

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE AGRONOMIA**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

**TESE**

**Micropropagação de espécies ornamentais: avanços e aplicações para *Alcea rosea*, *Dianthus caryophyllus* e *Anthurium andraeanum***

**Talita dos Santos Ferreira**

**2025**



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE AGRONOMIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

**MICROPROPAGAÇÃO DE ESPÉCIES ORNAMENTAIS: AVANÇOS E  
APLICAÇÕES PARA *ALCEA ROSEA*, *DIANTHUS CARYOPHYLLUS* E  
*ANTHURIUM ANDRAEANUM***

**TALITA DOS SANTOS FERREIRA**

Sob a Orientação da Prof. Dr.

**Rogério Gomes Pêgo**

Tese submetida como requisito parcial  
para obtenção do grau de **Doutora em  
Fitotecnia**, no Curso de Pós-Graduação  
em Fitotecnia.

Seropédica. RJ  
Fevereiro de 2025

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada  
com os dados fornecidos pelo autor

F 345m Ferreira, Talita dos Santos, 1988-  
Micropropagação de espécies ornamentais: avanços e aplicações para *Alcea rosea*, *Dianthus caryophyllus* e *Anthurium andraeanum* / Talita dos Santos Ferreira. - Seropédica, 2025.  
106 f.: il.

Orientador: Rogério Gomes Pêgo. Tese (Doutorado).  
-- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-graduação em Fitotecnia, 2025.

1. Planta ornamental. 2. Cultura de tecidos. 3. Araceae. 4. Antúrio. 5. Alcea. I. Pêgo, Rogério Gomes, 1983-, orient. II Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-graduação em Fitotecnia III. Título.

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – A autora”.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO INSTITUTO DE AGRONOMIA**

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

**TALITA DOS SANTOS FERREIRA**

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Fitotecnia**, no Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia, área de Concentração em Produção Vegetal.

TESE APROVADA EM 25/02/2025.

Documento assinado digitalmente  
 **ROGERIO GOMES PEGO**  
Data: 25/04/2025 16:04:37-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

**Dr. Rogério Gomes Pêgo, UFRRJ**  
**Orientador/Presidente**

Documento assinado digitalmente  
 **CIBELLE VILELA ANDRADE FIORINI**  
Data: 07/05/2025 08:34:34-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

**Dra. Cibelle Vilela Andrade Fiorini, UFRRJ**  
**Examinador Interno ao Programa**

Documento assinado digitalmente  
 **NATANE AMARAL MIRANDA PADUA**  
Data: 07/05/2025 13:53:47-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

**Dra. Natane Amaral Miranda, UFRRJ. Examinador**  
**Interno ao Programa**

Documento assinado digitalmente  
 **CARLOS ANTONIO DOS SANTOS**  
Data: 05/05/2025 05:54:13-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

**Dr. Carlos Antônio dos Santos, IFPR. Examinador**  
**Externo ao Programa**

Documento assinado digitalmente  
 **LUIZ FERNANDO DE SOUSA ANTUNES**  
Data: 26/04/2025 19:34:01-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

**Dr. Luiz Fernando de Sousa Antunes, UFERSA**  
**Examinador Externo ao Programa**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus.

À minha família e amigos pelo apoio e compreensão, em especial minha mãe Margareth e o meu padrasto Celso.

À minha filha Júlia que é a minha força, a que me dá inspiração e forças para me manter de pé, me incentivando a ser uma pessoa melhor e a superar todos os obstáculos para estar com ela.

Ao meu orientador, o professor Rogério Gomes Pêgo, todo meu carinho! Sempre atencioso, me ensinou, orientou, incentivou e acima de tudo, confiou em mim. Obrigado pela parceria, aulas, dicas, correções e conversas. Por acreditar no meu potencial e conceder-me condições de alcançar minhas aspirações e sonhos. Sua confiança e apoio no meu trabalho foi primordial.

Aos meus amigos Luiz Fernando de Sousa Antunes e Karolyn Alves Laranja Silva, pela amizade e parceria desde a graduação.

Aos amigos e pessoas que embora não citadas colaboraram e incentivaram, para que este trabalho fosse cumprido.

Ao Laboratório de Epidemiologia e Patologia de Sementes – LabEPS, a professora Margarida Goréte Ferreira do Carmo, pelo acolhimento, ajuda e toda infraestrutura oferecida durante o período de condução do experimento. E aos alunos Carlos Antonio dos Santos e Laura Carine Candido pela amizade e por todo suporte e ajuda no laboratório.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro em especial ao Colegiado e colaboradores do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia.

A CAPES pelo apoio financeiro através da bolsa de estudos.

À FAPERJ pelo auxílio financeiro para que essa pesquisa pudesse ser realizada.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 (**Portaria 206, de 04 de setembro de 2018 da CAPES**).

Muito Obrigada!

## RESUMO GERAL

FERREIRA, Talita dos Santos; **Micropropagação de espécies ornamentais: avanços e aplicações para *Alcea rosea*, *Dianthus caryophyllus* e *Anthurium andraeanum***. 2025. 106p. Tese (Doutorado). Instituto de Agronomia. Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2025.

A micropropagação tem sido uma das principais técnicas obtenção massal de mudas de qualidade de espécies ornamentais, especialmente das espécies de difícil propagação. Dentre as espécies podem ser citadas plantas de alcea (*Alcea rosea* L.) propagada por sementes, cujo relatos de dormência tem sido frequente, além disso, essa espécie desenvolve-se em roseta, não produzindo ramificações e por isso a propagação vegetativa é bastante limitada. Outra espécie de grande interesse econômico é o cravo (*Dianthus caryophyllus*) que embora possam ser propagados por sementes, a forma tradicionalmente utilizada por floricultores é a propagação por estaquia, o que torna o manejo de matrizeiros bastante oneroso. Outra cultura de grande importância comercial são os antúrios (*Anthurium andraeanum* L.), pertencentes à Família Araceae, que também apresenta muitos entraves para a produção pela germinação de sementes ou propagação vegetativa tradicional, da qual as mudas comerciais são oriundas da micropropagação de plantas. Para todas essas espécies, vantagens significativas podem ser alcançadas com o uso da micropropagação *in vitro*. Nesse sentido, essa tese foi construída em capítulos que objetivam elucidar aspectos da micropropagação de diferentes espécies ornamentais. No capítulo I pode-se constatar que os frutos de *A. rosea* apresentam aspecto achatado contendo, em média, 33 sementes. As sementes germinadas *in vitro* não apresentam dormência, entretanto, a escarificação mecânica promove maiores índice de velocidade de germinação e a produção de plântulas mais vigorosas, independente do meio de cultura utilizado. No capítulo II a suplementação de 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP ao meio MS possibilitou a maior brotação de estacas de *A. rosea*, sendo indispensável o uso desse regulador para a indução de brotações ao passo que a suplementação de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de AIB ao meio MS favorece a rizogênese. No capítulo III para plantas de *D. caryophyllus* o maior percentual de germinação *in vitro* foi obtido com o meio MS<sub>Total</sub>. A formação do maior número de brotos ocorreu no MS suplementado com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 0,5 mg L<sup>-1</sup> de AIB, com uma média de 144 brotos por explante. A formação do maior número de raízes (9,3) ocorreu no MS<sub>1/2</sub> suplementado com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de AIB. No capítulo IV para plantas de *A. andraeanum* L., recomenda-se a assepsia por imersão em álcool 70% (v/v) + solução de gentamicina (20%) por 1 minuto, e posteriormente a imersão por 7 minutos em solução de hipoclorito de sódio 2% (v/v). A combinação dos fatores: explante retirado da folha de idade intermediária + meio de cultivo com WPM + ambiente escuro, foi o tratamento mais eficiente no controle da oxidação e na etapa de indução de calos nos explantes. O meio WPM suplementado com 2,0 mg/L de BAP + 1,0 mg/L de 2,4D ou 1,0 mg/L de BAP + 0,5 mg/L de AIB induzem a produção de calos embriogênicos. E no capítulo V o artigo de revisão fornece informações abrangentes e atualizadas sobre a complexidade da polinização de plantas da família Araceae e suas relações sobre as especificidades de insetos polinizadores.

**Palavras-chave:** Cultura de tecidos. Araceae. Planta ornamental. Calogênese.

## GENERAL ABSTRACT

FERREIRA, Talita dos Santos; **Micropropagation of ornamental species: advances and applications for *Alcea rosea*, *Dianthus caryophyllus* and *Anthurium andraeanum***. 2025. 106p. Thesis (Doctorate). Institute of Agronomy. Postgraduate Program in Phytotechnics. Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2025.

Micropropagation has been one of the main techniques for obtaining high-quality seedlings of ornamental species, especially those that are difficult to propagate. Among the species, we can mention the alcea (*Alcea rosea* L.) propagated by seeds, whose dormancy has been frequently reported. Furthermore, this species develops in rosettes, does not produce branches, and therefore vegetative propagation is quite limited. Another species of great economic interest is the carnation (*Dianthus caryophyllus*), which, although it can be propagated by seeds, is traditionally propagated by cuttings, which makes the management of nursery stocks quite expensive. Another crop of great commercial importance is the anthurium (*Anthurium andraeanum* L.), which belongs to the Araceae family, which also presents many obstacles for production by seed germination or traditional vegetative propagation, from which commercial seedlings come from plant micropropagation. For all these species, significant advantages can be achieved with the use of in vitro micropropagation. In this sense, this thesis was constructed in chapters that aim to elucidate aspects of the micropropagation of different ornamental species. In Chapter I, it can be seen that the fruits of *A. rosea* have a flattened appearance and contain, on average, 33 seeds. The seeds germinated in vitro do not present dormancy; however, mechanical scarification promotes higher germination rates and the production of more vigorous seedlings, regardless of the culture medium used. In Chapter II, the supplementation of 2.0 mg L<sup>-1</sup> of BAP to the MS medium allowed for greater sprouting of *A. rosea* cuttings, making the use of this regulator essential for inducing sprouting, while the supplementation of 1.0 mg L<sup>-1</sup> of IBA to the MS medium favors rhizogenesis. In Chapter III, for *D. caryophyllus* plants, the highest percentage of in vitro germination was obtained with the MSTotal medium. The formation of the greatest number of shoots occurred in the MS supplemented with 1.0 mg L<sup>-1</sup> of BAP + 0.5 mg L<sup>-1</sup> of IBA, with an average of 144 shoots per explant. The formation of the greatest number of roots (9.3) occurred in the MS1/2 supplemented with 1.0 mg L<sup>-1</sup> of IBA. In chapter IV for *A. andraeanum* L. plants, asepsis by immersion in 70% (v/v) alcohol + gentamicin solution (20%) for 1 minute is recommended, followed by immersion for 7 minutes in 2% (v/v) sodium hypochlorite solution. The combination of factors: explant taken from the intermediate-aged leaf + culture medium with WPM + dark environment, was the most efficient treatment in controlling oxidation and in the callus induction stage in the explants. WPM medium supplemented with 2.0 mg/L BAP + 1.0 mg/L 2,4D or 1.0 mg/L BAP + 0.5 mg/L IBA induces the production of embryogenic callus. And in chapter V the review article provides comprehensive and updated information on the complexity of pollination of plants of the Araceae family and their relationships on the specificities of pollinating insects.

**Keywords:** Tissue culture. Araceae. Ornamental plant. Callogenesis.

## Sumário

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA GERAL.....</b>	<b>3</b>
2.1 O Mercado de Plantas Ornamentais.....	3
2.2 Cultura <i>In Vitro</i> de Tecidos Vegetais.....	4
2.3 Germinação <i>In Vitro</i> .....	5
2.4 Micropropagação de Plantas Ornamentais .....	5
2.4.1 Rotas morfo genéticas <i>in vitro</i> .....	7
2.4.1.1 Organogênese .....	7
2.4.1.2 Embriogênese somática.....	8
3 Referências Bibliográficas .....	10
<b>4 CAPÍTULO I - FRUIT AND SEED MORPHOMETRY AND IN VITRO GERMINATION OF HOLLYHOCK SEEDS.....</b>	<b>15</b>
4.1 ABSTRACT.....	16
4.2 RESUMO.....	16
4.3 INTRODUCTION.....	17
4.4 MATERIAL AND METHODS.....	18
4.5 RESULTS AND DISCUSSION.....	19
4.6 CONCLUSIONS.....	22
4.7 REFERENCES.....	23
<b>5 CAPÍTULO II - ESTABELECIMENTO DE PROTOCOLOS PARA A GERMINAÇÃO E MICROPROPAGAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE <i>ALCEA ROSEA</i> L.....</b>	<b>26</b>
5.1 RESUMO.....	27
5.2 ABSTRACT.....	28
5.3 INTRODUÇÃO .....	29
5.4 MATERIAL E MÉTODOS .....	30
5.4.1 Germinação <i>in vitro</i> de <i>Alcea rosea</i> L. ....	30

5.4.2 Multiplicação <i>in vitro</i> de microestacas de <i>Alcea rosea</i> L.....	30
5.4.3 Enraizamento <i>in vitro</i> de microestacas de <i>Alcea rosea</i> L.....	31
5.4.4 Indução de calos em explantes foliares de <i>Alcea rosea</i> L. ....	31
5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
5.6 CONCLUSÕES.....	39
5.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40
<b>6 CAPÍTULO III - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO MEIO DE CULTURA NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES E MICROPROPAGAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE PLANTAS DE <i>DIANTHUS CARYOPHYLLUS</i> L..</b> .....	<b>43</b>
6.1 RESUMO .....	44
6.2 ABSTRACT .....	45
6.3 INTRODUÇÃO .....	46
6.4 MATERIAL E MÉTODOS .....	48
6.4.1 Germinação <i>in vitro</i> de <i>Dianthus caryophyllus</i> .....	48
6.4.2 Multiplicação <i>In Vitro</i> de <i>Dianthus Caryophyllus</i> .....	48
6.4.2.1 Fonte de explantes e meios para multiplicação: .....	48
6.4.2.2 Multiplicação <i>in vitro</i> de microestacas .....	48
6.4.3 Crescimento e Enraizamento <i>in vitro</i> de Plântulas de <i>Dianthus caryophyllus</i> . ....	49
6.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
6.5.1 Germinação <i>in vitro</i> .....	50
6.5.2 Multiplicação <i>in vitro</i> .....	51
6.5.3 Crescimento e enraizamento <i>in vitro</i> .....	54
6.6 CONCLUSÕES.....	56
6.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
<b>7 CAPÍTULO IV - MICROPROPAGAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE <i>ANTHURIUM ANDRAEANUM</i> L VR. 'BLACK QUEEN'</b> .....	<b>61</b>
7.1 RESUMO .....	62
7.2 ABSTRACT .....	63

7.3 INTRODUÇÃO .....	64
7.4 MATERIAL E MÉTODOS .....	65
7.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	68
7.5.1 Desinfestação dos Explantes para o estabelecimento <i>in vitro</i> de <i>Anthurium andraeanum</i> “Black Queen”.....	68
7.5.2 Idade da folha, posição do explante e Condições de Incubação .....	69
7.5.3 Meios para indução de embriogênese somática.....	71
7.6 CONCLUSÃO.....	75
7.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76
<b>8 CAPÍTULO V - BIOLOGIA FLORAL, SISTEMA REPRODUTIVO E POLINIZAÇÃO DE ARACEAE JUSS.: UMA REVISÃO. ....</b>	<b>82</b>
8.1 RESUMO .....	83
8.2 ABSTRACT .....	83
8.3 INTRODUÇÃO .....	84
8.4 METODOLOGIA .....	84
8.5 BIOLOGIA FLORAL .....	85
8.5.1 O Gênero <i>Anthurium</i> Schott.....	85
8.5.2 O Gênero <i>Philodendron</i> .....	87
8.6. POLINIZAÇÃO NATURAL EM ARÁCEAS.....	88
8.7 POLINIZAÇÃO ARTIFICIAL.....	92
8.8 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	93
8.9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	94

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

O mercado global de plantas ornamentais desempenha um papel fundamental na economia, este setor tem registrado um crescimento anual significativo, tornando-se um importante segmento econômico não apenas no Brasil, mas no mundo. O Brasil está entre os 15 maiores produtores de plantas ornamentais no mundo e concentra sua produção principalmente para o mercado interno (IBRAFLOR, 2022). A produção e venda de flores e plantas ornamentais representam um setor essencial do agronegócio brasileiro, com mais de 2,5 mil espécies e 17,5 mil variedades sendo produzidas. Em 2021, este mercado registrou um crescimento anual de 15%, alcançando um faturamento de aproximadamente 10,9 bilhões de reais (IBRAFLOR, 2022).

Nos últimos anos, houve um aumento no cultivo de plantas com múltiplas finalidades, sendo os principais: plantas para paisagismo, flores de corte e plantas em vaso, com um crescimento anual de 10% em 2020, gerando empregos significativos e contribuindo para a economia nacional. (IBRAFLOR, 2022).

Geralmente na produção de mudas de plantas ornamentais, ocorre diversos fatores que prejudicam o alcance de plantas com qualidade e padrão para serem comercializadas. Em métodos convencionais de propagação, a taxa de multiplicação de plantas pode ser limitada, pode ocorrer variação genética indesejada entre as plantas e em certas espécies vegetais, pode ser difícil obter material de propagação de alta qualidade e quantidade suficiente para atender à demanda. Fatores ambientais adversos também influenciam, como clima extremo, solo inadequado ou disponibilidade limitada de água e podem dificultar o cultivo de plantas (DEBNATH, MALIK; BISEN, 2006). Devido a todos estes fatores a micropropagação *in vitro* surge então como uma alternativa para contornar esses desafios.

A busca por meios alternativos como a micropropagação *in vitro* oferece vantagens significativas em relação à propagação convencional de plantas, como: a redução do risco de contaminação por patógenos do solo, água ou ar devido ao cultivo em ambientes estéreis. Aumento da taxa de multiplicação, uma única planta pode ser multiplicada rapidamente para produzir um grande número de mudas geneticamente idênticas em um curto período de tempo (AKIN-IDOWU, IBITOYE; ADEMOYEGUN, 2009).

Em técnicas de propagação convencionais, como a propagação por sementes por exemplo, pode ocorrer variação genética indesejada entre as plantas, com a utilização da técnica de micropropagação é possível garantir a uniformidade genética entre as mudas, pois são produzidos clones geneticamente idênticos a planta mãe, garantindo assim a uniformidade genética entre as mudas (CANÇADO et al., 2013).

Em certas espécies vegetais, pode ser difícil a obtenção de material de propagação de alta qualidade e quantidade suficiente para atender à demanda. A micropropagação permite a produção em massa de mudas a partir de uma pequena quantidade de tecido vegetal, superando as limitações de disponibilidade de material de propagação (KHATTAB et al., 2014; PERULLO et al., 2015). Fatores ambientais adversos, como clima extremo, solo inadequado ou disponibilidade limitada de água, podem dificultar o cultivo de plantas. Com a micropropagação, as plantas podem ser cultivadas em condições controladas em laboratório, independentemente das condições ambientais externas (LEMA-RUMIŃSKA; KULUS, 2014). Garantindo assim uma maior produtividade de mudas de melhor qualidade e conseqüentemente, de menor custo.

Em situações em que não há disponibilidade de sementes durante todo o ano, quando a produtividade de sementes é baixa ou quando há escassez de material vegetativo, a micropropagação pode ser empregada como uma alternativa viável para a produção em larga escala de mudas, especialmente para espécies ameaçadas de extinção (WOCHOK, 1981;

NIEMEYER, 2017). Em resumo, a micropropagação *in vitro* oferece uma alternativa promissora para superar os desafios associados à produção de plantas com qualidade, proporcionando um método eficiente, rápido e confiável para multiplicar plantas com características desejadas.

Entre os principais fatores que restringem a micropropagação *in vitro* de algumas espécies estão a escolha da fonte do explante, a formulação adequada do meio de cultura e a concentração dos reguladores de crescimento (BIDABADI; JAIN, 2020). O processo de micropropagação geralmente envolve várias etapas, incluindo o estabelecimento, a seleção e desinfestação dos explantes, a multiplicação, o enraizamento e a aclimação das plantas (CANÇADO et al., 2013). Outras limitações no estabelecimento incluem a alta taxa de contaminação por microrganismos indesejados e a oxidação dos explantes, o que é bastante comum na micropropagação de espécies lenhosas (SALLES et al., 2017).

A micropropagação baseia-se no princípio da totipotência celular, isso significa que uma única célula vegetal tem a capacidade de se multiplicar e gerar uma nova planta completa (THORPE, 2012). Células isoladas, protoplastos, fragmentos de folhas, brotos, tubérculos ou raízes, comumente chamados de explantes (provenientes da planta), podem ser empregados para gerar novas plantas, contanto que sejam cultivados em um meio de cultura contendo os nutrientes e os reguladores de crescimento apropriados e em um ambiente com condições controladas de acordo com a necessidade da espécie utilizada (AKIN-IDOWU; IBITOYE; ADEMOYEGUN, 2009).

Devido a todos esses fatores é de suma importância a realização de trabalhos para a elaboração de protocolos de acordo com cada espécie e que este seja eficiente e assim se consiga a produção de mudas de alta qualidade genética e fitossanitária em larga escala, contribuindo assim para atender à crescente demanda do mercado. Sendo assim esta tese foi desenvolvida com o objetivo da elaboração de protocolos para a germinação e micropropagação *in vitro* específicos para diferentes espécies ornamentais, contribuindo assim para a divulgação de informações de protocolos para a multiplicação da espécie.

A tese foi organizada em cinco capítulos, redigidos na forma de artigos científicos, descrito abaixo, onde dois artigos já foram publicados e os outros serão futuramente submetidos.

**Capítulo I** - Morfometria de frutos e sementes e germinação *in vitro* de sementes de *Alcea rosea* L.

**Capítulo II** - Estabelecimento de protocolos para a germinação e micropropagação *in vitro* de *Alcea rosea* L.

**Capítulo III** - Efeito da concentração do meio de cultura na germinação de sementes e micropropagação *in vitro* de plantas de *Dianthus caryophyllus*.

**Capítulo IV** - Micropropagação *in vitro* de *Anthurium andraeanum* L. vr. 'Black queen'.

**Capítulo V** - Biologia floral, sistema reprodutivo e polinização de araceae juss.: uma revisão.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA GERAL

### 2.1 O Mercado de Plantas Ornamentais

A expressão "espécie ornamental" designa plantas cultivadas por sua beleza, aplicáveis na arquitetura e no paisagismo de variados ambientes, adaptáveis tanto a espaços ao ar livre quanto a recipientes decorativos, estabelecendo uma conexão entre o ser humano e a natureza (SILVA et al., 2014).

O mercado de flores e plantas ornamentais apresenta uma ampla gama de produtos e serviços. Este setor, altamente competitivo, engloba diversas espécies adaptáveis a diferentes condições de solo e climas, tanto temperados quanto tropicais e subtropicais, que oferecem flores e folhagens destinadas a cortes, plantio em vasos, comercialização de sementes, bulbos e mudas de árvores de porte significativo (FRANÇA et al., 2010; BRAINER, 2019).

O mercado global de plantas ornamentais desempenha um papel crucial na economia, com principais produtores incluindo a Índia, China, União Europeia, Estados Unidos, Japão e México. A Holanda destaca-se como líder na exportação de plantas ornamentais, seguida por Colômbia, Equador, Quênia e Etiópia. Entre os maiores importadores estão Reino Unido, Alemanha, Estados Unidos, Holanda e França. O Brasil, como um dos 15 maiores produtores de plantas ornamentais, concentra sua produção principalmente para o mercado interno (IBRAFLOR, 2022).

A atividade de produção de flores e plantas ornamentais envolve cerca de 8 mil produtores, distribuídos em uma área total de 15,6 mil hectares, cultivando mais de 2,5 mil espécies e 17,5 mil variedades (IBRAFLOR, 2022). Os segmentos principais abrangem plantas ornamentais para paisagismo e jardinagem (24%), flores de corte (15%) e plantas em vaso (58%) (JUNQUEIRA; PEETZ, 2017; REIS et al., 2020; IBRAFLOR, 2022). Em 2020, o setor registrou um crescimento anual de 10%, alcançando um faturamento de aproximadamente 9,6 bilhões de reais. O estado de São Paulo lidera a produção e consumo nacionais, movimentando cerca de 3,5 bilhões de reais. O setor contribui significativamente para a economia, gerando mais de 209 mil empregos diretos e mais de 800 mil empregos indiretos (IBRAFLOR, 2022).

O crescimento do mercado de flores e plantas ornamentais no Brasil tem sido impulsionado principalmente pelas favoráveis condições climáticas, hídricas e de solo encontradas no país. Para atender à crescente demanda e às expectativas dos consumidores, a horticultura ornamental tem investido em tecnologias que possibilitam a produção de alta qualidade em ambientes protegidos (JUNQUEIRA; PEETZ, 2017). O aumento do consumo de flores e plantas ornamentais no Brasil teve um grande aumento por causa do aumento de renda da população, além disso, a venda de flores em supermercados e pela Internet, tornou o produto mais disponível e de fácil comercialização (NEVES; PINTO, 2015). Cerca de 50% dos consumidores brasileiros preferem plantas envasadas devido à sua durabilidade e versatilidade, podendo ser acomodadas tanto em ambientes internos quanto externos.

A produção de plantas ornamentais demanda a conjunção entre produtividade e a excelência sanitária e estética do produto. Nesse sentido, o produtor deve permanecer atualizado acerca das novas tecnologias disponíveis, como a produção de mudas *in vitro*, a introdução de novas variedades cultivadas, a prática de cultivo sem solo e a implementação de métodos de controle integrado de pragas, entre outras (MANTOVANI, et al., 2008).

O mercado brasileiro de plantas ornamentais está a todo vapor, em pleno crescimento, conforme revelado por um estudo realizado pelo Instituto Brasileiro de Floricultura (IBRAFLOR, 2022). As perspectivas para o futuro desse mercado são muito promissoras. De acordo com os dados dessa pesquisa, considerando o aumento da área cultivada e o crescimento

do Produto Interno Bruto (PIB) nacional, o Brasil tem potencial para estar entre os 10 maiores produtores do mundo nos próximos anos.

## 2.2 Cultura *In Vitro* de Tecidos Vegetais.

A cultura de tecidos *in vitro* tem como objetivo gerar uma nova planta geneticamente idêntica à original, através da clonagem vegetal, que consiste na propagação assexuada de células ou organismos para obter um novo indivíduo com o mesmo genótipo do ancestral comum (TORRES et al., 2000; POLESI, 2011). Esta é fundamentada na capacidade de totipotência das células vegetais, uma característica fundamental que descreve a habilidade intrínseca das células de plantas de se diferenciarem em todos os tipos de células necessárias para formar um organismo completo (NOGUEIRA, 2023). Em termos simples, as células vegetais totipotentes possuem o potencial de se transformar em qualquer tipo de célula especializada, seja de raiz, caule, folha ou flor, e de se desenvolver em um organismo adulto funcional.

Essa técnica envolve o cultivo de segmentos de plantas em recipientes como tubos de ensaio, que contêm um meio de cultura adequado. A partir desses segmentos, que podem incluir gemas, fragmentos de folhas, raízes ou ápices caulinares, é possível obter centenas a milhares de plantas geneticamente idênticas. Após o cultivo *in vitro*, essas plantas são retiradas dos tubos de ensaio, aclimatadas e então transferidas para o campo, onde seguem seu desenvolvimento normal (MELO BARROS, 2004).

Nos dias atuais, a técnica de cultura de tecidos representa uma ferramenta de grande utilidade para a clonagem de plantas em larga escala, contribuindo também para estudos de transformação genética e conservação de espécies vegetais. Isso resulta na produção de plantas saudáveis, vigorosas e geneticamente superiores, que podem ser reproduzidas em grande quantidade (GUIMARÃES, 2016).

O emprego dessa técnica está em constante expansão no mercado, visando atender à necessidade por mudas saudáveis e livres de patógenos em qualquer época do ano, ocupando menos espaço físico e tempo, e garantindo alta fidelidade genética, produtividade, uniformidade e desempenho no campo (ERIG; SCHUCH, 2005).

A técnica de cultivo *in vitro* é uma ferramenta biotecnológica utilizada para isolar e cultivar células, tecidos, órgãos e/ou plantas inteiras de forma asséptica em meio nutritivo, sob condições controladas de luz, temperatura e fotoperíodo (CARVALHO et al., 2011), possibilitando assim uma melhor compreensão da interação entre fatores ambientais, como nutrientes, luz e temperatura, e fatores genéticos e hormonais, contribuindo para o desenvolvimento de plantas saudáveis, vigorosas e geneticamente superiores, que podem ser reproduzidas em grande quantidade. Além disso, a cultura de tecidos é especialmente útil na multiplicação de espécies que apresentam dificuldades na propagação por métodos tradicionais (DUTRA, et al., 2009).

O sucesso dessa técnica depende de diversos fatores, incluindo a composição do meio de cultura, o ambiente de cultivo e o genótipo envolvido. Essa área da biotecnologia compreende diversos métodos de propagação vegetal em laboratório, sendo amplamente utilizada como ferramenta para estudar o metabolismo, a fisiologia, o desenvolvimento e a reprodução de plantas com características desejáveis, como resistência a pragas e produção de substâncias de interesse comercial (POLESI, 2011).

Para as diferentes técnicas aplicadas no cultivo *in vitro* são testadas diferentes formulações de meio de cultura, tipos e concentrações de reguladores de crescimento, tipos de explantes, métodos de assepsia do material vegetal e condições de incubação (SILVA; FERREIRA, 2016).

## 2.3 Germinação *In Vitro*

A fase de germinação desempenha um papel crucial na cultura *in vitro* de tecidos vegetais, servindo como uma estratégia promissora para a produção em massa de plantas. Tanto as características intrínsecas quanto os fatores ambientais influenciam as respostas de germinação e desenvolvimento de diversas espécies (KULKAMI et al., 2006).

A germinação *in vitro* de plantas é um processo essencial na biotecnologia vegetal, que envolve a germinação de sementes ou a proliferação de explantes vegetais em condições controladas de laboratório. Nesse método, as sementes ou explantes são cultivados em meios de cultura contendo nutrientes, vitaminas, reguladores de crescimento e outros componentes necessários para o desenvolvimento das plantas.

A germinação *in vitro* é particularmente útil em espécies cujas taxas de germinação em condições naturais são inadequadas para a obtenção de material vegetal destinado à experimentação ou ao atendimento das demandas comerciais. A dormência de sementes é um fator que pode reduzir essas taxas, dificultando o estabelecimento de culturas *in vitro*. Além disso, há plantas cujas sementes carecem de endosperma, requerendo associações com outros organismos para a nutrição inicial do embrião e o prosseguimento dos eventos metabólicos associados à germinação (COUTO et al., 2004; GUIMARÃES, 2016).

Muitas plantas são conhecidas por seu crescimento lento e baixa taxa de germinação de sementes. Portanto, a germinação *in vitro* de sementes torna-se indispensável, oferecendo maior uniformidade no processo germinativo (MEDEIROS et al., 2006; PÉREZMOLPHE-BALCH et al., 2015). Em comparação com a germinação em condições naturais, a germinação *in vitro* oferece vantagens significativas, como evitar problemas de aborto embrionário, reduzir o tempo necessário para o processo e aumentar a taxa e sincronização da germinação (RETES-PRUNEDA et al., 2007; REIS, et al., 2008).

O cultivo de plantas germinadas *in vitro* representa uma etapa importante para a aquisição de explantes juvenis com uma resposta morfogenética satisfatória e livre de contaminação. A germinação de sementes *in vitro* representa uma alternativa viável para a multiplicação da espécie, além de favorecer a preservação da variabilidade genética e o aumento da disponibilidade de mudas para viveiristas ou para fins de conservação (BARROSO, 2021).

Existem diferentes protocolos e técnicas para a germinação *in vitro*, que variam de acordo com a espécie vegetal e o tipo de explante utilizado. Em geral, o processo envolve a desinfecção dos explantes, o cultivo em meios de cultura apropriados, a manutenção das condições ideais de temperatura, umidade e iluminação, e o monitoramento do desenvolvimento das plantas ao longo do tempo (ZANELLO, 2018).

## 2.4 Micropropagação de Plantas Ornamentais

A micropropagação de plantas surge como uma opção para a propagação comercial de espécies de interesse econômico, sendo recomendada quando outras técnicas de propagação por métodos convencionais, como estaquia ou sementes apresentam dificuldades e não são eficazes para determinadas espécies (DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009).

Dentre os diversos grupos de plantas produzidas através das técnicas de propagação *in vitro*, as plantas ornamentais são as que tem maior destaque, provavelmente devido ao alto valor agregado do produto final (ZANELLO, 2018). Para cultivo comercial de plantas ornamentais, a micropropagação é uma técnica apresentada como alternativa para a produção de mudas de alta qualidade genética e fitossanitária, pois através de apenas um explante é possível produzir centenas e até mesmo milhares de mudas de alta qualidade, com espaço e tempo reduzidos (SOUZA et al., 2009). Sendo esta técnica ideal para multiplicação de clones de um espécime de características desejadas.

A produção de mudas por meio da micropropagação ocorre em condições assépticas e controladas, abrangendo nutrientes, luminosidade, fotoperíodo e temperatura. Essa técnica tem ganhado popularidade no mercado, e seu uso vem crescendo a cada dia visando atender à demanda por mudas saudáveis e livres de patógenos, disponíveis durante todo o ano, em tempo e espaços físicos reduzidos, com alta fidelidade genética, maior produtividade, uniformidade e desempenho consistente no campo (ERIG; SCHUCH, 2005).

O processo de micropropagação compreende essencialmente cinco etapas distintas: a) seleção de matrizes; b) coleta de material vegetal e estabelecimento *in vitro*; c) multiplicação ou proliferação de brotações axilares; d) alongamento e enraizamento *in vitro*; e) aclimatização (REBELO, 2020). No entanto, o êxito na obtenção de uma grande quantidade de mudas micropropagadas é influenciado por diversos fatores como a cultivar utilizada, pois cada espécie ou variedade se comporta de maneira diferente, sua condição genética e sanitária do material vegetal utilizado como fonte de explantes (matrizes), assim como a idade e o tipo dos explantes utilizados são aspectos críticos a serem considerados para que se alcance o estabelecimento *in vitro* bem-sucedido (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; PATI et al., 2006). Os explantes a serem utilizados podem ser gemas axilares, ápices caulinares e radiculares, segmentos nodais, e tecidos diferenciados (ASMAR, et al., 2011).

A concentração dos reguladores vegetais no meio de cultura, juntamente com a concentração de sais, açúcares e a natureza física do meio (sólido ou líquido), também afetam significativamente o crescimento e desenvolvimento das plantas (PEREZ, 2001). Além das condições ambientais tanto no cultivo *in vitro* quanto na aclimatização *ex vitro* (COSTA; PEREIRA, 2023).

Os meios de cultura utilizados desempenham um papel crucial na micropropagação, fornecendo às plantas os nutrientes necessários para seu crescimento e desenvolvimento *in vitro*. São compostos por uma variedade de substâncias orgânicas e inorgânicas que atendem às demandas energéticas, metabólicas e estruturais das células vegetais. Esses meios são enriquecidos com componentes como água, sais inorgânicos contendo macro e micronutrientes, carboidratos, vitaminas e reguladores de crescimento vegetal, além de outros aditivos como carvão ativado (NASCIMENTO, 2022). Essa combinação equilibrada de nutrientes e reguladores de crescimento é essencial para promover a proliferação celular e a diferenciação dos tecidos vegetais, permitindo o sucesso da micropropagação.

Os fito-reguladores que são acrescentados no meio de cultura possuem como objetivo suprir a insuficiência de hormônios nos explantes isolados (GRIMALDI, 2009). Há diversas formulações de meios de cultura que são empregadas para diferentes espécies, sendo as auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico e etileno componentes vitais que influenciam o sucesso do cultivo *in vitro* (REIS et al., 2008). Os reguladores vegetais, como auxinas e citocininas, são os mais importantes e amplamente utilizados na cultura de tecidos vegetais desempenhando um papel fundamental na regulação do crescimento e morfogênese das plantas, estes têm sido empregados com sucesso na propagação *in vitro* de diversas espécies (GEORGE et al. 2008; RAI et al., 2011).

Segundo Rebelo (2020), as auxinas são empregadas para induzir a divisão e a expansão celular, bem como a organogênese e a embriogênese somática. Geralmente, em concentrações de maior presença de auxinas é favorecido a iniciação das raízes (rizogênese). Já na presença de maior quantidade de citocininas em relação às auxinas no meio, visa promover a divisão celular, induzir a diferenciação dos brotos adventícios e a proliferação dos brotos axilares, liberando as gemas axilares da dominância apical (SKOOG; MILLER, 1957). Quando a relação entre as duas classes de reguladores de crescimento é equimolar ocorre o desenvolvimento dos calos (MARTINS et al., 2012).

O estabelecimento *in vitro* de espécies ornamentais apresentam muitos desafios, com algumas limitações, como a oxidação dos explantes e contaminações endógenas e exógenas

(SATO et al., 2001). A contaminação microbiana, proveniente do contato dos explantes com o ar e o solo, representa uma dificuldade significativa no processo (DANTAS; OLIVEIRA; CÂMARA, 2002; SALLES et al., 2017). A resistência dos microrganismos aos procedimentos de desinfestação pode resultar em uma baixa taxa de sobrevivência dos explantes durante as fases iniciais de introdução e estabelecimento (CAMPOS et al., 2007). Uma alternativa para reduzir os altos índices de contaminação nessa fase é o uso de material vegetal originado de sementes germinadas em condições assépticas (XAVIER; OTONI; PENCHEL, 2007; AZEVEDO, 2018).

Para a desinfestação *in vitro*, são empregados diversos procedimentos e produtos, sendo os mais utilizados o etanol (70%) devido seu alto potencial germicida e o hipoclorito de sódio em várias concentrações (DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009). A eficiência no uso desses produtos químicos durante a desinfestação é crucial, por isso é necessário que se tenha protocolos eficientes para o uso dos produtos químicos durante a desinfestação, determinando o tempo e a concentração ideais para controlar as contaminações, minimizando danos aos explantes e garantindo o sucesso no estabelecimento *in vitro* (SALLES et al., 2017).

#### **2.4.1 Rotas morfogenéticas *in vitro***

Na micropropagação a embriogênese somática e a organogênese são vias de regeneração que tem como principal vantagem a multiplicação de plantas em grandes proporções (GURGEL, 2017). Tanto a organogênese quanto a embriogênese somática podem ocorrer diretamente do explante ou através da fase intermediária de calo (OLIVEIRA, 2020.). Na via direta, a regeneração é iniciada a partir de tecidos dos explantes, enquanto na via indireta, ocorre uma etapa anterior à regeneração conhecida como calogênese. O calo é formado por um grupo de massas celulares pouco diferenciadas antes da regeneração do indivíduo (TORRES et al., 2000; NASCIMENTO, et al., 2022). A embriogênese somática pode ser obtida através do cultivo de explantes em meio sólido ou líquido, de forma direta ou indireta, sendo que a forma direta não passa pelo estágio de formação de calo.

Na embriogênese, células somáticas originam embriões análogos aos embriões zigóticos (NASCIMENTO, et al., 2022). Embora a embriogênese possa resultar em maiores quantidades de plantas em comparação com a organogênese, nem todas as espécies apresentam uma resposta favorável a essa técnica. Além disso, há uma certa dificuldade em estabelecer sistemas de embriogênese reproduzíveis em larga escala (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; SHAHZAD et al., 2017).

##### **2.4.1.1 Organogênese**

A organogênese é uma rota de regeneração amplamente empregada na cultura de tecidos, consistindo na formação de órgãos vegetais, como brotos ou raízes, a partir de uma ou mais células. É um processo monopolar, no qual ocorre o desenvolvimento de uma parte por vez e há uma conexão vascular com o explante (KERBAUY, 1997). Quando o explante já contém células meristemáticas ou meristemas pré-existentes, ocorre a organogênese direta; enquanto que, se houver a formação de calo antes da diferenciação das células competentes, ocorre a organogênese indireta (PERES, 2001).

De acordo com Nodari, 2016, na organogênese direta as gemas ou primórdios de gemas existentes são estimulados a proliferar sem que haja a desdiferenciação dos tecidos dos explantes, já na organogênese indireta ocorre a indução de tecidos desdiferenciados (calos) a partir dos tecidos dos explantes, novas gemas e eixos caulinares se desenvolvem a partir desses calos. É importante observar que, para a organogênese indireta, ao contrário da direta, há uma

fase de desdiferenciação seguida por uma reprogramação celular (rediferenciação) para a formação dos novos tecidos e órgãos.

A organogênese é influenciada por um equilíbrio hormonal entre as citocininas, que promovem o crescimento dos brotos, e as auxinas, que estimulam o crescimento das raízes (ANDRADE et al., 2000). Na primeira etapa, a desdiferenciação inicial de células dos explantes resulta em células ou grupos de células competentes, ou seja, capazes de responder aos efeitos estimuladores do meio de cultura para a formação de gemas, compreendendo a fase de indução (fase 2). Na terceira fase, a transferência destas células já competentes para meios indutores de gemas torna-as determinadas, isto é, comprometidas com uma rota específica de desenvolvimento. As células, a partir desta etapa, diferenciam-se em primórdios de gemas, mesmo se transferidas para meios não indutores (RIOS, 2016).

A organogênese é uma técnica vantajosa em comparação com métodos convencionais de propagação clonal, pois possibilita uma rápida e eficiente multiplicação de plantas a partir de um único explante (LUIS, 2016). Porém, atualmente o processo de obtenção de organogênese *in vitro* é em grande parte empírico, requerendo testes específicos para cada espécie em relação à fonte do explante, composição mineral do meio de cultura (incluindo suas vitaminas e fontes de carbono), equilíbrio hormonal e condições ambientais (PERES, 2002).

#### **2.4.1.2 Embriogênese somática**

A embriogênese somática inicia-se com a etapa da indução embriogênica de uma única ou grupo de células somáticas, resultando em uma estrutura bipolar, contendo meristemas apicais aéreos e radiculares, diferenciados em polos opostos (radicular e parte aérea) simultaneamente (WILLIAMS et al., 1986; NASCIMENTO, 2022). De maneira geral, este modelo morfogenético inicia com a seleção e ativação de células embriogênicas competentes (modelo direto) ou com a indução de calos (modelo indireto) e progride de forma análoga àquela observada para a embriogênese zigótica (NODARI, 2016).

Este processo passa por etapas distintas, incluindo indução, multiplicação, maturação e germinação. Para induzir a formação das massas pró-embriogênicas, é necessário estimular o explante por meio de estímulos físicos, químicos ou fisiológicos, geralmente utilizando combinações de reguladores de crescimento das classes auxinas e citocininas, os quais controlam a proliferação celular (PINHAL et al., 2011). Além disso, as citocininas desempenham um papel crucial no estabelecimento da estrutura bipolar nos embriões, assim como na melhoria do desenvolvimento embrionário após a indução do embrião somático (REE; GUERRA, 2015). O equilíbrio hormonal entre os reguladores de crescimento determina se a diferenciação celular ocorrerá e qual rota regenerativa será seguida. Portanto, o efeito fisiológico sobre o explante é primariamente influenciado pela concentração desses reguladores no meio de cultura (TERMIGNONI, 2005; NASCIMENTO, 2022).

A embriogênese somática proporciona uma produção em larga escala de plantas, resultando em uma significativa redução do custo por unidade de muda produzida (GUAN et al., 2016). É uma técnica de suma importância na pesquisa biológica, viabilizando estudos sobre o desenvolvimento fisiológico, resistência a doenças e pragas, sobre o genoma, metabolismo, proteômica, epigenético e outras áreas da pesquisa. Além disso, é a única técnica de propagação vegetativa que gera mudas clonais com raízes pivotantes (BONGA, 2010; COSTA, 2019; PARK).

Essa técnica possui diversas outras aplicações, como a produção de sementes sintéticas, a conservação de germoplasma, proporcionando flexibilidade aos programas de melhoramento genético, e a manipulação genética para o desenvolvimento de plantas transgênicas (ANDRADE, 2002). Também é empregada no rejuvenescimento de clones com características

desejáveis, mas que apresentam desvantagens, como baixa taxa de enraizamento ou crescimento plagiotrópico das mudas (PAIS, 2019).

Sob condições adequadas, os embriões somáticos podem ser obtidos de forma sincronizada, apresentando um alto grau de uniformidade clonal e conformidade genética, o que confere à embriogênese somática uma relevância ímpar na propagação de plantas (MOURA, 2016).

Para se desenvolver um protocolo eficiente, tanto para a embriogênese somática quanto para a organogênese, é um processo árduo e laborioso, pois é essencial adaptar as técnicas para cada espécie, uma vez que cada espécie apresenta exigências específicas quanto ao protocolo ideal (CARVALHO et al., 2011). Isso se deve à influência do genótipo das plantas utilizadas na cultura de tecidos, exigindo ajustes nas condições de cultivo, composição do meio nutritivo, tipo e concentração de reguladores vegetais, além do tipo de explante, uma vez que as características genéticas de cada espécie determinam respostas diferentes ao cultivo *in vitro* (ESTRADA-LUNA et al. 2008; GURGEL, 2017).

A cultura *in vitro* de plantas ornamentais tem sido objeto de diversos estudos, visando a otimização dos protocolos de micropropagação. Os resultados desses estudos indicam que a escolha dos reguladores de crescimento e das condições de cultura pode influenciar significativamente a eficiência de diferentes processos como da multiplicação e regeneração de brotos, entre outros (COLOMBO, et al., 2010).

### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKIN-IDOWU, P., IBITOYE, D.; ADEMOYEGUN, O. Tissue culture as a plant production technique for horticultural crops. **African J. Biotechnol.** 8, 3782–3788, 2009.
- ANDRADE, S. R. M. Princípios da cultura de tecidos vegetais. **Planaltina: Embrapa Cerrados**, p. 14, 2002.
- ANDRADE, M.W. et al. Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr.All). **Ciência Agrotecnica**, v.24, n.1, p.174-80, 2000.
- ASMAR, S. A, RESENDE, R. F, ARARUNA, E. C, MORAIS, T. P.; LUZ, J. M. Q. Citocininas na multiplicação *in vitro* de hortelã-pimenta (*Mentha x Piperita* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 533-538, 2011.
- AZEVEDO, M. L. **Micropropagação e enraizamento de miniestacas de mogno africano** (*Khaya ivorensis* A. Chev). Dissertação (Mestrado), Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, MG, 2018.
- BARROSO, A. M. F. Caracterização Morfológica e Germinação de Sementes de *Beaucarnea Recurvata* Lem. **Trabalho de Conclusão de Curso**, Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, 2021.
- BIDABADI, S. S.; JAIN, S. M. Cellular, molecular, and physiological aspects of *in vitro* plant regeneration. **Plants** v.9, n.6, e702, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants9060702>.
- BRAINER, M.S.C.P. Flores e plantas ornamentais. **Caderno Setorial ETENE**. Ano 4, n. 95, 2019.
- CANÇADO, G. M.; BRAGA, F. T.; SOUZA, R. A. V.; NUNES, C.F.; RIBEIRO, A. P.; SOARES, B. D. F. Cultivo *in vitro* da oliveira e suas aplicações. In: Oliveira, A. F. (Ed.). *Oliveira no Brasil: tecnologias de produção*. **Belo Horizonte: Epamig**, p. 275-310. 2013.
- CAMPOS, R. A. S.; AÑEZ, L. M. M.; DOMBROSKI, J. L. D.; DIGNART, S. L. Micropropagação de *Jatropha elliptica* (Pohl) Müll. Arg. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9, p. 30-36, 2007.
- COSTA, A. O. **Estabelecimento de sistemas de regeneração *in vitro* de flamboyant** [*Delonix regia* (Bojer ex Hook) Raf.]. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Goiás; 2019.
- CARVALHO, A.C.P.P. et al. Glossário de cultura de tecidos de plantas. **Plant Cell Culture; Micropropagation**, v.7, p.30-60, 2011.
- COLOMBO, L. A., ASSIS, A. M. D., FARIA, R. T. D.; ROBERTO, S. R. Estabelecimento de protocolo para multiplicação *in vitro* de Bastão-do-imperador (*Etilingera elatior*) Jack RM Sm. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 32, p. 695-700, 2010.
- COSTA, F. D. S.; PEREIRA, J. **Propagação clonal *in vitro* de abacaxizeiros: metodologias e aplicações para a obtenção de mudas em larga escala**. 2023.
- COUTO, J.M.F. et al. Desinfestação e germinação *in vitro* de sementes de mogno (*Swietenia macrophylla* King). **Revista Árvore**, v.28, n.5, p.633-642, 2004.
- DANTAS, S.; OLIVEIRA, S.; CÂMARA, T. Contaminação microbiana no cultivo *in vitro* de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 10, p. 391-407, 2002.

- DEBNATH, M., MALIK, C.; BIEN, P. Micropropagation: A Tool for the Production of High-Quality Plant-based medicines. **Curr. Pharm. Biotechnol.** 7, 33–49, 2006.
- DUTRA, L. F.; WENDLING, I.; BRONDANI, G. E. A micropropagação de eucalipto. **Pesquisa Florestal Brasileira**, n. 58, p. 49-49, 2009.
- ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Estabelecimento *in vitro* de mirtilo a partir de segmentos nodais. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 6, n. 1/2, p. 91-96, 2005.
- ESTRADA-LUNA, A. A., DE JESÚS MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, J., TORRES-TORRES, M. E.; CHABLE-MORENO, F. *In vitro* micropropagation of the ornamental prickly pear cactus *Opuntia lanigera* Salm-Dyck and effects of sprayed GA3 after transplantation to *ex vitro* conditions. **Scientia Horticulturae**, v. 117, p. 378-385, 2008.
- FRANÇA, C. A. M.; SOUZA, M. P.; PEDROSO, E. A.; SILVA, T. N.; SOUZA FILHO, T. A. Flores e folhagens tropicais: mercado em expansão. **V Encontro Nacional de Anppas**, Florianópolis, 18p. 2010.
- GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. Plant Propagation by Tissue Culture The Background. **Dordrecht: Springer**, 504p. 2008.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. 1ed. Brasília: **EMBRAPA**. p. 183-260. 1998.
- GRIMALDI, F. **Propagação *in vitro* cultivar packham's triumph (*Pyrus communis*, L.).** 74 F. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal), Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2009.
- GUAN, Y.; LI, S. G.; FAN, X. F.; SU, Z. H. Application of somatic embryogenesis in woody plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. 398, 2016.
- GUERRA, M. P.; TORRES, A. C. e TEIXEIRA, J. B. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. 1 ed. Brasília: **Embrapa**, 1999, p.533-568. 1998.
- GUIMARÃES, D. T. **Germinação *in vitro*, desenvolvimento inicial e micropropagação de cereus jamacaru em meios de cultura simplificados.** Monografia - Universidade Federal de Campina Grande. 2016.
- GURGEL, Z. E. D. R. **Micropropagação e conservação de *Comanthera mucugensis* Giul. subsp. mucugensis.** Tese (Doutorado), Universidade Estadual de Feira de Santana, BA. 2017.
- IBRAFLO. **Instituto Brasileiro de Floricultura.** O mercado de flores no Brasil. Disponível em: [https://www.ibraflor.com.br/\\_files/ugd/b3d028\\_2ca7dd85f28f4add9c4eda570adc369f.pdf](https://www.ibraflor.com.br/_files/ugd/b3d028_2ca7dd85f28f4add9c4eda570adc369f.pdf). Acesso em: 20/01/2023.
- JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, M. Brazilian consumption of flowers and ornamental plants: habits, practices and trends. **Ornamental Horticulture**, v. 23, n. 2, p. 178-184, 2017.
- KERBAUY, Gilberto Barbante. Clonagem de plantas *in vitro*. **Biotechnology Ciência e Desenvolvimento**, v. 1, n. 1, p. 30-33, 1997.
- KHATTAB, S., EL SHERIF, F., EL-GARHY, H. A., AHMED, S.; IBRAHIM, A. Genetic and phytochemical analysis of the *in vitro* regenerated *Pilosocereus robinii* by **ISSR, SDS-PAGE and HPLC.** **Gene** v. 533 p. 313-321, 2014.
- LEMA-RUMIŃSKA, J.; KULUS, D. Micropropagation of cacti - A review. **Haseltonia** v. 19, p. 46-63, 2014.

- LUIS, B. M. S. **Physalis peruviana: ensaios de cultura *in vitro* e hibridação**. Dissertação de Mestrado, Universidade de Coimbra, Portugal, 2016.
- MANTOVANI, N., GRANDO, M. F., SUZIN, M., AUGUSTIN, L.; CALVETE, E. O. Micropropagação de plantas ornamentais. **Plantas ornamentais-aspectos para a produção. 2ª ed. Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo**, p. 70-91, 2008.
- MEDEIROS, L. A., DE RIBEIRO, R. C. S., GALLO, L. A., OLIVEIRA, E. T.; DEMATTE, M. E. S. P. *In vitro* propagation of *Notocactus magnificus*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.84. p.165-169, 2006.
- MELO BARROS, M. A. **A Experimentação e a Utilização de Ambientes Virtuais de Estudo na Aprendizagem de Conceitos sobre Clonagem Vegetal**. Dissertação (mestrado), Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2004.
- MOURA, L. C. **Indução de embriões somáticos em *Eucalyptus spp.*** 83f. Tese (Doutorado em Ciência Florestal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG. 2016.
- NASCIMENTO, G. S., RUAS, I. L., MARCHI, M. N. G., BATISTA, K. R., LEITE, M. C. B.; SCHNADELBACH, A. S. Morfogênese *in vitro* de duas espécies de orquídeas da Chapada Diamantina-BA. **Revista RG News**, v. 8, p. 2, 2022.
- NASCIMENTO, L. L. P. **Indução da embriogênese somática de Jenipapeiro**. Dissertação (Mestrado em Agricultura e Biodiversidade) - Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, SE, 2022.
- NIEMEYER, R. P. **Germinação, micropropagação e aclimatização de *Lobelia brasiliensis* A. O. S. Vieira; Shepherd (*Campanulaceae*), espécie ameaçada e endêmica do Distrito Federal com potencial ornamental**. ii, 77 f., il. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade de Brasília, Brasília, 2017.
- NODARI, R. O. **Principais técnicas de cultura de órgãos e tecidos vegetais**. Tese (Doutorado), Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC, 2016.
- NOGUEIRA, L. S. **Atividades antioxidante e anti-inflamatória *in vitro* de extratos de células-tronco vegetais obtidos a partir de calos de *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner**. Dissertação (Mestrado) Universidade Vila Velha, ES. 2023.
- OLIVEIRA, I. M. **Obtenção de calos embriogênicos de uma cultivar de feijão-caupi adaptada ao semiárido brasileiro**. Monografia, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, RN 2020.
- PAIS, M. S. Somatic embryogenesis induction in woody species: the future after OMICs data assessment. **Frontier Plant Science**, v. 28, 2019.
- PARK, Y. S, BONGA, J. M. **Application of somatic embryogenesis in forest management and research**. 2010.
- PATI, P. K.; RATH, S. P.; SHARMA, M.; SOOD, A.; AHUJA, P. S. *In vitro* propagation of rose – a review. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 94-114, 2006.
- PERES, L. E. P. Bases fisiológicas e genéticas da regeneração de plantas *in vitro*. **Biociência**, v. 4, n. 25, p. 44-48, 2002.

- PERES, L. E., MORGANTE, P. G., VECCHI, C., KRAUS, J. E.; VAN SLUYS, M. A. Shoot regeneration capacity from roots and transgenic hairy roots of tomato cultivars and wild related species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 65, p. 37-44, 2001.
- PEREZ-MOLPHE-BALCH, E. et al. Tissue culture of ornamental cacti. **Scientia Agrícola**, v.72, n.6, 2015.
- PERULLO, N., DETERMANN, R. O., CRUSE-SANDERS, J. M.; PULLMAN, G. S. Seed cryopreservation and micropropagation of the critically endangered species swamp pink (*Helonias bullata* L.). **In Vitro Cellular; Developmental Biology-Plant**, v. 51, p. 284-293, 2015.
- PINHAL, H. F.; ANASTÁCIO, M. R.; CARNEIRO, P. A. P.; SILVA, V. J.; MORAIS, T. P.; LUZ, J. M. Q. Aplicações da cultura de tecidos vegetais em fruteiras do Cerrado. **Ciência Rural**, n. 7, p. 1136-1142, 2011.
- POLESI, N.P.E. Microrganismos endofíticos e a cultura de tecidos vegetais: quebrando paradigmas. **Revista brasileira de Biociências**, v.9, n.4, p.533-541, 2011.
- RAI, M.K.; SHEKHAWAT, N. S.; GUPTA, H. A. K.; PHULWARIA, M.; RAM, K.; JAISWAL, U. The role of abscisic acid in plant tissue culture: a review of recent progress. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 106, p. 179-190, 2011.
- REBELO, D. C. C. **Micropropagação e avaliação da estabilidade genética da *Tuberaria lignosa***. Dissertação de Mestrado. 2020.
- REE, J. F.; GUERRA, M. P. Palm (Arecaceae) somatic embryogenesis. **In Vitro Cellular and Developmental Biology—Plant**, v. 51, p. 589-602, 2015.
- REIS, J. M. R.; CHALFUN, N. N. J.; LIMA, L. C. de O.; LIMA, U. C. Efeito do estiolamento e do ácido indolbutírico no enraizamento de estacas do porta-enxerto *Pyrus calleryana* Dcne. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n. 4, p. 931-938, 2000.
- REIS, S.; REIS, M.; V.; NASCIMENTO, Â. M. P. Pandemic, social isolation and the importance of people-plant interaction. **Ornamental horticulture**, v. 26, p. 399-412, 2020.
- REIS, E. S.; PINTO, J. E. B. P.; ROSADO, L. D. S.; CORRÊA, R. M. Influência do meio de cultura na germinação de sementes *in vitro* e taxa de multiplicação de *Melissa officinalis* L. **Revista Ceres**, vol. 55, n.3, p.160-167, 2008.
- RETES-PRUNEDA, J. L., DE LOURDES VALADEZ-AGUILAR, M., PÉREZ-REYES, M. E.; PÉREZ-MOLPHE-BALCH, E. Propagación *in vitro* de espécies de *Echinocereus*, *Escontria*, *Mammillaria*, *Melocactus* y *Polaskia* (Cactaceae). **Boletín de la Sociedad Botánica de México**, v. 81, p.9-16, 2007.
- RIOS, A. P. D. S. **Morfogênese *in vitro* e germinação em arbóreas nativas da mata atlântica ameaçadas de extinção**. Tese (Doutorado), Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ. 2016.
- SALLES, E. A. P. B.; ALCANTARA, G. B.; QUOIRIN, M. G. G.; GONÇALVES, A. N.; HIGA, A. R. Desinfestação e introdução *in vitro* de segmentos nodais de *Acacia mearnsii*. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 37, n. 92, p. 485-491, 2017. DOI: <https://doi.org/10.4336/2017.pfb.37.92.1392>.
- SATO, A. Y.; DIAS, H. C. T. ANDRADE, L. A.; SOUZA, V. C. Micropropagação de *Celtis* sp: controle da contaminação e oxidação. **Cerne**, v.7, n.2, p.117-23, 2001.

- SHAHZAD, A.; PARVEEN, S.; SHARMA, S.; SHAHEEN, A.; SAEED, T., YADAV, V.; ...; UPADHYAY, A. Plant Biotechnology: Principles and Applications. 1 ed. **Singapore: Springer**, p. 37-72, 2017.
- SILVA, E. I.; SANTOS, J.; CONCEIÇÃO, G. Diversidade de plantas ornamentais no centro de estudos superiores de Caxias, da Universidade Estadual do Maranhão. **Enciclopédia Biosfera**, v. 10, n. 18, 2014.
- SILVA, M.M.A.; FERREIRA, L.T. **Cultivo *in vitro* de plantas e suas aplicações em cactáceas**. Campina Grande: INSA, 32p. 2016.
- SOUZA, J. C. A. V.; BARROSO, D. G.; CARNEIRO, J. G. A.; TEIXEIRA, S. L.; BALBINOT, E. Propagação vegetativa de cedro-australiano (*Toona ciliata* M. Roemer) por miniestaquia. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 33, n. 2, p. 205-213. 2009.
- TERMIGNONI, R. R. **Cultura de tecidos vegetais**. 1 Ed. Porto Alegre: UFRGS, 2005
- TORRES, F. J. B., SCHMILDT, O., SCHMILDT, E. R., GONTIJO, A. B. P. L., OLIVEIRA, V. D. S., COELHO, R. I.; AMARAL, J. A. T. D. Regeneração *in vitro* do tomateiro 'alambra' f 1. **Nucleus (16786602)**, v. 17, n. 2, 2020.
- TORRES, A.C et al. Glossário de biotecnologia vegetal. Brasília: **Embrapa Hortaliças**, 128 p. 2000.
- THORPE, Trevor. History of plant tissue culture. In: Plant Cell Culture Protocols. **Humana Press**, Totowa, NJ, p. 9-27. 2012.
- XAVIER, A.; OTONI, W.C.; PENCHEL, R.M. Micropropagação e enxertia *in vitro* de espécies florestais. In: BORÉM, A. (Ed.) Biotecnologia Florestal. **Viçosa: Editora UFV**, p.55-74, 2007.
- WOCHOK Z.S. The role of tissue culture in preserving threatened and endangered plant species. **Biol Conserv.**, v.20, p.83–89, 1981.
- WILLIAMS, E. S.; MAHESWARAN, B. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. **Annals of Botany**, v. 57, p. 443- 462, 1986.
- ZANELLO, C. A. **Propagação *in vitro* de orquídeas Phalaenopsis por segmentos de inflorescências e embriogênese somática**. Dissertação, Universidade Federal De São Carlos, SP, 2018.

## 4 CAPÍTULO I

### FRUIT AND SEED MORPHOMETRY AND IN VITRO GERMINATION OF HOLLYHOCK SEEDS

FERREIRA, T. S.; PÊGO, R. G.; MARTINS, R. C. F. Fruit and Seed Morphometry and in Vitro Germination of Hollyhock Seeds. **Fronteiras: Journal of Social, Technological and Environmental Science**, v. 12, n. 2, p. 98-107, 10 ago. 2023. DOI: <https://doi.org/10.21664/2238-8869.2023v12i2.p98-107>

#### 4.1 ABSTRACT

*Alcea rosea* L. is an ornamental shrubs that has many possible uses, including medical purposes. This species is mainly propagated by seeds, however, there are few studies that describe their morphometric characteristics, in addition, previous reports show that they have dormancy that makes the germination difficult. Therefore, this work aimed to determine the morphological characteristics of the fruit and seeds of *A. rosea* and to evaluate its *in vitro* seeds germination under different pregerminative methods in different culture media. For the morphological description, 25 fruits or seeds were evaluated. For the *in vitro* germination in the MS and WPM culture media, the pregerminative treatments were: T1 - untreated seeds (control); T2 - mechanical scarification (cut in the seed coat); T3 - thermal scarification (immersion of the seeds in water at 60 °C for 16 min). The experimental design was completely randomized, in a 3x2 factorial scheme (pregerminative treatments x culture media), with eight replications and twenty seeds per replication. A visual scale was proposed to classify the seedlings vigor. The schizocarp hollyhock fruit is flattened and its diameter is greater than its height, and each fruit contains 33 seeds, on average. The seeds have approximately 4.2 mm in length and 100 seeds weight, on average, 0.89 g. The culture medium does not influence the seeds germination and the pregerminative treatments are not necessary for the germination. However, the mechanical scarification promoted the best germination speed index and the production of more vigorous plants.

**Keywords:** *Alcea rosea* L., seeds dormancy, scarification, vigor scale, medicinal.

#### 4.2 RESUMO

A *Alcea rosea* L. é um arbusto ornamental que tem muitas possibilidades de usos, incluindo fins medicinais. Essa espécie é propagada principalmente por sementes, no entanto, existem poucos estudos que descrevem suas características morfométricas, ademais, relatos anteriores mostram que elas têm dormência que dificulta a germinação. Portanto, este trabalho teve como objetivos determinar as características morfológicas dos frutos e sementes de *A. rosea* e avaliar a germinação *in vitro* de suas sementes sob diferentes métodos pré-germinativos em diferentes meios de cultura. Para a descrição morfológica, foram avaliados 25 frutos ou sementes. Para a germinação *in vitro* nos meios de cultura MS e WPM, os tratamentos pré-germinativos foram: T1 - sementes não tratadas (controle); T2 - escarificação mecânica (corte no tegumento); T3 - escarificação térmica (imersão das sementes em água a 60 °C por 16 min). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3x2 (tratamentos pré-germinativos x meios de cultura), com oito repetições e vinte sementes por repetição. Uma escala visual foi proposta para classificar o vigor das mudas. O fruto esquizocarpo da alcea é achatado e seu diâmetro é maior que sua altura, e cada fruto contém, em média, 33 sementes. As sementes têm comprimento aproximado de 4,2 mm e 100 sementes pesam, em média, 0,89 g. O meio de cultura não influencia a germinação das sementes e não é necessário o uso de tratamento pré-germinativo para a germinação. Entretanto, a escarificação mecânica promoveu o melhor índice de velocidade de germinação e a produção de plantas mais vigorosas.

**Palavras-chave:** *Alcea rosea* L., dormência de sementes, escarificação, escala de vigor, medicinal.

### 4.3 INTRODUCTION

*Alcea rosea* L., popularly known as hollyhock, is an ornamental shrubs traditionally grown under full sun, which can be used in massive beds, as border along walls or as isolated plants in gardens (LORENZI, 2015; EVIK ; RUSSAK, 2019). Hollyhock plants are 2-3 m tall and produce up to 40 flowers daily; they have high stately ornaments and produce large single, semi-double, or double flowers of many different colors; moreover, they have a long period of flowering (LI *et al.*, 2012; FAHAMIYA *et al.*, 2016; ORAEE *et al.*, 2019).

Beyond beauty, the hollyhock produces edible flowers that are used to make tea, which taste is slightly bitter (NEWMAN ; O'CONNOR, 2009); besides that, it has a great folkloric medicinal history in the East Mediterranean, where all parts of the plants are used due to their medicinal properties such as their antioxidant, antimicrobial, antiviral and hepatoprotective actions, among others (AZAB, 2016; ABDEL-SALAM *et al.*, 2018; KALEMBA-DROŹDŹ ; CIERNIAK, 2019).

The hollyhock is acropetal (basal flowers open first) and the seeds must be harvested from ripe fruits (JOHRI ; RAGHUVANSHI, 2014). However, there are few works showing the morphometric description of its fruit and seeds, and it is very important for the management of seeds technology and breeding (BRASIL, 2009; LI *et al.*, 2012; FAHAMIYA *et al.*, 2016).

This species is often propagated by seeds, however, there are reports that indicate the presence of dormancy that inhibits its germination (BRASIL, 2009; FAHAMIYA *et al.*, 2016; BATTAL *et al.*, 2019). This fact may happen due to the impermeability of the integument to water, considered one of the main causes of dormancy in some species of the Malvaceae family (ENSCONET, 2009).

Different pregerminative methods have been used to overcome seeds dormancy such as scarification (mechanical, chemical or thermal) and the soaking of seeds in water (SHOOSHTARIAN ; SALEHI, 2010; TIWARI *et al.*, 2016). Among the pregerminative treatments in hollyhock seeds, the scarification can be used through a pin-pricking or by cutting the seed coat with the aid of a scalpel, enabling the water absorption to increase the germination rates (BRASIL, 2009). Hot water (60-80 °C) is an alternative to improve the seed germination of others species of the same botanic family, nevertheless, boiling water (100 °C) can cause sensitive damage to the seeds (McDONNELL *et al.*, 2012).

The *in vitro* seeds germination can be a technique to optimize the propagation that is limited by other methods, and, it has been widely used to obtain seedlings of species of limited germination (LEE *et al.*, 2013; PÉGO *et al.*, 2015; PRUDENTE *et al.*, 2015; BATTAL *et al.*, 2019). Many different basic media formulations have been used for the *in vitro* propagation of ornamental plants. The MS medium (MURASHIGE ; SKOOG, 1962) is the most used one in the micropropagation of many species, however, for the seeds germination stage, it has been modified or diluted. On the other hand, the WPM medium (LLOYD ; MCCOWN, 1980) has shown good results in the seed germination of native species or of other species that are sensitive to high salt concentrations, possibly due to the fact that it contains neither cobalt nor iodine micronutrients and it has 4 times less nitrogen in comparison to MS (LARRABURU, 2012, KOENE *et al.*, 2019).

Previous studies have shown that the *in vitro* seed germination of *Alcea sp.* is influenced by the composition of the substrate; and it seems that these seeds are sensitive to the osmotic variations of the culture medium. Negative responses to *A. officinalis* seed germination were observed when sucrose was added in the medium (YOUNESIKELAKI *et al.*, 2016). The use of adequate methods to overcome the seed dormancy as well as the appropriate germination in the culture media, enable to obtain high quality and to achieve the classification of vigorous plants. The seedlings classification is a parameter that helps to choose the methodology or the plants for stages of the *in vitro* multiplication or even for the conservation of species.

There are few studies on the propagation of hollyhock, therefore, this work aimed to determine the morphological characteristics of the fruit and seeds of *A. rosea*; and to evaluate the in vitro germination of its seeds under different pregerminative methods in different culture media.

#### 4.4 MATERIAL AND METHODS

Ripe fruits of hollyhock were harvested and taken to the laboratory for their morphological characterization and biometric analysis. The metric dimensions of fruits and seeds were carried out with the aid of a graduated caliper. The biometric data were obtained from 25 replications of fruits or seeds and subjected to quantitative analysis. For the morphological description, it was observed the form and the color of the fruits. The 1000-seeds weight was determined according to BRASIL (2009).

The seeds were selected and those visibly empty or attacked by pests were retained. The selected ones were used in the in vitro germination, and for it, the following pregerminative methods were tested: T1 - untreated seeds (control); T2 - mechanical scarification by cutting the seed coat with a scalpel, according to BRASIL (2009); T3 - thermal scarification by the immersion of the seeds in hot water (60 °C) for 16 min, which were later kept still until they cooled naturally and reached room temperature (25 °C).

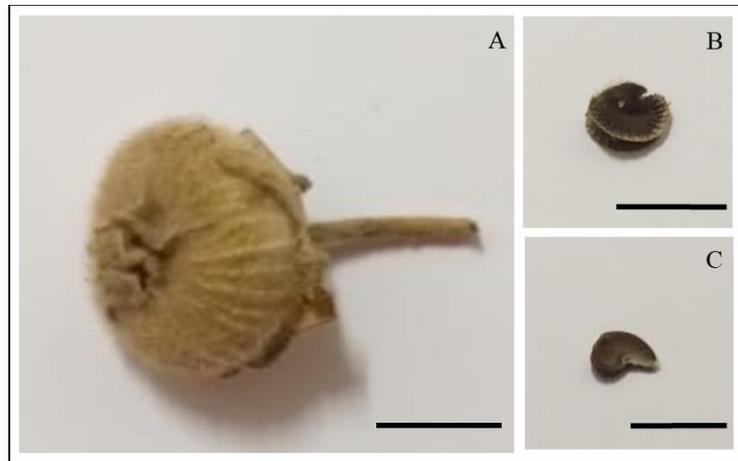
After the pre-treatments, the seeds were sterilized under flow cabinet with 70% ethanol for 5 min, followed by sodium hypochlorite 2.5% (v/v) for 15 min and washed three times with sterile distilled water. The sterilized seeds were placed in sterile flasks containing 20 mL of culture medium. The MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) and WPM - Woody Plant Medium (LLOYD; MCCOWN, 1981) mediums were used. Both media were prepared with the addition of 30 g L<sup>-1</sup> of sucrose and 7 g L<sup>-1</sup> of agar, and the pH was adjusted to 5.8 before being sterilized in autoclave for 20 min at 121 °C. After the inoculation, the seeds were kept in a growth chamber at 30 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> of photons irradiance, 25 °C ± 2 °C of temperature, and under 16-hour photoperiod provided by fluorescent lamps (OSRAM®, similar to daylight).

The germination data were registered daily and at the end of the observation period (seven days after the inoculation), the germination (%) and the germination speed index (GSI) were calculated according to MAGUIRE (1962). A classification to discriminate the vigor of seedlings was proposed, as follows: high vigor (HV) - seedlings with the presence of primary root and with completely open cotyledon leaves; medium vigor (MV) - seedlings with short primary root and shoot in the beginning of development; and low vigor (LV) - seedlings with the beginning of the radicle emission and with no shoot emitted.

The experimental design was completely randomized, in a 3 x 2 factorial scheme (three pregerminative treatments and two culture media), with eight replications and twenty seeds per replication. The data were subjected to the analysis of variance and the means were compared by the Tukey's test at 5% probability level, using the statistical program Sisvar (FERREIRA, 2011).

#### 4.5 RESULTS AND DISCUSSION

The hollyhock fruits are schizocarp (Figure 1A), with a persistent cálix that turns brown on ripening; which occurs at different periods over the cycle because of the acropetal flowering (JOHRI ; RAGHUVANSHI, 2014). Inside the fruits are produced many mericarps arranged radially (Figure 1B), with a black seed in each one of them (Figure 1C).



**Figure 1.** Schizocarpic fruit (A), mericarp (B) and seed (C) of hollyhock. Bars: A = 1.0 cm; B and C = 0.5 cm.

Hollyhock fruits (schizocarp) are small and flattened and their diameter is greater than their height, and each fruit contains 33 seeds, on average. The seeds are homogeneous with approximately 4.2 mm in length and 100 seeds weight, on average, 0.89 g (Table 1), equivalent to 113 seeds per gram.

**Table 1.** Fruit diameter (FD), fruit height (FH), number of seeds per fruit (NSF), seed length (SL), seed width (SW) and 1000-seeds weight (1000-SW) of hollyhock.

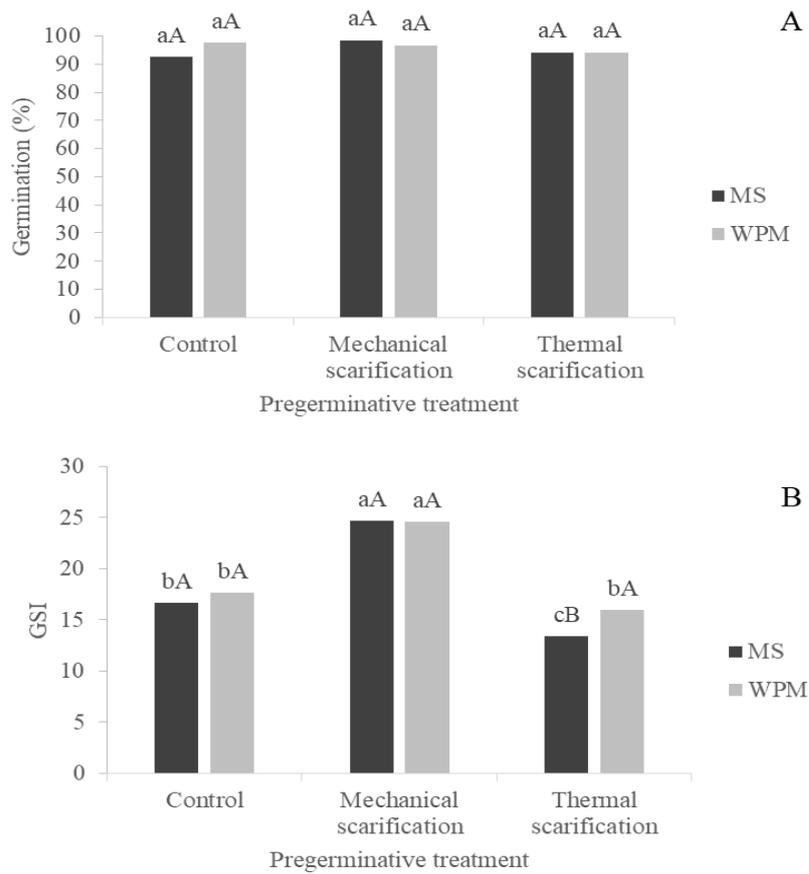
	FD (mm)	FH (mm)	NSF -	SL (mm)	SW (mm)	1000-SW (g)
Maximum	22.92	8.75	37.00	4.48	3.26	9.04
Average	20.70	7.95	32.52	4.19	2.97	8.88
Minimum	18.70	7.00	22.00	3.87	2.64	8.61
CV (%)	4.74	6.66	8.41	3.97	5.89	1.61

The seed germination of *A. rosea* started two days after the inoculation on the MS and WPM culture media. In this study, it was observed that, even though the culture medium does

not influence the hollyhock seeds germination, it seems that there is no dormancy, as frequently reported in the literature, because even in the untreated seeds, the germination was higher than 93% (Figure 2A).

Despite the fact that previous studies reported that hollyhock has coat dormancy, through the observation of 1% of germination when no pregerminative treatment was used (SHOOSHTARIAN ; SALEHI, 2010), a study shows that the in vitro germination improves the germination of hollyhock seeds (*A. rosea*), when the tegument is partially removed with a scalpel, reaching 80% of germination (KEW, 2019). Similarly, the germination rates of *Alcea kurdica* can reach 90% after the treatment with a cut in the seed (BATTAL *et al.*, 2019).

The pregerminative treatments influenced significantly the GSI (Figure 2B). There was a significant interaction among the pregerminative treatments and the culture media. It was observed that the highest GSI was achieved when the seeds were treated by the mechanical scarification, regardless the culture medium. However, when the seeds were treated with the thermal scarification, the GSI was slightly higher in the WPM medium compared to MS. There was no significant difference in the GSI between culture media in the untreated seeds. It seems that the mechanical scarification enables the quick absorption of water, in order to allow the faster germination process in comparison to the other pregerminative treatment methods (URSULINO *et al.*, 2019).



**Figure 2.** Germination (A) and germination speed index (GSI) (B) of hollyhock seeds grown in different culture media. Mean values followed by different capital letters between the media and lowercase letters among the pregerminative treatments significantly differ from each other by the Tukey’s test at 5%.

A scale to classify the quality of the seedlings was established (Figure 3). According to the rules for seed analysis (BRASIL, 2009), a seedling is normal when it has all the essential structures and when it is properly developed and healthy. The standardization of the quality of seedlings has a wide application in agriculture because it ensures that vigorous materials with physiological quality are efficiently classified. There are no visual standards to classify the hollyhock seedlings quality, therefore, the development of a visual scale may help in future studies of this species, whether for in vitro propagation or for seed technology and analysis, in which other types of seeds are used. The development of visual scales helps to minimize mistakes during the seeds classification, minimizing the subjectivity in the essay (BRASIL, 2009; MARCOS FILHO, 2015).



**Figure 3.** Visual scale of the vigor of hollyhock seedlings: high vigor (A); medium vigor (B) and low vigor (C). Bars = 1 cm.

There was a significant interaction among the pregerminative treatments and the culture media. The mechanical scarification allowed the production of high vigor seedlings in the MS and in the WPM media (Table 2). However, the highest percentages of low vigor seedlings were found in the intact seeds or in the ones treated with hot water (60 °C), regardless the medium used.

**Table 2.** Vigor classifications of in vitro hollyhock seedlings obtained from seeds submitted to pregerminative treatments and grown on different culture media.

Treatment	HV (%)		MV (%)		LV (%)	
	MS	WPM	MS	WPM	MS	WPM
Control	11 bA*	19 bA	5 bB	17 bA	78 aA	59 aA
Mechanical scarification	51 aA	39 aA	21 aB	33 aA	26 bA	23 bA
Thermal scarification	12 bA	6 bA	6 bB	22 bA	77 aA	67 aA
CV (%)	7.1		5.8		3.3	

\* Mean values followed by different capital letters between the media and lowercase letters among the pregerminative treatments significantly differ from each other by the Tukey's test at 5%.

There was a relationship between the GSI (Figure 2B) and the vigor classifications of the seedlings detected through the visual scale of hollyhock. This happened because plants that germinate quickly have a better capacity to show their physiological potential in optimal conditions of seed germination (MARCOS FILHO, 2015). The classification of vigor, based on the visual scale, allowed to detect more accurate physiological expressions than those only presented by the maximum seed germination. Besides that, many studies correlate plant

morphology with the successful micropropagation of many species, suggesting the selection of plants with stronger morphological characteristics (YOUNESIKELAKI *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2019; KOENE *et al.*, 2019).

In practice, this new scale of vigor proposed for hollyhock allows to identify the seedlings that have a greater potential to be selected for future stages of seedlings production, such as *in vitro* multiplication. In addition, this methodology is the first proposal for rating the vigor of seedlings of hollyhock, which contributes to other areas of research, such as seed technology.

#### **4.6 CONCLUSIONS**

The schizocarp hollyhock fruit is flattened and its diameter is greater than its height, and each fruit contains 33 seeds, on average. The seeds have approximately 4.2 mm in length and 100 seeds weight, on average, 0.89 g.

The culture medium does not influence the seeds germination and the seeds do not need any pregerminative treatment to germinate. However, the mechanical scarification promoted the best germination speed index and the production of more vigorous plants.

#### 4.7 REFERENCES

- ABDEL-SALAM, A. A. et al. Flavonoids of *Alcea rosea* (L.) and their immune stimulant, antioxidant and cytotoxic activities on hepatocellular carcinoma HepG-2 cell line. **Natural Product Research**, v. 32, n. 6, p. 702–706, 2018. Available from: <<https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1332602>>. Accessed: Nov. 27, 2022. doi: 10.1080/14786419.2017.1332602.
- AZAB, A. ALCEA: Traditional medicine, current research and future opportunities. **European Chemical Bulletin**, v. 5, n. 12, p. 505-514, 2016. Available from: <<http://dx.doi.org/10.17628/ecb.2016.5.505-514>>. Accessed: Nov. 29, 2022. doi: 10.17628/ecb.2016.5.505-514.
- BATTAL, A. et al. Tıbbi Öneme Sahip Hatmiler İçin Etkili Bir Çımlendirme Yöntemi: Tohum Kabuğuna Çentik Atılması. **Bitlis Eren Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi**, v. 8, n. 3, p. 843-851, 2019. Available from: <<https://doi.org/10.17798/bitlisfen.544221>>. Accessed: Nov. 27, 2022. doi: 10.17798/bitlisfen.544221.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNAD/DNDV/CLAV, 2009. 399p. Available from: <[https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/arquivos-publicacoes-insumos/2946\\_regras\\_analise\\_\\_sementes.pdf](https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/arquivos-publicacoes-insumos/2946_regras_analise__sementes.pdf)>. Accessed: Nov. 27, 2022.
- FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. 1 ed. Porto Alegre: Artmed, 323p. 2004.
- ENSCONET. **Curation Protocols; Recommendations**. Royal Botanic Gardens, Kew (Eds.), 2009. 45p. Available from <[http://brahmsonline.kew.org/Content/Projects/msbp/resources/Training/ENSCONET\\_Curation\\_protocol\\_English.pdf](http://brahmsonline.kew.org/Content/Projects/msbp/resources/Training/ENSCONET_Curation_protocol_English.pdf)>. Accessed: Nov. 25, 2022.
- EVİK, K.; RUSSAK, H. 100 years of horticulture in Tallinn Botanic Garden. In: TOMSONE, S. **Baltic Botanic Gardens**. Periodical issue of the University of Latvia. Riga: University of Latvia Press, p.56-61. 2019.
- FAHAMIYA, N. et al. A comprehensive review on *Althaea rosea* Linn. **Indo American Journal of Pharmaceutical Research**, v. 6, n. 11, p. 6888-6894, 2016.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: A computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v.35, n. 6, p.1039-1042, 2011. Available from <<https://doi.org/10.1590/S1413-70542011000600001>>. Accessed: Nov. 29, 2022. doi: 10.1590/S1413-70542011000600001.
- JOHRI, A.; RAGHUVANSHI, R. K. Floral biology, Pollination and Breeding system in *Alcea rosea* (L.) syn. *Althaea chinensis* Wall. (Malvaceae). **The international journal of plant reproductive biology**, v. 6, n. 2, p. 139-144, 2014. Available from: <<https://pdfs.semanticscholar.org/db05/237a1bc2aeb399c84e1bdfd4f999b3fda86e.pdf>>. Accessed: Nov. 27, 2019. doi: 10.14787/ijprb.2014.6.2.139-144.

KALEMBA-DROŽDŽ, M.; CIERNIAK, A. Antioxidant and genoprotective properties of extracts from edible flowers. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 58, n. 1, p. 42–50, 2019. Available from: <<http://dx.doi.org/10.13140/RG.2.2.17195.49442/1>>. Accessed: Nov. 30, 2022. doi: 10.13140/RG.2.2.17195.49442/1.

KEW - ROYAL BOTANIC GARDENS. **Banco de dados de informações de sementes**. 2019. Available from: <<http://data.kew.org/sid/sidsearch.html>>. Accessed: sep. 9, 2022.

KOENE, F. M. et al. Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of *Acianthera prolifera* (Orchidaceae). **African Journal of Botany**, v. 121, n. 1, p. 83–91, 2019. Available from: <<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.07.019>>. Accessed: Nov. 25, 2022. doi: 10.1016/j.sajb.2018.07.019.

LARRABURU, E. E. et al. *In vitro* propagation of pink lapacho: response surface methodology and factorial analysis for optimisation of medium componentes. **International Journal of Forestry Research**, v. 1, n. 1, p. 1-9, p. 2012. Available from: <<https://doi.org/10.1155/2012/318258>>. Accessed: Nov. 07, 2022. doi: 10.1155/2012/318258.

LEE, H. et al. Comparison of seed viability among 42 species stored in a genebank. **Korean Journal of Crop Science**, v. 58, n. 4, p. 432-438, 2013. Available from: <<http://dx.doi.org/10.7740/kjcs.2013.58.4.432>>. Accessed: Nov. 27, 2022. doi: 10.7740/kjcs.2013.58.4.432.

LI, Q. et al. Floral morphology and mating system of *Alcea rosea* (Malvaceae). **Plant Ecology and Evolution**, v. 145, n. 2, p. 176–184, 2012. Available from: <<https://doi.org/10.5091/plecevo.2012.651>>. Accessed: Nov. 29, 2022. doi: 10.5091/plecevo.2012.651.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Combined Proceedings of International Plant Propagators Society**, v. 30, p. 421-427, 1980. Available from: <<https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19830315515>>. Accessed: Nov. 27, 2022.

LORENZI, H. **Plantas para jardim no Brasil: herbáceas, arbustivas e trepadeiras**. 2 ed. Instituto plantarum, Nova Odesa, 1120p. 2015.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination - aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v.2, p.176-177, 1962. Available from: <<https://doi.org/10.2135/cropsci1962.0011183X000200020033x>>. Accessed: Nov. 30, 2022. doi: 10.2135/cropsci1962.0011183X000200020033x.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. 2. ed., Londrina: ABRATES, 660p. 2015.

McDONNELL, A. et al. Effects of hot water on breaking seed dormancy of the endangered kankakee mallow, *Iliamna Remota* Greene (Malvaceae). **Erigenia**, n. 25, p. 8–13, 2012. Available from: <<https://core.ac.uk/download/pdf/154505916.pdf>>. Accessed: Nov. 25, 2022.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-479, 1962. Available from: <<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>>. Accessed: Nov. 30, 2022. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.

NEWMAN, S. E.; O'CONNOR, A. S. Edible flowers. Gardening series. Flowers. **Colorado State University, Extension**, v. 1, n. 7.237, p. 1-5, 2009. Available from: <<https://extension.colostate.edu/docs/pubs/garden/07237.pdf>>. Accessed: Nov. 05, 2022.

ORAEE, T. et al. Alleviation of drought stress effects by exogenous application of spermidine and salicylic acid on hollyhock (*Alcea rosea*). **Journal of Ornamental Plants**, v. 9, n. 4, p. 303-318, 2019. Available from: <[http://jornamental.iaurasht.ac.ir/article\\_667494.html](http://jornamental.iaurasht.ac.ir/article_667494.html)>. Accessed: Nov. 30, 2022.

PÊGO, R. G.; PAIVA, P. D. O.; PAIVA, R. In vitro seed germination and seedlings development of *Syngonanthus elegans* and *Syngonanthus elegantulus*. **Acta Horticulturae**, v. 1083, p. 249-254, 2015. Available from: <<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2015.1083.30>>. Accessed: Nov. 27, 2022. doi: 10.17660/ActaHortic.2015.1083.30.

PRUDENTE, D. O. et al. Germinação *in vitro* e aclimatização de sempre-viva. **Plant Cell Culture and Micropropagation**, Lavras, v. 11, n. 2, p. 62-69, 2015.

SHOOSHTARIAN, S.; SALEHI, H. Enhancing *Alcea aucheri* (Boiss.) Alef. seed germination by application of some scarification treatments. **Advances in Environmental Biology**, v. 4, n. 2, p. 216-219, 2010.

SILVA, T. D. et al. Morphophysiological *in vitro* performance of Brazilian ginseng (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen) based on culture medium formulations. **In vitro cellular ; developmental biology - plant**, v. 55, n. 4, p. 454-467, 2019. Available from: <<https://doi.org/10.1007/s11627-019-10003-9>>. Accessed: Nov. 30, 2022. doi: 10.1007/s11627-019-10003-9.

TIWARI, A. K. et al. Seed dormancy in ornamental plants: a review. **Indian Journal of Agricultural Sciences**, v. 86, n. 5, p. 580-592, 2016.

URSULINO, M. M. et al. Superação de dormência e vigor em sementes de Fava-d'Anta (*Dimorphandra gardneriana* Tulasne). **Ciência Florestal**, v. 29, n. 1, p. 105-115, 2019. Available from: <<http://dx.doi.org/10.5902/1980509810460>>. Accessed: Nov. 05, 2022. Epub May 30, 2019. doi: 10.5902/1980509810460.

YOUNESIKELAKI, F. S. et al. Optimization of seed surface sterilization method and *in vitro* seed germination in *Althaea officinalis* (L.) - an important medicinal herb. **Indian Journal of Science and Technology**, v. 9, n. 28, p. 1-6, 2016. Available from: <<https://indjst.org/articles/optimization-of-seed-surface-sterilization-method-and-in-vitro-seed-germination-in-althaea-officinalis-l-an-important-medicinal-herb>>. Accessed: Nov. 27, 2022. doi:10.17485/ijst/2016/v9i28/90896.

## **5 CAPÍTULO II**

### **ESTABELECIMENTO DE PROTOCOLOS PARA A GERMINAÇÃO E MICROPROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE *ALCEA ROSEA* L.**

## 5.1 RESUMO

A alcea (*Alcea rosea* L.) é uma espécie explorada para fins ornamentais e medicinais que apresenta dificuldades de produção de mudas por vias vegetativas, sendo a micropropagação uma alternativa para sua propagação. Portanto esse trabalho objetivou elaborar um protocolo para a germinação, multiplicação, enraizamento e indução de calos para avaliar o potencial morfogênético de *A. rosea* L. em condições *in vitro*. Para a germinação *in vitro* foram avaliados os seguintes tratamentos: T1- (MS<sub>Total</sub>); T2 - ( $\frac{1}{2}$  MS); T3 - (WPM<sub>Total</sub>), T4 - ( $\frac{1}{2}$  WPM). Para a fase de multiplicação *in vitro* das microestacas, foram testados o meio MS suplementado com 0 mg L<sup>-1</sup> (controle) (T1), 1,0 mg L<sup>-1</sup> (T2), 2,0 mg L<sup>-1</sup> (T3) e 3,0 mg L<sup>-1</sup> (T4) BAP (6-benzilaminopurina). Para o enraizamento *in vitro* o meio MS foi suplementado com diferentes concentrações de ácido indol-3-butírico (AIB), como se segue: T1) MS sem adição de AIB nas concentrações de 0 mg L<sup>-1</sup> (controle); 0,5 mg L<sup>-1</sup> (T2), 1,0 mg L<sup>-1</sup> (T3), 1,5 mg L<sup>-1</sup> (T4) e 2,0 mg L<sup>-1</sup> (T5). Para a indução de calos e avaliação do potencial morfogênético *in vitro*, foram utilizados explantes de raiz e folha inoculadas em meio MS foi suplementado 1,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,5 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D (T1) ou 0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 1,0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D (T2). Após 7 dias houve 100% de germinação, não havendo diferenças estatísticas para a taxa ou velocidade de germinação entre os tratamentos. Os meios de cultura MS e WPM nas concentrações originais ou diluídas possibilita a germinação *in vitro* de 100% das sementes. O meio MS com 100% ou 50% da concentração de sais possibilita a produção de maiores números de raízes e folhas, enquanto que o meio WPM (100%) possibilita a produção eficiente de raízes e plantas com maior comprimento de raízes e parte aérea. O MS suplementado com 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP possibilitou a maior brotação de estacas de *A. rosea*, sendo indispensável o uso desse regulador para a indução de brotações. O meio MS suplementado com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de AIB é o mais indicado para a rizogênese possibilitando a indução de raízes em 100% dos explantes. O meio MS suplementado com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D foi onde os explantes cultivados apresentaram maior potencial morfogênético *in vitro*. Esse protocolo apresenta metodologias eficientes para a produção de mudas micropropagadas de *A. rosea* com potencial para atender as demandas do mercado.

**Palavras-chave:** Cultura de tecidos vegetais. Planta medicinal. Espécie ornamental. Calogênese.

## 5.2 ABSTRACT

*Alcea* (*Alcea rosea* L.) is a species used for ornamental and medicinal purposes that presents difficulties in producing seedlings by vegetative means, and micropropagation is an alternative for its propagation. Therefore, this study aimed to develop a protocol for germination, multiplication, rooting and callus induction to evaluate the morphogenetic potential of *Alcea rosea* L. under in vitro conditions. For in vitro germination, the following treatments were evaluated: T1- (Total MS); T2 - ( $\frac{1}{2}$  MS); T3 - (Total WPM), T4 - ( $\frac{1}{2}$  WPM). For the in vitro multiplication phase of microcuttings, the MS medium supplemented with 0 mg L<sup>-1</sup> (control) (T1), 1,0 mg L<sup>-1</sup> (T2), 2,0 mg L<sup>-1</sup> (T3) and 3,0 mg L<sup>-1</sup> (T4) BAP (6-benzylaminopurine) was tested. For in vitro rooting, the MS medium was supplemented with different concentrations of indole-3-butyric acid (IBA), as follows: T1) MS without addition of IBA at concentrations of 0 mg L<sup>-1</sup> (control); 0,5 mg L<sup>-1</sup> (T2), 1,0 mg L<sup>-1</sup> (T3), 5,0 mg L<sup>-1</sup> (T4) and 2,0 mg L<sup>-1</sup> (T5). For callus induction and evaluation of the in vitro morphogenetic potential, root and leaf explants inoculated in MS medium supplemented with 1,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,5 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D (T1) or 0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 1,0 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D (T2) were used. After 7 days, there was 100% germination, with no statistical differences in the germination rate or speed between treatments. The MS and WPM culture media at original or diluted concentrations allow 100% in vitro germination of seeds. The MS medium with 100% or 50% salt concentration allows the production of greater numbers of roots and leaves, while the WPM medium (100%) allows the efficient production of roots and plants with greater root and shoot length. The MS medium supplemented with 2,0 mg L<sup>-1</sup> of BAP allowed the greatest sprouting of *A. rosea* cuttings, making the use of this regulator essential for inducing sprouting. The MS medium supplemented with 1,0 mg L<sup>-1</sup> of IBA is the most suitable for rhizogenesis, allowing root induction in 100% of the explants. The MS medium supplemented with 1,0 mg L<sup>-1</sup> of 2,4-D showed the greatest in vitro morphogenetic potential. This protocol presents efficient methodologies for the production of micropropagated seedlings of *A. rosea* with the potential to meet market demands.

**Keywords:** Plant tissue culture. Medicinal plant. Ornamental species. Callogenesis.

### 5.3 INTRODUÇÃO

*Alcea rosea* L., conhecida popularmente como malva-rosa, é um arbusto ornamental tradicionalmente cultivado a pleno sol, da família Malvaceae, apreciada por suas vistosas flores em tons de rosa, vermelho, branco e amarelo, que se difundiram pela sua aplicação em jardins residenciais e públicos (LI et al., 2012; FAHAMIYA et al., 2016).

As plantas de *A. rosea* L. podem chegar a mais de 2 m de altura e produzem até 40 flores diariamente; podendo estas serem flores simples, semi-duplas ou duplas de muitas cores diferentes; além disso, possuem um longo período de floração (LI et al., 2012; FAHAMIYA et al., 2016; ORAEE et al., 2019) (Figura 1).



**Figura 1.** Aspecto geral de haste floral de *Alcea rosea*. Fonte: Adaptado de Azadeh et al. (2024).

Além da beleza, a malva-rosa produz flores comestíveis que são utilizadas para fazer chás, cujo sabor é levemente amargo (NEWMAN; O'CONNOR, 2009) ou usadas na composição de fármacos para o controle dos sintomas de tosse, e ainda com ações antioxidantes, antimicrobianas, anti-inflamatórias, sedativos, analgésicos e antibióticos, entre outros (AZADEH et al., 2024). Além disso, possui uma grande história medicinal folclórica no Mediterrâneo oriental, onde todas as partes das plantas são utilizadas devido às suas propriedades medicinais, como ação antioxidante, antimicrobiana, antiviral, hepatoprotetora, entre outras (AZAB, 2016; ABDEL-SALAM et al., 2018; KALEMBA-DROŹDŹ; CIERNIAK, 2019).

A propagação dessas plantas se dá majoritariamente por sementes cuja literatura tem relatado a dificuldade de germinação pela presença de dormência (FAHAMIYA et al., 2016; BATTAL et al., 2019), no entanto mais recentemente foi constatado que a germinação *in vitro* de *Alcea rosea* permite a alta germinabilidade de sementes sendo uma técnica recomendada para essa espécie (FERREIRA et al., 2023).

Para a propagação *in vitro*, tanto o meio Murashige e Skoog (MS) (MURASHIGE; SKOOG, 1962) quanto o meio Woody Plant Medium (WPM) (LLOYD; McCOWN, 1980), na sua composição original ou em diluições, têm sido usados para a produção de muitas espécies. Para *Alcea* estudos têm sido realizados utilizando meios MS e WPM com sucesso (TARIQ et al., 2024; FERREIRA et al., 2023; FAHAMIYA et al., 2016), no entanto esses estudos têm sido utilizados para etapas específicas como a germinação de sementes ou a calogêneses.

Para *A. rosea* L. a multiplicação *in vitro*, utilizando microestacas, é uma técnica promissora para obter mudas mais rápida e eficiente uma vez que essas plantas têm crescimento durante a fase vegetativa do tipo roseta e a produção de brotos não é comum. O processo de multiplicação *in vitro* de microestacas envolve a utilização de pequenos segmentos de tecido

vegetal retirados de uma planta-matriz saudável e cultivados em condições assépticas em meio de cultura apropriado (DIAS, et al., 2012). Esses segmentos, chamados de microestacas, contêm células meristemáticas responsáveis pelo crescimento e desenvolvimento das plantas, o que permite a sua regeneração em novas plantas completas (SOUZA, 2020).

O sucesso da multiplicação *in vitro* de *A. rosea* L., depende da formulação adequada do meio de cultura que deve conter nutrientes essenciais, como sais minerais, vitaminas, carboidratos e reguladores de crescimento (NASCIMENTO, 2022). Os reguladores de crescimento, como citocininas e auxinas, desempenham um papel crucial na micropropagação *in vitro*, pois o uso adequado desses reguladores, em concentrações específicas, pode aumentar significativamente a eficiência da multiplicação e morfogênese *in vitro* (RAI et al., 2011).

Dada a importância dessa espécie que apresenta múltiplos usos e apontados a importância de obter mudas de alta qualidade fitossanitária e em grandes quantidades o objetivo deste trabalho foi elaborar um protocolo mais eficiente para a germinação, multiplicação *in vitro* a partir de microestacas e avaliação da indução de calos para a avaliar o potencial morfogênico de *A. rosea* L. em condições *in vitro*.

## 5.4 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.4.1 Germinação *in vitro* de *Alcea rosea* L.

As sementes *A. rosea* L. foram desinfestadas, em álcool etílico 70% (v/v), por 5 minutos e, em seguida, imersas em hipoclorito de sódio 2,5% (v/v), por 10 minutos. Em câmara de fluxo laminar, as sementes foram lavadas três vezes, em água destilada autoclavada, sendo, posteriormente, inoculadas em meio. O delineamento experimental foi de 4 tratamentos com 10 repetições, e cada parcela experimental foi composta por dois tubos de ensaio, em cada tubo foi colocado 10 ml de meio e apenas uma semente. Os meios utilizados foram o MS e WPM em diferentes concentrações. Os tratamentos consistiram em: T1 - (MS<sub>Total</sub>); T2 - (½ MS); T3 - (WPM<sub>Total</sub>), T4 - (½ WPM). Aos meios foram acrescidos de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e solidificado com 7 g L<sup>-1</sup> de ágar. O pH do meio foi ajustado para 5,8, antes da autoclavagem sob pressão de 1,5 atm e à temperatura de 121 °C, por 20 minutos.

Em seguida, os tubos foram levados para sala de crescimento e mantidos sob fotoperíodo de 16/8 horas de luz/escuro e intensidade luminosa de 25 µmol.m<sup>-2</sup>. s<sup>-1</sup>, à temperatura de 25 ± 1 °C. Após 30 dias da inoculação foram avaliados: a porcentagem de germinação (%) e o índice de velocidade de germinação (IVG) de acordo com Maguire (1962), Número de Raízes (NR), Número de Folhas (NF), Comprimento da Raiz (CR), Comprimento do Broto (CB) e % de plantas com presença de calos.

Os dados obtidos na experimentação foram submetidos à análise de variância utilizando o software estatístico SISVAR®, e as médias foram comparadas utilizando o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

### 5.4.2 Multiplicação *in vitro* de microestacas de *Alcea rosea* L.

Para a multiplicação *in vitro* de *A. rosea*, foram utilizados microestacas com aproximadamente 1,0 cm de comprimento provenientes de mudas micropropagadas.

Foram testados meios de cultura MS com a concentração total de sais suplementados com citocinina BAP (6-benzilaminopurina) nas concentrações de 0 mg L<sup>-1</sup> (controle) (T1), 1,0 mg L<sup>-1</sup> (T2), 2,0 mg L<sup>-1</sup> (T3) e 3,0 mg L<sup>-1</sup> (T4). Aos meios de cultura foram adicionados com 30 g/L<sup>-1</sup> de sacarose e solidificados com 7 g L<sup>-1</sup> de ágar e usando 10ml por tubo de ensaio. O

pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem. Em seguida os meios foram esterilizados em autoclave a 121 °C e 1,5 atm de pressão por 20 minutos.

A inoculação dos explantes foi realizada em câmara de fluxo laminar, colocando-se uma microestaca por tubo. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com 4 tratamentos e 10 repetições, e cada parcela experimental foi composta por dois tubos de ensaio. Em seguida, os tubos contendo os explantes foram levados para sala de crescimento e mantidos sob fotoperíodo de 16/8 horas de luz/escuro e intensidade luminosa de 25  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , à temperatura de  $25 \pm 1$  °C. Após 40 dias da inoculação foram observados os seguintes parâmetros: Número de Brotos (NB) e Número de folhas (NF).

Os dados obtidos na experimentação foram submetidos à análise de variância utilizando o software estatístico SISVAR®, e as médias foram comparadas utilizando o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

#### **5.4.3 Enraizamento *in vitro* de microestacas de *Alcea rosea* L.**

As microestacas foram obtidas de plantas de *A. rosea* pré-estabelecidas *in vitro* com aproximadamente 1 cm de comprimento provenientes de mudas micropropagadas, sendo folhas e raízes os explantes utilizados.

Os tratamentos para indução de raízes consistiram do meio MS (concentração completa dos sais) em ausência ou presença da auxina ácido indol-3-butírico (AIB), como se segue: T1) MS sem adição de AIB nas concentrações de 0 mg L<sup>-1</sup> (controle); T2) MS + 1,0 mg L<sup>-1</sup>; T3) MS + 5,0 mg L<sup>-1</sup> e T4) MS + 10,0 mg L<sup>-1</sup> de AIB. Os meios de cultura utilizados foram solidificados com 7 g L<sup>-1</sup> de ágar, suplementado com 30 g/L-1 de sacarose e pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, sendo utilizados tubos de ensaio, contendo 10 mL de meio por tubo. Em seguida os meios foram autoclavados a 120 °C e 1 atm de pressão por 20 minutos. A inoculação dos explantes foi realizada em câmara de fluxo laminar, colocando-se uma microestaca por tubo.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com 4 tratamentos e 10 repetições, e cada parcela experimental foi composta por 2 tubos de ensaio. Em seguida, os tubos contendo os explantes foram levados para sala de crescimento e mantidos sob fotoperíodo de 16/8 horas de luz/escuro e intensidade luminosa de 25  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , à temperatura de  $25 \pm 1$  °C.

Após 30 dias da inoculação foram observados os seguintes parâmetros: porcentagem de indução de raízes, Número de raízes formadas (NR), comprimento da maior raiz (CMR), comprimento do broto (CB) e porcentagem de calos formados (PC).

Os dados obtidos na experimentação foram submetidos à análise de variância utilizando o software estatístico SISVAR®, e as médias foram comparadas utilizando o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

#### **5.4.4 Indução de calos em explantes foliares de *Alcea rosea* L.**

##### **A) Fonte de explantes:**

Folhas e raízes de plântulas obtidas da germinação de sementes *in vitro* de *A. rosea* L. foram utilizadas como fonte de explantes para indução de calos.

Os meios para indução foi o MS suplementado com fontes de diferentes concentrações de o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e 6-benzilaminopurina (BAP), como se segue: MS suplementado com 1,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,5 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D (T1) e MS suplementado com 0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 1,0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D (T2). Os meios de cultura utilizados foram solidificados com 7 g L<sup>-1</sup> de ágar, suplementado com 30 g/L<sup>-1</sup> de sacarose e pH ajustado para 5,8 antes da

autoclavagem, sendo utilizados tubos de ensaio, contendo 10 mL de meio por tubo. Em seguida os meios foram autoclavados a 120 °C e 1 atm de pressão por 20 minutos.

As raízes e folhas utilizadas como explantes foram padronizadas com 2,0 cm de comprimento e 1,0 cm<sup>2</sup>, respectivamente. A inoculação dos explantes foi realizada em câmara de fluxo laminar, colocando-se um explante por tubo. O delineamento experimental foi o fatorial 2x2, sendo o fator 1 dois tipos de explantes (raiz e folhas) e o fator 2 os meios de cultura (T1 e T2) com 10 repetições, e cada parcela experimental foi composta por dois tubos de ensaio. Em seguida, os tubos contendo os explantes foram levados para sala de crescimento e mantidos sob fotoperíodo de 16/8 horas de luz/escuro e intensidade luminosa de 25 μmol.m<sup>-2</sup>. s<sup>-1</sup>, à temperatura de 25 ± 1 °C.

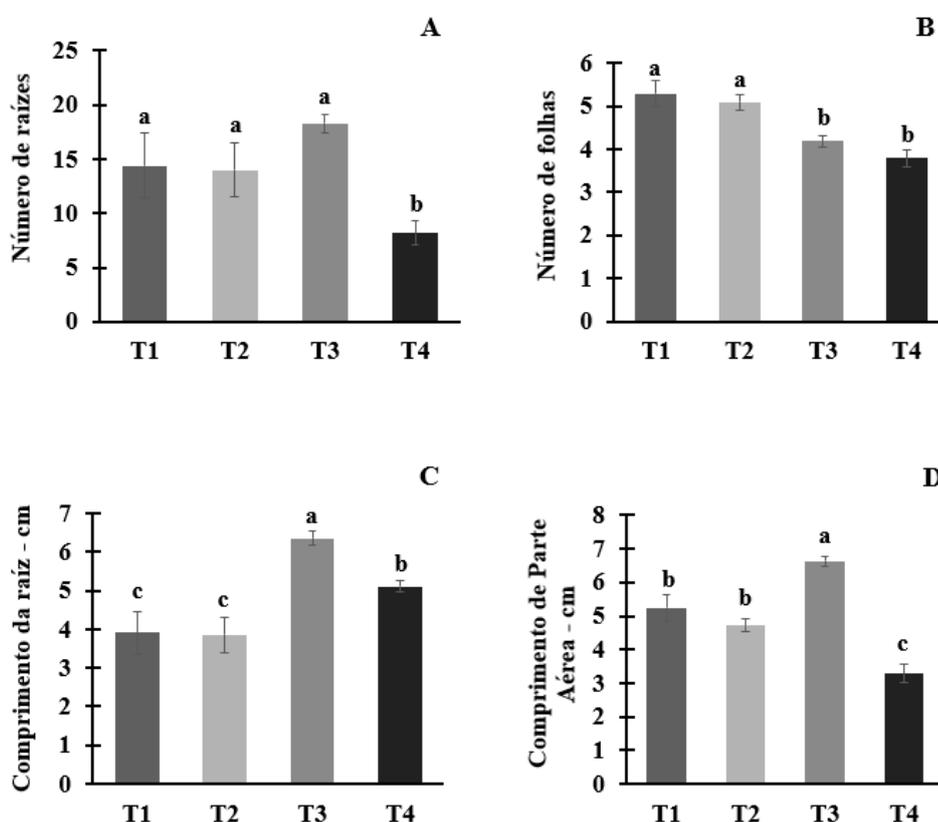
Após 19 dias da inoculação para o explante foliar e de 30 dias para o explante de raiz foram observadas as porcentagens de indução de calos. Os dados obtidos na experimentação foram submetidos à análise de variância utilizando o software estatístico SISVAR®, e as médias foram comparadas utilizando o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

## 5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.5.1 Germinação *in vitro* de *Alcea rosea* L.

Sementes de *A. rosea* L. germinam rapidamente, atingindo 100% de germinação aos 7 dias após o início do teste, independente do meio de cultura utilizado, não havendo diferença significativa entre eles. De forma semelhante, não foram observadas diferenças significativas para a velocidade de germinação entre os tratamentos com meios diferentes. Resultado semelhante ao encontrado por Ferreira et al., (2023), que observou as mesmas características em seu trabalho onde também não houve diferença estatística entre os meios utilizados na germinação de *A. rosea* L.

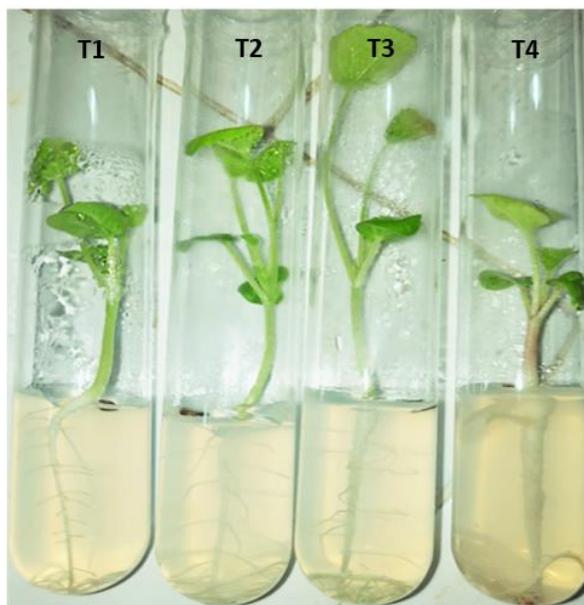
Após 30 dias da inoculação foi possível observar diferenças estatísticas para as variáveis avaliadas relacionadas às características morfológicas das plantas. Não houve diferenças significativas para o número de raízes e número de folhas entre as plantas crescidas no meio MS, 1/2MS e WPM, no entanto, plantas crescidas no meio 1/2WPM tiveram número de raízes significativamente inferior (Figura 2A).



**Figura 2.** Médias dos resultados para Número de Raízes (A), Número de Folha (B), Comprimento da Raiz (cm) (C) e Comprimento de Parte Aérea (cm) (D) das plântulas de *Alcea rosea* L. germinadas *in vitro* nos meios de cultura. T1- (MS<sub>Total</sub>); T2 - (1/2 MS); T3 - (WPM<sub>Total</sub>), T4 - (1/2 WPM). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O maior número de folhas também foi observado em plantas crescidas em meio MS, que diferiram significativamente daquelas crescidas em meio WPM, independente da concentração (Figura 2B).

O maior comprimento de raiz e parte aérea foi obtido em plantas crescidas em meio WPM (Figuras 2A e 2B). As características morfológicas das plantas podem ser observadas na Figura 3.



**Figura 3.** Aspecto visual de plantas de *Alcea rosea* L. crescidas em diferentes meios de culturas. T1- (MS<sub>Total</sub>); T2 - ( $\frac{1}{2}$  MS); T3 - (WPM<sub>Total</sub>), T4 - ( $\frac{1}{2}$  WPM).

A diferença na performance das plantas crescidas em meios de cultura pode ser justificada pelos teores nutricionais dos diferentes meios durante o crescimento das plantas. Especificamente para o comprimento de parte aérea de plantas de *Alcea*, os resultados foram semelhantes aos observados para *Syngonanthus elegathulus* (Bong.) Ruhland, que também tiveram maior crescimento em altura no meio WPM que contém 25% dos teores de íons nitrato e amônia do meio MS, além de mais potássio e um alto nível de íons sulfato quando comparados ao meio MS (PÊGO; PAIVA; PAIVA, 2014).

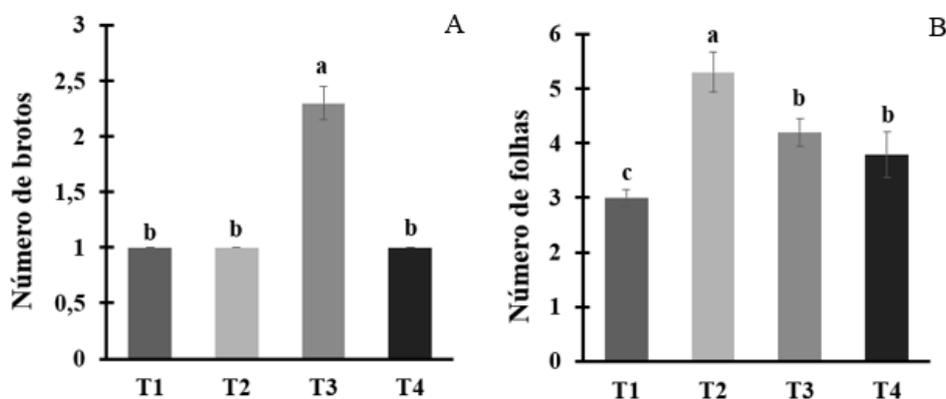
Espécies ornamentais nativas ou pouco domesticadas a influência de concentrações de meios de cultura pode determinar o crescimento das plantas, especialmente aquelas que exigem baixos teores de nutrientes para desenvolver. Nessas condições o uso de meios de cultura com menores teores de nutrientes pode ser vantajoso (PÊGO; PAIVA; PAIVA, 2013). Visualmente as plantas apresentaram boas características visuais e não apresentaram sintomas de deficiências nutricionais ou clorose foliar, independente dos meios utilizados (Figura 3).

É importante destacar que embora a *A. rosea* L. seja tradicionalmente utilizada no oriente médio e sudeste asiático por centenas de anos para fins medicinais (AZADEH et al., 2024), ainda há pouca informação sobre o seu comportamento em diferentes condições de fertilização, por isso compreender as limitações de meios de cultura e suas composições é importante para a propagação *in vitro* mais eficiente.

### 5.5.2 Multiplicação *in vitro* de microestacas *Alcea rosea* L.

Houve diferença significativa entre as concentrações de citocininas estudados. Sendo que a adição de 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP, proporcionou a produção média de 2,3 brotos (Figura 4A). Para a variável número de folhas houve diferença significativa, onde o tratamento com a suplementação do meio de cultura com 1 mg L<sup>-1</sup> de BAP (T2) proporcionou cerca de 5,3 folhas, seguido de meios suplementados com 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 3,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP, não diferindo significativamente entre si (Figura 4B). Possivelmente, este resultado pode ser devido ao

tratamento com 1 mg L<sup>-1</sup> de BAP (T2) possuir apenas 1 broto fazendo com que a planta tivesse mais energia disponível para a produção de folhas, enquanto o T3 que possuía mais brotos usou a energia tanto para o desenvolvimento dos brotos, quanto para a produção de folhas.



**Figura 4.** Número de brotações (A) e número de folhas (B) obtidos em plantas de *Alcea rosea* L, tratadas com diferentes concentrações de BAP. T1 = 0 mg L<sup>-1</sup>, T2 = 1,0 mg L<sup>-1</sup>, T3 = 2,0 mg L<sup>-1</sup> e T4 = 3,0 mg L<sup>-1</sup>. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A *A. rosea* L. é uma planta rasteira que normalmente cresce ereta e sem ramificações em seu caule, devido a essa característica presente na sua morfologia, a utilização do regulador de crescimento BAP para o alcance da indução de brotos demonstrou-se ser de extrema importância para a multiplicação via microestacas, dando origem a resultados satisfatórios com a obtenção de um valor de 2,3 brotos por microestaca em 100% do teste (Figura 4).

Embora o número de brotações pareça ser baixo, o hábito de crescimento da espécie parece influenciar fortemente a emissão de brotações como evidenciados em estudos anteriores onde o segmento nodal possibilitou a produção de 1,6 brotos por explante (GORMEZ BATTAL; TURKER, 2019). Tyub et al., (2016) ao utilizarem o meio MS basal + BAP (2,5 µM) para a indução de brotos em *Alcea* alcançou o número médio de 3 brotos em 60% do teste.

### 5.5.3 Enraizamento *in vitro* de microestacas de *Alcea rosea* L.

Houve efeito significativo da suplementação de AIB aos meios de cultura na indução de raízes após 30 dias. A presença de auxina foi determinante na produção de raízes de *Alcea*, sendo que meios sem a suplementação desse regulador de crescimento, não produziram raízes (Tabela 1).

**Tabela 1.** Porcentagem de explantes de *Alcea rosea* L. apresentando indução de raízes (IR), Número de raízes (NR), Comprimento da maior raiz (CMR), Comprimento do broto (CB) e Presença de calo (PC).

Tratamentos	IR (%)	NR (n)	CMR (cm)	CB (cm)	PC (%)
T1 - (MS + 0,0 mg L <sup>-1</sup> de AIB)	0c	0c	0d	6,3c	60b
T2 - (MS + 1,0 mg L <sup>-1</sup> de AIB)	100a	24a	2,1a	9,0a	40a
T3 - (MS + 5,0 mg L <sup>-1</sup> de AIB)	80b	23a	0,5c	6,2c	100c
T4 - (MS + 10,0 mg L <sup>-1</sup> de AIB)	70b	14b	1,3b	7,4b	100c

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A suplementação com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de AIB (T2) foi significativamente superior aos demais tratamentos, atingindo a porcentagem máxima explantes enraizados (100%) (Tabela 1).

O maior número de raízes foi obtido em plantas crescidas em meio MS suplementados com 1,0 mg L<sup>-1</sup> e 5,0 mg L<sup>-1</sup> de AIB com 24 e 23 raízes por explante, respectivamente, não diferindo entre si. O meio suplementado com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de AIB (T2) se destacou por apresentar o maior comprimento de raiz (2,1 cm), o maior comprimento de broto (9 cm) e a menor porcentagem para a presença de calos com 40%. Sendo assim o tratamento T2 - (MS + 1,0 mg L<sup>-1</sup> de AIB) é o mais indicado para o alcance da indução do enraizamento em plantas de *A. rosea* L.

O AIB é um regulador de crescimento amplamente reconhecido por sua eficácia na indução de enraizamento, conforme relatado por Gratapaglia ; Machado (1998). Segundo Willians et al., (1985), na ausência deste regulador, a formação de raízes pode ser inexistente ou limitada, dependendo da espécie. Neste trabalho o AIB se mostrou ser indispensável para que se alcançasse a indução de raízes nas microestacas de *A. rosea* L.

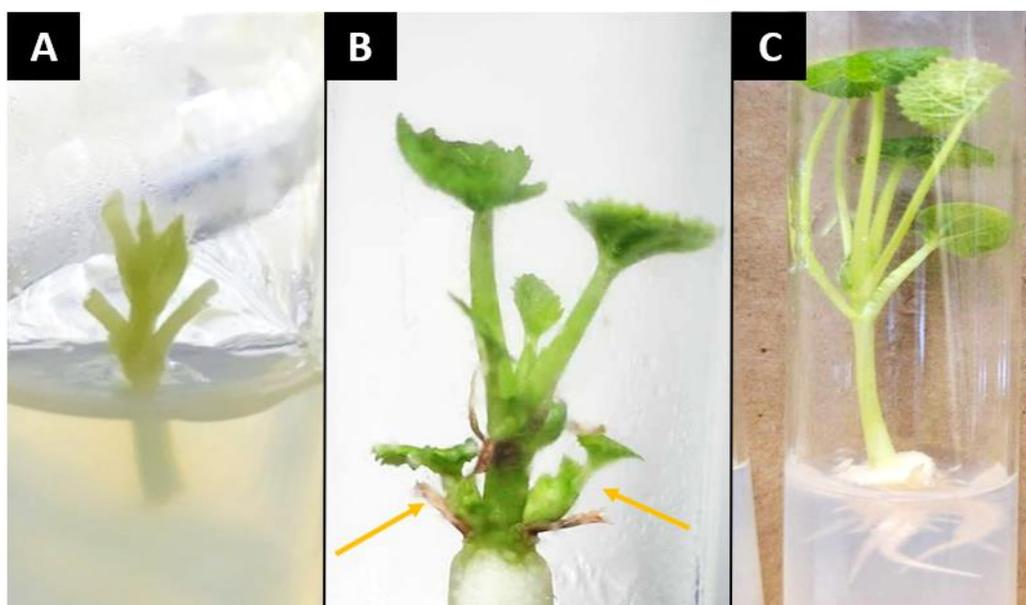
Em todos os tratamentos, observou-se a formação de calos na base das brotações. Porém quando foram adicionados 5,0 mg L<sup>-1</sup> (T3) e 10,0 mg L<sup>-1</sup> (T4) de AIB 100% das estacas apresentaram calos, sendo estes com aspectos friáveis e compactos (Tabela 1, Figura 5).



**Figura 5.** Enraizamento *in vitro* de *Alcea rosea* L. nos seguintes tratamentos: (MS + 0,0 mg L<sup>-1</sup> de AIB), T2 - (MS + 1,0 mg L<sup>-1</sup> de AIB), T3 - (MS + 5,0 mg L<sup>-1</sup> de AIB) e T4 - (MS + 10,0 mg L<sup>-1</sup> de AIB).

Conforme Welander ; Snygg (1987), a formação de calos está fortemente associada às concentrações e ao tipo de auxina presente no meio de cultura. Erig et al. (2004) afirmam que a formação de calos na zona de enraizamento é indesejável, pois pode comprometer a qualidade das raízes, especialmente no que diz respeito à conexão vascular com a planta. No entanto, os resultados deste estudo indicam que a rizogênese do tratamento com concentrações menores de auxina 1,0 mg L<sup>-1</sup> de AIB não foi prejudicada pela presença de calos, pois foi observada a presença de raízes bem formadas de bom calibre e saudáveis. Resultado semelhante também foi encontrado por Rocha, et al., (2008), que avaliando o enraizamento *in vitro* de genótipos de jenipapeiro utilizando concentrações de AIB, também observaram a presença de calos na base das raízes induzidas e estes não afetaram o processo de aclimatização e sobrevivência das plantas.

A multiplicação *in vitro* de microestacas é uma técnica de propagação de plantas que possibilita a produção de um grande número de plantas uniformes e saudáveis. Essa técnica tem sido amplamente utilizada devido às suas várias vantagens. Neste trabalho foi possível alcançar com sucesso a obtenção de um protocolo para a multiplicação *in vitro* da espécie *A. rosea* L. (Figura 6).



**Figura 6.** (A) Microestaca utilizada para a indução de brotações, (B) microestaca com indução de brotações em meio MS suplementado com 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP e (C) microestaca com indução de raízes em meio MS suplementado com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de AIB.

### 5.5.3 Micropropagação *in vitro* de explantes *Alcea rosea* L.

Após 19 dias da inoculação já foi possível observar a presença de indução de calos nos explantes foliares nos dois tratamentos. Para os explantes de raízes só foi observado o início da indução após 30 dias (Tabela 2).

Neste trabalho a porcentagem de indução de calos foi de 100% para todos os tratamentos, não havendo diferença estatística entre eles.

**Tabela 2.** Tempo para indução calos (TIC) e porcentagem de explantes induzidos (PEI) em explantes foliares ou radiculares de *A. rosea* em diferentes tratamentos.

Tratamentos	TIC (dias)		PEI (%)	
	Folha	Raiz	Folha	Raiz
T1 (1,0 BAP+1,0 2,4-D)	19Aa	30Ab	100Aa	100Aa
T2 (0,0 BAP+1,0 2,4-D)	19Aa	30Ab	100Aa	100Aa

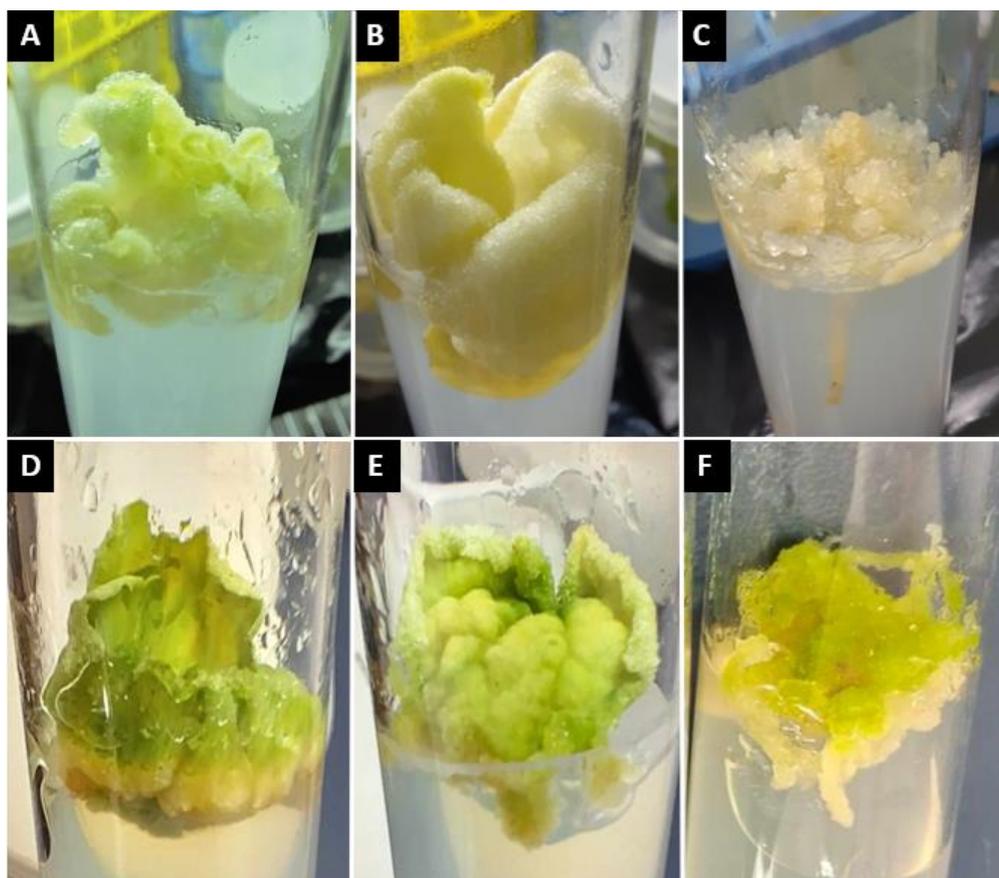
A comparação entre diferentes explantes (Folha e Raiz) são representadas pelas letras maiúsculas e a comparação entre os tratamentos pelas letras minúsculas. \*Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Foi possível observar que os calos do tratamento T2 (MS suplementado com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D), quando comparados ao T1 (MS suplementado com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 0,5 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D), se desenvolveram melhor, com a presença de calos mais compactos com cores mais

verdes e eram mais vigorosos (Figura 7 - D, E e F), enquanto os calos do tratamento T1 apresentavam calos friáveis, brancos ou amarelados e menos vigorosos (Figura 7 - A, B e C). Sendo assim o tratamento T2 é o que mais apresenta potencial para o seu uso no processo de organogênese indireta de explantes de *A. rosea* L.

Resultado semelhante foi observado por Mujib et al., (2017), que testando diferentes concentrações de 2,4-D para a indução de calos em explante foliar e de raiz de *Alcea*, conseguiu maior frequência de indução de calos quando foi utilizado o meio MS suplementado com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D, com valores de 27,5% e 39,1% a partir dos explantes de raiz e folha, respectivamente. Naz; Anis, (2012), também avaliando em seu trabalho a indução de calos para *A. officinalis* L., observaram que o meio MS suplementado com 15,0 µM de 2,4-D foi o que apresentou os melhores resultados. Görmez; Battal; Turker, (2019), avaliando diferentes concentrações de 2,4-D para a espécie *A. kurdica*, obtiveram os melhores resultados para indução de calo em explante foliar utilizando o 2,4-D. Munir et al., (2012), observaram em seu trabalho onde testou diferentes reguladores para a indução de calos, que o melhor hormônio para indução de calos de *A. rosea* L. foi o 2,4-D.

O 2,4-D tem sido amplamente utilizado para induzir a formação de calos na maioria das famílias de plantas e também na família *Malvaceae*, sendo assim, os resultados obtidos neste trabalho são consistentes com os estudos encontrados na literatura que indicam que o 2,4-D é o mais indicado para a obtenção da indução de calos bem-sucedida para a espécie estudada *Alcea rosea* L.



**Figura 7.** Calos produzidos de explante foliar e de raiz no T1 (MS suplementado com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 0,5 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D) (A, B e C); calos produzidos de explante foliar e de raiz no T2 (MS suplementado com 0,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 1,0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D) (D, E e F).

A micropropagação vem sendo muito utilizada como uma técnica para a preservação e rápida multiplicação em larga escala de germoplasmas importantes (DUBE, 2011). Atualmente, há uma grande demanda por medicamentos à base de plantas como alternativa às drogas sintéticas, devido a isto, muitos recursos de plantas medicinais estão ameaçados ou até mesmo à beira da extinção. Portanto, a aplicação desta tecnologia possibilita o fornecimento de plantas para o mercado ornamental e também das matérias-primas necessárias para o isolamento de medicamentos pelas indústrias farmacêuticas sem esgotar os recursos naturais das plantas (NAIKA; KRISHNA, 2008).

Mujib et al. (2017), descreve que a tecnologia de cultura de tecidos torna possível a produção de um grande número de plantas uniformes e livre de doenças de espécies medicinais importantes, o que possibilita ajudar na conservação do germoplasma, podendo assim estes serem reintroduzidos em habitats protegidos, como os Parques Nacionais. Considerando a importância da espécie *A. rosea* L. devido às suas propriedades medicinais e a sua utilização como planta ornamental, o presente estudo se torna altamente relevante, pois usando este protocolo, é possível produzir um grande número de plantas livres de doenças em um curto período de tempo, garantindo seu suprimento contínuo para a indústria sem a necessidade de retirá-las de seu habitat natural, contribuindo assim para a sua preservação.

## 5.6 CONCLUSÕES

Os meios de cultura MS e WPM nas concentrações originais ou diluídas possibilita a germinação *in vitro* de 100% das sementes de *A. rósea* L.

O meio MS com 100% ou 50% da concentração de sais possibilita a produção de maiores números de raízes e folhas, enquanto que o meio WPM (100%) possibilita a produção eficiente de raízes e plantas com maior comprimento de raízes e parte aérea.

O MS suplementado com 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP possibilitou a maior brotação de de estacas de *A. rosea*, sendo indispensável o uso desse regulador para a indução de brotações.

O meio MS suplementado com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de AIB é o mais indicado para a rizogênese possibilitando a indução de raízes em 100% dos explantes.

O meio MS suplementado com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D foi o que mais apresentou potencial morfogenético *in vitro*.

O protocolo utilizado neste estudo é sugerido como um método eficiente que pode ser explorado para atender à demanda ornamental, medicinal e industrial de *A. rosea* através da *micropropagação in vitro* da espécie, permitindo a rápida multiplicação e o uso sustentável destas plantas.

## 5.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-SALAM, N. A., GHAZY, N. M., SALLAM, S. M., RADWAN, M. M., WANAS, A. S., ELSOHLY, M. A., ...; SHENOUDA, M. L. Flavonoids of *Alcea rosea* L. and their immune stimulant, antioxidant and cytotoxic activities on hepatocellular carcinoma HepG-2 cell line. **Natural product research**, v. 32, n. 6, p. 702-706, 2018.
- AZAB, A. ALCEA: Traditional medicine, current research and future opportunities. **European Chemical Bulletin**, v. 5, n. 12, p. 505-514, 2016.
- AZADEH, Z.; ASGHARIAN, S.; HABTEMARIAM, S.; LORIGOOINI, Z.; TAHERI, A. A review of botanical, phytochemical, and pharmacological properties of *Alcea rosea* L. *Future Natural Products*, v. 9, n. 2, in presse, 2024.
- BATTAL, A. et al. Tıbbi Öneme Sahip Hatmiler İçin Etkili Bir Çımlendirme Yöntemi: Tohum Kabuğuna Çentik Atılması. **Bitlis Eren Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi**, v. 8, n. 3, p. 843-851, 2019.
- AZEVEDO, M. L. **Micropropagação e enraizamento de miniestacas de mogno africano (*Khaya ivorensis* A. Chev)**. Dissertação (Mestrado em ciências florestais), Universidade federal dos vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2018.
- DIAS, P. C., DE OLIVEIRA, L. S., XAVIER, A.; WENDLING, I. Estaquia e miniestaquia de espécies florestais lenhosas do Brasil. **Revista Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 32, n. 72, p. 453, 2012.
- DUBE, P., GANGOPADHYAY, M., DEWANJEE, S.; ALI, M. N. Establishment of a rapid multiplication protocol of *Coleus forskohlii* Briq. and *in vitro* conservation by reduced growth. **Indian Journal of Biotechnology**. 2011.
- ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Estabelecimento *in vitro* de mirtilo a partir de segmentos nodais. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 6, n. 1/2, p. 91-96, 2005.
- FAHAMIYA, N., SHIFFA, M.; ASLAM, M. A comprehensive review on *Althaea rosea* Linn. **Indo American Journal of Pharmaceutical Research**, v. 6, n. 11, p. 6888-6894, 2016.
- FERREIRA, T. S., PÊGO, R. G.; MARTINS, R. D. C. F. Fruit and seed morphometry and *in vitro* germination of Hollyhock Seeds. **Fronteira: Journal of Social, Technological and Environmental Science**, v. 12, n. 2, p. 98-107, 2023.
- GÖRMEZ, G., BATTAL, A.; TURKER, M. The investigation of *in vitro* callus formation, regeneration and micropropagation of Devegulu hollyhock, a medicinal plant. **Caucasian Journal of Science**, v. 6, n. 2, p. 111-123, 2019.
- TARIQ, H.; ANDLEEB, A.; BATOOL, S.; ALI, U.; WAQAS, M.; WAHAB, A.; ZAMAN, G.; DROUET, S.; GIGLIOLI-GUIVARC'H, N.; HANO, C.; ABBASI, B.H. Qualitative and quantitative analysis of high-value metabolites from callus culture of *Alcea rosea* L.. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, v. 157, n. 68, 2024.

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

NAIKA, H. R.; KRISHNA, V. Plant regeneration from callus culture of *Clematis gouriana* Roxb. A rare medicinal plant. **Turkish Journal of Biology**, v. 32, n. 2, p. 99-103, 2008.

KALEMBA-DROŽDŽ, M.; CIERNIAK, A. Antioxidant and genoprotective properties of extracts from edible flowers. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 58, n. 1, p. 42–50, 2019.

KOENE, F. M. et al. Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of *Acianthera prolifera* (Orchidaceae). **African Journal of Botany**, v. 121, n. 1, p. 83–91, 2019.

LI, Q. et al. Floral morphology and mating system of *Alcea rosea* (Malvaceae). **Plant Ecology and Evolution**, v. 145, n. 2, p. 176–184, 2012.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Combined Proceedings of International Plant Propagators Society**, v. 30, p. 421-427, 1980.

MUJIB, A., PIPAL, T., ALI, M., TONK, D., ZAFAR, N.; GULZAR, B. In vitro propagation of *Althaea officinalis*: the role of plant growth regulators in morphogenesis. **BioTechnologia. Journal of Biotechnology Computational Biology and Bionanotechnology**, v. 98, n. 3, 2017.

MUNIR, M., HUSSAIN, A. T. H. A. R., UL-HAQ, I., QURESHI, R., MUNAZIR, M. E. H. M. O. O. D. A., RSHAD, M.; KHAN, M. Callogenesis potential of cotyledonary explants of *Althaea rosea*. from Pakistan. **Pak. J. Bot**, v. 44, p. 271-275, 2012.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-479, 1962.

NASCIMENTO, G. S., RUAS, I. L., MARCHI, M. N. G., BATISTA, K. R., LEITE, M. C. B.; SCHNADELBACH, A. S. Morfogênese *in vitro* de duas espécies de orquídeas da Chapada Diamantina-BA. **Revista RG News**, v. 8, p. 2, 2022.

NAZ, R.; ANIS, M. Acceleration of adventitious shoots by interaction between exogenous hormone and adenine sulphate in *Althaea Officinalis* L. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 168, p. 1239-1255, 2012.

NEWMAN, S. E.; O'CONNOR, A. S. Edible flowers. Gardening series. **Flowers. Colorado State University, Extension**, v. 1, n. 7.237, p. 1-5, 2009.

ORAEI, T., SHOOR, M., TEHRANIFAR, A.; NEMATI, H. Alleviation of drought stress effects by exogenous application of spermidine and salicylic acid on hollyhock (*Alcea rosea*). **Journal of Ornamental plants**, v. 9, n. 4, p. 303-318, 2019.

PÊGO, R. G.; PAIVA, P. D. O.; PAIVA, R. In vitro seed germination and seedlings development of *Syngonanthus elegans* and *Syngonanthus elegantulus*. **Acta Horticultura**, v. 1083, p. 249-254, 2015.

- PRUDENTE, D. D. O, Nery, F. C, REIS, M. V, PAIVA, P. D. D. O, NERY, M. C.; AMIN, T. D. O. Germinação *in vitro* e aclimatização de sempre-viva. **Plant Cell Culture and Micropropagation**, Lavras, v. 11, n. 2, p. 62-69, 2015.
- PÊGO, R. G.; PAIVA, P. D. O; PAIVA, R. Micropropagation protocol of *Syngonanthus elegans* (Bong) Ruhland: an ornamental species. *Acta Scientiarum. Agronomy*, v. 36, n. 2, p. 347-353, 2014.
- RAI, M.K.; SHEKHAWAT, N. S.; GUPTA, H. A. K.; PHULWARIA, M.; RAM, K.; JAISWAL, U. The role of abscisic acid in plant tissue culture: a review of recent progress. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 106, p. 179-190, 2011.
- ROCHA, M. A. C. D., COSTA, M. A. P. D. C., SILVA, S. A., LEDO, C. A. D. S., MOREIRA, M. J. S.; BASTOS, L. P. Enraizamento *in vitro* e aclimatização de genótipos de jenipapeiro (*Genipa americana* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, 30, 769-774. 2008.
- SILVA, T. D. et al. Morphophysiological *in vitro* performance of Brazilian ginseng (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen) based on culture medium formulations. **In vitro cellular; developmental biology - plant**, v. 55, n. 4, p. 454-467, 2019.
- SOUZA, C. C. **Padrões de miniestacas e densidade de minicepas na propagação clonal de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla***. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal), Universidade Federal de Viçosa, 57 f. 2012.
- SOUZA, M. R. Estaquia e miniestaquia de *Conocarpus erectus* L. e *Rhizophora mangle* L. **Monografia (Graduação) Universidade Federal rural do Semi-Árido**, Mossoró, RN, 2020.
- TYUB, S.; KAMILI, A. N.; BHAT, M. M. *In vitro* propagation of *Althaea rosea*-a valuable medicinal plant of Kashmir Himalaya. **Journal of Nature and Natural Sciences (JNNSci)**, v. 1, n. 5, p. 1-4, 2016.
- YOUNESIKELAKI, F. S. et al. Optimization of seed surface sterilization method and *in vitro* seed germination in *Althaea officinalis* (L.) - an important medicinal herb. **Indian Journal of Science and Technology**, v. 9, n. 28, p. 1-6, 2016.
- WELANDER, M.; SNYGG, O. Effect of applied and endogenous auxin on callus and root formation of *in vitro* shoots of the apple rootstocks M26 and A2. **Annals of Botany**, London, v. 59, n. 4, p. 439-443, 1987.
- PÊGO, R.G. PAIVA, P. D. O, PAIVA, R. Micropropagation of *Syngonanthus eleganthulus*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 37, n. 1, p. 32-39, 2013
- WILLIAMS, R.R.; TAJI, A.M.; BOLTON, J.A. Specificity and interation among auxin, light, and pH in rooting of Australian woody species *in vitro* Hortscience, **St. Joseph**, v. 20, n.6, p. 1052-1053, 1985.

## 6 CAPÍTULO III

### EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO MEIO DE CULTURA NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES E MICROPROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE PLANTAS DE *DIANTHUS* *CARYOPHYLLUS* L..

## 6.1 RESUMO

O cravo (*Dianthus caryophyllus* L.) é uma espécie que possui grande importância no setor ornamental, suas flores estão entre as três principais flores de corte comercializadas no mercado internacional. Tudo isso devido a beleza de suas flores e a diversidade de cores que esta possui. Por isso a propagação por cultura de tecidos desta espécie é de grande importância. O trabalho teve como objetivo desenvolver um protocolo eficiente para a germinação e propagação *in vitro* de Cravo Chabaud Gigante Dobrado vermelho. Para a germinação *in vitro* foram avaliados os seguintes tratamentos: T1- (MS<sub>Total</sub>); T2 - (½ MS); T3 - (WPM<sub>Total</sub>), T4 - (½ WPM). Para a fase de multiplicação de brotos, os explantes utilizados vieram de plântulas germinadas *in vitro*, foram testados os seguintes tratamentos: T1) MS sem adição de BAP; T2) MS suplementado com 3,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP; T3) MS suplementado com 4,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP; T4) MS suplementado com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 0,5 mg L<sup>-1</sup> de AIB e T5) MS suplementado com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 0,5 mg L<sup>-1</sup> de 2,4D. Para o enraizamento *in vitro* foram avaliados os tratamentos: T1) ½ MS sem adição de reguladores; T2) ½ MS suplementado com 0,5 mg L<sup>-1</sup> de AIB; T3) ½ MS suplementado com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de AIB. O maior percentual de germinação *in vitro* foi obtido com o meio MS<sub>Total</sub>. A formação do maior número de brotos ocorreu no T4 (MS suplementado com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 0,5 mg L<sup>-1</sup> de AIB), com uma média de 144 brotos por explante. A formação do maior número de raízes (9,3) ocorreu no MS<sub>1/2</sub> suplementado com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de AIB. Sendo assim, o protocolo utilizado neste estudo é sugerido como um método eficiente para a multiplicação da espécie *Dianthus caryophyllus* Chabaud Gigante Dobrado vermelho.

**Palavras-chave:** Biotecnologia. Citocininas. Cultura de tecidos vegetais. Cravo. Hiperidricidade. Espécie ornamental.

## 6.2 ABSTRACT

The carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) is a species that has great importance in the ornamental sector, its flowers are among the three main cut flowers commercialized in the international market. All this due to the beauty of its flowers and the diversity of colors that it has. Therefore, the propagation by tissue culture of this species is of great importance. Therefore, this work aimed to develop an efficient protocol for the germination and in vitro propagation of Red Double Giant Chabaud Carnation. For in vitro germination, the following treatments were evaluated: T1- (Total MS); T2 - ( $\frac{1}{2}$  MS); T3 - (Total WPM), T4 - ( $\frac{1}{2}$  WPM). For the shoot multiplication phase, the explants used came from seedlings germinated in vitro, the following treatments were tested: T1) MS without addition of BAP; T2) MS supplemented with  $3,0 \text{ mg L}^{-1}$  of BAP; T3) MS supplemented with  $4,0 \text{ mg L}^{-1}$  of BAP; T4) MS supplemented with  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  BAP +  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  AIB and T5) MS supplemented with  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  BAP +  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  2,4D. For in vitro rooting, the following treatments were evaluated: T1)  $\frac{1}{2}$  MS without addition of regulators; T2)  $\frac{1}{2}$  MS supplemented with  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  AIB; T3)  $\frac{1}{2}$  MS supplemented with  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  AIB. The highest percentage of in vitro germination was obtained with the MSTotal medium. The formation of the greatest number of shoots occurred in T4 (MS supplemented with  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  BAP +  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  AIB), with an average of 144 shoots per explant. no MS $\frac{1}{2}$  supplemented with  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB, the protocol used in this study is suggested as an efficient method for the multiplication of the species *Dianthus caryophyllus* Chabaud Giant Double Red.

**Keywords:** Keywords: Biotechnology. Cytokinins. Plant tissue culture. Cravo. Hyperhydricity. Ornamental species.

## 6.3 INTRODUÇÃO

O gênero *Dianthus* possui três importantes espécies ornamentais nomeadamente, *D. caryophyllus*, *D. chinensis* e *D. barbatus* (KANTIA; KOTHARI, 2002). Das três espécies, *D. caryophyllus* é comercialmente mais importante como cultura de flores de corte e é bem explorada para desenvolver protocolos de regeneração para multiplicação clonal.

O cravo (*Dianthus caryophyllus* L.), conhecido como cravo Chabaud Gigante Dobrado vermelho é pertencente à família Caryophyllaceae, é uma erva cosmopolita, sendo cultivado no mundo inteiro (CARNEIRO, 2020). Esta família de plantas possui aproximadamente 2.200 espécies, enquanto o gênero *Dianthus* inclui cerca de 300 espécies (AL-MA'ATHEDI et al., 2018; YAGI et al., 2020). O cravo é uma das flores de corte mais importantes globalmente, sendo vendidas durante todo o ano e está entre as três principais flores de corte comercializadas no mercado internacional, ocupando o terceiro lugar no mercado ornamental depois da rosa e do crisântemo (ABI MEHMOODET al., 2014).

As plantas de *Dianthus Caryophyllus* Chabaud têm hastes florais longas e adequadas para confecção de arranjos florais. As principais características comerciais do cravo são; a forma, tamanho e cor das flores, a fragrância, sua longa vida de vaso de mais de 14 dias e sua capacidade de suportar o transporte por longas distâncias devido à sua notável capacidade de reidratação após transporte contínuo (ABELIOTIS et al., 2016; AHMADIAN et al., 2017).

A propagação de plantas de cravo pode ser realizada por sementes ou por estaquia. O cultivo *in vitro* a partir de sementes apresenta inúmeras vantagens sobre as técnicas de propagação convencionais, como: maior porcentagem de sementes germinadas, maior velocidade de germinação. A produção de plantas isentas de pragas e doenças, controle das condições de cultivo, produção independente da época do ano, utilização de um menor espaço físico para produção das mudas, conseqüentemente menos tempo gasto para produção, entre outros (CARVALHO et al., 2011). A técnica mais comum é a propagação por estaquia, no entanto plantas cultivadas como plantas matrizes podem perder vigor e qualidade fitossanitária ao longo dos anos, podendo ser infectadas internamente por patógenos como fungos, bactérias e vírus que diminuem significativamente o rendimento produtivo da cultura (KARAMI, 2008). A propagação vegetativa tradicional não pode eliminar o patógeno das novas plantas, portanto, a técnica *in vitro* é considerada como o melhor método alternativo para esta espécie, podendo ser utilizado para diversos fins, incluindo a eliminação de vírus, a micropropagação comercial e a transformação genética (JORAPUR, et al., 2018; SIROHI, et al., 2021).

A germinação e micropropagação de cravo *in vitro* tem sido pouco relatada na literatura com resultados diferentes conforme a espécie estudada. Segundo Ferreira, (2021), o conhecimento disponível para o manejo e análise de sementes de plantas é bem restrito, não sendo conhecido informações básicas sobre a germinação, o cultivo e as potencialidades da grande maioria das espécies. Porém, a maioria dos estudos utiliza reguladores de crescimento, em diferentes concentrações e combinações, a fim de garantir a produção das plantas.

A multiplicação *in vitro* é uma técnica que envolve o cultivo de segmentos de plantas em recipientes como tubos de ensaio, que contêm um meio de cultura adequado. A partir desses segmentos é possível se obter centenas a milhares de plantas geneticamente idênticas (POLESI, 2011). Nos dias atuais, a técnica de cultura de tecidos representa uma ferramenta de grande utilidade para a clonagem de plantas em larga escala, contribuindo também para estudos de transformação genética e conservação de espécies vegetais. Isso resulta na produção de plantas saudáveis, vigorosas e geneticamente superiores, que podem ser reproduzidas em grande quantidade (GUIMARÃES, 2016). O emprego dessa técnica está em constante expansão no mercado, visando atender à necessidade por mudas saudáveis e livres de patógenos em qualquer época do ano, ocupando menos espaço físico e tempo, e garantindo alta fidelidade genética, produtividade, uniformidade e desempenho no campo.

De acordo com Aoyama, et al., (2012) as combinações entre o uso de reguladores e os tipos de explantes são definidas de acordo com a resposta morfogênica desejada e a disponibilidade de plantas matrizes. Portanto, o desenvolvimento de protocolos eficientes para a micropropagação de cravo exige adequações para cada espécie, relativas ao tipo de explante, às combinações de reguladores de crescimento e às condições de cultura.

Reguladores de crescimento como as auxinas sintéticas o ácido naftalenoacético (ANA), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido indol-3-butírico (AIB) são citados como reguladores que promovem o enraizamento em plantas *in vitro*, incluindo plantas do gênero *Dianthus* enquanto que as citocininas 6-benzilaminopurina (BAP) e isopenteniladenina (2iP) promovem a formação de calos ou novas brotações, no entanto a combinação desses reguladores podem potencializar as respostas fisiológicas e otimizar a propagação de plantas de cravo, como acontece em outras espécies vegetais (ALMEIDA et al., 2015). Os reguladores vegetais, como auxinas e citocininas, são os mais importantes e amplamente utilizados na cultura de tecidos vegetais desempenhando um papel fundamental na regulação do crescimento e morfogênese das plantas, estes têm sido empregados com sucesso na propagação *in vitro* de diversas espécies (RAI et al., 2011; GEORGE et al., 2008).

Segundo Rebelo (2020), as auxinas são empregadas para induzir a divisão e a expansão celular, bem como a organogênese e a embriogênese somática. Geralmente, em concentrações de maior presença de auxinas é favorecido a iniciação das raízes (rizogênese). Já na presença de maior quantidade de citocininas em relação às auxinas no meio, visa promover a divisão celular, induzir a diferenciação dos brotos adventícios e a proliferação dos brotos axilares, liberando as gemas axilares da dominância apical (MARTINS et al., 2012).

Embora alguns pesquisadores tenham relatado anteriormente regeneração *in vitro* de cravo (KHATUN, 2018, 2013; AL-MA'ATHEDI et al., 2018; AHMADIAN et al., 2017; HAYATI et al., 2016; KHARRAZI et al, 2011; CASAS et al., 2010), ainda não há estudo para a variedade de cravo utilizada neste trabalho. Portanto, esse trabalho teve como objetivo desenvolver um protocolo eficiente para a germinação e multiplicação *in vitro* de Cravo Chabaud Gigante Dobrado vermelho.

## 6.4 MATERIAL E MÉTODOS

### 6.4.1 Germinação *in vitro* de *Dianthus caryophyllus*

As sementes *D. caryophyllus* foram desinfestadas, em álcool etílico 70% (v/v), por 1 minuto e, em seguida, imersas em hipoclorito de sódio 2,5% (v/v), por 10 minutos. Em câmara de fluxo laminar, as sementes foram lavadas três vezes, em água destilada autoclavada, sendo, posteriormente, inoculadas em meio de cultura. O delineamento foi inteiramente casualizado, constando de 4 tratamentos com 10 repetições, e cada parcela experimental foi composta por dois frascos de 200ml, em cada frasco foi colocado apenas uma semente. Os meios utilizados foram o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e WPM – Woody Plant Medium (LLOYD; MCCOWN, 1981) em diferentes concentrações. Os tratamentos consistiram em: T1- (MS<sub>Total</sub>); T2 - (½ MS); T3 - (WPM<sub>Total</sub>), T4 - (½ WPM). Aos meios foram acrescidos de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e solidificado com 7 g L<sup>-1</sup> de ágar. O pH do meio foi ajustado para 5,8, antes da autoclavagem sob pressão de 1,5 atm e à temperatura de 121 °C, por 20 minutos.

Em seguida, os frascos foram levados para sala de crescimento e mantidos sob fotoperíodo de 16/8 horas de luz/escuro e intensidade luminosa de 25 μmol.m<sup>-2</sup>. s<sup>-1</sup>, à temperatura de 25 ± 1 °C. O teste foi mantido em sala de crescimento por 30 dias e foi avaliado a porcentagem de germinação. Os dados foram submetidos à análise de variância por meio do teste F e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade com auxílio do software R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2016).

### 6.4.2 Multiplicação *In Vitro* de *Dianthus Caryophyllus*

#### 6.4.2.1 Fonte de explantes e meios para multiplicação:

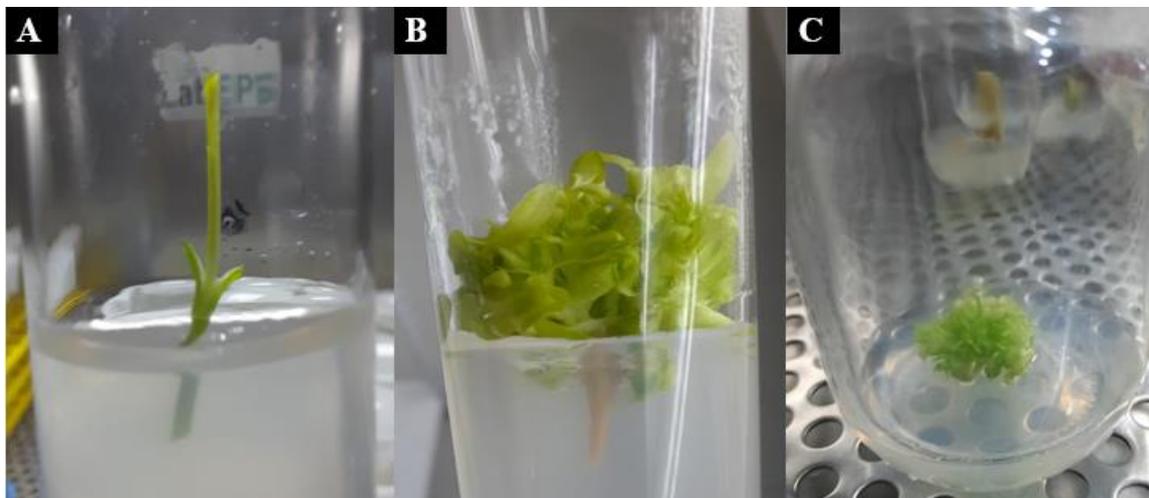
A germinação *in vitro* foi bem-sucedida e a utilização de mudas estéreis foi uma escolha vantajosa por evitar contaminação e obter explantes com alta capacidade de regeneração. Devido a isto plântulas obtidas da germinação de sementes *in vitro* de *Dianthus caryophyllus* foram utilizadas como fonte de explantes. Sendo microestacas os explantes utilizados, oriundas do meio MS.

#### 6.4.2.2 Multiplicação *in vitro* de microestacas

Microestacas foram retiradas de plântulas crescidas *in vitro* e foram inoculados nos meios indutores. O meio de cultura escolhido foi o MS em razão dos resultados do teste de germinação feito anteriormente no experimento de germinação *in vitro* de *Dianthus caryophyllus* no tópico (6.4.1). Os tratamentos consistiram em meio MS suplementado com os seguintes reguladores de crescimento: T1) Controle 0 g.L<sup>-1</sup> de BAP; T2) 3,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP; T3) 4,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP e T4) 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 0,5 mg L<sup>-1</sup> de AIB. Os meios de cultura utilizados foram solidificados com 7 g L<sup>-1</sup> de ágar, suplementado com 30 g/L<sup>-1</sup> de sacarose e pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, sendo utilizados tubos de ensaio, contendo 10 mL de meio por tubo. Em seguida os meios foram autoclavados a 120 °C e 1 atm de pressão por 20 minutos.

A inoculação dos explantes foi realizada em câmara de fluxo laminar, colocando-se uma microestaca por tubo (Figura 1-A). O delineamento foi inteiramente casualizado, constando de 10 repetições, e cada parcela experimental foi composta por dois tubos de ensaio. Em seguida, os tubos contendo os explantes foram levados para sala de crescimento e mantidos sob fotoperíodo de 16/8 horas de luz/escuro e intensidade luminosa de 25 μmol.m<sup>-2</sup>. s<sup>-1</sup>, à temperatura de 25 ± 1 °C. Após 20 dias da inoculação, devido à limitação do desenvolvimento

de brotações devido a limitação de espaço dentro do tubo (Figura 1-B), foi realizada a transferência dos explantes para frascos de 200ml, contendo 20ml de meio MS sem a adição de reguladores de crescimento (Figura 1-C). Em seguida, os frascos foram levados para sala de crescimento e mantidos sob as mesmas condições em que estavam no início do teste por mais 15 dias.



**Figura 1.** Microestaca de cravo em tubo de ensaio (A); Indução de brotação no tubo com limitação no desenvolvimento (B); Transferência para frascos de 200 mL (C).

As avaliações foram realizadas após um total de 35 dias da inoculação, foram avaliadas as seguintes variáveis: número de brotos (NB), massa fresca total (MFT) e massa seca total (MST), porcentagem de plântulas com a presença de raízes (PPR), calos (C) e hiperidricidade (HP).

Para avaliar o comprimento dos brotos (escala) (CB), devido a formação de múltiplos brotos presentes nos tratamentos, esses foram individualizados e divididos em quatro escalas de tamanho: (0-0,9cm); (1,0-1,9cm); (2,0-2,9cm) e (>3,0cm), isto para facilitar a avaliação.

Os dados foram submetidos à análise de variância por meio do teste F e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade com auxílio do software R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2016).

#### **6.4.3 Crescimento e Enraizamento *in vitro* de Plântulas de *Dianthus caryophyllus*.**

Após a avaliação do teste de indução de brotações, os brotos individualizados serviram como fonte de explante para a terceira etapa do experimento visando a indução de raízes. Os tratamentos do novo teste de indução de raízes foram: T1) ½ MS sem adição de reguladores; T2) ½ MS suplementado com 0,5 mg L<sup>-1</sup> de AIB; T3) ½ MS suplementado com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de AIB. O delineamento foi inteiramente casualizado, constando de 10 repetições, e cada parcela experimental foi composta por dois tubos de ensaio. Os meios de cultura utilizados foram solidificados com 7 g L<sup>-1</sup> de ágar, suplementado com 30 g/L<sup>-1</sup> de sacarose e pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, sendo utilizados tubos de ensaio, contendo 10 mL de meio por tubo. Em seguida os meios foram autoclavados a 120 °C e 1 atm de pressão por 20 minutos. Após 30 dias do início do teste foram avaliadas as médias das seguintes variáveis: números de raízes (NR), número de brotos (NB), comprimento das raízes (CR), comprimento dos brotos (CB) e porcentagem da presença de plantas com hiperidricidade (PPH). Os dados foram submetidos à análise de variância por meio do teste F e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade com auxílio do software R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2016).

## 6.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.5.1 Germinação *in vitro*

Após 7 dias da inoculação das sementes todos os tratamentos já apresentavam 100% de germinação, não havendo diferenças significativas entre os meios de cultura utilizados.

**Tabela 1.** Germinação *in vitro* de sementes de *Dianthus caryophyllus* nos tratamentos após 35 dias da inoculação.

Meio de cultura	Germinação (%)
MS	100 a
½ MS	100 a
WPM	100 a
½ WPM	100 a

\*Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Após 30 dias da inoculação as plantas apresentavam desenvolvimento diferentes, sendo nos diferentes meios. As plantas crescidas no meio MS e ½ MS apresentavam-se bem desenvolvidas sem sintomas visuais de deficiência de nutrientes e mantinham a cor verde. Enquanto que as plantas crescidas em meios WPM e ½ WPM apresentavam folhas amarelada (Figura 2).



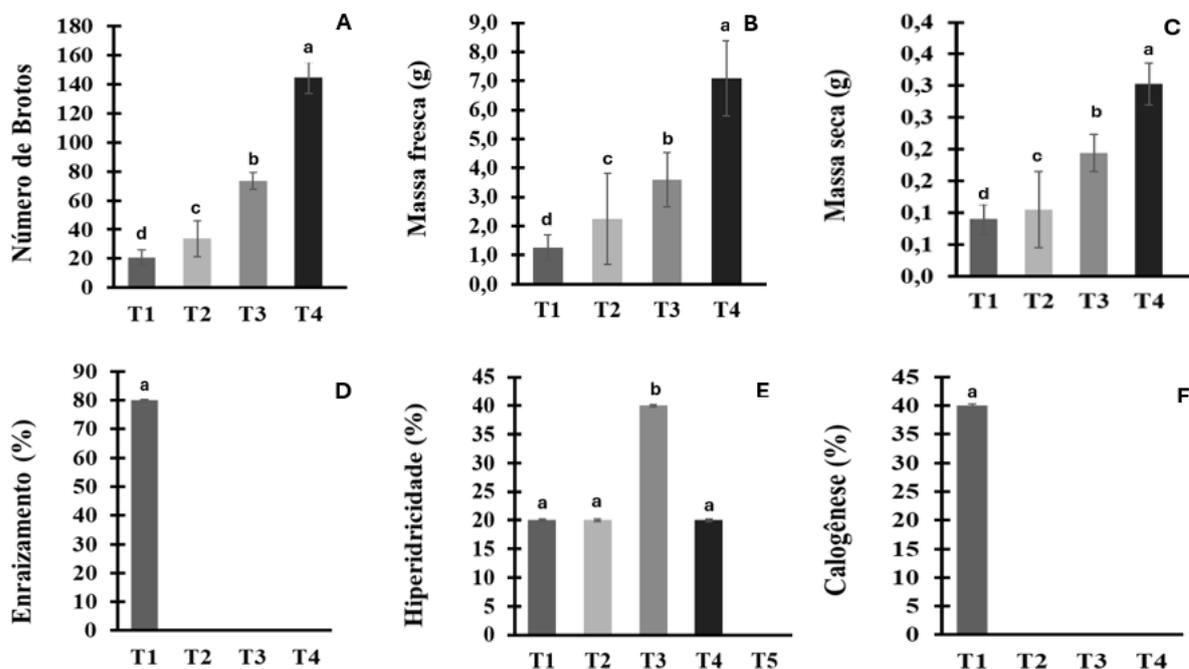
**Figura 2.** Germinação *in vitro* de *Dianthus caryophyllus* nos seguintes tratamentos: T1- (MS Total); T2 - (½ MS); T3 - (WPM Total), T4 - (½ WPM).

É possível que as plantas de cravo tenham se beneficiado dos maiores teores nitratos, como fonte de nitrogênio, presentes no meio MS o que pode ter sido responsável pelo crescimento de plantas de melhor qualidade e com coloração verde mais intensa. Estudo recente indica que há uma relação entre a concentração de nitratos e a qualidade plantas de cravo,

justificando que a redução dos teores nutricionais do meio de cultura pode favorecer, inclusive a hiperidricidade de plantas (PUROHIT; AGARWAL, 2017).

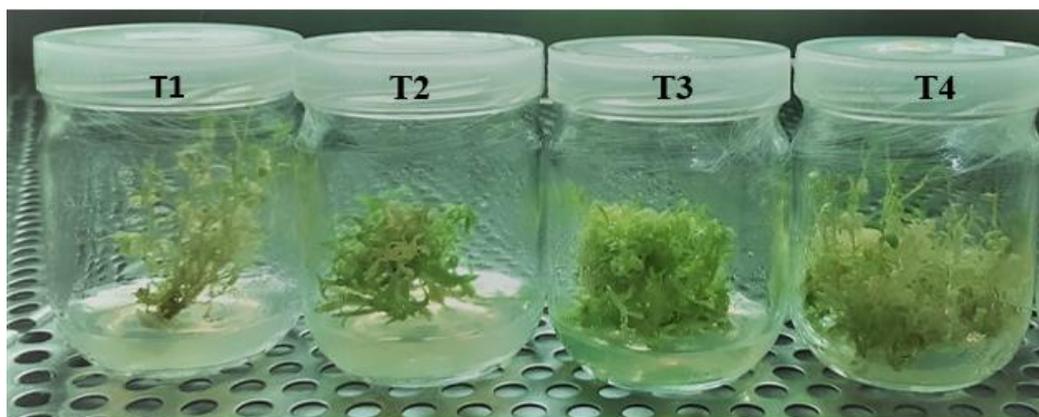
### 6.5.2 Multiplicação *in vitro*

A brotação de segmentos caulinares de *D. caryophyllus* ocorre em meio MS sem a adição de reguladores de crescimento, com uma produção média de 21 brotos (T1) (Figura 3).



**Figura 3.** Médias dos resultados das variáveis Números de Brotos (A); Massa Fresca de plantas (B); Massa seca de plantas (C); Presença de Raiz (D); Presença de Hiperidricidade (E) e Presença de Calos (F) durante a multiplicação de *D. caryophyllus* nos tratamentos: T1) Controle 0 g.L<sup>-1</sup> de BAP; T2) 3,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP; T3) 4,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP e T4) 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 0,5 mg L<sup>-1</sup> de AIB.\* Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Embora para indução de brotações em *D. caryophyllus* não seja determinante a presença de reguladores de crescimento, foi possível observar que o uso de fitorreguladores potencializa a produção de maiores valores de brotos por microestaca. Foi observado um incremento no número de brotações em plantas crescidas em meio MS suplementado com 4,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP (T3), ou ainda, com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 0,5 mg L<sup>-1</sup> de AIB (T4). Sendo indicado então o uso de fitorreguladores quando o objetivo for a maximizar a produção de brotos por microestacas na micropropagação desta espécie (Figura 4).



**Figura 4.** Formação de múltiplos brotos de *Dianthus caryophyllus* nos tratamentos após 35 dias da inoculação nos tratamentos: T1) Controle 0 g.L<sup>-1</sup> de BAP; T2) 3,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP; T3) 4,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP e T4) 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 0,5 mg L<sup>-1</sup> de AIB.

Em média, as microestacas tratadas com 1,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,5 mg L<sup>-1</sup> AIB (T4) apresentaram o maior número de brotações (144 brotos), maior massa fresca e massa seca diferindo significativamente dos demais tratamentos. O número de brotações para esse tratamento foi de 6,4 vezes superior ao tratamento controle, 4 vezes superior àquelas tratadas com 3 mg L<sup>-1</sup> BAP e quase 2 vezes maior que aquelas tratadas com 4 mg L<sup>-1</sup> de BAP (Figura 3).

Na fase de multiplicação, geralmente são utilizadas citocininas com ou sem auxina no meio basal para remover a dominância apical e se obter o máximo número de brotos. Os resultados de estudos anteriores mostraram que a combinação entre o uso de uma citocinina como BAP combinada com uma auxina, geralmente garantiram uma melhor taxa de multiplicação (HOLOBIUC et al., 2010).

Cristea et al., 2010, em seu trabalho observaram que o melhor meio para multiplicação de *D. henteri*, foi com a utilização de BAP 1 mg L<sup>-1</sup> e ANA 0,1 mg L<sup>-1</sup>, onde cada microestaca gerou de 110 a 240 explantes. Papafotiou; Stragas, 2007, avaliando em seu trabalho a propagação *in vitro* de *Dianthus fruticosus* L. e observaram resposta semelhante a respeito do equilíbrio hormonal do meio de cultura, com melhor taxa de multiplicação no meio contendo (ANA 0,1 mg L<sup>-1</sup> e isopenteniladenina (2iP) 0,5 mg L<sup>-1</sup>). Hayati, et al., 2016, obtiveram resultados semelhantes trabalhando com a espécie *Dianthus ingoldbyi*, em meio MS suplementado com 1mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,3mg L<sup>-1</sup> de ANA.

PAREEK, et al., 2004, trabalhando com as espécies *Dianthus caryophyllus*, *D. chinensis* e *D. barbatus*, também obtiveram a melhor resposta em termos de formação de múltiplos brotos em meio MS com BAP (1 mg L<sup>-1</sup>) + ANA (0,5 mg L<sup>-1</sup>). Além disso, Van Altvorst (1992) e Yantcheva et al. (1998) relataram alto número de brotos por explante em meio MS incluindo 0,9 mg L<sup>-1</sup> BAP e 0,3 mg L<sup>-1</sup> ANA. Mangal et al., (2002) e Onamu et al., 2003, também usaram meio MS suplementado com combinação de ANA e Cinetina para indução de brotos com sucesso. Todos esses trabalhos só confirmam que o tratamento T4 que possui a combinação de uma citocina com uma auxina é o mais indicado para um maior êxito na multiplicação de brotos de *Dhiantus caryophyllus* Chabaud.

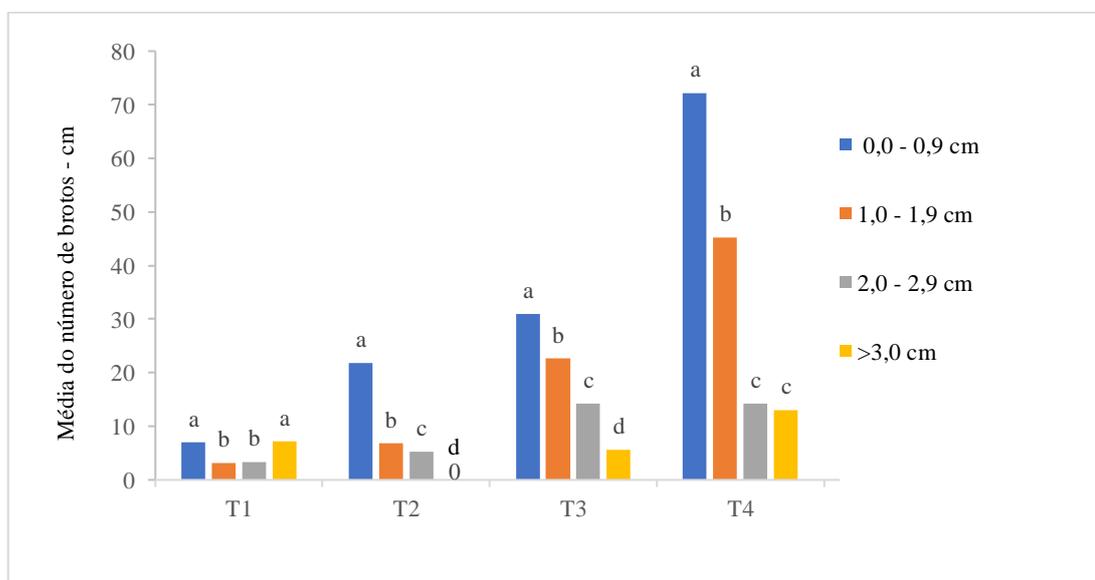
Outros trabalhos mostraram que a maior taxa de multiplicação do cravo foi alcançada na faixa de 0,5 a 4 mg L<sup>-1</sup> de citocininas e que a concentração ideal dependia do cultivar utilizado (ALI et al. 2008; SALEHI, 2006). Ali et al., (2008), observaram em seu trabalho que para *D. caryophyllus* L. e *D. superbis* L., o desenvolvimento ideal dos brotos foi observado em meio basal contendo 4 mg L<sup>-1</sup> de BAP. Kharrazi, et al., (2011), também observou em seu trabalho com *D. caryophyllus* L. a maior formação de brotos em meio com 4 mg L<sup>-1</sup> de BAP.

Em todos os tratamentos, foi observado o surgimento de brotos com a presença de hiperidricidade, sendo uma condição desfavorável para o estabelecimento e desenvolvimento adequado. Esse fenômeno é descrito como sendo uma anormalidade caracterizada pela presença de folhas ou brotos encharcados de água, apresentando uma aparência translúcida ou vítreo (SOUZA, 2018). A hiperidricidade é o problema mais relatado na literatura como o fator que mais afeta a micropropagação, sendo o cravo uma das plantas mais afetadas por esta anomalia, assim como todas as espécies das Cariofiláceas (CASAS, et al., 2010).

O controle da hiperidricidade em plantas micropropagadas de cravo tem sido foco de muitas pesquisas (SAHER, et al., 2004). Um dos fatores que influenciam esse fenômeno são as concentrações dos reguladores de crescimento, especialmente a citocinina (BAP); a umidade e a concentração salina do meio de cultura, principalmente o efeito do agente gelificante e do sistema de vedação (VASCONCELOS, et al., 2012; CUZZUOL, et al., 1995). Sharma e Mohan (2006), também relataram que o tipo de citocinina é um dos fatores mais importantes que afetam a taxa de hiperidricidade, eles notaram que em seu trabalho ao diminuir a concentração de BAP de 2 para 0 mg L<sup>-1</sup> durante subculturas subsequentes, a taxa de hiperidricidade diminuiu.

Com base nestes estudos pode-se concluir que vários fatores podem influenciar no surgimento deste fenômeno durante o processo de micropropagação da espécie de cravo, com base nos resultados deste trabalho foi possível observar que o tratamento T4 apresentou uma taxa de 20%, este valor é baixo em comparação com o tratamento T3 (40%). Sendo assim é indicado que em estudos futuros possa ser testado algumas das soluções sugeridas por Vasconcelos, et al., (2012) e Cuzzuol, et al., (1995), para que se possa minimizar ainda mais esse valor do tratamento T4 e que se possa obter um maior número de plantas livres desse fenômeno.

Microestacas de *Dianthus caryophyllus* tratadas com 1,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,5 mg L<sup>-1</sup> AIB produziram maior número de brotações com comprimentos superior a 3 cm, quando comparado com os outros tratamentos (Figura 5).



**Figura 5.** Médias dos números de brotos de *Dianthus caryophyllus* de acordo com a escala de tamanho do broto para cada tratamento: T1) Controle 0 g.L<sup>-1</sup> de BAP; T2) 3,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP; T3) 4,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP e T4) 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 0,5 mg L<sup>-1</sup> de AIB. \*Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O tamanho do broto é um fator muito importante para o processo de estabelecimento *in vitro*, e apresenta algumas vantagens quando se obtém brotos mais longos, pois são mais fáceis de se manusear e conseguir individualizá-los para a próxima etapa e também acabam por possuir mais chances de sucesso nas próximas etapas do processo de micropropagação da espécie. CRISTEA et al., 2010, em seu trabalho com *Dianthus henteri* obteve resultado semelhante ao encontrado neste trabalho onde o comprimento médio dos brotos foi de 2,9 cm quando se usou a combinação de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ANA.

Estacas cultivadas em meio de cultura sem a adição de reguladores de crescimento (controle) conseguiram induzir brotações, no entanto esses se são, em geral, menores que 1 cm de comprimento sendo, conseqüentemente, um problema para as próximas etapas do protocolo, pois quanto menor o broto, menos chance destes se estabelecerem e sobreviverem. Outro fator relevante é que brotos com tamanhos muito pequenos, são bem mais difíceis de serem manipulados e individualizados para serem utilizados em futuras etapas da micropropagação, como por exemplo o enraizamento e a climatização.

### 6.5.3 Crescimento e enraizamento *in vitro*

Após trinta dias do início do teste foi possível observar que todos os tratamentos apresentaram indução de raízes (Tabela 2). Para as variáveis NR, CR, NB, CB o tratamento T2 (½ MS suplementado com 0,5 mg L<sup>-1</sup> de AIB) e T3 (½ MS suplementado com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de AIB) foram os que apresentaram os melhores valores, isso faz com que esses se tornem os tratamentos mais próximos dos resultados adequados para que se obtenha plântulas com maiores chances de sobrevivência. Porém o T3 se destacou por apresentar os maiores valores para número de raízes e brotos e também para o comprimento das raízes (Tabela 2 e Figura 6). Estas variáveis são as de maior relevância quanto ao objetivo principal desse teste, pois são os fatores mais relevantes para o sucesso da micropropagação da espécie.

**Tabela 2.** Média das variáveis: números de raízes (NR), número de brotos (NB), comprimento das raízes (CR), comprimento dos brotos (CB) e (%) de presença de plantas com hiperidricidade (PPH) de *Dianthus caryophyllus* nos tratamentos: T1) ½ MS sem adição de reguladores; T2) ½ MS suplementado com 0,5 mg L<sup>-1</sup> de AIB; T3) ½ MS suplementado com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de AIB.

Tratamento	NR (Unid)	CR (cm)	NB (unid)	CB (cm)	PPH (%)
T1	4,7 c	1,0 c	5,8 c	7,9 a	7,0 b
T2	6,4 b	2,1 b	6,4 b	4,3 c	6,0 c
T3	9,3 a	3,1 a	7,3 a	5,6 b	14,0 a

\*Letras iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



**Figura 6.** Indução de raízes no T3 ( $\frac{1}{2}$  MS suplementado com  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB).

Foi possível observar que o T1 ( $\frac{1}{2}$  MS sem adição de reguladores), mesmo contendo somente o meio MS em sua composição resultou também na produção de raízes e brotos, sendo uma opção para uso. Porém quando comparado com o tratamento T3, a complementação do meio com o indutor de raiz AIB, aumentou significativamente todas as variáveis avaliadas, sendo este de grande interesse quando se tem o objetivo de se maximizar características importantes para o sucesso na obtenção de enraizamento. Outros trabalhos com *Dianthus caryophyllus* também obtiveram sucesso no enraizamento com a utilização do AIB. Dogra (2007), observou porcentagem máxima de enraizamento (99,15) com  $5 \mu\text{M}$  de AIB. Pathania, (1988), também obteve melhor resposta de enraizamento com  $5 \mu\text{M}$  de AIB e Bora et al (2007) e Ahmad et al (2008) com  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB.

Mais uma vez foi possível observar que o fenômeno da hiperidricidade também esteve presente no processo de indução de enraizamento (Tabela 2), afetando todos os tratamentos, com o tratamento T3 apresentando uma maior porcentagem (14%), quando comparado aos outros tratamentos T1 e T2 com 7 e 6%, respectivamente. Como foi dito anteriormente no processo de multiplicação de brotos, a hiperidricidade é amplamente reconhecida como um dos principais desafios enfrentados na micropropagação de espécies de cravo. Afetando negativamente o desenvolvimento das plantas de cravo, pois folhas hiperídricas tendem a ser mais suscetíveis a infecções fúngicas e dificultam a absorção de nutrientes essenciais, levando ao enfraquecimento das plântulas, comprometendo sua qualidade e capacidade de aclimação após o transplântio para o ambiente *ex vitro* (CASAS, et al., 2010).

Para mitigar os efeitos da hiperidricidade durante a etapa de enraizamento *in vitro* de cravos, é importante ajustar cuidadosamente as condições de cultivo, incluindo a otimização da umidade relativa, aeração adequada, controle da intensidade luminosa e seleção adequada dos reguladores de crescimento no meio de cultura (CUZZUOL, et al., 1995).

## 6.6 CONCLUSÕES

É possível germinar e propagar plantas de cravo *in vitro*, obtendo plantas capazes de gerar mudas em quantidade e qualidade.

O maior percentual de germinação *in vitro* e vigor foi obtido com o meio MS<sub>Total</sub>. A formação do maior número de brotos ocorreu no meio MS suplementado com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP + 0,5 mg L<sup>-1</sup> de AIB, com uma média de 144 brotos por explante. A formação do maior número de raízes (9,3) ocorreu no meio MS<sub>1/2</sub> suplementado com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de AIB.

Em conclusão, o protocolo para a germinação e micropropagação utilizada neste estudo é sugerido como um método eficaz para a multiplicação da espécie *Dianthus caryophyllus* Chabaud Gigante Dobrado vermelho.

## 6.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABELIOTIS, K.; BARLA, S.A.; DETSIS, V.; MALINDRETOS, G. Life cycle assessment of carnation production in Greece. **Journal of Cleaner Production**, v.112, p.32-38. 2016.
- ABID MEHMOOD, M.; AKHTAR KHAN, M. S.; AHMAD, N. Growth, yield and quality of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) cultivars under lath house conditions. **Journal of Ornamental Plants**, v. 4, n. 1, p. 27-32, 2014.
- AHMAD, F.; MANDAL, B. B.; GUPTA, S. Effect of some growth regulators on rooting of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) under *in vitro* conditions. **Applied Biological Research**, v. 10, n. 1 and 2, p. 44-46, 2008.
- AHMADIAN, M.; BABAEI, A.; SHOKRI, S.; HESSAMI, S. Micropropagation of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) in liquid medium by temporary immersion bioreactor in comparison with solid culture. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v.15, n.2, p.309-315, 2017.
- ALI, A., AFRASIAB, H., NAZ, S. H. A. G. U. F. T. A., RAUF, M.; IQBAL, J. An efficient protocol for *in vitro* propagation of carnation (*Dianthus caryophyllus*). **Pakistan Journal of Botany**, v. 40, n. 1, p. 111, 2008.
- AL-MA'ATHEDI, A.F.; ABBAS, A.J.; AL-ABDALY, H.M. Effect of growth regulators on improving productivity and quality of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) flowers with economic study. **Annals of Agricultural Sciences**, v.63, n.1, p.109-114, 2018.
- ALMEIDA, E. M., DIJKSTRA, D., RIBEIRO, F. M., SOUSA, R. M., ZANATA, F. A., MACHADO, A. S.; RIOS, A. D. F. O uso de reguladores de crescimento vegetal em plantas forrageiras. **Nutritime Revista Eletrônica, on-line, Viçosa**, v.12, n.5, p.4302-4308. 2015.
- AOYAMA, E. M., VERSIEUX, L. D. M., NIEVOLA, C. C.; MAZZONI-VIVEIROS, S. C. Avaliação da eficiência da propagação de *Alcantarea imperialis* (Bromeliaceae) cultivada *in vitro* e *ex vitro*. **Rodriguésia**, v. 63, p. 321-331, 2012.
- BORA A, SINGH S, TALUKDAR MC, HAZARIKA BN. An efficient method for *in vitro* plant regeneration in carnation. **Indian Journal of Horticulture**. 64(4):439-443. 2007.
- CASAS, J. L.; OLMOS, H.; PIQUERAS, A. Propagação *in vitro* do cravo (*Dianthus caryophyllus* L.). **Protocolos para propagação *in vitro* de plantas ornamentais**, p. 109-116, 2010.
- CARNEIRO, C.E. **Caryophyllaceae in Flora do Brasil 2020**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2020.
- CARVALHO, A.C.P.P.; TORRES, A.C.; BRAGA, E.J.B.; LEMOS, E.E.P.D.; SOUZA, F.V.D.; PETTERS, J.A.; WILLADINO, L.; CÂMARA, T.R. Glossário de cultura de tecidos de plantas. **Plant Cell Culture; Micropropagation**, v.7, n.1, 2011.
- CRISTEA, V., BRUMMER, A. T., JARDA, L. I. L. I. A. N. A.; MICLĂUȘ, M. I. H. A. I. *In vitro* culture initiation and phytohormonal influence on *Dianthus henteri*—a Romanian endemic species. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 15, n. 1, p. 25-33, 2010.

CUZZUOL, G. R. F., GALLO, L. A., ALMEIDA, M. D.; CROCOMO, O. J. Controle da vitrificação do cravo (*Dianthus caryophyllus* L.) *in vitro*. **Scientia Agricola**, v. 52, p. 604-614, 1995.

DOGRA, S. *In vitro* mutagenesis in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) for induction of resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *Dianthi*. **Ph. D. thesis**, submitted to Dr. Y S Parmar University of Horticulture and Forestry, Nauni, Solan (H.P.), 2007.

FERREIRA, G. S. Copaifera langsdorffii, Uma Espécie de Uso Múltiplo do Cerrado: Uma Revisão de Literatura. **Trabalho de conclusão de curso, Departamento de Engenharia Florestal**, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 56f. (2021).

GUIMARÃES, Darlysson Tavares. Germinação *in vitro*, desenvolvimento inicial e micropropagação de cereus jamacaru em meios de cultura simplificados. **Monografia** - Universidade Federal de Campina Grande. 2016.

HAYATI, A. R. D. A., DAYAN, S., KARTAL, Ç.; GÜLER, N. *In vitro* conservation of critically endangered *Dianthus ingoldbyi* Turrill under slow growth conditions. **Trakya University Journal of Natural Sciences**, v. 17, n. 1, p. 47-54, 2016.

HOLOBIUC, I.; MITOI, M., BLINDU, R.; HELEPCIUC, F. O estabelecimento de um banco genético *in vitro* em *Dianthus spiculifolius* Schur. e *D. glacialis* ssp. *gelidus* (Schott Nym. et Kotschy) Tutin: II. Caracterização de culturas de médio prazo em condições de crescimento mínimo. **Cartas biotecnológicas romenas**, v. 2, pág. 5111-5119, 2010.

JORAPUR, S.; JOGDANDE, N.; DHUMALE, D. Petal callus mediated de novo regeneration of shoots in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). **The Pharma Innovation Journal**, v. 7, n. 1, p. 218-22, 2018.

KHARRAZI, M., NEMATI, H., TEHRANIFAR, A., BAGHERI, A.; SHARIFI, A. *In vitro* culture of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) focusing on the problem of vitrification. 2011.

KANTIA, A.; KOTHARI, S. L. High efficiency adventitious shoot bud formation and plant regeneration from leaf explants of *Dianthus chinensis* L. **Scientia Horticulturae**, v. 96, n. 1-4, p. 205-212, 2002.

KHATUN, M. M.; ROY, P. K.; RAZZAK, Md Abdur. Additive effects of coconut water with various hormones on *in vitro* regeneration of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). **The J. Anim. Plant Sci.** 28(2): 2018.

KHATUN, M. M.; RAHMAN, M. M.; ROY, P. K. *In vitro* regeneration and field evaluation of Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) through shoot tip and node culture. **Journal of applied Science and Technology**, v. 9, n. 1, p. 93-99, 2013.

KARAMI, O.; DELJOU, A.; KORDESTANI, G. K. Embriogênese somática secundária de cravo (*Dianthus caryophyllus* L.). **Cultura de Células Vegetais, Tecidos e Órgãos**, v. 92, p. 273-280, 2008.

LIM, T. K. *Dianthus Caryophyllus*. **Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants: Flowers**, Vol. 7. 2014.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Micropropagação comercialmente viável de louro da montanha, *Kalmia latifolia*, através do uso de cultura de pontas de brotos. **Micropropagação**

**comercialmente viável de louro da montanha, *Kalmia latifolia*, através do uso de cultura de pontas de brotos.** v. 30, pág. 421-427, 1980.

MANGAL, M., BHARDWAJ, S.V. KAUR, D.R.; MANGAL, A.K. Use of meristem tip culture to eliminate carnation latent virus from carnation plant. **Indian journal of experimental biology**, 40: 119-122. 2002.

MARTINS, C. R.; CARVALHO, A. C. P. P. Avanços da cultura de tecidos na micropropagação de plantas. III Ciclo de palestras sobre cultivo *in vitro* de plantas, 3., **Anais...Aracaju: Embrapa:Tabuleiros Costeiros**, 2012.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p473-497, 1962.

ONAMU, R., OBUKOSIA, S. D., MUSEMBI, N.; HUTCHINSON, M. J. Efficacy of thidiazuron in *in vitro* propagation of carnation shoot tips: Influence of dose and duration of exposure. **African Crop Science Journal**, 2003.

PAPAFOTIOU, M.; STRAGAS, J. Seed germination and *in vitro* propagation of *Dianthus fruticosus* L. In: **VI International Symposium on New Floricultural Crops 813**. p. 481-484. 2007.

PAREEK, A.; KANTIA, A.; KOTHARI, S. L. *In vitro* cloning of ornamental species of *Dianthus*. **Indian journal of biotechnology**, 2004.

PATHANIA, N. S. **Propagation of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) through tissue culture**. M. Sc. Thesis, submitted to Dr. Y S Parmar University of Horticulture and Forestry, Nauni, Solan (H.P.), 1988.

PEREIRA, E.O.; LIMA, A.B.P.; NOGUEIRA, E.U.; COUTO, D.R.; SOARES, T.C.B. Germinação *in vitro* de *Pitcairnia flammea* (Bromeliaceae): efeito do meio de cultivo e do carvão ativo. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v.7, N.13, p. 634-642, 2011

POLESI, N.P.E. Microrganismos endofíticos e a cultura de tecidos vegetais: quebrando paradigmas. *Revista brasileira de Biociências*, v.9, n.4, p.533-541, 2011.

PUROHIT, S.; AGARWAL, M. Mineral manipulation and antioxidative studies in carnation - *Dianthus caryophyllus* L.. **International Journal of Crop Science and Technology**, v. 3, n. 2, 2017. DOI: 10.26558/ijcst.334683

R CORE TEAM. **A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2016.

REBELO, D. C. C. **Micropropagação e avaliação da estabilidade genética da *Tuberaria lignosa***. Dissertação de Mestrado. 2020.

SAHER, S., PIQUERAS, A., HELLIN, E.; OLMOS, E. Hyperhydricity in micropropagated carnation shoots: the role of oxidative stress. **Physiologia plantarum**, v. 120, n. 1, p. 152-161, 2004.

SALEHI, H. Can a general shoot proliferation and rooting medium be used for a number of carnation cultivars?. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 1, p. 25-30, 2006.

SHARMA, U.; MOHAN, J. S. S. Reduction of vitrification in *in vitro* raised shoots of *Chlorophytum borivillianum* Sant.; Fernand., a rare potent medicinal herb. **Indian Journal of Experimental Biology**, 2006.

SIROHI, U., SHARMA, S., KUMAR, M., S SENGAR, R., K GANGWAR, L., TOMAR, A., ...; K YADAV, M. An Effective Protocol for Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) cv. 'Geolei' Explants Sterilization for Successful Callusing and Shoot Regeneration. **International Journal of Environment and Climate Change**. 2021.

SOUZA, G. A. R.; Fatores bióticos e abióticos que afetam a micropropagação *in vitro*, **Trabalho de conclusão de curso (Graduação)**, Instituto Federal de Minas Gerais, 2018.

VAN ALTVORST, A. C, KOEHORST, H. J. J, BRUINSMA, T., JANSEN, J., CUSTERS, J. B. M, JONG, J.; DONS, J. J. M. Formação adventícia de brotos a partir de explantes foliares *in vitro* de cravo (*Dianthus caryophyllus* L.). **Scientia horticultrae**, v. 3-4, pág. 223-235, 1992.

VASCONCELOS, A.V.G.; TOMAS, L.F.; CAMARA, T.R.; WILLADINO, L. Hiperidricidade: uma desordem metabólica. **Ciência Rural**, v.42, n.5, mai, 2012.

YAGI, M.; SHIRASAWA, K.; HIRAKAWA, H.; ISOBE, S.; MATSUNO, J.; UNO, Y.; YAMAGUCHI, H. QTL analysis for flowering time in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). **Scientia Horticulturae**, v.262, p.109053. 2020.

YANTCHEVA, A.; VLAHOVA, M.; ATANASSOV, A. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). **Plant Cell Reports**, v. 18, n. 1-2, p. 148-153, 1998.

## **7 CAPÍTULO IV**

### **MICROPROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE *ANTHURIUM ANDRAEANUM* L VR. 'BLACK QUEEN'**

## 7.1 RESUMO

O Antúrio é a segunda flor tropical mais importante no mercado mundial de flores. A propagação *in vitro* via embriogênese somática é uma alternativa eficiente para a propagação em larga escala de diversas espécies ornamentais. No entanto, não há relatos do desenvolvimento de protocolos completos de embriogênese somática, com produção de plantas de *Anthurium andraeanum* L. vr. 'Black Queen'. Por isso os objetivos deste trabalho foram: avaliar o melhor método de assepsia dos explantes, determinar a idade da folha usada como doadora de explante, a orientação do explante no meio, as condições de incubação, além de avaliar diferentes meios de cultura e de concentrações de reguladores de crescimento mais adequados para o alcance da embriogênese somática de *Anthurium andraeanum* L. vr. 'Black Queen'. Para a assepsia dos explantes foliares, verificou-se que a imersão em álcool 70% (v/v) + solução de gentamicina (20%) por 1 minuto, e posteriormente a imersão por 7 minutos em solução de hipoclorito de sódio 2% (v/v), foi o mais eficiente. A combinação dos fatores: explante retirado da folha de idade intermediária + meio de cultivo com WPM + ambiente escuro, foi o tratamento mais eficiente no controle da oxidação e na etapa de indução de calos nos explantes. Os tratamentos T1 - (WPM + 2,0 mg/L<sup>-1</sup> de BAP + 1,0 mg/L<sup>-1</sup> de 2,4D) e T2 - (WPM + 1,0 mg/L<sup>-1</sup> de BAP + 0,5 mg/L<sup>-1</sup> de AIB) induziram a produção de calos embriogênicos com valores de 30 e 60% respectivamente, onde a forma como os segmentos foliares foram orientados no meio afetou significativamente o potencial morfogênico, gerando calos embriogênicos por via direta e indireta. Com base nos resultados obtidos, o protocolo elaborado neste trabalho é recomendado para a obtenção da micropropagação *in vitro* da espécie *Anthurium andraeanum* L. vr. 'Black Queen'.

**Palavras-chave:** Embriogênese somática; Cultivo *in vitro*; Aráceas; Meio WPM; Idade de explante.

## 7.2 ABSTRACT

Anthurium is the second most important tropical flower in the world flower market. In vitro propagation via somatic embryogenesis is an efficient alternative for large-scale propagation of several ornamental species. However, there are no reports of the development of complete somatic embryogenesis protocols, with production of *Anthurium andraeanum* L. var. 'Black Queen' plants. Therefore, the objectives of this study were: to evaluate the best method of explant asepsis, determine the age of the leaf used as an explant donor, the orientation of the explant in the medium, the incubation conditions, and to evaluate different culture media and concentrations of growth regulators most suitable for achieving somatic embryogenesis of *Anthurium andraeanum* L. var. 'Black Queen'. For the asepsis of leaf explants, it was found that immersion in 70% (v/v) alcohol + gentamicin solution (20%) for 1 minute, and subsequent immersion for 7 minutes in 2% (v/v) sodium hypochlorite solution, was the most efficient. The combination of factors: explant taken from intermediate-aged leaves + culture medium with WPM + dark environment, was the most efficient treatment in controlling oxidation and in the callus induction stage in the explants. The treatments T1 - (WPM + 2,0 mg/L<sup>-1</sup> BAP + 1,0 mg/L<sup>-1</sup> 2,4D) and T2 - (WPM + 1,0 mg/L<sup>-1</sup> BAP + 0,5 mg/L<sup>-1</sup> AIB) induced the production of embryogenic callus with values of 30 and 60%, respectively, where the way in which the leaf segments were oriented in the medium significantly affected the morphogenic potential, generating embryogenic callus directly and indirectly. Based on the results obtained, the protocol developed in this work is recommended for obtaining in vitro micropropagation of the species *Anthurium andraeanum* L. var. 'Black Queen'.

Keywords: Somatic embryogenesis; In vitro culture; Araceae; WPM medium; Explant age.

### 7.3 INTRODUÇÃO

*Anthurium* é um importante gênero da Família Araceae, com 950 espécies neotropicais (BOYCE; CROAT, 2018) cujas flores do tipo espata e bela folhagem frequentemente conferem alto valor ornamental, sendo uma das mais importantes flores tropicais no comercializadas mundialmente (PERERA et al., 2016; POLI et al., 2015). Na floricultura nacional são consideradas flores de múltiplo propósito, podendo ser produzidas para uso como flor ou folhagem de corte, como planta envasada e ainda para composição de jardins em projetos paisagísticos (GUADALUPE; MAYANIN, 2017).

Originário das Américas do Sul e Central, a espécie *Anthurium andraeanum* é uma das mais amplamente exploradas na floricultura contendo muitas variedades e híbridos comerciais (ROOPA; CHANDRASHEKAR; HARISHKUMAR, 2021). O híbrido 'Black Queen', desenvolvido da Holanda, recebeu esse nome homenagem a família real holandesa, sendo conhecida popularmente como: antúrio-negro, rainha-negra e Black Queen (PLANTASONYA, 2024). Seu valor ornamental deve-se à presença de uma espádice negra brilhante, espata e folhagem atraentes variando em tamanho que confere valor ornamental para o mercado plantas envasadas ou flores de corte com longa vida pós-colheita, que chega a ter uma duração de 60 dias, (PLANTASONYA, 2024, TEIXEIRA et al., 2015).

Embora haja uma demanda significativa, o cultivo de antúrios ainda enfrenta limitações, sobretudo devido à escassez de mudas de alta qualidade fitossanitária e genética (SOSA-FLORES et al., 2019). A propagação do antúrio ocorre tanto por via sexuada (sementes) quanto assexuada (DESAI et al., 2015). Métodos tradicionais de propagação vegetativa, como divisão de touceiras ou estaquia, podem disseminar pragas e doenças, além de limitar a disponibilidade de mudas e comprometer a comercialização do produto final. A produção de mudas por sementes é um processo lento e resulta em plantas não uniformes em vigor, tamanho e produtividade, bem como variações nas inflorescências em termos de cores, formas e tamanhos (TOMBOLATO et al., 2004). Portanto, a propagação *in vitro* surge como uma técnica alternativa viável para resolver esses problemas (DESAI et al., 2015).

Na área de plantas ornamentais, nos antúrios por exemplo as plantas híbridas são predominantes, e a clonagem *in vitro* tem sido utilizada para uniformizar características como época de floração, tamanho e forma das flores, entre outros aspectos (PINHEIRO, 2010). Assim, a propagação *in vitro* tem sido amplamente empregada como um método alternativo para a produção de plantas desta espécie em larga escala e com alta qualidade fitossanitária (TEIXEIRA et al. 2015).

Na literatura vários trabalhos têm sido descritos para a micropropagação *in vitro* de diversas espécies de antúrio de interesse econômico, cujas metodologias utilizadas possuem muitas variações dependendo do genótipo utilizado, envolvendo 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, (ATAK ; CELIK, 2009, 2012; PINHEIRO, et al., 2009; ISLAM et al., 2010; GU et al., 2012; CARDOSO ; HABERMANN, 2014; AJDARBIN et al., 2015; BHATTACHARYA et al., 2015; PERERA et al.; 2016; GUADALUPE ; MAYANIN, 2017; PRAKASHA et al., 2017; SAPTARI et al., 2017; THOKCHOM ; MAITRA, 2017; ZHANG et al., 2017; BHAVANA et al., 2018; WANG et al., 2019; LIMA, et al., 2020). Guerra et al., (1998) destacam que as respostas às condições de cultivo podem variar conforme a fonte do explante, dependendo da espécie em estudo. Krishnaraj e Vasil (1995) acrescentam que o genótipo é um fator crucial na resposta, influenciando o desenvolvimento e a fisiologia dos explantes em cultura de tecidos. Essa constatação foi corroborada por Pierik (1976), que observou a formação de calos em explantes de segmentos foliares de 38 genótipos de *Anthurium andraeanum*, dos

quais 31 apresentaram produção satisfatória de calos, quatro mostraram pouca formação e três genótipos não produziram essa estrutura.

É possível observar então que há muita variação nos protocolos e que os resultados da resposta morfogênica *in vitro* são totalmente dependentes do genótipo utilizado, os procedimentos de propagação *in vitro* não são amplamente aplicáveis a todas as espécies de *Anthurium*, justificando assim a necessidade do desenvolvimento de protocolos específicos para cada variedade de antúrio (GANTAIT; MANDAL, 2010). Devido a estes fatores, o objetivo deste estudo foi desenvolver um protocolo eficiente de micropropagação para a espécie *Anthurium andraeanum* variedade 'Black Queen'.

## 7.4 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Experimento 1

#### 2.1.1 Desinfestação dos Explantes

Todas as folhas de *Anthurium andraeanum* “Black Queen”, foram coletadas de uma planta matriz adulta adquirida comercialmente. Antes da aplicação de cada tratamento todas as folhas foram cuidadosamente lavadas com água corrente durante 5 min, depois foram colocados em água destilada estéril contendo 2 gotas de Tween 20 a cada 100 ml de solução, por 5 minutos, e posteriormente enxaguados seis vezes com água destilada.

Foi testado diferentes tratamentos para a desinfestação dos explantes, todos com base no trabalho de ATAK ; CELIK, (2009), como se segue: T1 - (1 minuto em álcool 70% (v/v), e posteriormente os explantes foram tratados por 30 minutos em solução de hipoclorito de sódio 5% (v/v)); T2 – (1 minuto em álcool 70% (v/v) e solução de gentamicina (20%) por 30 minutos e posteriormente os explantes foram tratados por 12 minutos em solução de hipoclorito de sódio 5% (v/v)); T3 – (1 minuto em álcool 70% (v/v) e solução de gentamicina (20%) por 15 minutos, e posteriormente os explantes foram tratados por 10 minutos em solução de hipoclorito de sódio 2% (v/v)); T4 - (álcool 70% (v/v) + solução de gentamicina (20%) por 5 minutos, e posteriormente os explantes foram tratados por 8 minutos em solução de hipoclorito de sódio 2% (v/v)); T5 - (álcool 70% (v/v) + solução de gentamicina (20%) por 1 minuto, e posteriormente os explantes foram tratados por 7 minutos em solução de hipoclorito de sódio 2% (v/v)).

Os explantes foliares foram lavados, em câmara de fluxo laminar, três vezes com água destilada e autoclavada e posteriormente foram seccionados, com aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> para posterior transferência para o tubo.

O meio de cultura utilizado foi meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), suplementado com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de 6-benzylaminopurine (BAP) e 1,0 mgL<sup>-1</sup> de ácido indolbutírico (AIB). Ao meio foi adicionado 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, o pH ajustado para 5,8 e solidificado com 7 g L<sup>-1</sup> de ágar, antes da autoclavagem. Foram utilizados tubos de ensaio, contendo 10 mL de meio por tubo. Em seguida os meios foram autoclavados a 120 °C e 1 atm de pressão por 20 minutos.

Os explantes foram mantidos em câmara incubadora, em condições controladas, com temperatura de 25 °C, fotoperíodo 16 horas sob intensidade luminosa de 36 mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, fornecida por lâmpadas fluorescentes do tipo branca fria. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com 5 tratamentos, com 5 repetições e 6 tubos por parcela com um explante por tubo. Após 30 dias da transferência dos explantes, foram avaliadas as porcentagens de contaminação e oxidação.

## 2.2 Experimento 2

### 2.2.1 Idade da folha, posição do explante e condições de Incubação

O objetivo deste teste foi avaliar a influência da luz no controle da oxidação fenólica dos explantes de *Anthurium andraeanum* “Black Queen”, determinar a influência do meio nutritivo, a idade da folha e o tipo de superfície do explante mais adequado para o estabelecimento *in vitro* de *Anthurium andraeanum* “Black Queen”.

Foram testados três tipos de folhas de *Anthurium andraeanum* “Black Queen”, com idades diferentes e com duas formas de orientação do explante no respectivo meio (adaxial e abaxial). Foram coletadas folhas em diferentes estágios: folha jovem, intermediária e adulta. Sendo caracterizadas como: folha jovem marrom (aproximadamente 10 dias após a expansão), folha intermediária marrom na parte de baixo e verde na parte de cima (aproximadamente 20 dias após a expansão) e folha adulta verde (acima de 30 dias após a expansão). Todas as folhas foram coletadas de uma planta matriz adulta adquirida comercialmente. Antes da aplicação de cada tratamento todas as folhas foram desinfestadas de acordo com o tratamento indicado neste trabalho dos resultados do teste de desinfestação realizado anteriormente.

Os meios de cultura utilizados foram: meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) e o Woody Plant Medium (WPM) elaborado por Lloyd e Mccow (1981), suplementados com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 1,0 mgL<sup>-1</sup> de AIB. Aos meios foram adicionados 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, o pH ajustado para 5,8 e solidificado com 7 g L<sup>-1</sup> de ágar, antes da autoclavagem. Foram utilizados tubos de ensaio, contendo 10 mL de meio por tubo. Em seguida os meios foram autoclavados a 120°C e 1 atm de pressão por 20 minutos.

Os tratamentos consistiram em:

Tratamento	Idade da Folha	Meio de cultura	Condição de cultivo
T1	Folha Jovem	MS	Claro
T2	Folha Jovem	MS	Escuro
T3	Folha Jovem	WPM	Claro
T4	Folha Jovem	WPM	Escuro
T5	Folha Intermediária	MS	Claro
T6	Folha Intermediária	MS	Escuro
T7	Folha Intermediária	WPM	Claro
T8	Folha Intermediária	WPM	Escuro
T9	Folha Adulta	MS	Claro
T10	Folha Adulta	MS	Escuro
T11	Folha Adulta	WPM	Claro
T12	Folha Adulta	WPM	Escuro

Os explantes foram mantidos em câmara incubadora, em condições controladas, com temperatura de 25 °C, onde foi testado também duas condições de cultivo: claro (fotoperíodo 16 horas sob intensidade luminosa de 36 mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, fornecida por lâmpadas fluorescentes do tipo branca fria) e escuro (fotoperíodo negativo). Após 30 dias da transferência dos explantes as variáveis avaliadas foram as porcentagens de oxidação e calogênese.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com cinco repetições e 6 tubos por parcela com um explante por tubo, em esquema fatorial (3x2x2), sendo o fator (A) idade da Folha, (B) Meio de cultura e (C) Condição de cultivo - claro e escuro. Os dados obtidos foram tabulados e submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade com auxílio do software R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2016).

## 2.3 Experimento 3

### 2.3.1 Meios para indução de embriogênese somática:

Os tratamentos foram:

- T1) WPM suplementado com 2,0 mg/L de BAP + 1,0 mg/L de 2,4D
- T2) WPM suplementado com 1,0 mg/L de BAP + 0,5 mg/L de AIB
- T3) MS suplementado com 1,0 mg/L de BAP + 0,5 mg/L de AIB
- T4) MS suplementado com 1,0 mg/L de BAP + 0,5 mg/L de ANA
- T5) MS suplementado com 1,0 mg/L de BAP + 0,5 mg/L de 2,4D
- T6) 1/2MS suplementado com 1,0 mg/L de BAP + 0,1 mg/L de 2,4D
- T7) 1/2MS suplementado com 1,0 mg/L de BAP + 0,5 mg/L de 2,4D
- T8) 1/2MS suplementado com 1,0 mg/L de BAP + 1,0 mg/L de 2,4D
- T9) 1/2MS suplementado com 2,0 mg/L de BAP + 1,0 mg/L de 2,4D
- T10) 1/2MS suplementado com 1,0 mg/L de BAP + 0,5 mg/L de AIB.

Antes da aplicação de cada tratamento todas as folhas foram desinfestadas de acordo com o tratamento indicado neste trabalho dos resultados do teste de desinfestação realizado anteriormente. A idade da folha a ser utilizada também foi conforme o indicado no teste anterior e a orientação do explante (adaxial ou abaxial) foi utilizada novamente devido aos dois tipos de explante apresentaram indução de calos no teste anterior.

Os meios de cultura utilizados foram solidificados com 7 g L<sup>-1</sup> de ágar, suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, sendo utilizados tubos de ensaio, contendo 10 mL de meio por tubo. Em seguida os meios foram autoclavados a 120 °C e 1 atm de pressão por 20 minutos.

Os tubos foram levados para sala de crescimento e foram mantidos em condições controladas, no escuro, à temperatura de 25 ± 1 °C de acordo com o resultado obtido no teste anterior de condições de cultivo e pela metodologia proposta pelos autores (NHUT et al., 2006; TE-CHATO et al., 2006; PUCHOOA; SOOKUN, et al., 2003).

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com 5 repetições e 6 tubos por parcela com um explante por tubo. As variáveis avaliadas foram as porcentagens de oxidação aos 30 e 60 dias após a inoculação e a porcentagem de explantes com calos embriogênicos. Os dados obtidos foram tabulados e submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade com auxílio do software R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2016).

## 7.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 7.5.1 Desinfestação dos Explantes para o estabelecimento *in vitro* de *Anthurium andraeanum* “Black Queen”.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 1, observa-se que para a desinfestação dos explantes, o tratamento T1 foi o único a apresentar contaminação (63%), todos os outros tratamentos foram eficientes no controle da contaminação. Todos os tratamentos apresentaram 100% de oxidação, fato observado pelo escurecimento dos explantes e ausência de algum tipo de indução de calogênese, em 30 dias de cultivo (Tabela 1).

**Tabela 1.** Porcentagens de contaminação e oxidação de explantes foliares de *Anthurium andraeanum* “Black Queen” submetidos a diferentes tratamentos de desinfestação.

Tratamentos	% Contaminação	% Oxidação
<b>T1</b> - (1 minuto em álcool 70% (v/v) + 30 minutos em solução de hipoclorito de sódio 5% (v/v))	63	100
<b>T2</b> - (1 minuto em álcool 70% (v/v) + solução de gentamicina (20%) por 30 minutos + 12 minutos em solução de hipoclorito de sódio 5% (v/v))	0	100
<b>T3</b> - (1 minuto em álcool 70% (v/v) + solução de gentamicina (20%) por 15 minutos + 10 minutos em solução de hipoclorito de sódio 2% (v/v))	0	100
<b>T4</b> - (álcool 70% (v/v) + solução de gentamicina (20%) por 5 minutos + 8 minutos em solução de hipoclorito de sódio 2% (v/v))	0	100
<b>T5</b> - (álcool 70% (v/v) + solução de gentamicina (20%) por 1 minuto + 7 minutos em solução de hipoclorito de sódio 2% (v/v))	0	100

Os tratamentos T2, T3, T4 e T5 apresentavam em seu processo como diferencial do tratamento T1 o uso da gentamicina, sendo assim é possível justificar que o uso da gentamicina no processo foi de grande importância para a obtenção de explantes livres de contaminantes.

De acordo com a literatura a gentamicina é um antibiótico comumente utilizados para inibir o crescimento de microrganismos nos cultivos *in vitro* (LEONE, 2013). As bactérias são particularmente problemáticas nesse contexto, sendo o tipo mais comum de contaminação em cultura de tecidos representando um obstáculo significativo para o estabelecimento de explantes *in vitro*. Sua capacidade de se tornarem sistêmicas e a dificuldade de detecção constituem um desafio significativo para o estabelecimento de explantes *in vitro* (OLIVEIRA, et al., 2013).

Vários produtos podem ser utilizados para a desinfestação, como o etanol 70% e o hipoclorito de sódio, em concentrações variadas (AZEVEDO, et al., 2023; DUTRA et al., 2009). As concentrações das soluções desinfestantes, assim como as combinações dos princípios ativos e os tempos de exposição, podem variar consideravelmente a depender do genótipo e do tipo de explante utilizado. De acordo com Cid e Zimmermann (2006), o uso de compostos químicos, como hipoclorito de sódio, etanol e fungicidas nas doses e tempos adequados para cada explante, pode ser eficiente no controle da contaminação dos explantes em cultivos *in vitro*.

Na literatura é possível encontrar alguns trabalhos onde citam diferentes métodos que foram aplicados para esterilizar a superfície dos explantes de antúrio, porém é possível observar que são bastante variáveis e dependiam do tipo de explante e da espécie de antúrio utilizada. Para a esterilização superficial de folhas os mais comuns são o uso de hipoclorito de sódio (1–5% p/v) por 12–30 min sozinho ou em combinação com etanol 70% por alguns segundos e em alguns casos, a utilização de antibióticos, fungicidas ou pesticidas (LAN et al., 2003; PUCHOOA, 2005; VIÉGAS et al., 2007; JAHAN et al., 2009; ATAK e CELIK, 2009; KUMARI et al., 2011; RAAD et al., 2012; FARSI et al., 2012).

As altas taxas de contaminação bacteriana e fúngicas observadas nos experimentos preliminares deste trabalho tornaram necessário o uso de hipoclorito de sódio, etanol e de antibiótico nos testes de desinfestação, pois provavelmente havia presença de bactérias e fungos endógenos na planta matriz utilizada como fonte de explantes.

Na cultura de tecidos, é crucial o controle e a prevenção da contaminação microbiana, uma vez que o meio de cultura oferece um ambiente propício para o crescimento de microrganismos, como bactérias, leveduras e fungos, esses microrganismos representam as principais causas de perdas de material vegetal (PALÚ, et al. 2011; DANTAS et al., 2002), sendo um problema para a produção em larga escala de espécies de interesse econômico (AZEVEDO et al., 2023).

No presente trabalho, foi possível observar que os tratamentos T2, T3, T4 e T5 não apresentaram contaminação nos explantes, sendo assim todos são métodos eficientes para a desinfestação de explantes da espécie de *Anthurium A.* “Black Queen”. Porém o tratamento T5 se destaca por ter sido o método mais otimizado, com o uso de menores concentrações do agente desinfestante associado a curtos tempos de imersão, sendo o mais indicado, pois de acordo com Torres et al., (1999) e Santos, et al., (2015), um processo de desinfestação eficaz é aquele que combina uma baixa taxa de contaminação com a menor exposição possível do explante ao agente descontaminante. Deste modo, no presente estudo com explantes foliares de *Anthurium A.* “Black Queen”, verificou-se que a imersão em álcool 70% (v/v) + solução de gentamicina (20%) por 1 minuto, e posteriormente a imersão por 7 minutos em solução de hipoclorito de sódio 2% (v/v), foi o mais eficiente para a desinfestação, pois foi o que conseguiu inibir a presença de contaminação, podendo ser realizado em um menor tempo, otimizando assim o tempo gasto e a mão de obra quando comparado aos demais tratamentos. Sobre a variável oxidação do explante, como todos os tratamentos apresentaram 100% de oxidação, este fator foi estudado no próximo teste, para que se encontrasse soluções para inibir esse processo.

### **7.5.2 Idade da folha, posição do explante e Condições de Incubação**

De acordo com os resultados da tabela 2, foi possível observar uma diferença significativa entre as variáveis analisadas. Os fatores meio de cultivo, condições de cultivo (claro e escuro) e a idade do explante apresentaram resultados relevantes, para que se alcançasse a ausência de oxidação e a indução de calos nos explantes de *Anthurium A.* “Black Queen”. Para a variável orientação do explante (adaxial ou abaxial) não foi observado nenhuma diferença significativa, pois todos os dois tipos de explante apresentaram indução de calos.

A folha de idade jovem e adulta não apresentaram valores satisfatórios para as variáveis avaliadas, apresentando valores altos de oxidação dos explantes e não apresentando indução de calos, os explantes retirados da folha com idade intermediária foram os que apresentaram os melhores resultados. O meio de cultivo utilizado influenciou no controle da oxidação, sendo os tratamentos contendo meio WPM em sua composição o que apresentou os melhores valores. A condição de cultivo também influenciou na obtenção de explantes com menor taxa de oxidação, pois todos os tratamentos em que o explante ficou no ambiente claro com presença de

luminosidade, apresentaram 100% de oxidação. Ficando evidente a necessidade do uso do ambiente escuro para o controle da oxidação nos explantes.

Os tratamentos T8 (Folha Intermediária; WPM e Escuro) e T12 (Folha Adulta; WPM e Escuro) foram os únicos a não apresentarem oxidação dos explantes, sendo o tratamento T8 com o explante retirado da folha de idade intermediária, no meio de cultivo com WPM e em ambiente de escuro o único a apresentar a ausência de oxidação e a ocorrência do processo de calogênese com 33%.

**Tabela 2.** Influência da idade da folha, meio de cultura e condições de cultivo nos explantes foliares de *Anthurium andraeanum* “Black Queen”.

Tratamento	Idade da Folha	Meio de cultura	Condição de cultivo	% Oxidação (60 dias)	% Calogênese
T1	Folha Jovem	MS	Claro	100c	0b
T2	Folha Jovem	MS	Escuro	100c	0b
T3	Folha Jovem	WPM	Claro	100c	0b
T4	Folha Jovem	WPM	Escuro	80b	0b
T5	Folha Intermediária	MS	Claro	100c	0b
T6	Folha Intermediária	MS	Escuro	80b	0b
T7	Folha Intermediária	WPM	Claro	100c	0b
T8	Folha Intermediária	WPM	Escuro	0a	33a
T9	Folha Adulta	MS	Claro	100c	0b
T10	Folha Adulta	MS	Escuro	80b	0b
T11	Folha Adulta	WPM	Claro	100c	0b
T12	Folha Adulta	WPM	Escuro	0a	0b

\*Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A oxidação fenólica representa um desafio significativo durante as etapas iniciais do cultivo *in vitro*. Segundo Andrade et al., (2000), a liberação de compostos fenólicos é desencadeada pelo dano celular decorrente da excisão dos explantes, os quais modificam a composição do meio de cultivo e a absorção de metabólitos.

De acordo com Werner et al., (2009), a oxidação fenólica é altamente dependente do genótipo e do tipo de explante utilizado, da fase de desenvolvimento da planta, na literatura é possível encontrar trabalhos que relatam que a oxidação fenólica pode ser controlada em diferentes espécies com algumas estratégias, como por exemplo reduzir a luminosidade e manter a cultura no escuro, pois a luz tende a aumentar a produção de fenóis na planta (MARKS ; SIMPSON, 1990; FLORES, et al., 1998), a diminuição na concentração de sais no meio de cultura (CALDAS et al., 1998), a adição de antioxidantes ao meio (BASSAN et al., 2006) e o uso de explantes jovens (mais herbáceos) ao invés dos mais velhos (mais lenhosos), pois tendem a oxidarem menos (TEIXEIRA, 2005).

Todas essas informações corroboram com os resultados obtidos neste trabalho, onde a utilização da combinação dos fatores meio de cultivo, condições de cultivo (claro e escuro) e a idade do explante foram importantes para a obtenção de um protocolo eficiente para o controle da oxidação. Sendo o tratamento T8 (explante retirado da folha de idade intermediária + meio de cultivo com WPM e em ambiente de escuro) o mais eficiente e o recomendado para que se alcance o controle da oxidação e a etapa de indução de calos nos explantes, etapas importantes para o início do processo de estabelecimento *in vitro* de *Anthurium andraeanum* “Black Queen”.

### 7.5.3 Meios para indução de embriogênese somática

Após 30 dias da inoculação dos explantes, foi possível observar que os tratamentos T4, T8, e T9 já apresentavam 100% de oxidação em todos os explantes. Após 60 dias foi possível observar que os tratamentos T3, T5, T6 e T7 também apresentaram 100% de oxidação dos explantes. Somente os tratamentos T1, T2 e T10 não apresentaram oxidação em seus explantes (Tabela 3).

Para a variável porcentagem de embriogênese somática somente os tratamentos T1 e T2 apresentaram indução de calos embriogênicos, onde o tratamento T2 foi o que apresentou o maior valor com uma taxa de 60% e o tratamento T1 apresentou metade desse valor com 30% (Tabela 3).

**Tabela 3.** Influência de diferentes composições de reguladores de crescimento vegetal na embriogênese somática de *Anthurium andreanum* vr. “Black Queen”.

Tratamentos	(%) Oxidação (30 dias)	(%) Oxidação (60 dias)	(%) Embriogênese
T1 - (WPM + 2,0 mg/L de BAP + 1,0 mg/L de 2,4D)	0 b	0 b	30 b
T2 - (WPM + 1,0 mg/L de BAP + 0,5 mg/L de AIB)	0 b	0 b	60 a
T3 - (MS + 1,0 mg/L de BAP + 0,5 mg/L de AIB)	0 b	100 a	0 c
T4 - (MS + 1,0 mg/L de BAP + 0,5 mg/L de ANA)	100 a	100 a	0 c
T5 - (MS + 1,0 mg/L de BAP + 0,5 mg/L de 2,4D)	0 b	100 a	0 c
T6 - (1/2MS + 1,0 mg/L de BAP + 0,1 mg/L de 2,4D)	0 b	100 a	0 c
T7 - (1/2MS + 1,0 mg/L de BAP + 0,5 mg/L de 2,4D)	0 b	100 a	0 c
T8 - (1/2MS + 1,0 mg/L de BAP + 1,0 mg/L de 2,4D)	100 a	100 a	0 c
T9 - (1/2MS + 2,0 mg/L de BAP + 1,0 mg/L de 2,4D)	100 a	100 a	0 c
T10 - (1/2MS + 1,0 mg/L de BAP + 0,5 mg/L de AIB)	0 b	0 b	0 c

\*Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Foi possível observar neste trabalho que os tratamentos que possuíam o meio WPM em sua composição foram, no geral, melhores em comparação com os tratamentos que continham o meio MS, tanto para a inibição da ocorrência de oxidação nos explantes, como também para a indução de calos embriogênicos e produção de embriões somáticos.

A oxidação de explantes é uma das limitações comuns do cultivo *in vitro* de várias espécies, principalmente espécies lenhosas (KERBAUY, 2004). A oxidação ocorre devido ao corte realizado no explante, promovendo a liberação de compostos fenólicos, modificando o meio de cultura e interferindo na absorção de nutrientes, inibindo o crescimento dos explantes, podendo ocasionar a morte dos tecidos (ANDRADE et al., 2000; MUDOI et al., 2014; JESUS SILVA, et al., 2016).

O meio de cultura WPM é amplamente empregado na micropropagação de plantas lenhosas, desempenhando um papel crucial no controle da oxidação em explantes foliares. De acordo com Gonçalves, et al, (2013), espécies de natureza lenhosa, ao serem cultivadas *in vitro*, liberam exsudatos resultantes da oxidação de compostos fenólicos, essa oxidação ocorre devido a liberação de compostos fenólicos *in vitro*, que são precursores da síntese de lignina, pelo tecido injuriado. Em trabalhos encontrados na literatura é possível verificar a presença de taninos que são compostos fenólicos citados como constituintes comuns em plantas da família Araceae, inclusive em plantas de antúrio (VIANNA, 2002; MACEDO, et al., 2005; LUNA, et al., 2016). Este fator justificaria o porquê dos tratamentos que possuíam o meio WPM em sua composição terem sido os únicos a inibirem a oxidação dos explantes, pois a espécie estudada

neste trabalho apresenta características semelhantes a plantas de natureza lenhosa, em relação a exsudação de compostos fenólicos após a excisão do explante no meio de cultura.

Fossati, (2017), observou em seu trabalho que o uso dos sais de WPM proporcionou uma redução da oxidação fenólica nos tecidos de oliveira inoculados, quando comparado ao meio MS. Conforme Bassan et al., (2006), a oxidação fenólica pode ser controlada através do meio de cultura utilizado, através da redução da concentração de sais no meio de cultura. O meio WPM apresenta apenas 45% da força iônica total do meio MS (NUNES et al., 2002) e concentrações menores de nitrato (MS 40  $\mu$ M; WPM 9,7  $\mu$ M), amônio (MS 20  $\mu$ M; WPM 4,9  $\mu$ M) e uma baixa concentração de nitrogênio total (MS 60,00  $\mu$ M; 14,7  $\mu$ M), além de mais potássio e altos níveis de íons sulfato (QUISEN; ANGELO, 2008; ROCHA, et al., 2007). Portanto conclui-se que a redução da concentração de sais no meio de cultura do WPM pode sim ter sido o fator que ajudou na redução da oxidação dos explantes de *Anthurium andreanum* vr. “Black Queen”.

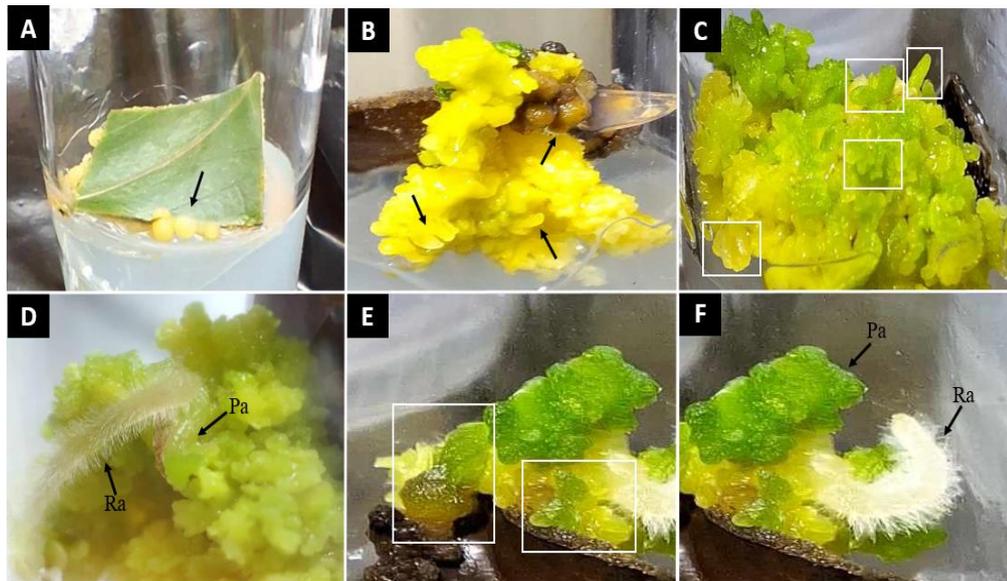
Durante o estabelecimento *in vitro*, o meio de cultura desempenha um papel crucial no desenvolvimento dos explantes, e sua composição pode variar de acordo com a espécie ou mesmo entre diferentes genótipos (GEORGE et al., 2008; COSTA et al., 2007). A força iônica do meio basal WPM utilizado neste estudo teve influência significativa na formação de calos embriogênicos.

Existe uma grande variedade de meios de cultura adaptados para uma ampla gama de espécies, diferindo, sobretudo quanto à sua composição e concentração de nutrientes (AMARAL, 2006). Silva et al. (2015), mencionam que o meio de cultivo MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) é o mais utilizado como meio basal na propagação *in vitro* de *Anthurium*. Teixeira, et al., (2015), corroboram essa informação, pois em seu trabalho de revisão fornecem uma análise detalhada das condições necessárias para o sucesso do cultivo de antúrios *in vitro*, e na maioria dos trabalhos com a produção de mudas micropropagadas de antúrio, os meios de cultivo utilizados foram o MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) e o meio Pierik (PIERIK, 1976).

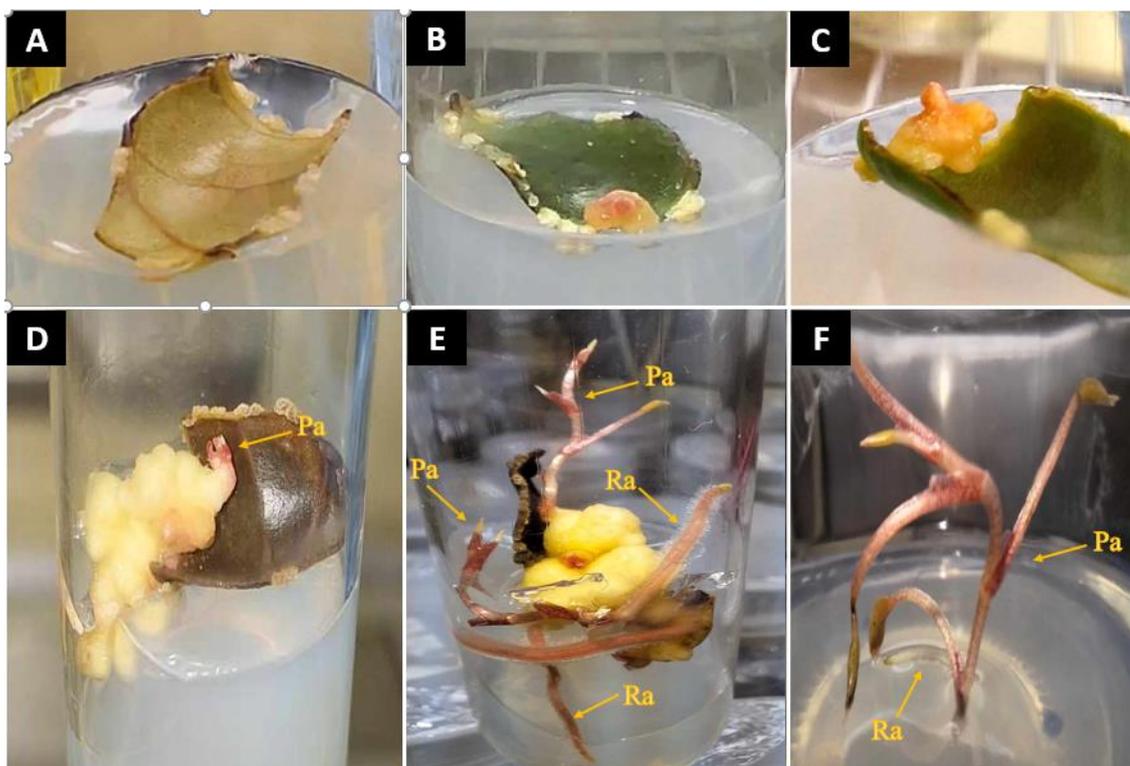
De acordo com essas informações e sabendo que o meio de cultura utilizado influencia muito no êxito da propagação *in vitro*, as metodologias utilizadas na micropropagação de antúrio podem necessitar de variações, sendo os resultados da resposta morfogênica *in vitro* totalmente dependentes do genótipo utilizado, os procedimentos de propagação *in vitro* não podem ser amplamente aplicáveis a todas as espécies de *Anthurium*, justificando assim a resposta diferente que obtivemos neste trabalho, onde o uso do meio WPM foi crucial para o alcance do estabelecimento *in vitro* do antúrio sem a ocorrência de oxidação no explante e com a indução de calos embriogênicos.

Neste experimento a proliferação de calos para os tratamentos T1 e T2, iniciaram-se nas bordas dos explantes foliares, onde sofreram injúria pelo corte do bisturi durante a excisão (Figura 1A e 2A). Foi possível observar que a orientação do explante (adaxial e abaxial) apresentou resultados relevantes, onde os explantes inoculados com a parte adaxial em contato com o meio deram origem a calos embriogênicos por via direta, no qual os embriões somáticos se originam a partir dos tecidos matrizes sem a formação de estágios intermediários, ou seja, a primeira expressão morfogênica é o surgimento de estruturas globulares diretamente no explante (Figura 1A), que já são caracterizados como o embrião (ULISSES, et al., 2016), e já os explantes inoculados com a parte abaxial em contato com o meio deram origem a calos embriogênicos por via indireta, que ocorre quando antes da formação do embrião ocorre uma proliferação extensiva do explante formando uma massa celular não diferenciada, chamada de calo, que também podem ser designada como massas ou complexos celulares pró-embriogênicos, os quais se dividem e formam os embriões somáticos (Figura 2B e C) (HORSTMAN, et al., 2017).

A embriogênese somática e a regeneração de plantas em Antúrio já foram relatadas por outros autores na literatura (XIN et al., 2006 ; BAUTISTA et al., 2008 ; PINHEIRO et al., 2013 , 2014 ; BHATTACHARYA et al., 2016; BHAVANA et al., 2018; WANG et al., 2019). Segundo Carvalho, et al., (2006), os embriões somáticos são estruturas bipolares e apresentam órgãos típicos de embriões zigóticos (radícula, hipocótilo e cotilédones). Na Figura 1 foi possível observar a presença de calos embriogênicos nos estádios globular, cordiforme, torpeda e cotiledonar e a realização do subcultivo para um meio com a mesma composição inicial já foi suficiente para o início da maturação e germinação dos embriões, estágios característicos de desenvolvimento de embriões somáticos de acordo com o relato de Ferrari et al., (2021). Na Figura 2 foi possível observar embriões amadurecidos mostrando o início da brotação formados a partir de uma massa de calo e depois a parte aérea e raiz bem desenvolvida.



**Figura 1.** Embriogênese somática por via direta a partir de explantes de *Anthurium andraeanum* “Black Queen”, inoculados no meio com a orientação do explante com a parte abaxial em contato com o meio. (A, B e C) embriões somáticos em diferentes estágios de desenvolvimento (globular, cordiforme, torpeda e cotiledonar); (D, E e F) estágio de maturação e germinação completa do embrião em planta, demonstrando zonas meristemáticas apical e radicular evidentes, onde (Ra) significa raiz e (Pa) parte aérea, sendo possível observar o desprendimento dos embriões a partir do calo mãe.



**Figura 2.** (A, B e C) embriogênese somática por via indireta a partir de explantes de *Anthurium andraeanum* “Black Queen”, inoculados no meio com a orientação do explante com a parte adaxial em contato com o meio, (D) embriões amadurecidos mostrando o início da brotação; (E e F) parte aérea e raiz bem desenvolvida, onde (Ra) significa raiz e (Pa) parte aérea.

Essa variação na formação de calos embriogênicos no mesmo tratamento pode ter ocorrido devido relação entre a quantidade de hormônios endógenos presente no explante e a capacidade deste explante de absorver os reguladores presentes no meio, isso porque o explante com a parte abaxial em contato com o meio, apresentava estar completamente em contato com o meio, e o explante com a parte adaxial em contato com o meio apresentava uma curvatura côncava (Figura 2A), não ficando em contato com o meio de forma completa, o que poderia fazer com que a capacidade de absorção dos reguladores de crescimento presentes no meio fossem absorvidos em quantidades diferentes pelo explante e assim causando um balanço hormonal diferente em cada tipo de explante e cada um dando uma resposta morfogênica diferente. Outros autores como Welander, (1988) e Pérez-Tornero, et al., (2000), também obtiveram respostas diferentes em seus trabalhos quanto ao uso da orientação da folha no meio de cultivo.

## 7.6 CONCLUSÃO

Para a assepsia dos explantes foliares, a imersão em álcool 70% (v/v) + solução de gentamicina (20%) por 1 minuto, e posteriormente a imersão por 7 minutos em solução de hipoclorito de sódio 2% (v/v), foi o mais eficiente.

A combinação dos fatores: explante retirado da folha de idade intermediária inoculadas em meio de cultivo com WPM e mantidas em ambiente escuro, proporcionou o mais eficiente controle da oxidação e a indução de calos nos explantes.

O meio WPM suplementado com  $2,0 \text{ mg/L}^{-1}$  de BAP e  $1,0 \text{ mg/L}^{-1}$  de 2,4D (T1) ou WPM com  $1,0 \text{ mg/L}^{-1}$  de BAP e  $0,5 \text{ mg/L}^{-1}$  de AIB (T2) induziram a produção de calos embriogênicos com valores de 30 e 60%, respectivamente. Sendo o tratamento T2 o recomendado para a obtenção de uma maior taxa de embriogênese somática de *Anthurium andraeanum* “Black Queen”.

Também ficou evidente que a forma como os segmentos foliares foram orientados afetou o potencial morfogênico do explantes de inoculados, gerando calos embriogênicos por via direta e indireta.

## 7.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AJDARBIN, M.; KAFI, M.; MIRMASOUMI, M.; AZADI, P. Indirect shoot regeneration in *Anthurium andreanum* 'Clisto' from leaf explant. **Journal of Ornamental Plants**, v. 5, n. 3, p. 159-166, 2015.
- ANDRADE, M. W.; LUZ, J. M. Q.; LACERDA, A. S.; MELO, P. R. A. Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All). **Ciência Agrotécnica, Lavras**, v. 24, n. 1, p. 174-180, 2000.
- ATAK, C.; ÇELIK, O. Micropropagation of *Anthurium* spp. In: DHAL, N. K.; SAHU, S. C. (Eds) **Plant Science**, p. 241-254, 2012.
- ATAK C, CELIKS O. Micropropagation of *Anthurium andreanum* from leaf explants. **Pakistan Journal of Botany**, v. 41, n. 3, p. 1155-1161, 2009.
- AZEVEDO, M. L., TITON, M., MARAVILHA, L. F., SPERANDIO, H. V., DOS SANTOS SILVA, A. V.; GORGENS, E. B. Estabelecimento *in vitro* do mogno africano (*Khaya grandifoliola*) a partir de sementes e explantes. **Série Técnica IPEF**, v. 26, n. 48, 2023.
- BAUTISTA, N. D. R., PEÑALVER, D. A., RODRÍGUEZ, R. B., CHIU, W. C., LÓPEZ, R. C.; TERRY, F. J. Embriogênese somática em *Anthurium andraeanum* Lind. variedade 'Lambada'. **Ra Ximhai**, 4, 135–149. 2008.
- BHATTACHARYA, C.; DAM, A.; KARMAKAR, J.; BANDYOPADHYAY, T. K. Efficient organogenesis from the induced meristemoid of *Anthurium andraeanum* Linden cv. Tinora. **Plant Science Today**, v. 2, n. 2, p. 82-86, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.14719/pst.2015.2.2.110>
- BHATTACHARYA, C.; DAM, A.; KARMAKAR, J.; BANDYOPADHYAY, T. K. Embriogênese somática direta e avaliação da homogeneidade genética de plantas regeneradas de *Anthurium andraeanum* Linden cv. Fantasia. **Célula In Vitro. Dev. Biol. Planta**, 52, 512–519. 2016.
- BHAVANA, G. P.; SATYAN, K. B.; ASWATH, C. A regenerative protocol and SEM study for *in vitro* propagation of *Anthurium* crossed lines via indirect somatic embryogenesis. **Bioscience Biotechnology Research Communications**, v. 11, n. 1, p. 31-40, 2018.
- BARRUETO CID, L.P.; JORDAN, M.Z. A contaminação *in vitro* de plantas. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (**Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento/Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, ISSN 1676-1340; n.122). 20p. 2006.
- BASSAN, J. S.; REINIGER, L. R. S.; ROCHA, B. H. G.; SEVERO, C. R. P.; FLÔRES, A. V. Oxidação fenólica, tipo de explante e meios de cultura no estabelecimento *in vitro* de canafístula (*Peltophorum dubium* (SPRENG.) TAUB.). **Ciência Florestal**, Santa Maria, RS, v. 16, n. 4, p. 381-390, 2006
- BOYCE, P.C.; CROAT, T.B. **The Überlist of Araceae Totals for Published and Estimated Number of Species in Aroid Genera**. 2018.
- BHAVANA, G. P.; SATYAN, Kumudini Belur; ASWATH, C. A regenerative protocol and SEM study for *in vitro* propagation of *Anthurium* crossed lines via indirect somatic embryogenesis. **Biosci. Biotech. Res. Comm**, v. 11, n. 1, p. 31-40, 2018.

- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**, v. 1, p. 87-132, 1998.
- CARDOSO, J. C.; HABERMANN, G. Adventitious shoot induction from leaf segments in *Anthurium andraeanum* is affected by age of explant, leaf orientation and plant growth regulator. **Horticulture, Environment and Biotechnology**, v. 55, n. 1, p. 56-62, 2014.
- CID, L.P.B.; ZIMMERMANN, M.J. A contaminação *in vitro* de Plantas Brasília: **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Boletim de Pesquisa, 122)**. 2006.
- COSTA, A. S; ARRIGONI-BLANK, M. F; BLANK, A. F; MENDONÇA, A. B; AMANCIO, V. F; LEDO, A. S. Estabelecimento de alecrim-pimenta *in vitro*. **Horticultura Brasileira**, 25: 068-072. 2007.
- DANTAS, S.; OLIVEIRA, S.; CÂMARA, T. Contaminação microbiana no cultivo *in vitro* de plantas. **Revisão anual de patologia de plantas**, v. 10, p. 391-407, 2002.
- DESAI, C.; INGHALIHALLI, R.; KRISHNAMURTHY, R. Micropropagation of *Anthurium andraeanum* - An important tool in floriculture. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 4, n. 3, p. 112-117, 2015.
- FARSI, M., TAGHAVIZADEH YAZDI, M.E., QASEMIOMRAN, V. Micropropagation of *Anthurium andraeanum* cv. Terra. **Afr. J. Biotechnol.** 11 (68), 13162–13166. 2012.
- FEITOSA, L. S. Influência de reguladores de crescimento no estabelecimento *in vitro* e indução de calos em pinhão-manso. **Dissertação (Mestrado)**, Universidade Federal de Sergipe, 2011.
- FERRARI, I. F.; MARQUES, G. A.; JUNIOR, W. L. S.; BIAZOTTI, B. B.; PENA PASSOS, M.; DE ALMEIDA, J. A. S.; MONDEGO, J. M. C.; MAYER, J. L. S. Comparative ontogenesis of *Coffea arabica* L. somatic embryos reveals the efficiency of regeneration modulated by the explant source and the embryogenesis pathway. **In Vitro Cellular; Developmental Biology – Plant**. v. 57, n. 5, p. 796- 810. 2021.
- FOSSATTI, G. desenvolvimento de técnicas de estabelecimento *in vitro* e enraizamento por estaquia de três variedades de oliveira (*Olea europaea* L.). **Trabalho de conclusão de curso (Monografia)**, Universidade Federal de Santa Catarina. 2017.
- FLORES, R., STEFANELLO, S., FRANCO, E.; MANTOVANI, N. *Regeneração in vitro* de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart.). **Current Agricultural Science and Technology**, v. 4, n. 3, 1998.
- GANTAIT, S.; MANDAL, N. Tissue culture of *Anthurium andraeanum*: a significant review and future prospective. **International Journal of Botany**, v. 6, n. 3, p. 207-219, 2010.
- GEORGE, E.F., DE KLERK, G.J. The components of plant tissue culture media: I. Macro- and micro-nutrients. In: George, E.F., Hall, M.A., De Klerk, G.-J. (Eds.), *Plant Propagation by Tissue Culture. The Background*, vol. 1, 3rd ed. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 65–113. 2008.
- GONÇALVES, T. S., BARBOSA, W. M., NANNETTI, D. C., DOS SANTOS, L. G. M., CAPRONI, D. T. R.; MELO, F. Oxidação *in vitro* de *Olea europaea* L. In: **5ª Jornada Científica e Tecnológica e 2º Simpósio da Pós-Graduação**. 2013.
- GU, A.; LIU, W.; MA, C.; CUI, J.; HENNY, R. J.; CHEN, J. Regeneration of *Anthurium andraeanum* from leaf explants and evaluation of microcutting rooting and growth under different light qualities. **HortScience**, v. 47, n. 1, p. 88-92, 2012.

- GUADALUPE, L. P.; MAYANIN, R. B. I. Morphogenesis and plant regeneration from *Anthurium andreaeanum* cv Calypso leaf explant. **African Journal of Biotechnology**, v. 16, n. 44, p. 2092-2099, 2017.
- 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.
- HORSTMAN, A.; BEMER, M.; BOUTILIER, K. A transcriptional view on somatic embryogenesis. **Wiley Regeneration**, v. 4, n. 4, p. 201-216. 2017.
- ISLAM, S. A.; DEWAN, M. M. R.; MUKUL, M. H. R.; HOSSENI, M. A.; KHATUN, F. *In vitro* regeneration of *Anthurium andreaeanum* cv. Nitta. **Bangladesh Journal of Agricultural Research**, v. 35, n. 2, p. 217-226, 2010.
- JAHAN, M.T., ISLAM, M.R., KHAN, R., MAMUN, A.N.K., AHMED, G., HAKIM, L. *In vitro* clonal propagation of *anthurium* (*Anthurium andraeanum* L.) using callus culture. **Plant Tissue Cult. Biotechnol.** 19 (1), 61–69. 2009.
- JESUS SILVA, H. F., ASMAR, S. A., DE OLIVEIRA, R. C., DE MELO, B., LUZ, J. M. Q.; PASQUAL, M. Estabelecimento *in vitro* e desenvolvimento inicial de barueiro (*Dipteryx alata* Vogel). **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 4, p. 1779-1790, 2016.
- KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 452 p. 2004.
- KRISHNARAJ, S.; VASIL, I. K. Somatic Embryogenesis in Herbaceous Monocots. In: THORPE T. A. (Ed.). *In vitro* embryogenesis in plants. **Dordrecht: Kluwer Academic Press**, p. 155-203. 1995.
- KUMARI, S., DESAI, J.R., SHAH, R.R. Callus mediated plant regeneration of two cutflower cultivars of *Anthurium andraeanum* Hort. J. Appl. **Hortic.** 13 (1), 37–41. 2011.
- LAN, Q.Y., QIU, Y.P., ZHANG, Y.H., YIN, S.H. Callus inducing and plantlet regeneration from leaf, petiole and stem of different *Anthurium andraeanum* varieties. **Acta Bot. Boreal Occident. Sin.** 23 (6), 1006–1009. 2003.
- LIMA, I. M. B., CAMPOS, A. S.; CARVALHO, A. C. P. P. The *in vitro* multiplication of *anthurium* cv. Eidibel. **Revista Agro@mbiente on-line**, v. 14, 2020.
- LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. Combined Proceedings of the International Plant Propagator's, **Carlisle**, v. 30, n. 1, p. 421-327, 1981.
- LUNA, et al. Análises fitoquímicas em extrato das folhas de *Anthurium affine* Schott (milho de urubu). **Medicina Veterinária (UFRPE)**, v. 10, n. 1-4, p. 1-4, 2016.
- MACEDO, E. G.; SANTOS FILHO, B. G.; POTIGUARA, R. C. V. Anatomia e arquitetura foliar de *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott (Araceae) espécie da várzea amazônica. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi**. Ciências Naturais, Belém, v.1, n. 1, p. 19-43, jan./abr. 2005.
- MARKS, T. R.; SIMPSON, S. E. Reduced phenolic oxidation at culture initiation *in vitro* following the exposure of field-grown stockplants to darkness or low levels of irradiance. **Journal of Horticultural Science**, v. 65, n. 2, p. 103-111, 1990.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, n.3, p.473-479, 1962.

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

OLIVEIRA, L. S., DIAS, P. C.; BRONDANI, G. E. Micropropagação de espécies florestais brasileiras. **Pesquisa florestal brasileira**, v. 33, n. 76, p. 439-453, 2013.

PALÚ, E. G., CORRÊA, L. D. S., SUZUKI, A. N.; BOLIANI, A. C. Uso de antibióticos para o controle de bactérias endógenas visando à micropropagação da figueira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, p. 587-592, 2011.

PERERA, R. N. I.; RAJAPAKSHA, R.G.A.S.; BANDARANAYAKE, W.M.E.K.; SAMARASINGHA, D. A. Micropropagation of new *anthurium* varieties: Lanka Beauty and Lanka Kumari. **Annals of the Sri Lanka Department of Agriculture**, v. 18, p. 56-60, 2016.

PÉREZ-TORNERO, O., EGEE, J., VANOOSTENDE, A.; BURGOS, L. Assessment of factors affecting adventitious shoot regeneration from *in vitro* cultured leaves of apricot. **Plant science**, 158(1-2), 61-70. 2000.

PLANTASONYA. **Cultivos e cuidados anturio-negro (*Anthurium-andraeanum*)**. 2024. Disponível em: <https://www.plantasonya.com.br/cultivos-e-cuidados/anturio-negro-anthurium-andraeanum.html>.

PINHEIRO, M. V. M, MARTINS, F. B, CRUZ, A. C. F; CARVALHO, A. C. P. P; VENTRELLA, M. C; OTONI, W. C. Maturação de *Anthurium andraeanum* cv. Embriões somáticos Eidibel de segmentos nodais. Desenvolvimento de células *in vitro*. **Biol. Planta** 49, 304–312. 2013.

PINHEIRO, M. V. M, MARTINS, F. B, CRUZ, A.C. F, CARVALHO, A. C. P. P, DE OLIVEIRA, E. J, E OTONI, W. C. Embriogênese somática em antúrio (*Anthurium andraeanum* cv. Eidibel) afetada por diferentes explantes. **Acta Sci. Agro**. 36, 87–98. 2014.

PINHEIRO, M. V. M. Propagação *in vitro* de antúrio (*Anthurium andraeanum* cv. Eidibel) via embriogênese somática. **Dissertação (Mestrado)**, UFV, Minas Gerais. 2010.

PINHEIRO, M. V. M; DIAS, G. M. G.; CARVALHO, A. C. P. P.; BARROS, L. M. Micropropagação de antúrio ‘IAC Eidibel’ por meio da indução ao estiolamento e regeneração de plantas. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 15, n. 2, p. 133-142, 2009.

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

PRAKASHA, D. P.; RAMYA, G.; SRINIVASALU, G. B. *In vitro* mass multiplication of *Anthurium andreanum* (HORT) cultivars. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 6, n. 9, p. 2579-2584, 2017.

PUCHOOA, D. *In vitro* mutation breeding of *Anthurium* by gamma radiation. **Int. J. Agric. Biol.** 7 (1), 11–20. 2005.

PUCHOOA, D.; SOOKUN, D. Induced mutation and *in vitro* culture of *Anthurium andraeanum*. Food and Agricultural Research Council, **AMAS**, p. 17-27, 2003.

- QUISEN, R. C.; ANGELO, P. C. S. Manual de procedimentos do laboratório de cultura de tecidos da Embrapa Amazônia Ocidental. **Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental**, 48 p. 2008.
- RAAD, M.K., ZANJANI, S.B., SHOOR, M., HAMIDOGHLI, Y., SAYYAD, A.R., KHARABIAN-MASOULEH, A., KAVIANI, B. Callus induction and organogenesis capacity from lamina and petiole explants of *Anthurium andreanum* Linden (Casino and Antadra). **Aust. J. Crop Sci.** 6 (5), 928–937. 2012.
- ROCHA, S. C., QUOIRIN, M., RIBAS, L. L. F.; KOEHLER, H. S. Micropropagação de *Cabralea canjerana*. **Revista Árvore**, v. 31, n. 1, p. 43-50, 2007.
- SANTOS, M. R. A. D., FERREIRA, M. D. G. R.; SARUBO, V. desinfestação de explantes foliares de café conilon (*Coffea canephora* Pierre) para estabelecimento *in vitro*. **Anais Brasília, D.F: Embrapa - Café**, 2009.
- SANTOS, M. R. A., DA SILVA CHAGAS, S. E.; GUIMARÃES, M. D. C. M. Estabelecimento de protocolo para descontaminação de explantes foliares de bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.). **Saber Científico (1982-792X)**, v. 4, n. 2, p. 10-16, 2021.
- SAPTARI, R. T.; SINTA, M.; BUDIANI, A. In vitro propagation of *Anthurium andreanum* cv. Nitta through organogenesis. **Agrivita Journal of Agricultural Science**, v. 39, n. 2, p. 192-200, 2017.
- SOSA-FLORES, P. V.; VALDEZ-AGUILAR, L. A.; CARTMILL, D.; CARTMILL, A. D.; BENAVIDES-MENDOZA, A. Response of potted anthurium (*Anthurium andreanum* Lind.) to the K<sup>+</sup>: Ca<sup>2+</sup>: Mg<sup>2+</sup> balance in the nutrient solution. **Journal of Plant Nutrition**, v. 42, n. 4, p. 351-361, 2019.
- SATO, A. Y.; DIAS, H. C. T.; ANDRADE, L. A.; SOUZA, V. C. Micropropagação de *Celtis* sp.: controle da contaminação e oxidação. **Cerne**, Lavras, v. 7, n. 2, p. 117-123, 2001.
- SILVA, J. A. T. S.; DOBRÁNSZKI, J.; WINARTO, B.; ZENG, S. *Anthurium* in vitro: A review. **Scientia Horticulturae**, v. 186, p. 266-298, 2015.
- 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**, Songkla, v. 28, n. 4, p. 717-722, 2006.
- TEIXEIRA DA SILVA, JA, DOBRANSZKI, J., WINARTO, B., AND ZENG, SJ. Antúrio *in vitro*: uma revisão. **ciência Hortic.** 186, 266–298. 2015.
- TEIXEIRA, J. B. Limitações ao processo de cultivo *in vitro* de espécies lenhosas. **Brasília: Embrapa-Recursos Genéticos e Biotecnologia**, 2001.
- THOKCHOM, R.; MAITRA, S. Micropopagation of *Anthurium andreanum* cv. Jewel from leaf explants. **Journal of Crop and Weed**, v. 13, n. 1, p. 23-27, 2017.
- 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.
- TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. **Brasília: Embrapa-CNPQ**. 2v. 298p. 1999.

- ULISSES, C., FERREIRA PEREIRA, J. A., SILVA, S. S., ARRUDA, E.; MORAIS, M. Indução e histologia de embriões somáticos primários e secundários do híbrido *Phalaenopsis classic spotted pink* (orquidaceae). **Acta biológica colombiana**, 21(3), 571-578. 2016.
- VIANNA, Wânia de Oliveira. Estudo farmacognóstico e farmacológico de *Philodendron bipinnatifidum* Schott (ARACEAE). **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo. 2002.
- VIÉGAS, J., DA ROCHA, M.T.R., FERREIRA-MOURA, I., CORRÊA, M.G.S., DA SILVA, J.B., DOS SAN-TOS, N.C., TEIXEIRA DA SILVA, J.A. *Anthurium andraeanum* (Linden ex André) culture: *in vitro* and *ex vitro*. **Floricult. Ornam. Biotechnol.** 1 (1), 61–65. 2007.
- WANG, G.; XU, C.; YAN, S.; XU, B. An efficient somatic embryo liquid culture system for potential use in large-scale and synchronic production of *Anthurium andraeanum* seedlings. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, artigo 29, 2019.
- WELANDER, M. Plant regeneration from leaf and stem segments of shoots raised *in vitro* from mature apple trees. **Journal of plant physiology**, v. 132, n. 6, p. 738-744, 1988.
- WERNER, E. T., CUZZUOL, G. R. F., PESSOTTI, K. V., LOPES, F. P.; ROGER, J. D. A. Controle da calogênese do pau-brasil *in vitro*. **Revista Árvore**, v. 33, p. 987-996, 2009.
- XIN, W. J; XU, B.; WANG, G. D; GUO, W. M; WEN, F. D; JIN, J. P. Embriogênese somática e regeneração vegetal de *Anthurium andraeanum*. **Acta Hort. Sinica**, 33, 1281–1286. 2006.
- ZHANG, H.; WANG, G.; QIAO, Y.; CHEN, C. Effects of timentin and other  $\beta$ -lactam antibiotics on callus induction shoot regeneration, and rooting in *Anthurium andraeanum* Linden ex Andre. **In vitro Cell, Development Biology - Plant**, v. 53, p. 219-225, 2017.

## 8 CAPÍTULO V

### BIOLOGIA FLORAL, SISTEMA REPRODUTIVO E POLINIZAÇÃO DE ARACEAE JUSS.: UMA REVISÃO.

FERREIRA, T. S.; PÊGO, R. G; SILVA, K. A. L; XAVIER, M. C. G. Biologia floral, sistema reprodutivo e polinização de Araceae Juss.: uma revisão. **Observatório de la Economía Latinoamericana**, [S. l.], v. 1, pág. 1185–1204, 2024.  
DOI: <https://doi.org/10.55905/oelv22n1-064>.

## 8.1 RESUMO

No presente trabalho é apresentado uma breve revisão relacionada ao que se conhece sobre os aspectos da biologia floral, reprodutiva e tipos de polinização das aráceas. As aráceas estão presentes em praticamente todos os continentes e exibem uma grande diversidade morfológica floral. A família Araceae possui dois principais tipos de inflorescência aquelas com apenas flores bissexuais e aquelas com flores unissexuais. Há também a ocorrência da protoginia que é quando não há coincidência entre as épocas de maturação da parte feminina e da masculina na flor. A sua polinização é realizada por uma grande variedade de grupos de insetos, sendo possível observar uma forte correlação familiar entre as características florais (estrutura da inflorescência, recompensas, atrativos) e o tipo de polinizador.

**Palavras-chaves:** aráceas, flores, polinizadores, inflorescência.

## 8.2 ABSTRACT

A brief review is presented regarding what is known about aspects of the floral, reproductive biology and types of pollination of Araceae. Araceae are present on practically all continents and exhibit a great floral morphological diversity. The Araceae family has two main types of inflorescence: those with only bisexual flowers and those with unisexual flowers. There is also the occurrence of protogyny, which is when there is no coincidence between the maturation times of the female and male parts of the flower. Its pollination is carried out by a wide variety of groups of insects, and it is possible to observe a strong family correlation between floral characteristics (inflorescence structure, rewards, attractions) and the type of pollinator.

**Keywords:** araceae, flowers, pollinators, inflorescence.

### 8.3 INTRODUÇÃO

A família *Araceae* Juss. é constituída por plantas herbáceas, pertencentes ao grupo das monocotiledôneas, com distribuição mundial. É a terceira maior família de monocotiledôneas e está dividida em oito subfamílias, é um dos membros mais antigos das angiospermas (CROAT et al., 2019; STEVENS, 2020). Estão distribuídas em 144 gêneros e 3645 espécies incluindo as *Lemnaceae* (BOYCE; CROAT, 2018) e no Brasil está presente em todo país e está representada por 36 gêneros e aproximadamente 484 espécies (COELHO et al. 2016).

As plantas representantes nessa família são facilmente reconhecidas por apresentarem uma inflorescência do tipo espádice, que é uma associação entre bráctea, a uma espata (GRAYUM 1990; MAYO et al., 1997).

As aráceas apresentam dois tipos de inflorescência, podendo ser bissexuais ou unissexuais e a polinização é realizada principalmente por insetos como besouros, abelhas e moscas (GIBERNAU, 2003).

As características florais das inflorescências das aráceas coevoluíram para garantir e maximizar o sucesso da polinização. Esta família apresenta características peculiares com grandes diferenças em sua biologia possuindo vários tipos de recursos florais que são oferecidos por suas flores aos seus polinizadores, como liberação de odor; termogênese; tecido nutritivo, protoginia e a presença de câmara que abriga os polinizadores (CHARTIER et al., 2014).

Devido à grande diversidade morfológica floral desta família os estudos que envolvem polinização e sistema reprodutivo são fundamentais para a compreensão de diversos processos ecológicos e evolutivos. Sendo assim, esta revisão tem como objetivo sumarizar o conhecimento sobre a diversidade da biologia floral, as interações ecológicas relacionadas à polinização, assim como os sistemas reprodutivos que ocorre nesta família, com o intuito de compilar informações para futuras pesquisas com o enfoque para essas áreas nas espécies das aráceas.

### 8.4 METODOLOGIA

Esta revisão sobre biologia floral, reprodutiva e polinização é principalmente com base nos poucos estudos encontrados com a família das aráceas.

Foi realizada uma revisão bibliográfica sobre o tema nas revistas acadêmicas científicas disponíveis on-line, realizada utilizando-se principalmente a base de dados do Web of Science, Scientific Electronic Library *Online* (SciELO) e Google Scholar. Outros artigos, dissertações e teses também foram usados com o intuito de compilar as informações obtidas quanto a biologia floral, sistema reprodutivo e polinização da família *Araceae* e ter uma visão mais abrangente com informações relevantes dos diferentes dados encontrados nas fontes de consulta e listando os principais neste trabalho.

## 8.5 BIOLOGIA FLORAL

Na família aráceas as flores conhecidas popularmente como “flor” o conjunto formado por uma folha modificada, colorida, denominada espata, e uma inflorescência tipo espiga, conhecida como espádice, onde estão agregadas dezenas de diminutas flores. O que normalmente se conhece por flor é o conjunto de uma inflorescência em espiga composta por inúmeras pequenas flores, dispostas em espiral denominada espádice, protegida por uma bráctea colorida denominada espata (SAKURAGUI et al., 2012).

Descrito por Schultz (1990) as flores da família aráceas são numerosas e reunidas em uma estrutura em forma de espiga de raque muito espessa, mais ou menos suculenta, chamada espádice. Esta é envolvida por uma bráctea não fibrosa, a espata que pode ser livre e completamente unida à espádice, persistente ou caduca, com cores e formas variadas e geralmente associadas à atração de agentes polinizadores.

As flores podem ser hermafroditas ou unissexuais, pequenas e sésseis. O perianto é raro nas flores unissexuais, mas pode ocorrer nas flores hermafroditas. Suas flores andróginas, ou seja, que possuem tanto os órgãos reprodutores femininos quanto os masculinos e apresentam o fenômeno da protoginia, quando a parte feminina está receptiva enquanto a masculina ainda está imatura, prevenindo a autofecundação e favorecendo o cruzamento natural entre plantas diferentes. (TOMBOLATO et al., 2004; (GUIMARÃES et al., 2008). O fruto é usualmente do tipo baga suculenta (raramente seca e firmemente carnosa ou coriácea), geralmente livre, mas pode ocorrer a fusão dos ovários para a formação de uma infrutescência indeiscente – em *Syngonium*, ou deiscente – em *Cryptocoryne* (MAYO et al. 1997).

Dois principais tipos de inflorescência podem ser encontrados nesta família: aquelas com apenas flores bissexuais, que podem ser representadas pelo gênero *Anthurium*; e aquelas com flores unissexuais, sendo representadas pelo gênero *Philodendron* (TEMPONI et al., 2005).

Para inflorescências do tipo *Anthurium*, há nenhum padrão espacial, pois as flores bissexuais estão presentes todas ao longo da inflorescência e sua antese dura vários dias. Para inflorescências de tipo *Philodendron*, as flores femininas estão localizadas na parte inferior e as flores masculinas na parte superior. Uma zona intermediária de flores masculinas estéreis está presente em certos gêneros (por exemplo, *Caladium*, *Philodendron*), e, em outros, um apêndice terminal sem flores (por exemplo, *Arum*) está presente acima das flores masculinas, que tem diversas funções, como odor e produção de calor (TOMBOLATO et al., 2004; CHARTIER et al., 2014), sua antese geralmente cessa após 1–2 dias.

### 8.5.1 O Gênero *Anthurium* Schott

*Anthurium* é o maior gênero de Pothoideae e de Araceae, com 950 espécies neotropicais (BOYCE; CROAT, 2018). As espécies deste gênero são caracterizadas por apresentarem inflorescência com espata geralmente persistente e espádice composta por flores bissexuais formadas por quatro tépalas dispostas em dois verticilos, quatro estames livres em dois verticilos e ovário bilocular com um a dois óvulos por lóculo, com placentação axial (MAYO et al., 1997; TEMPONI et al., 2005).

Durante todo o ano, o antúrio produz inflorescências terminais, em espádice mais ou menos ereta, com flores sem brácteas, pequenas e sésseis, que emergem da base de cada nova folha. O que é popularmente conhecido como “flor” é, na realidade, o conjunto formado por uma folha modificada, colorida, denominada de espata, e uma inflorescência do tipo espiga, conhecida como espádice, onde estão agregadas dezenas de pequenas flores (MAYO et al., 1997; CROAT, 1998).

A espata, usualmente acima das folhas, adquire formas diversas, desde cordato-ovaladas, bastante alongadas ou curtas, até abobadadas ou em forma de concha, o que protege a espádice. Ocorre em tons de branco e diversos tons de rosa, laranja, verde, vermelho e marrom, ou ainda bicolor, com diferentes padrões de distribuição. Pode ser plana ou côncava, de forma oval, circular, cordata ou pregueada, frequentemente com nervuras proeminentes, cujas bordas não se sobrepõem nas bases (MAYO et al., 1997; TEMPONI et al., 2005).

A espádice pode ser cilíndrica ou cônica, ereta, ligeiramente curvada, torcida ou alongada. Quando nova, pode ser colorida, verde-clara, branca, rosada ou amarela, ou apresentar uma combinação de duas cores, ocorrendo mudança de cor, da base em direção ao ápice. Essa mudança de cor se dá pelo amadurecimento gradual das flores (MAYO et al., 1997).

A flor do antúrio é um segmento pequeno da espádice, semelhante a pequenos losangos dispostos em espiral na espádice (Figura 1). É hermafrodita perfeita e apresenta as partes masculinas e femininas, com ovário súpero bicarpelar e quatro anteras (GUEVARA-IBARRA, 2015).

**Figura 1.** Inflorescência de *Anthurium andraeanum* (A) e *Anthurium lucens* Standl. (B).



**Fonte:** Elaborado pelos autores com base no site do Field Museum.

O perianto é rudimentar, composto de quatro estames, geralmente emergindo apenas sobre os segmentos do perianto e um ovário com duas células, geralmente com um óvulo por célula, ou, às vezes, com dois ou mais. Quando receptivo, o estigma aparece como uma protuberância plana e arredondada no centro da flor e apresenta-se coberto por uma substância líquida incolor (CROAT, 1997).

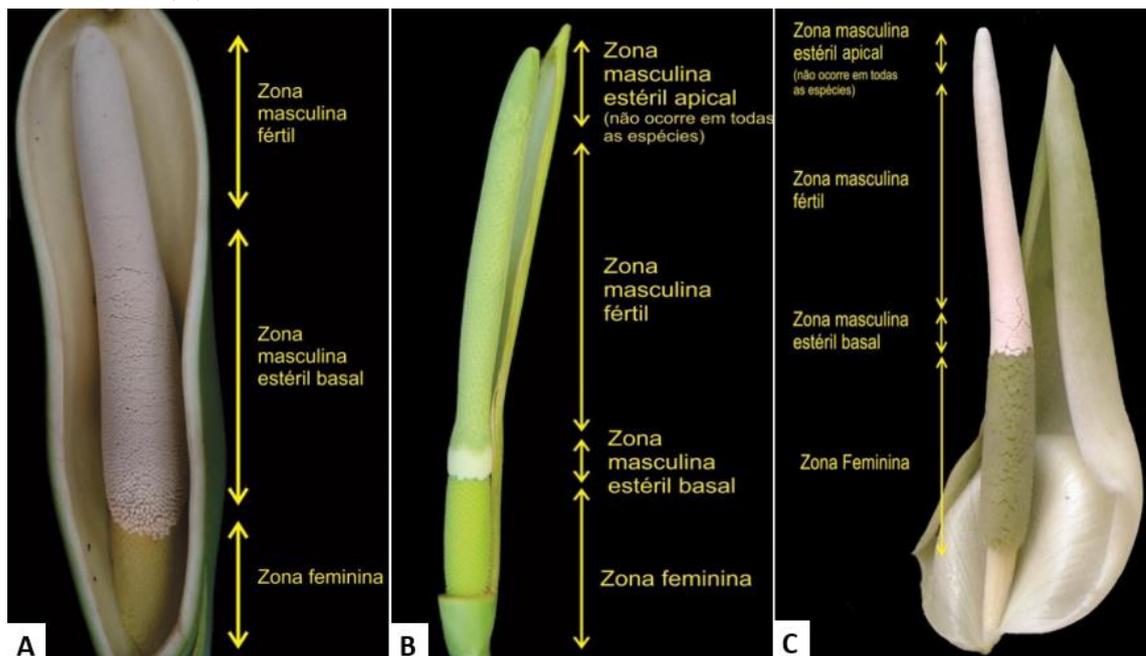
Não há coincidência entre as épocas de maturação da parte feminina e da masculina ocorrendo a protoginia, ou seja, o estigma (parte feminina) torna-se receptivo antes que os grãos de pólen sejam liberados pelas anteras (parte masculina) (RUIZ-IDARRAGA, 2017). Na natureza, isso ajuda a assegurar a polinização cruzada e evitar a autopolinização, porém, dificulta a polinização controlada das plantas (MAYO, 1991; GUEVARA-IBARRA, 2015).

### 8.5.2 O Gênero *Philodendron*

Na família Araceae *Philodendron* Schott é o segundo maior gênero (CROAT, 1997), exclusivamente neotropical e apresenta 482 espécies formalmente reconhecidas (BOYCE; CROAT, 2018). As flores são unissexuais, o perigônio é ausente, a antera sem espessamento de parede celular em endotécio e o endosperma é copioso. A espata persiste até a maturidade do fruto, então sofrendo abertura na base. Sua espádice está dividida em três zonas bem definidas de flores unissexuadas: a zona feminina, de flores pistiladas na base da espádice, a masculina estéril na região mediana constituída de estaminódios, e a masculina fértil de flores estaminadas, na parte superior (Figura 2-A) (MAYO, 1991; BUTURI, 2015).

Em algumas espécies, pode existir uma quarta zona apical de flores estéreis (Figura 2-B e C) composta novamente por estaminódios (COELHO, 2010). Essa estrutura é envolta pela espata, responsável por proteger o desenvolvimento das flores, em praticamente toda a sua extensão. A estrutura pode ou não apresentar uma constrição mediana de grau variado, formando um tubo na base da inflorescência que circunda as flores pistiladas e parte dos estaminódios (MAYO, 1991).

**Figura 2.** Morfologia das espádices dos subgêneros *Meconostigma* (A). *Philodendron* (B), *Pteromischum* (C).



**Fonte:** Buturi (2015).

As flores femininas, ou como também são chamadas, pistiladas, em *Philodendron* são consideradas de grande importância taxonômica. Elas consistem de um gineceu simples, faltando estaminódios ou partes do perigônio. O gineceu é sincárpico, superior e composto de 2 a 34 carpelos. Uma importante característica do gineceu é a presença de um canal estilar separado para cada carpelo. O estigma das flores adjacentes pode ser contíguo ou distante uns dos outros. (MAYO, 1997).

De acordo com Mayo (1991), as flores femininas podem ser divididas em três grandes regiões: estigma ou região estigmática, estilete ou região estilar, e ovário. O estigma é constituído por uma única superfície contínua, sendo as células epidérmicas alongadas em papilas secretoras que são ocasionalmente multicelulares. A região estilar é aquela entre o ápice do ovário e a base do estigma. O estilete é formado por células alongadas situadas logo acima

da região estilar. Esta é frequentemente mucilaginoso e pode se apresentar em lobos (MAYO, 1997).

A terceira região das flores femininas é o ovário que é dividido em lóculos (cavidade do ovário de uma flor). O número de lóculos em *Philodendron* é extremamente variável girando em torno de 2 a 34. Os números mais comuns são 4, 5 e 6 lóculos por ovário, isso junto com a ocorrência de ovários 2-3 locular sugere que as flores de *Philodendron* são basicamente dímeras e trímeras em proporções aproximadamente iguais. (MAYO, 1997; COELHO 2010).

Também é característica da inflorescência dos *Philodendron* a capacidade termogênica, que somada aos numerosos canais de resina frequentemente encontrados na espata e à constrição da mesma, são descritas como associadas aos mecanismos de polinização (GIBERNAU et al., 2003; GOTTSBERGER et al., 2013).

## 8.6. POLINIZAÇÃO NATURAL EM ARÁCEAS

As aráceas estão presentes em praticamente todos os continentes, porém poucos estudos foram realizados sobre a biologia da sua polinização, embora este seja claramente um campo de extremo interesse; a maioria dos trabalhos focam mais na parte de taxonomia ligada a adaptações biológicas florais.

As aráceas são sempre protogínicas e a fase feminina (receptividade do estigma) e masculina (deiscência das anteras) geralmente não se sobrepõem, de modo que o cruzamento obrigatório entre plantas diferentes parece ser a regra geral. Alguns casos de autopolinização ou apomixia são conhecidos ou suspeitos (*Amorphophallus bulbifer*, *Anthurium bakeri*, *Pinellia*, algum *Arum*) (MAYO et al. 1997).

De acordo com Gibernau, (2003), do ponto de vista da interação flor-polinizador, existem três situações em Araceae.

1) "clássica" interação flor-polinizador. A inflorescência não desempenha nenhum papel importante na reprodução dos polinizadores. O polinizador visita a inflorescência procurando por um recurso (fluido estigmatizado, pólen) ocorrendo como consequência a polinização.

2) A inflorescência passa a fazer parte do ciclo reprodutivo do polinizador. Insetos visitam inflorescências de Araceae não apenas por recompensas alimentares (néctar, pólen ou tecido floral), mas também para encontrar congêneres sexuais, realizar cópulas e às vezes botar seus ovos.

3) A inflorescência "engana" os polinizadores imitando o local de postura do polinizador (fezes, cogumelos, animal morto). Assim, os insetos visitam a inflorescência para completar seu ciclo reprodutivo. Por meio dessa atração enganosa, os insetos conseguem realizar a polinização, mas sem realmente receber qualquer recompensa.

Uma quarta situação poderia ser sugerida em qual é o polinizador que "engana" a flor, pegando o recurso, mas não conseguindo realizar a polinização. Um exemplo bem conhecido é o roubo de néctar por abelhas ou zangões e até mesmo pássaros. Tal interação existe em certas plantas, embora em alguns casos a polinização é afinal alcançada (MALOOF; INOUE, 2000).

A família Araceae é conhecida por ser entomófilo, sendo polinizada principalmente por insetos como besouros e moscas, mas também por abelhas e tripes (GIBERNAU, 2003; MAYO et al. 1997). Sendo possível observar uma forte correlação familiar entre as características florais (estrutura da inflorescência, recompensas, atrativos) e o tipo de polinizador (BARABÉ; LACROIX, 2008).

### 8.6.1 Tipos de polinização natural em aráceas

Embora a estrutura morfológica das inflorescências seja praticamente a mesma em todas as aráceas com flores bissexuais, há uma variação significativa na forma, cor, tamanho e odor, bem como nos grupos de polinizadores a eles associados. Grayum, (1990) e Mayo et al., (1997) propuseram que besouros e moscas são geralmente os polinizadores mais comuns entre as Araceae. Sendo as abelhas o terceiro grupo de polinizadores mais frequente da família (DIAZ; KITE, 2006).

#### 8.6.1.1 Polinização pelo vento

Grayum, (1986) propôs uma vez que a polinização pelo vento pode ser o modo de polinização ancestral em Araceae, mas as espécies existentes de Araceae não apresentam características florais tipicamente relacionadas à polinização pelo vento (por exemplo, sem anteras pendentes, sem anteras expostas ao vento e quando há muito pólen produzido, é pegajoso). Além disso, baixas densidades populacionais e grandes distâncias entre plantas com flores tornam a polinização pelo vento bastante improvável (CAMAZINE ; NIKLAS, 1984).

#### 8.6.1.2 Polinização por besouros

A polinização por besouros em aróides com flores bissexuais foi relatada para *Anthurium*, *Calla*, *Lysichiton*, *Monstera* e *Symplocarpus* (CHARTIER et al., 2014). As plantas cujas inflorescências produzem câmaras florais oferecem abrigo, calor, local de acasalamento e alimento como recompensa e são polinizadas. Os polinizadores visitam predominantemente essas plantas para cortejar e se alimentar de pólen e tecidos florais. Os gorgulhos também depositam ovos nas inflorescências (GASCA-ALVAREZ, 2013; CHARTIER et al., 2014 ; RUIZ-IDARRAGA, 2017).

Considerando o padrão de floração, a duração da floração, a presença de uma câmara de polinização e as recompensas recebidas, o sistema de polinização de *Monstera* é muito semelhante ao relatado para aráceas com flores unissexuais e armadilhas polinizadas por escaravelhos (*Dynastinae*) (GIBERNAU, 2016). Os besouros são aparentemente atraídos pelo agradável aroma floral emitido por essas plantas, e visitam as inflorescências em pequeno número durante as fases feminina e masculina da antese para copular, ovipositar, consumir tecidos vegetais e/ou pólen (FRANZ, 2007).

#### 8.6.1.3 Polinização por moscas (díptera)

Atualmente é conhecido que as moscas são um dos grupos de visitantes mais frequentemente observados associados à polinização em Araceae (GIBERNAU, 2016). Geralmente visitam as inflorescências de aráceas em busca de recompensas alimentares, cortejo e substrato para oviposição, podendo obter a recompensa (mutualismo) ou não (engano) (CHARTIER et al., 2014).

As moscas mais comuns que visitam as flores bissexuais pertencem à família *Drosophilidae* (moscas da fruta), que parecem visitar principalmente as inflorescências para acasalar e ovipositar. As flores polinizadas por essas moscas geralmente emitem um odor que lembra frutas fermentadas ou maduras (CROAT, 1997 ; SCHWERDTFEGGER et al., 2002). As moscas utilizam as inflorescências como criadouro durante a maior parte de seu ciclo de vida, alimentando-se adicionalmente de exsudatos florais e/ou substâncias sólidas (mas não pólen) produzidas pelos estames (FARTYAL et al., 2013).

#### 8.6.1.4 Polinização das abelhas

O terceiro grupo de polinizadores mais frequentemente relatado para aráceas com flores bissexuais são as abelhas. Notavelmente, *Anthurium*, um dos gêneros mais ricos em espécies dentro de Araceae, e em particular *Spathiphyllum* são amplamente polinizados por abelhas (DÍAZ JIMÉNEZ, 2016 ; ETL et al., 2017 ). Por outro lado, nas aráceas de flores unissexuais, a polinização por abelhas é uma exceção, sendo mencionado apenas como um possível tipo de polinização em *Anchomanes* Schott e alguns *Amorphophallus* (GIBERNAU, 2011).

Entre as abelhas polinizadoras de *Anthurium* e *Spathiphyllum* relatadas até agora estão as espécies de *Apini* (abelhas melíferas), *Augochlorini* (abelhas halictinas), *Euglossini* (abelhas das orquídeas), *Halictini* (abelhas halictinas), *Meliponini* (abelhas sem ferrão) e *Tapinotaspidini*. As flores polinizadas por essas abelhas compartilham algumas características, como a antese diurna e um agradável aroma floral, que é emitido principalmente nas primeiras horas da manhã em ambas as fases sexuais e atua como o principal atrativo (GUEVARA-IBARRA, 2015 ; DÍAZ JIMÉNEZ, 2016 ; ETL et al., 2017).

Um aspecto bem conhecido das inflorescências de aráceas é o processo de aquecimento (MAYO et al., 1997) que tem como objetivo fornecer uma recompensa energética para os polinizadores, permitindo ao inseto que este reduza o custo energético de sua atividade, e também fazendo com que ocorra um aumento da volatilização de compostos perfumados, que são importantes na atração de besouros (SEYMOUR et al., 2003).

Espécies de diversos gêneros dentro da família se destacam pelas suas modificações morfológicas e a presença de estruturas secretoras que medeiam essa interação. Como por exemplo em *Arum* a epiderme da espata impede que as moscas escapem da inflorescência (CHARTIER et al., 2014). Em outros gêneros, como *Dieffenbachia*, ocorre o acúmulo de reserva em determinadas regiões da inflorescência que funcionam como oferta nutritiva para os polinizadores. O néctar é produzido no estigma de algumas espécies presentes em *Anthurium*, *Arum* e na subfamília *Lasioideae* (MAYO et al. 1997).

A cor da espata e, em menor grau, o da espádice, varia consideravelmente dentro da família, em espécies polinizadas por moscas, essas variações de cores são conhecidas por serem importantes na atração destes polinizadores. Zonas de cores diferenciadas são frequentes: em *Philodendron* muitas espécies têm zonas roxas dentro o tubo de espata, enquanto a lâmina é branca ou pálida verde. Em *Arisaema* e *Arisarum*, encontra-se a situação inversa, com tubos de espata brancos e lâminas roxas que são frequentemente listradas (GIBERNAU, 2016).

Outra característica marcante desta família é a liberação de odor, este evidentemente é um fator primordial para o processo de atração de polinizadores e já foi relatado para várias espécies (GIBERNAU et al., 2011, GIBERNAU et al., BARABÉ 2010). As Araceae são famosas por seus odores em suas inflorescências, principalmente pelo fato de não serem muito agradáveis, já foram feitas até comparações com o odor de fezes de cachorro, esterco de cavalo, peixe podre, gás sulfuroso, vaca morta, cheiro de frutas podres, cogumelos, queijo, etc. Uma espécie bem conhecida por ter um odor floral bem desagradável faz parte do gênero *Amorphophallus*, conhecida como flor cadáver, devido ao seu odor ser comparado como o de um cadáver em decomposição (GIBERNAU, 2016; CHARTIER et al., 2014).

As armadilhas florais estão entre os dispositivos mais sofisticados que evoluíram em angiospermas no contexto da polinização. Os mecanismos de armadilha de gêneros com flores unissexuais e espatas relativamente complexas atraíram mais atenção em estudos de polinização. Muito menos é conhecido sobre os mecanismos de polinização em gêneros com flores bissexuais e espatas mais simples ou espalhadas (GIBERNAU, 2011; CHARTIER et al., 2014).

Enquanto “armadilha” parece ocorrer de forma precisa em *Arum*, *Arisaema* e *Cryptocoryne*, onde apenas as inflorescências masculinas fornecem uma saída para os

insetos. As inflorescências femininas permanecem fechadas e os insetos capturados não podem escapar. Já para outros gêneros (por exemplo, *Amorphophallus*, *Philodendron*) não se está claro se os polinizadores não podem ou simplesmente não querem sair da inflorescência, uma vez que após penetrar, não saia mais, sendo conservado lá talvez por possíveis atrativos como as secreções do estigma, corpos alimentares ou locais de reprodução (JIMÉNEZ et al., 2019).

Embora a termogênese (autoprodução de calor na inflorescência que faz com que volatilize o perfume foral para atrair os polinizadores) seja muito comum em Araceae não é de forma alguma uma regra geral. Sua função geralmente está associada a volatilização de compostos de odor, e, mais especulativamente, para assim dar precisão tanto a duração do período de atração do polinizador (duração do período de aquecimento), tipo de composto de odor utilizado e distância sobre a qual polinizadores podem ser atraídos (temperatura máxima) (GIBERNAU, 2016).

Em outros gêneros, no entanto, os odores são produzidos aparentemente sem aquecimento. A produção de odor e a termogênese (quando presente) ocorrem principalmente nos apêndices terminais ou nas zonas masculinas da espádice naqueles gêneros que não possuem apêndices (por exemplo, *Philodendron*, *Xanthosoma*) (BARABÉ 2010; GIBERNAU et al., 2016).

A manipulação do comportamento dos polinizadores dentro da inflorescência pode ser a base para muitas das características especializadas da espádice, particularmente em gêneros de flores unissexuais. Por exemplo as espécies de *Philodendron* que são conhecidas por serem polinizadas por grandes escaravelhos *Dynastine* (RUIZ-IDARRAGA, 2017), especialmente espécies de *Cyclocephala* e *Erioscelis*, que visita as flores para encontrar locais de acasalamento ao anoitecer, seguindo os aromas que são exalados das inflorescências devido à atividade termogênica.

Estes besouros voam em padrões de ziguezague seguindo aromas até perto da inflorescência onde a espata interior geralmente com a superfície de cor mais pálida fornece um alvo de pouso. Besouros agregados, às vezes em grande número onde eles se reproduzem, comem a flor masculina estéril e afetam a polinização das fêmeas receptivas (MAIA et al., 2010; GOTTSBERGER et al., 2013). Eles passam a noite e todo o dia seguinte no tubo da espata (uma suposição do motivo desse tipo de comportamento seria para evitar ser comido por pássaros sempre vigilantes). Perto ou ao entardecer do dia seguinte, quando o calor termogênico faz com que as flores masculinas estourem seus depósitos de pólen, os besouros são forçados a sair da inflorescência pela espata que agora estará se fechando, forçando-os a escalar a espádice, fazendo com que assim sejam cobertos com o pólen. Outro fator interessante é que a inflorescência também fornece uma substância viscosa produzida na espata ou na espádice para cobrir grande parte da carapaça lisa do besouro, para que seja aderido o pólen seco na hora da sua saída (GIBERNAU, 2011, 2016).

As abelhas *Euglossine* são os grupos de insetos mais associados a polinização em gêneros com flores bissexuais como em *Anthurium* e besouros escaravelho *Dynastine* em gêneros com flores unissexuais como em *Philodendron* (CHARTIER et al., 2014).

Dentre a variedade de visitantes florais que podem atuar como polinizadores de *Anthurium*, encontram-se diferentes tipos de abelhas (*Apini*, *Augochlorini*, *Euglossini*, *Halictini*, *Meliponini*, *Tapinotaspidini*), besouros (*Curculionidae*) e moscas (*Cecidomyiidae*, *Drosophilidae*) (HENRICH et al., 2010; GUEVARA-IBARRA, 2015; ETL et al., 2017). Outros visitantes, como lepidópteros, tripes e até beija-flores são mencionados como possíveis polinizadores (HARTLEY et al., 2017).

Outro exemplo do processo de polinização pode ser observado para a espécie *A. formosum* que produz flores hermafroditas, sua floração dura entre 8-15 dias e começa com a fase receptiva da parte feminina durante os primeiros 2-3 dias, seguida de um repouso de alguns dias que é seguido pela produção de pólen por 3-4 dias. As florzinhas amadurecem

progressivamente desde a base até a ponta da espádice durante a antese. A floração é perfumada entre 6h30 e 10h durante as fases feminina e masculina (pólen) e, durante esses períodos, enxames de abelhas *euglossinas* barulhentas são atraídas pelo perfume com sabor de goma de menta das flores (Figura 4). Apenas as abelhas machos visitam as flores e vêm raspar uma cera perfumada na superfície da espádice, que é usada para produzir um feromônio de abelha para atrair as abelhas fêmeas. As abelhas alternam entre enxugar a cera da espádice e transferi-la para órgãos de armazenamento em suas patas traseiras enquanto pairam imóveis perto da flor. Disputas territoriais frequentes ocorrem entre abelhas individuais em flores lotadas. Dessa forma, as abelhas estarão polinizando essas plantas transportando o pólen das florações da fase masculina para as florações da fase feminina recém-ativas (CHARTIER et al., 2014).

### **8.7 POLINIZAÇÃO ARTIFICIAL**

Etapas da polinização artificial: Não há coincidência entre as épocas de maturação da parte feminina e da masculina ocorrendo a protoginia. Em geral a inflorescência está pronta para a polinização quando o estigma exsuda uma gota de líquido que se assenta no ápice de cada flor, visível nas primeiras horas da manhã. Algumas cultivares apresentam tal gota, em todas as flores ao mesmo tempo, enquanto outras apresentam em sucessão. De qualquer modo, quando as gotas estão presentes, as flores estão prontas para ser polinizadas. Para realizar a coleta do pólen, este está pronto para ser coletado e/ou utilizado quando se torna visível na superfície da espádice, permanecendo disponível por vários dias. Para o cruzamento, espalhe-se o pólen sobre a espádice com o uso de um pincel. Nos dias subsequentes, enquanto houver disponibilidade de pólen e de líquido sobre os estigmas, tal procedimento pode ser repetido. Após este processo é recomendado etiquetar a haste floral com a informação da polinização correspondente (CASTRO et al., 2012).

## 8.8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Observa-se então que as aráceas fazem parte de um grupo de plantas que possui uma grande diversidade na sua biologia floral e variedade nos seus mecanismos para alcançar a polinização. As flores desta família podem ser hermafroditas ou unissexuais, pequenas e sésseis. Apresentam também o fenômeno da protoginia, prevenindo a autofecundação e favorecendo o cruzamento natural entre plantas diferentes.

De maneira geral as espécies desta família possuem vários tipos de recursos florais que são oferecidos por suas flores, onde os seus polinizadores podem se alimentar, ou nelas realizarem alguma outra atividade, como acasalamento e oviposição.

As suas inflorescências possuem características bem marcantes como a emissão de odores atrativos, armadilhas florais e ofertas de alimento, na forma de tecidos nutritivos e pólen. Outro destaque é a termogênese floral, um mecanismo metabólico de aquecimento da espádice que facilita a volatilização dos aromas atrativos e oferece abrigo aquecido aos besouros dentro das câmaras florais. Os insetos são considerados como sendo os seus principais polinizadores, mas outros visitantes, como lepidópteros, tripes e até beija-flores também já foram mencionados na literatura como possíveis polinizadores.

A família aráceae é muito grande, muito diversa, principalmente quando se fala sobre sua biologia floral, sendo notável por produzir uma das inflorescências mais conspícuas de entre todas as angiospérmicas, e também as flores mais pequenas que se conhecem. E mesmo havendo características tão diferentes e importantes, poucos trabalhos são encontrados na literatura com ênfase na biologia floral e polinização sobre esta família e há muito ainda a ser descoberto, visto que as aráceas fazem parte da maior família de Angiospermas existentes.

## 8.9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARABÉ, D.; C. LACROIX. Morfologia de desenvolvimento da flor de *Anaphyllopsis americana* e sua relevância para nossa compreensão de Araceae basal. **Botany** 86: 1467-1473. 2008.
- BOYCE, P.C.; CROAT, T.B. **The Überlist of Araceae** Totals for Published and Estimated Number of Species in Aroid Genera. 2018.
- BUTURI, C. V. O Gênero *Philodendron* Schott (Araceae) no estado do Paraná – Brasil. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Paraná. 2015.
- CAMAZINE, S.; K. J. NIKLAS. Aerobiology of *Symplocarpus foetidus*: Interactions between the spathe and spadix. *Amer. J. Bot.* 71: 843–850. 1984.
- CASTRO, A. C. R., TERAPO, D., DE CARVALHO, A. C. P. P., LOGES, V. **Antúrio**. 2012.
- CHARTIER, M., M. GIBERNAU; SS RENNER. A evolução dos tipos de interação planta-polinizador em Araceae. **Evolução** 68: 1533–1543. 2014.
- COELHO MAN, SOARES ML, CALAZANS LSB, GONÇALVES EG, ANDRADE IM, PONTES TA, SAKURAGUI CM, TEMPONI LG, BUTURI C; MAYO S. Araceae. *In*: Lista de espécies da flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2016.
- COELHO, M. A. N. a família araceae na Reserva Natural Vale, linhares, espírito Santo, Brasil. **Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão**, v. 28, n. 1, p. 41-87, 2010.
- CROAT, T. B., TEISHER, J., HANNON, L. P.; KOSTELAC, C. V. Araceae of the LitaSan Lorenzo Region (Esmeraldas Province, Ecuador). Part 1: *Anthurium* sect. *Polyneurium*. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 104(1), 105–168. 2019.
- CROAT T. B. History and current status of systemic research with Araceae, **Aroideana** 21: 26-145. 1998.
- CROAT, T. B. Flowering behavior of the neotropical genus *Anthurium* (Araceae). **Amer. J. Bot.** 67: 888–904. 1980.
- CROAT, T.B. A revision of *Philodendron* subgenus *Philodendron* (Araceae) for Mexico and Central America. **Ann Missouri Bot Gard** 84(3): 311–704. 1997.
- DÍAZ JIMÉNEZ, P. Biología Floral y Reproductiva de *Spathiphyllum cochlearispathum* (Liebm.) Engl. y *Spathiphyllum ortgiesii* Regel (Araceae) en la Región de Los Tuxtlas, Veracruz, México. **Master's thesis**, Universidad Veracruzana, Xalapa. 2016.
- DIAZ, A.; G. C. KITE. Why be a rewarding trap? The evolution of floral rewards in *Arum* (Araceae), a genus characterized by saprophilous pollination systems. **Biol. J. Linn. Soc.** 88: 257–268. 2006.
- ETL, F., A. FRANSCHITZ, A. J. C. AGUIAR, J. SCHÖNENBERGER; S. DÖTTERL. A perfume-collecting male oil bee? Evidences of a novel pollination system involving *Anthurium acutifolium* (Araceae) and *Paratetrapedia chocoensis* (Apidae, Tapinotaspidini). **Flora** 232: 7–15. 2017.
- FARTYAL, R. S., J. J. GAO, M. J. TODA, Y.-G. HU, K. T. TAKANO, A. SUWITO, T. KATOH, et al. *Colocasiomyia* (Diptera: Drosophilidae) revised phylogenetically, with a new

- species group having peculiar lifecycles on monsteroïd (Araceae) host plants. *Syst. Entomol.* 38: 763–782. 2013.
- FRANZ, N. M. Pollination of *Anthurium* (Araceae) by derelomine flower weevils (Coleoptera: *Curculionidae*). *Int. J. Trop. Biol.* 55: 269–277. 2007.
- GASCA-ALVAREZ, H. J. New records of *Cyclocephala* Dejean (Coleoptera: Scarabaeidae: Dynastinae) associated with *Caladium bicolor* (Aiton) Vent. (Araceae). *Coleopt. Bull.* 67(4): 416–418. 2013.
- GIBERNAU, M. Pollinators and visitors of aroid inflorescences III—Phylogenetic; chemical insights. *Aroideana* 39: 4–22. 2016.
- GIBERNAU, M. Pollinators and visitors of aroid inflorescences. *Aroideana* 26: 66–83. 2003.
- GIBERNAU, M. Pollinators and visitors of aroid inflorescences: An addendum. *Aroideana* 34: 70–83. 2011.
- GIBERNAU, M., M. CHARTIER; D. BARABÉ. Recent advances toward an evolutionary comprehension of Araceae pollination. Pp. 101–114 in S. Ole, P. Gitten, B. Anders S.; D. Jarrold I. (editors), *Diversity, Phylogeny, and Evolution in the Monocotyledons*. Aarhus University Press, Aarhus. 2010.
- GOTTSBERGER, G., I. SILBERBAUER-GOTTSBERGER; S. DÖTTERL. Pollination and floral scent differentiation in species of the *Philodendron bipinnatifidum* complex (Araceae). *Pl. Syst. Evol.* 299: 793–809. 2013.
- GRAYUM, M. H. 1986. Correlations between pollination biology and pollen morphology in the Araceae, with some implications for angiosperm evolution. Pp. 313–327 in S. Blackmore; I. K. Ferguson (editors), *Pollen and Spores: Form and Function*. Academic Press, London. 1986.
- GRAYUM, M. H. Evolution and phylogeny of Araceae. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 77: 628–697. 1990.
- GUEVARA-IBARRA, L. Biología Reproductiva de *Anthurium buganum* (Araceae) en el Parque Natural Regional El Vínculo, Colombia. **Undergraduate thesis**, Universidad del Valle, Cali. 2015.
- GUIMARÃES, J. A., DE CASTRO, A. C. R., MESQUITA, A. L. M., BRAGA SOBRINHO, R.; DE AZEVEDO, F. R. Manual de reconhecimento e controle das principais pragas do antúrio no Estado do Ceará. **Embrapa Agroindústria Tropical-Documentos** (INFOTECA-E), 2008.
- HARTLEY, N., T. KRÖMER; M. GIBERNAU. Lepidopteran visitors of *Anthurium* inflorescences. *Aroideana* 40: 84–96. 2017.
- HENTRICH, H., R. KAISER; G. GOTTSBERGER. Floral biology and reproductive isolation by floral scent in three sympatric aroid species in French Guiana. *Pl. Biol.* 12: 587–596. 2010.
- JIMÉNEZ, P. D., HENTRICH, H., AGUILAR-RODRÍGUEZ, P. A., KRÖMER, T., CHARTIER, M.; GIBERNAU, M. A Review on the Pollination of Aroids with Bisexual Flowers1. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 104(1), 83-104. 2019.
- MAIA, A. C. D., C. SCHLINDWEIN, D. M. A. F. NAVARRO; M. GIBERNAU. Pollination of *Philodendron acutatum* (Araceae) in the Atlantic Forest of Northeastern Brazil: A single scarab beetle species guarantees high fruit set. *Int. J. Pl. Sci.* 171: 740–748. 2010.

- MALLOOF, J. E.; D. W. INOUE. Are nectar robbers cheaters or mutualists? **Ecology** 81:2651–2661. 2000.
- MAYO, S. J., J. BOGNER; P. C. BOYCE. The Genera of Araceae. **Royal Botanic Gardens, Kew**. 1997.
- MAYO, S.J. A revision of *Philodendron* subgenus Meconostigma. **Kew Bulletin**, 46(4): 601–681. 1991.
- POLI, L. P., TEMPONI, L. G.; COAN, A. I. Ike. Gynoecial ontogeny of *Anthurium*: contributions for floral developmental studies in Araceae (Alismatales). **Botany**, v. 93, n. 1, p. 47–56, 2015.
- RUIZ-IDARRAGA, J. M. Biología Floral y Reproductiva de *Anthurium kunthii* y *Anthurium caucavallense* (Araceae) en un Fragmento de Bosque Seco de Colombia. **Undergraduate thesis**, Universidad del Valle, Cali. 2017.
- STEVENS, P. F. Angiosperm Phylogeny Website. Version 14, July 2017. Retrieved March 26, 2020.
- SAKURAGUI, C.M., CALAZANS, L.S.B.; MORAIS, E.B.; COELHO, M.A.N.; PELLEGRINI, M.O.O. Diversity and conservation of *Philodendron* Schott (Araceae) in Atlantic Forest of Rio de Janeiro State, Brazil. **Journal of Botanical taxonomy and Geobotany** 122: 1– 21. 2011.
- SCHULTES R. E.; RAFFAUF R.F. The healing forest: medicinal and toxic plants of the northwest Amazonia, Dioscorides Press, **Oregon**, 500 p. 1990.
- SCHWERDTFEGER, M., G. GERLACH; R. KAISER. Anthecology in the neotropical genus *Anthurium* (Araceae): **A preliminary report**. *Selbyana* 23: 258–267. 2002.
- SEYMOUR, R. S., C. R. WHITE; M. GIBERNAU. Heat reward for insect pollinators. **Nature** 426: 243–244. 2003.
- TEMPONI, L.G.; GARCIA, F.C.P.; SAKURAGUI, C.M.; CARVALHO-OKANO, R.M.de. Diversidade morfológica e formas de vida das Araceae no parque estadual do Rio Doce, Minas Gerais. **Rodriguésia**, v.56, n.88, p.1–13, 2005.
- TOMBOLATO, A. F. C., UZZO, R. P., DE CASTRO, A. C. R., SAKAI, M.;SAES, L. A. Recursos genéticos e melhoramento do antúrio (*Anthurium andraeanum* Linden) no IAC-APTA. **Ornamental Horticulture**, v. 10, n. 1/2, 2004.