiplication the adequate amount of BAP is 3.33 μM . Massive calli were induced, in both native species, in nodal segment explant supplemented with at least 5 μM of ANA.

Keyword: tissue culture; Araceae; multiplication; ornamental species

INTRODUÇÃO

O gênero *Anthurium* Schott é o mais diverso da família Araceae, incluindo aproximadamente 2000 espécies (Boyce & Croat, 2018). O antúrio ocupa a segunda colocação em planta tropical mais comercializada no mundo, seguido apenas das orquídeas (Silva et al., 2015). O *A. andraeanum* é a principal espécie do gênero e tem se difundido comercialmente em todo Brasil (Tombolato & Costa, 1998).

No *Anthurium* spp, além das flores, a folhagem também é bastante apreciada comercialmente, pelo contraste das nervuras, pelo efeito, formato e cor de suas folhas que podem variar de verde claro a verde escuro, suave ou aveludado, além da alta durabilidade. O *A. plowmanii* e *A. maricense* Nadrus & Mayo são duas espécies nativas brasileiras (Coelho & Mayo, 2000), ambas com capacidades desejáveis para serem usadas na ornamentação, para folhagem de corte, para paisagismo e para vaso (Castro et al., 2010; Morais et al., 2017; Guimarães et al., 2019).

A propagação convencional do *A. plowmanii* e *A. maricense* via assexuada (divisão de touceiras/rebentos, estacas) e por sementes (sexuada) são métodos utilizados, porém, encontra-se em desvantagem para a produção em larga escala de antúrio para folhagem devido ao longo tempo para obtenção de novas mudas, a grande possibilidade de disseminação de pragas e doenças, e a impossibilidade de produção de um grande número de mudas em um curto espaço de tempo (Silva et al, 2019), além da baixa viabilidade e geração de variabilidade (Murillo-Gómez et al., 2014). Sendo assim, a micropropagação tem se constituído o método mais indicado para a propagação e reprodução dessa espécie tropical, por ser uma técnica viável para a produção de grande quantidade e alta qualidade fitossanitária de mudas idênticas à planta matriz, livres de pragas e doenças, bem como uniformes (Silva et al., 2015).

No Brasil, o primeiro registro da aplicação da cultura de tecidos em *Anthurium* é o de Castro et al. (1986). Em parâmetros mundiais, a primeira espécie do gênero a ser micropropagada foi o *A. andraeanum* por Pierik et al., (1974) por meio da organogênese indireta de explantes foliares, com indução de calos e regeneração de brotos adventícios, porém este método é considerado desvantajoso devido à baixa taxa de multiplicação e devido à ameaça de variação somaclonal (Bautista et al., 2008; Pinheiro et al., 2009).

Como alternativa, vem sendo utilizado a organogênese por explantes oriundos de segmentos nodais (Campos et al., 2018) isolados da planta mãe por incremento de reguladores de crescimento citocinina acrescentado ao meio nutritivo (Santos-Serejo et al.,

2006) que tem como vantagem o aumento da taxa de multiplicação *in vitro* de antúrio e redução do aparecimento de variações fenotípicas. Entre as citocininas mais utilizadas, estão: 1-fenil-3-(1,2,3-tiadiazol-5-il) uréia (TDZ), 6-furfurilaminopurina (CIN), isopenteniladenina (2iP), além de 6-benzilaminopurina (BAP) e N6-(4-hidroxi-3-metilbut-2-enil) aminopurina (ZEA) indicado para multiplicação de *A. maricense* (Serafim et al., 2018; Campos et al., 2018).

A escolha do tipo de citocinina e suas concentrações tem sido um dos fatores mais importantes no sucesso da multiplicação de explantes cultivados *in vitro* de espécies do gênero *Anthurium*. Vale destacar que a taxa de multiplicação de antúrio se dá principalmente em função da interação da espécie (genótipo/variedade) e da concentração de citocinina (Campos et al. 2018).

A embriogênese somática é uma outra rota metabólica utilizada, em antúrio, para a produção *in vitro* de mudas induzida por acréscimo de auxina ao meio de cultura, sendo o ácido naftalenoacético (ANA) um dos mais utilizados, (Melo et al., 2019). É uma das principais técnicas da micropropagação, e que permite a produção vegetativa com alta taxa de multiplicação, redução de mão de obra, possibilitando diminuir significativamente o custo por unidade produzida. O método também é útil para produção de sementes sintéticas e com isso, conservar o material em bancos de genes (Zimmermann, 2010).

A micropropagação de *Anthurium* spp. ocorre por meio de explantes oriundos de mudas, gemas axilares, ápice caulinar (meristema), lâmina foliar, nó e pecíolo, espata e espádice. No entanto, para a indução de calos embriogênicos, a fonte de explante oriunda do seccionamento de folhas (Bautista et al. 2008) e segmento nodal (Pinheiro, 2010; Pinheiro et al., 2014; Pinheiro, 2014; Melo et al., 2019) tem sido a principal fonte de explante utilizada. Vale ressaltar que na cultura de antúrio, a eficiência deste método é afetada por três principais fatores: a origem dos explantes, o tipo e concentração da auxina (Pinheiro et al., 2014).

Assim, considerando a importância e as vantagens da micropropagação em relação à propagação convencional e o grande potencial de uso ornamental destas espécies nativas de antúrio, ambas ainda pouco exploradas comercialmente, objetivou-se avaliar a multiplicação via organogênese, de segmentos nodais *in vitro* de *A. plowmanii*, através de concentrações do regulador de crescimento (BAP) e indução de calos embriogênicos em explantes de pecíolo e segmento nodal de *A. maricense* e *A. plowmanii* submetidos diferentes concentrações de ANA.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Embrapa Agroindústria Tropical (CNPAT), em Fortaleza, Ceará, no período de fevereiro a maio de 2019. O material vegetal para a obtenção de explantes de ambos experimentos foi obtido do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de Flores Tropicais, de duas espécies de antúrio para folhagem: *A. plowmanii* e *A. maricense*. O presente estudo foi dividido em dois experimentos, o primeiro referente à fase de multiplicação por meio da organogênese e o outro à indução de calos embriogênicos.

Experimento 1: multiplicação de *Anthurium plowmanii* via organogênese

Para a indução de brotações, foram utilizados segmentos nodais com aproximadamente 1,0 cm de comprimento contendo uma gema (meristema axilar) de mudas estabelecidas *in vitro* de *A. plowmanii*. Esses explantes tiveram as raízes excluídas, quando presentes, e as folhas retiradas, antes da inoculação *in vitro*. Eles foram inoculados sob condições assépticas em câmara de fluxo laminar, na posição vertical em tubos de ensaio (150 mm x 25 mm), contendo 10 mL de meio de cultura esterilizado em autoclave. A composição do meio nutritivo utilizado foi Pierik (1976), com 20 g L⁻¹ de sacarose, solidificado com agente gelatinoso (gelrite®) a 1,8 g L⁻¹. O pH foi ajustado a 5,8 antes da autoclavagem. A autoclavagem do meio de cultivo foi realizada a 121 °C, durante 15 minutos. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, constando de 6 concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP), 0,0 µM; 1,11 µM; 2,22 µM; 3,33 µM; 4,44 µM e 5,55 µM, em 5 repetições, sendo cada unidade experimental constituída por seis tubos de ensaio contendo um segmento nodal/tubo.

As culturas foram mantidas em sala de crescimento por um período de 60 dias, com temperatura de 24 ± 1°C, fotoperíodo de 16 horas de luz e intensidade luminosa de 30 µmol m⁻² s⁻¹. Após este período, as mudas foram selecionadas de forma aleatória para a avaliação. Foram avaliados o número de folhas, número de brotos, altura do maior broto (cm), número de raízes e tamanho da maior raiz (cm), logo após, foi registrado o peso fresco, em mg. Em seguida as mudas foram mantidas em estufa à 60°C por um período de 72 horas para obtenção da massa seca (em mg) de cada amostra.

Os dados foram submetidos à análise de variância utilizando o nível de significância de 1%, através do software estatístico SISVAR® (Ferreira, 2000). Os dados foram estudados por meio da análise de regressão utilizando o software TableCurve® v

5.01. O software Sigmaplot versão 12.5 foi usado para representar graficamente os resultados.

Experimento 2: Embriogênese somática de *A. plowmanii* e *A. maricense*

Para a indução de calos embriogênicos, foram utilizados explantes obtidos de mudas mantidas *in vitro* de *A. plowmanii* e *A. maricense*. Seguindo a metodologia proposta por Pinheiro et al. (2014) para a indução de embriogênese somática, os explantes consistiram em segmentos nodais com aproximadamente 1,0 cm de comprimento contendo uma gema (meristema axilar), e segmento de pecíolo, também com aproximadamente 1,0 cm de comprimento.

Esses segmentos foram inoculados em meio de cultura Pierik 2 (meio de cultivo ESA, Carvalho et al., 2012), juntamente com diferentes concentrações de ANA. A composição do meio nutritivo (ESA) foi de acordo com o protocolo estabelecido por Pinheiro et al., (2014). A este meio de cultivo foi adicionado o regulador de crescimento ácido α -naftalenoacético (ANA) nas concentrações de 0 μ M; 5 μ M; 10 μ M; 15 μ M; 20 μ M; além de 20g de sacarose; solidificado com 1,8 g L⁻¹ de agente gelatinoso (gelrite®), e o pH ajustado a 5,8 antes de ser autoclavado. A autoclavagem do meio de cultivo foi realizada a 121 °C durante 15 minutos.

Os explantes, tanto de segmento nodal quanto de pecíolo, foram inoculados na posição horizontal, em tubos de ensaio (150 mm x 25 mm) com 10,0 mL de meio nutritivo contendo um segmento/tubo, sob condições assépticas, em câmara de fluxo laminar. Todos os tubos foram tampados com tampa de polipropileno e vedados por película esticável aderente. Em seguida, as culturas foram colocadas em câmara de crescimento a 24 \pm 1° C, no escuro.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 2 x 2 x 5: duas espécies de antúrio (*A. plowmanii* e *A. maricense*); dois tipos de explante (segmento nodal e segmento de pecíolo) e cinco concentrações de ANA, (0 μ M; 5 μ M; 10 μ M; 15 μ M; 20 μ M) com cinco repetições, e cada unidade experimental constituída por cinco tubos de ensaio contendo um segmento/tubo.

Aos 106 dias após a inoculação e permanência dos explantes no escuro, contou-se o número de calos com características embriogênicas, isto é, de coloração amarela intensa (Pinheiro et al., 2014). A análise dos resultados por meio do teste não-paramétrico foi utilizada para a indução de calos com características embriogênicas tanto em *A. plowmanii* quanto em *A. maricense* devido aos dados não apresentarem distribuição normal

e tão pouco homogeneidade das variâncias quando submetidos ao nível de 5% de probabilidade. O teste não-paramétrico utilizado foi o Teste de Kruskal-Walis, no qual todos os tratamentos foram ranqueados e submetidos às comparações múltiplas, ao nível de 5%. O software estatístico utilizado para análise não-paramétrica foi o Action Stat, versão do R: 3.3.2, e os gráficos elaborados no software SigmaPlot, versão 12.5.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento 1: Multiplicação de *Anthurium plowmanii* via organogênese

Por meio da análise de variância dos dados verificou-se efeito significativo ao teste F para todas as características avaliadas (Tabela 1). A formação de brotações (Figura 1A) ocorreu em todas as concentrações de citocinina testadas, inclusive na ausência de BAP, este fato pode estar relacionado aos fatores endógenos (citocinina) já presentes no explante, o que promove o desenvolvimento espontâneo de brotos (Campos et al., 2018).

Tabela 1 - Resumo da análise de variância das médias de mudas micropropagadas *Anthurium plowmanii*, a partir de segmentos nodais, em diferentes concentrações de BAP, aos 60 dias de cultivo *in vitro*

Quadrados Médios								
FV	GL	NB	AB	NFB	NR	CR	MF	MS
Tratamento	5	38,8020**	4,6990**	205,0524**	30,1067**	44,4039**	196560,0360**	883,9312**
Erro	143	3,0995	0,5828	21,8587	1,1977	1,6313	10274,8958	69,5793
Média		3,49	2,20	7,11	1,29	1,09	186,41	18,73
CV (%)		50,45	34,73	65,72	87,67	116,82	54,38	44,53

** significativos a 1% de probabilidade pelo teste F. FV: fator de variação; GL: grau de liberdade; BAP: 6-benzilaminopurina; CV: coeficiente de variação; NB: número de brotos; AB: altura do maior broto; NFB: número de folhas por broto; NR: número de raiz; CR: comprimento da raiz; MF: massa fresca; MS: massa seca

A indução de maior taxa de multiplicação (Figura 1A) foi ajustada ao modelo à medida que a concentração de BAP foi crescente. Constatando-se que essa resposta morfo genética é influenciada pela concentração utilizada. Nota-se que quando se utilizaram as menores concentrações (de 0,0 a 1,11 μM) os explantes não mostraram resultados satisfatórios para essa característica observada.

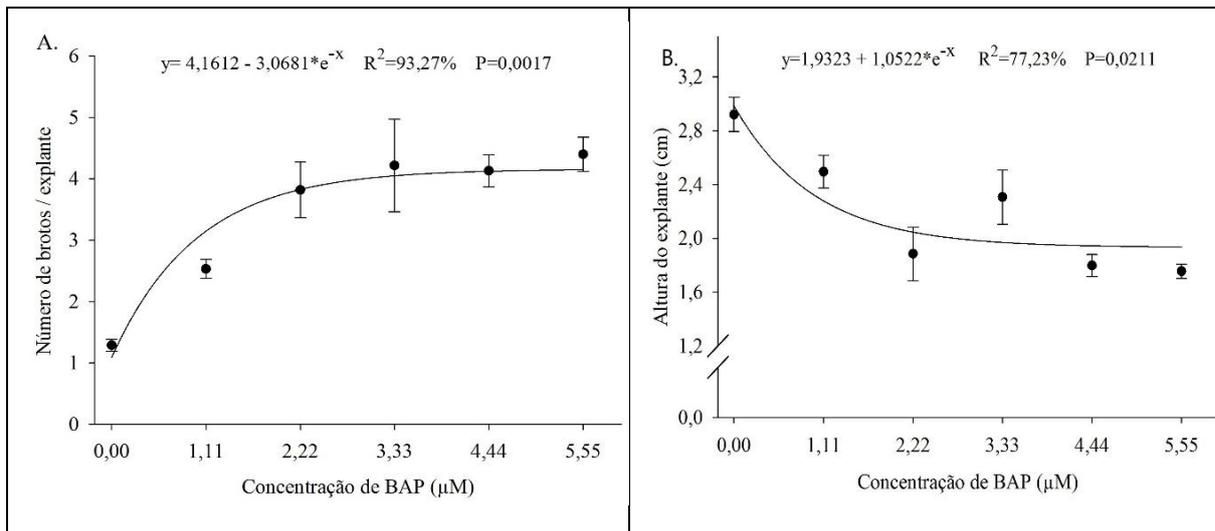


Figura 1 - Efeito de diferentes concentrações de BAP no número de brotações regeneradas por explante (A); altura do maior broto (B) de mudas micropropagadas de *Anthurium plowmanii*, a partir de segmento nodal, aos 60 dias de cultivo *in vitro*

O menor número de brotações regeneradas para o *A. plowmanii* foi obtido no meio de cultura Pierik sem a adição do regulador de crescimento, baixos valores para número de brotação também foram registrados em Serafim et al., (2018) em *A. maricense* (1,13) e em Campos et al., (2018) para *A. maricense* (1,06) e para *A. bonplandii* (1,46), em contrapartida, em ambos foi verificado o aumento de brotos com a utilização de doses superiores a zero de BAP, isto é, com a utilização de doses variando de 1,11 a 6,66 µM.

O BAP promoveu maior número de brotos (Figura 1A) regenerados por nó no meio de cultivo contendo 3,33 µM, atingindo ponto máximo na linha de regressão, com média de 4,5 de mudas por explante. Segundo Serafim et al., (2018) o aumento do número de mudas regeneradas acontece com o incremento das doses de BAP. Maiores taxas de regeneração de brotações (5,15) também foram encontradas por Campos et al., (2019) com a utilização de 3,33 µM de BAP em antúrio ‘Rubi’.

Com base nestes resultados, o BAP mostrou significativas respostas morfológicas do explante utilizado, quando adicionada aos meios de cultivo, com destaque na fase de multiplicação devido ao efeito na quebra de dormência apical e indução da proliferação de gemas axilares (Santos-Serejo, 2006), sendo amplamente utilizada na micropropagação de plantas de antúrio (Murillo-Gómez et al., 2014), entretanto, as concentrações ideais desta citocina variam de acordo com a espécie utilizada.

Diante disso, dados obtidos neste trabalho são concordantes com as afirmações de Campos et al. (2018) que verificaram maior indução a regeneração de gemas em meio de cultivo contendo BAP (4,70 e 3,37 µM, respectivamente), em *A. maricense* e *A. bonplandii*, a eficiência do BAP também foi constatado em Serafim et al. (2018) em *A. maricense*.

A adição de BAP ao meio de cultura teve efeito significativo no número de brotos por explantes, seguido pelo decréscimo das variáveis: altura do maior broto (Figura 1B), número de raízes (Figura 2B) e comprimento da maior raiz (Figura 2C), mediante o incremento na concentração desta citocinina. Em contrapartida, os brotos com maiores alturas (2,71 cm) foram observados na ausência de BAP (Figura 1B). O efeito desta citocinina adicionada ao meio é a regeneração dos brotos em antúrio, diante disso, estes resultados podem estar relacionados ao fato desta citocinina não ser responsável em promover o alongamento e enraizamentos de mudas, mas sim, o efeito de aumento de brotações (Tavares, 2016), e quebra de dominância apical.

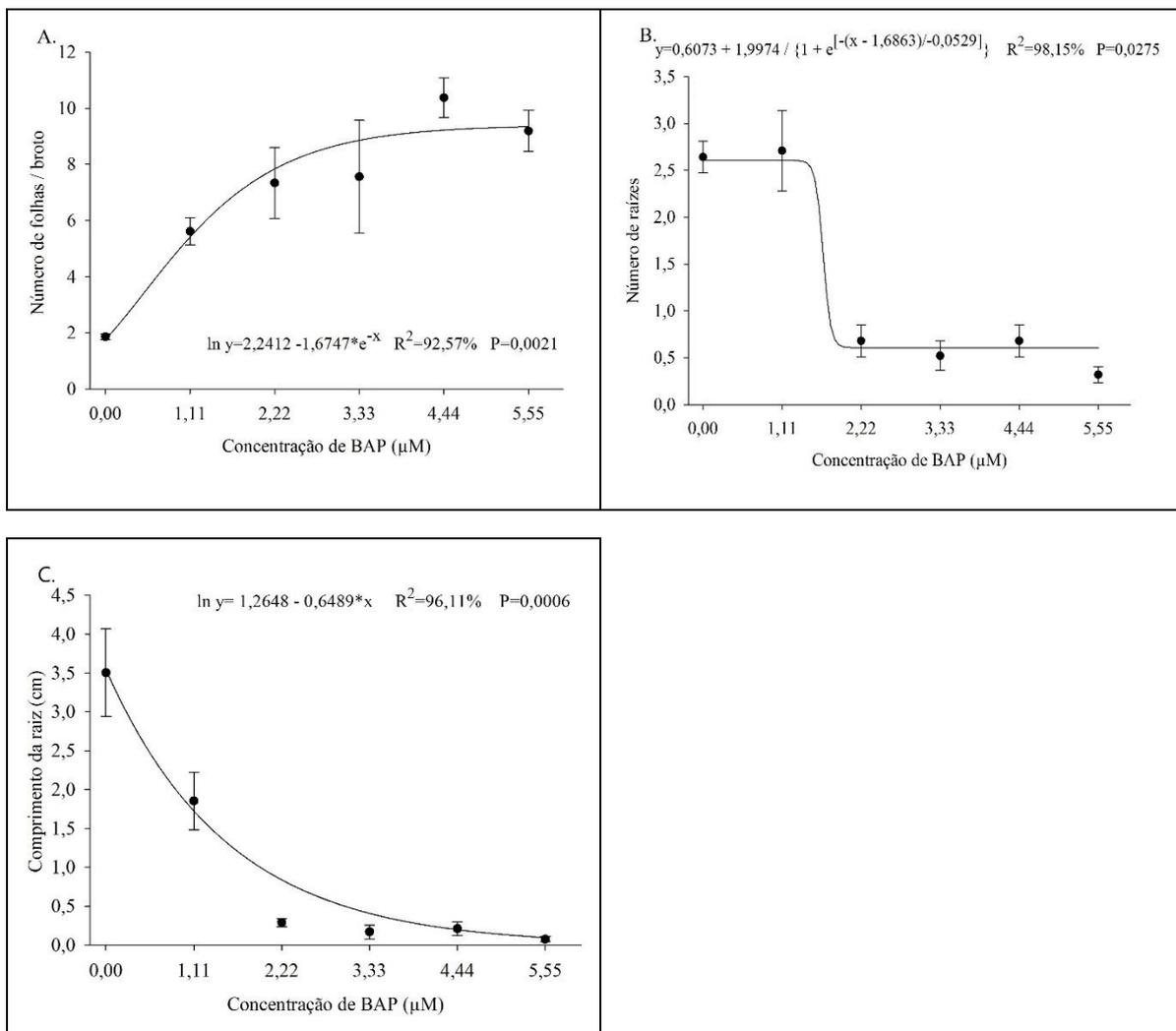


Figura 2 - Efeito de diferentes concentrações de BAP no número de folhas por broto (A); número de raízes por explante (B); comprimento da maior raiz (C) de mudas micropropagadas de *Anthurium plowmanii*, a partir de segmento nodal, aos 60 dias de cultivo *in vitro*

Para a variável número de folhas, constatou-se que na medida que houve maiores taxas de brotos, aumentou o número total de folhas por brotos/tubo (Figura 2A), ambos induzidos com o aumento das concentrações de BAP. Ribeiro et al. (2014) afirmam que para a espécie copo-de-leite (*Zantedeschia aethiopica* L. Spreng), havendo maior número

de folhas resulta em uma maior taxa de multiplicação, pois a medida que aumenta o número de folhas, aumentam também as gemas axilares e internódios além de incrementar o número de segmentos nodais, justificando.

O processo de enraizamento avaliado através do número de raízes (Figura 2B) começou espontaneamente sem o regulador de crescimento, e que pode estar associado ao mesmo fato de estímulo de brotações como verificou Campos et al., (2018), isto é, aos fatores endógenos (citocinina) naturalmente expressos no explante quando adicionado ao meio nutritivo e submetidos em condições adequadas favorecendo ao estímulo de enraizamento (como luz, temperatura, nutrientes, entre outros) como foi o caso deste estudo. Porém, com a adição de BAP observou-se efeito negativo na formação das raízes. O efeito inibitório da raiz também foi verificado em Campos et al., (2019) para a cultivar Rubi, utilizando a concentração 6,66 μ M na qual não houve nenhuma formação de raízes, já sem adição de BAP verificou-se pelos mesmos autores 100% de enraizamento em explantes.

O comprimento da maior raiz (Figura 2C) também decresceu com o aumento da concentração da citocinina. Na micropropagação, a presença de raiz é essencial para o desenvolvimento da muda na fase de aclimatização, contudo, esta característica não é o fator principal a ser levado em consideração na fase indução a multiplicação *in vitro*, e sim o (NB) número total de brotos (Carvalho et al., 2009).

Maiores valores de massa fresca total mensurados pela expressão da parte aérea juntamente com o sistema radicular (Figura 3A) dos brotos/tubo (26, 48 mg) foram observados utilizando-se 3,33 μ M de BAP. Provavelmente isso ocorreu devido à taxa de brotos obtidos, influenciado pela concentração do regulador de crescimento utilizado.

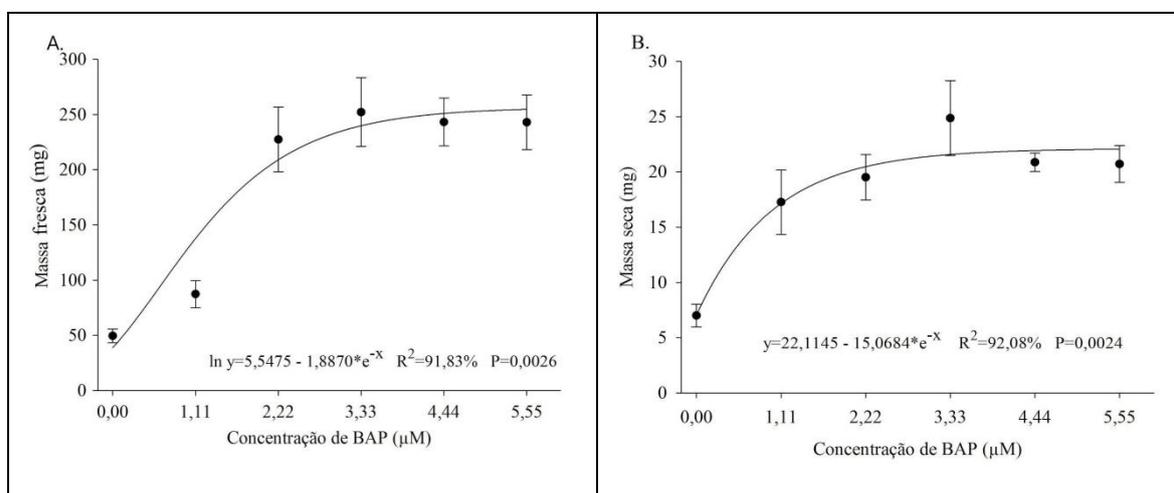


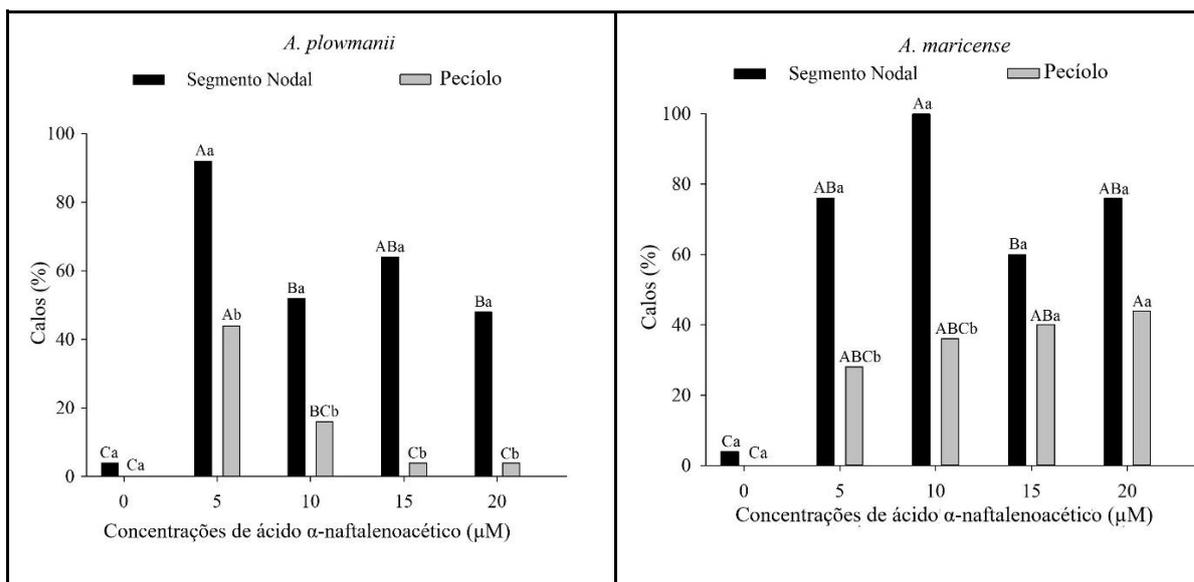
Figura 3 - Efeito de diferentes concentrações de BAP na massa fresca das brotações (A); massa seca das brotações(B) de mudas micropropagadas de *Anthurium plowmanii*, a partir de segmentos nodais, aos 60 dias de cultivo *in vitro*.

A massa seca total dos brotos/tubo (Figura 3B), atingiu o valor máximo (26,64 mg) com a utilização de 3,33 μM de BAP. Isso ocorreu devido a variável estar correlacionada com a variável massa fresca e número de botos, assim, a maior formação de brotações acarretou em maior massa seca da espécie.

Experimento 2: Embriogênese somática de *A. plowmanii* e *A. maricense*

Pela análise dos resultados por meio do teste não-paramétrico (Kruskal-Walis) submetidos ao nível de 5% de probabilidade foi obtido Qui-quadrado 42,7 com 19 graus de liberdade e o valor de p foi de 0,0014.

As menores percentagens de formação de calos embriogênicos das duas espécies de antúrio (Figura 4 e Figura 5) foram registrados em segmento de pecíolo (0%) no meio de cultivo sem a adição de ANA, esses dados também foram constatados em segmentos nodais de antúrio ‘Rubi’ (Campos et al., 2019) e diferem do encontrado neste estudo (4% de calos, nas duas espécies nativas) com explante oriundo de segmento nodal, entretanto não houve diferença estatística entre as fontes de explantes utilizadas, nesta dose. Contudo, mostra-se com este estudo, concordando ao que foi reportado por Melo et al., (2019), que auxinas adicionadas ao meio de cultivo exercem importante papel na indução massiva à embriogênese somática.



*Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Walis a 5% de probabilidade

*Letras maiúsculas comparam-se as doses de ANA de uma mesma parte da planta e minúsculas, à fonte de explante de uma mesma dose

Figura 4. Percentagem de calos com características embriogênicas em função das concentrações de ácido α -naftalenoacético (ANA) em segmentos nodais e segmentos de pecíolos inoculados em meio de indução à embriogênese somática de *Anthurium Plowmanii*

Figura 5. Percentagem de calos com características embriogênicas em função das concentrações de ácido α -naftalenoacético (ANA) em segmentos nodais e segmentos de pecíolos inoculados em meio de indução à embriogênese somática de *Anthurium maricense*

Em segmento nodal de *A. plowmanii* foi verificado que a utilização de 5 μM de ANA induz a maior taxa (92%) de calos com características embriogênicas, esta dose

difere-se estatisticamente de 10 μM , e com a utilização de 15 μM não é verificado diferença estatística em segmento nodal em relação às doses de 5 μM e 10 μM , já a dose de 20 μM apresentou baixa porcentagem de calos, mesmo não diferindo da dose de 10 μM , ficando superior apenas da dose 0 μM . Melo et al., (2019) em *A. andraeanum* verificaram que para atingir média máxima de formação de calos (23,8%) de explantes de segmento nodal foi necessária a utilização de 7,5 μM de ANA.

Foi verificado que o percentual de segmento nodal de *A. plowmanii* (Figura 4) foi estatisticamente superior independentemente da concentração de ANA utilizada, em relação a segmento do pecíolo, diferindo-se estatisticamente quando comparado as duas fontes de explantes nas mesmas doses utilizadas. Assim, a utilização de 5 μM de ANA em segmento nodal promove maior taxa de calos, sendo indicada para a micropropagação desta espécie a partir da embriogênese somática, já a utilização de segmento de pecíolo, apesar que apresentou calos com características embriogênicas a partir da utilização de 5 μM de ANA, não se mostrou viável devido a ser menos responsivo em relação a segmento nodal.

Em *A. maricense* (Figura 5), o maior percentual de calos foi verificado utilizando segmento nodal a 10 μM de ANA (100%), porém não houve diferença estatística com a utilização de doses de 5 μM (76%) e 20 μM de ANA (76%). Mostrando assim, que a utilização mínima de ANA (5 μM) em segmento nodal desta espécie promove grande percentual de calos embriogênicos, não sendo necessária a utilização de doses superiores de ANA.

Em segmento de pecíolo, não houve diferença significativa em meio sem a adição de ANA, com 5 μM e 10 μM , sendo assim obtidos os menores números de calos, apesar que 5 e 10 μM não difere de 15 e 20 μM , já o maior percentual de calos foi verificado com a utilização da dose máxima de ANA (20 μM), contudo não difere das demais concentrações iguais ou superiores 5 μM de ANA. Verificaram-se maiores taxas de calos quando adicionado ANA ao meio de cultivo, e aumentou o percentual de calos à medida que se adicionou uma maior concentração da auxina.

Todos os calos formados apresentaram coloração amarela conforme o protocolo para indução de embriogênese somática proposto por Pinheiro et al., (2014). O explantes mais competentes para a indução de calos com característica embriogênica em *A. plowmanii* foi oriundo de segmento nodal, já em *A. maricense* os explantes derivados de segmento nodal e segmento de pecíolo mostram-se adequadas para obtenção da embriogênese somática, pois ambos verificaram-se ser responsivos mesmo sendo

necessário a utilização de 15 μM de ANA para não diferirem estatisticamente entre si a 5% de probabilidade.

As fontes de explantes de antúrio testadas neste estudo são indicadas em indução de calos embriogênicos concordando com a afirmação de Pinheiro et al., (2014) em antúrio para flor de corte (*A. andraeanum* cv. Eidibel), apesar de que segmentos nodais são mais responsivos em relação ao segmento de pecíolo, dados estes também verificados neste estudo em antúrio para folhagem, tanto em *A. plowmanii* quanto em *A. maricense*.

A não adição de ANA promove baixo número calos, já a adição 5 μM é suficiente para maior indução de calo nas duas espécies nativas estudadas. Em *A. plowmanii* e *A. maricense*, explante oriundo de segmento nodal mostrou ser mais responsivo utilizando a dose mínima de 5 μM para proliferação de calos com características embriogênicas. A indução da embriogênese somática nas duas espécies é afetada por dois principais fatores: origem do explante e concentração da auxina ANA, estas respostas também foram encontradas por Pinheiro et al., (2014), trabalhando com *A. andraeanum* cv. Eidibel.

CONCLUSÃO

A utilização de BAP inibe a altura de brotos, o número de raízes e o comprimento da raiz de *A. plowmanii*, mas concentrações superiores a 2,22 μM de BAP estimulam as brotações e o aparecimento de folhas em brotos regenerados, além de incrementar a massa fresca e massa seca de mudas micropropagadas desta espécie nativa.

A quantidade adequada de BAP para o incremento na taxa de multiplicação, bem como para o número de brotações e melhor desempenho no desenvolvimento das mudas *in vitro* a partir do segmento nodal em *A. plowmanii*, é de 3,33 μM .

As espécies *A. plowmanii* e *A. maricense* desenvolvem calos com características embriogênicas. Segmentos nodais são mais viáveis na indução de calos nas duas espécies estudadas, para obtenção de embriões somáticos.

Para obtenção de uma eficiente indução à embriogênese somática dessas espécies, é indicado que o meio de cultura seja suplementado com o regulador de crescimento ANA, na concentração de 5 μM em segmento nodal de *A. plowmanii* e *A. maricense*.

REFERÊNCIAS

Bautista, N.D.R.; Peñalver, D. A.; Rodríguez, R. B.; Chiu, W. C.; López, R. C.; Terry, F. J.; Peralta, M. P.; Martínez, O. G. Embriogénesis somática em (*Anthurium andraeanum* Lind.) variedad 'Lambada'. **Revista de Sociedad, Cultura y Desarrollo Sustentable**, v.4, p.135-149, 2008.

Boyce, P. C.; Croat, T. B. The Überlist of Araceae, totals for published and estimated number of species in Aroid genera. 2018. <http://www.aroid.org/genera/180211uberlist.pdf>. 14 dez 2019.

Castro, A. E. F. et al. Propagação vegetativa do antúrio *in vitro*. In: Congresso Brasileiro de floricultura e plantas ornamentais, 3., 1982, Salvador, **Anais...Campinas: Instituto de Botânica**, p. 13-25, 1986.

Castro, A. C. R.; Morais, E. B.; Mourão, I. C. S.; Loges, V. Carvalho, A. C. P. P. Ornamental foliage potential of *Anthurium* accessions. **Acta Horticulturae**, v. 855, p. 61-86, 2010.

Campos, A. S.; Carvalho, A. C. P. P.; Castro, A. C. R.; Bertini, C. H. C. de M. Micropropagation of two species of foliage *anthurium* by direct organogenesis. **Ciência Rural**, v. 48, n. 7, 2018.

Campos, A. S.; Melo, P. B. dos S.; Bertini, C. H. C. de M.; Carvalho, A. C. P. P. de. Micropropagação de antúrio 'Rubi' estiolamento e regeneração de brotações. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2019 21 p. (Boletim de pesquisa e desenvolvimento/Embrapa Agroindústria Tropical).

Carvalho, A. C. P. P.; Pinheiro, M. V. M.; Dias, G. M. G.; Morais, J. P. S. Multiplicação *in vitro* de abacaxi ornamental por estiolamento e regeneração de brotações. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 1, p. 103-108, 2009.

Carvalho, A. C. P. P. de; Pinheiro, M. V. M.; Martins, F. B.; Cruz, A. C. F.; Otoni, W. C. Produção de mudas micropropagadas de Antúrio (*Anthurium andraeanum*) cv. Eidibel por embriogênese somática. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2012. 14 p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Circular técnica, 41).

Coelho, M. A. N.; Mayo, S.J. . *Anthurium maricense* Nadruz & Mayo - a new species of *Anthurium* Schott (Araceae: tribe Anthurieae) for Brazil. **Aroideana**, USA, v. 23, p. 82-87, 2000.

Ferreira, D. F. análises estatísticas por meio do sisvar para windows versão 4.0. in: Reunião anual da região brasileira da sociedade internacional de biometria, 45., 2000, São Paulo. **Anais ... São Carlos, SP: SIB**, 2000, p. 255-258.

Guimarães, A. L. A.; Tanque, P. R. do.; Pyrrho. A. dos S.; Vieira, A. C. de M. Toxicological and anatomical study of vegetative organs of *Anthurium maricense* Nadruz and Mayo (Araceae). **Revista Agroambiental**, v. 11, n. 2, 2019.

Melo, P. B. S.; Carvalho, A. C. P. P. de, Bertini, C. H. C. de M.; Muniz, C. R.; Rossetti, A. G. Induction of somatic embryogenesis in two cultivars of *Anthurium* analysed by scanning electron microscopy. **Revista Agroambiente On-line**, v. 13, n. 0, p. 1-13, 2019. <http://dx.doi.org/10.18227/1982-8470ragro.v13i0.5333>.

Morais, E. B.; Castro, A. C. R. de.; Aragão, F. A. de S; Silva, T. F.; Soares, N. S.; Silva, J. P. da. Evaluation of potential use of native *Anthurium* foliage. **Ornamental Horticulture**, v. 23, n. 1, p. 07-14, 2017. <http://dx.doi.org/10.14295/oh.v23i1.949>

Murillo-Gómez, P. A.; Naranjo, E.; Callejas, R.; Atehortúa, L.; Urrea, A. Micropropagation of the native species *Anthurium antioquiense* Engl. for conservation purposes. **Agronomía Colombiana**, v. 32, n. 3, p. 334-340, 2014.

Pierik, R. L. M.; Steegmans, H. H. M.; Van Der Meys, J. A. J. Plantlet formation in callus tissues of *Anthurium andraeanum* Lind. **Scientia Horticulturae**, v. 2, n. 2, p. 193-198, 1974.

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

Pinheiro, M. V. M.; Dias, G. de M. G.; Carvalho, A. C. P. P. de; Barros, L. de M. Micropropagação de antúrio 'IAC Eidibel' por meio da indução ao estiolamento e regeneração de plantas. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 15, n. 2, p. 133-142, 2009.

Pinheiro, M. V. M. **Propagação in vitro de antúrio (*anthurium andraeanum* cv. eidibel) via embriogênese somática**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2010. 80p. Dissertação.

Pinheiro, M. V. M.; Martins, F. B.; Cruz, A. C. F. da; Carvalho, A. C. P. P. de; Oliveira, E. J. de; Otoni, W. C. Somatic embryogenesis in *anthurium* (*Anthurium andraeanum* cv. Eidibel) as affected by different explants. *Acta Scientiarum. Agronomy*, v. 36, n. 1, p. 87-98, 2014.

Pinheiro, M. V. M. **Propagação fotoautotrófica de *Etinglera elatior* 'Porcelana' e aspectos anatômicos e caracterização e expressão do gene SERK na embriogênese somática em *Anthurium andraeanum* 'Eidibel'**. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 2014. 114 p. Tese (Doutorado em Botânica).

Ribeiro, M. de N. O.; Pasqual, M.; Silva, A. B. da; Rodrigues, V. A. *In vitro* propagation of Calla lily: adenine sulphate and 6-benzilaminopurine. **Ornamental Horticulture**, v. 20, n. 1, p. 21-26, 2014.

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. (edit. Tec.). **Introdução à Micropropagação de Plantas**. Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Cruz das Almas, p. 80-98, 2006.

Serafim, C. M.; Campos, A. S.; Melo, P. B. dos S.; Castro, A. C. R. de; Carvalho, A. C. P. P. de. Types and concentrations of cytokinins in the micropropagation of *Anthurium maricense*. **Revista Agroambiente On-line**, v. 12, n. 2, p. 117-123, abril-junho, 2018. <http://dx.doi.org/10.18227/1982-8470ragro.v12i2.4671>.

Silva, Jaime A. T. da; Dobránszki, J.; Winarto, B.; Zeng, S. *Anthurium in vitro*: a review. **Scientia Horticulturae**, v. 186, p. 266-298, 2015.

Silva, C. de F. B. Da; Carvalho, A. C. P. P. de; Castro, A. C. R. de; Taniguchi, C. A. K.; Dias, N. Da S.; Miranda, F. R. de; Pastori, P. L.; Alves, F. H. N. Da S.; Campos, A. S. Produção de antúrio para folhagem em vaso. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2019. 27 p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Circular técnica, 48).

Tavares, V. P. C. **Indução de brotos de antúrio ‘cananeia’ por meio de estiolamento in vitro.** Fortaleza: Universidade Federal do Ceará-UFC. Centro de Ciências Agrárias Curso De Agronomia, 2016. 52p. Monografia.

Tombolato, A. F. C.; Costa, A. M. M. **Micropropagação de plantas ornamentais.** 1998. 72p.

Zimmermann, M. J. Embriogênese somática. In: Cid, L.P.B (ed. tec.). **Cultivo *in vitro* de plantas.** Brasília - DF: Embrapa informação tecnológica, 2010. p. 67-101.