



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

PRISCILA BEZERRA DOS SANTOS MELO

INDUÇÃO À EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E IDENTIFICAÇÃO
DE MARCADORES ISSR EM ANTÚRIO

FORTALEZA

2016

PRISCILA BEZERRA DOS SANTOS MELO

**INDUÇÃO À EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E IDENTIFICAÇÃO
DE MARCADORES ISSR EM ANTÚRIO**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Agronomia.
Área de concentração: Melhoramento Vegetal.

Orientadora:
Profa. Dra. Cândida Hermínia Campos de Magalhães Bertini.

Co-orientadora:
Dra. Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho.

FORTALEZA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- M486i Melo, Priscila Bezerra dos Santos.
Indução à embriogênese somática e identificação de marcadores ISSR em antúrio / Priscila Bezerra dos Santos Melo. – 2016.
99 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Fitotecnia), Fortaleza, 2016.
Orientação: Prof. Dr. Cândida Hermínia Campos de Magalhães Bertini .
Coorientação: Prof. Dr. Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho .
1. Anthurium andraeanum. 2. Morfogênese in vitro. 3. Diversidade genética. I. Título.

CDD 630

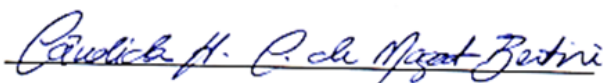
PRISCILA BEZERRA DOS SANTOS MELO

INDUÇÃO À EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E
IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES ISSR EM ANTÚRIO

Dissertação submetida à Coordenação do
Curso de Pós-Graduação em
Agronomia/Fitotecnia da Universidade Federal
do Ceará, como requisito parcial para obtenção
do grau de Mestre em Agronomia.
Área de concentração: Melhoramento Vegetal.

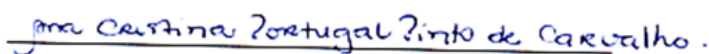
Aprovada em: 19/07/2016.

BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Cândida Hermínia Campos de Magalhães Bertini (Orientadora)

Universidade Federal do Ceará (UFC)



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

Embrapa Agroindústria Tropical (CNPAT)



Prof. Dr. Roberto Jun Takane (Conselheiro)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus, por ser minha força e refúgio.

À minha família, por ser meu bem mais precioso.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por estar ao meu lado e ser meu sustento para seguir em frente sempre, por mais difícil que seja o caminho.

À minha família, esposo e amigos, pelo incentivo, apoio, dedicação e carinho.

A orientação e co-orientação das queridas e admiráveis, orientadora Cândida H. Campos de Magalhães, e co-orientadora Ana Cristina P. P. de Carvalho, pelos preciosos ensinamentos, paciência, apoio, incentivo e atenção.

Ao conselheiro de banca Roberto Jun Takane, pelo tempo dedicado, por toda atenção e contribuição na avaliação de meu trabalho.

À Dr^a Patricia do Nascimento Bordallo, pela gentileza de conceder o laboratório de Biologia Molecular para execução de grande parte do meu trabalho.

À Dr^a Celli Rogrigues Muniz, pelo laboratório de Microscopia concedido, por toda atenção e dedicação no auxílio prestado para a realização de parte do meu trabalho.

Ao Dr. Antonio Fernando Caetano Tombolato por ceder o material do IAC.

À querida Eveline Nogueira Lima, por ceder seu tempo, dividir sua experiência e conhecimento, e por toda sua dedicação no auxílio da execução de parte fundamental do meu trabalho.

Aos colegas de pós-graduação, especialmente às queridas amigas Lílian e Liliane, bem como aos colegas e amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais.

A todos os professores do programa, pelos preciosos ensinamentos.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, colaboraram para mais essa conquista em minha vida.

Ao CNPq, pela bolsa concedida.

A Universidade Federal do Ceará pela oportunidade de realização do curso de graduação e pós-graduação.

À Embrapa Agroindústria Tropical pela infraestrutura e apoio para realização das atividades de pesquisa do meu trabalho.

“A grande conquista é o resultado de pequenas vitórias que passam despercebidas.”

(Paulo Coelho)

RESUMO GERAL

O antúrio é uma importante espécie ornamental para o agronegócio da floricultura. Assim, é importante garantir o sucesso de seu cultivo. O uso da biotecnologia permite o desenvolvimento de técnicas eficientes de propagação *in vitro*. Uma dessas técnicas é a embriogênese somática. Porém, além destes esforços, uma das técnicas que pode contribuir efetivamente para o sucesso do cultivo do antúrio é a caracterização das cultivares da espécie, por meio de marcadores moleculares. Assim, o estudo foi dividido em dois experimentos. Experimento 1: Objetivou-se estabelecer um protocolo de indução à embriogênese somática para as cultivares de antúrio Jureia e Luau, utilizando como explantes segmentos nodais. Estudou-se o efeito da interação entre os fatores cultivar, tipo e concentração do regulador de crescimento sobre a oxidação (%) e formação de calos embriogênicos (%). Utilizou-se microscopia eletrônica de varredura (MEV) para identificar se as estruturas formadas a partir dos explantes apresentavam características embriogênicas. Constatou-se que a cultivar Jureia é mais sensível e o meio adicionado de ANA mais propenso à oxidação. Quanto à formação de calos embriogênicos, constatou-se que a cultivar Luau tem maior potencial embriogênico e estabeleceu-se o seguinte protocolo de indução à embriogênese somática, para as duas cultivares estudadas: segmentos nodais devem permanecer 75 dias, no escuro, em meio ESA (Pierik 1976, modificado) suplementado com 7,5 µM de ANA. Experimento 2: Objetivou-se a seleção de marcadores ISSR para caracterização molecular das cultivares de antúrio Sublime, Luau, Jureia e Maré, a partir de amostras de folhas oriundas de plantas estabelecidas *in vitro*, obtidas de organogênese indireta, e de amostras de calos embriogênicos. Foi realizada a extração de DNA das amostras coletadas, revelando DNA de boa qualidade. Foi feita a PCR de 18 marcadores ISSR e os produtos da reação foram visualizados por eletroforese. Os fragmentos revelados no gel de agarose foram transformados em dados binários [1 – presença de banda; 0 – ausência de banda], possibilitando agrupar as amostras em termos de distância genética em um dendrograma. Constatou-se que os marcadores ISSR utilizados apresentaram polimorfismo, sendo eficientes para caracterizar as amostras de antúrio estudadas. Foram identificados marcadores cultivar-específicos. Sublime revelou-se como a cultivar geneticamente mais estável, e Maré, como a mais instável. Estes resultados proporcionam novas perspectivas para a propagação *in vitro*, bem como são úteis para o melhoramento genético e proteção da identidade genética das cultivares de antúrio estudadas.

Palavras-chave: *Anthurium andraeanum*. Morfogênese *in vitro*. Diversidade genética.

ABSTRACT

Anthurium is an important ornamental species for floriculture's agribusiness. Thus, it is very important to ensure the success of its cultivation. The use of biotechnology allows the development of effective techniques for *in vitro* propagation. One of these techniques is the somatic embryogenesis. However, beyond these efforts, another technique that can effectively contribute to the success of *Anthurium* cultivation, is the characterization of anthurium's cultivars, by means of molecular markers. Therefore, the study was divided into two experiments. Experiment 1: The objective was to establish an induction protocol for somatic embryogenesis for the anthurium's cultivars Jureia and Luau, using nodal segments as explants. It was studied the effect of the interaction among the factors cultivar, growth regulator type and concentration on oxidation (%) and formation of embryogenic calli (%). The scanning electron microscopy (SEM) was used to identify whether the structures formed from the explants showed embryogenic characteristics. The evaluations about oxidation showed that Jureia is the most sensitive cultivar, and that the medium added with NAA is more prone to oxidation. As for the formation of embryogenic calli, it was found that Luau has more embryogenic potential and it was established the following protocol for induction of somatic embryogenesis for the two studied cultivars: nodal segments must be maintained for 75 days, in the dark, in the medium ESA (Pierik 1976 modified) supplemented with 7.5 mM of NAA. Experiment 2: The objective was the selection of ISSR markers for molecular characterization of anthurium's cultivars Sublime, Luau, Jureia and Maré, using leaf samples of *in vitro* established plants, from indirect organogenesis, and samples of embryogenic calli. The DNA extraction was made, showing a genetic material of good quality. The PCR of the 18 ISSR markers was made and the reaction products were visualized by electrophoresis. The revealed fragments in the agarose gel were transformed into binary data [1- presence of band; 0 - absence of band], allowing the classification of the samples in terms of genetic distance in a dendrogram. It was found that all the ISSR used showed polymorphism, being effective to characterization of the anthurium's samples studied. Cultivar-specific markers were identified. It was found that Sublime is the cultivar genetically most stable and Maré the most unstable. These results provide new perspectives for the *in vitro* propagation, and are useful for breeding and protection of the studied anthurium's cultivars.

Keywords: *Anthurium andraeanum*. *In vitro* morphogenesis. Genetical diversity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1 - Exportações e importações brasileiras de flores e plantas ornamentais..... 17
- Figura 2 – Vantagens e desvantagens da produção de flores e plantas ornamentais no estado do Ceará..... 18
- Figura 3 – Inflorescências de antúrio (*Anthurium andraeanum*) cvs. IAC Luau (A), Jureia (B), Sublime (C) e Maré (D)..... 19
- Figura 4 – Mudas de antúrio (*Anthurium andraeanum*) cv. Eidibel estabelecidas *in vitro* (C) a partir de organogênese indireta, ou seja, por meio da formação de calo (B), em explantes de folhas jovens (A)..... 23

CAPÍTULO I

- Figura 1 – Análise de regressão do desdobramento do efeito dos níveis de concentração para cada um dos reguladores de crescimento, referente à oxidação, durante 90 dias após a inoculação de segmentos nodais em meio de indução à embriogênese somática de *Anthurium andraeanum*. Fortaleza-CE, 2016..... 56
- Figura 2 – Análise de regressão do desdobramento do efeito dos níveis de concentração para cada um dos reguladores de crescimento, referente à presença de calos embriogênicos, durante 90 dias após a inoculação de segmentos nodais em meio de indução à embriogênese somática de *Anthurium andraeanum*. Fortaleza-CE, 2016..... 59
- Figura 3 – Análise de regressão do desdobramento do efeito dos níveis de concentração para cada cultivar, referente à presença de calos embriogênicos, durante 90 dias após a inoculação de segmentos nodais em meio de indução à embriogênese somática de *Anthurium andraeanum*. Fortaleza-CE, 2016..... 61
- Figura 4 – Análise de regressão do desdobramento do efeito dos períodos de avaliação para cada cultivar, referente à presença de calos embriogênicos, durante 90 dias após a inoculação de segmentos nodais em meio de indução à embriogênese somática de *Anthurium andraeanum*. Fortaleza-CE, 2016..... 64

- Figura 5 – Análise de regressão do desdobramento do efeito da interação entre períodos de avaliação e níveis de concentração, referente à presença de calos embriogênicos, durante 90 dias após a inoculação de segmentos nodais em meio de indução à embriogênese somática de *Anthurium andraeanum*. Fortaleza-CE, 2016..... 66
- Figura 6 – Amostras de explantes de segmento nodal de *Anthurium andraeanum* cultivar Luau, utilizadas na microscopia eletrônica de varredura, para análise tridimensional das estruturas formadas aos 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63 e 70 dias (d) de cultivo em meio de indução à embriogênese somática (ESA + 2,5 µM de ANA). Fortaleza-CE, 2016..... 68
- Figura 7 – Amostras de explantes de segmento nodal de *Anthurium andraeanum* cultivar Jureia, utilizadas na microscopia eletrônica de varredura, para análise tridimensional das estruturas formadas aos 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63 e 70 dias (d) de cultivo em meio de indução à embriogênese somática (ESA + 7,5 µM de ANA). Fortaleza-CE, 2016..... 69
- Figura 8 – Amostras de explantes de segmento nodal das cultivares de *Anthurium andraeanum* Jureia (figura A) e Luau (figura B), antes do cultivo em meio de cultura de indução à embriogênese somática, e suas respectivas imagens ultraestruturais, obtidas por microscopia eletrônica de varredura. A seta azul indica as células do explante sem presença de intumescimento na figura A, e a seta amarela indica a bainha que recobre a gema do explante na figura B. Fortaleza-CE, 2016..... 69
- Figura 9 – Imagens, obtidas por microscopia eletrônica de varredura, das amostras de explantes de segmento nodal de *Anthurium andraeanum* cultivar Jureia, correspondentes aos 7, 21, 42 e 56 dias de cultivo em meio de indução à embriogênese somática (ESA + 7,5 µM de ANA). A seta verde indica células intumescidas e alongadas. A seta vermelha indica células com formato arredondado. A seta amarela indica células individualizadas. Fortaleza-CE, 2016..... 70

Figura 10 – Imagens, obtidas por microscopia eletrônica de varredura, das amostras de explantes de segmento nodal de *Anthurium andraeanum* cultivar Luau, correspondentes aos 7, 21, 42 e 70 dias de cultivo em meio de indução à embriogênese somática (ESA + 2,5 µM de ANA). A seta verde indica células intumescidas e alongadas. A seta vermelha indica células com formato arredondado. A seta amarela indica células individualizadas. Fortaleza-CE, 2016..... 71

CAPÍTULO II

- Figura 1 – Visualização dos DNAs extraídos em gel de eletroforese a 1,8% de agarose, em TBE. A primeira e última coluna correspondem ao marcador 1 kb da invitrogen. As demais colunas são as amostras dos DNAs de antúrio Luau (L), Sublime (S), Maré (M) e Jureia (J), a partir de folhas (F) de mudas estabelecidas *in vitro* e calos embriogênicos (C), totalizando 8 amostras. As amostras de DNA foram extraídas em replicatas (1 e 2)..... 86
- Figura 2 – Padrão de amplificação de oito amostras de antúrio, utilizando o iniciador I 807. A primeira coluna corresponde ao marcador 1 kb da invitrogen. As quatro posteriores colunas são as amostras dos DNAs de antúrio de folhas: 1- Luau; 2- Sublime; 3- Maré; 4- Jureia. As quatro posteriores colunas são as amostras dos DNAs de antúrio de calos embriogênicos: 5- Luau; 6- Sublime; 7- Maré; 8- Jureia. As setas amarela e vermelha, indicam bandas polimórficas e monomórficas, respectivamente..... 89
- Figura 3 – Dendrograma de dissimilaridade genética entre oito amostras de folha (F) e calo (C) de antúrio. Grupos formados: I (2 - Sublime F; 6 - Sublime C); II (1 - Luau F; 4 - Jureia F; 5 - Luau C; 8 - Jureia C); Grupo III (3 - Maré F); Grupo IV (7 - Maré C)..... 94

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1 – Meios de cultura ESA (etapas 1: indução de calos embriogênicos e 2: proliferação das culturas embriogênicas), ESB (etapa 3: maturação dos embriões somáticos) e ESC (etapa 4: germinação dos embriões somáticos) utilizados na produção de mudas micropropagadas de antúrio, (<i>Anthurium andraeanum</i>) via embriogênese somática [PIERIK (1976), modificado].....	26
--	----

CAPÍTULO I

Tabela 1 – Meio de cultura ESA utilizado nas etapas de indução de calos embriogênicos e proliferação das culturas embriogênicas, para produção de mudas micropropagadas de antúrio (<i>Anthurium andraeanum</i>), via embriogênese somática [PIERIK (1976), modificado].....	50
Tabela 2 – Desdobramento do efeito da interação entre cultivares e reguladores de crescimento, referente à oxidação e presença de calos embriogênicos, durante 90 dias após a inoculação de segmentos nodais em meio de indução à embriogênese somática de <i>Anthurium andraeanum</i> . Fortaleza-CE, 2016.....	53
Tabela 3 – Desdobramento do efeito dos reguladores de crescimento para cada nível de concentração, referente à oxidação e presença de calos embriogênicos, durante 90 dias após a inoculação de segmentos nodais em meio de indução à embriogênese somática de <i>Anthurium andraeanum</i> . Fortaleza-CE, 2016.....	55
Tabela 4 – Desdobramento do efeito das cultivares para cada nível de concentração, referente à presença de calos embriogênicos, durante 90 dias após a inoculação de segmentos nodais em meio de indução à embriogênese somática de <i>Anthurium andraeanum</i> . Fortaleza-CE, 2016.....	61
Tabela 5 – Desdobramento do efeito das cultivares para cada período de avaliação, referente à presença de calos embriogênicos, durante 90 dias após a inoculação de segmentos nodais em meio de indução à embriogênese somática de <i>Anthurium andraeanum</i> . Fortaleza-CE, 2016.....	63

CAPÍTULO II

Tabela 1 –	Identificação das amostras de DNA de antúrio utilizadas para a condução do experimento de identificação de marcadores moleculares ISSR, para a caracterização molecular do antúrio. Fortaleza-CE, 2016.....	83
Tabela 2 –	Identificação, bandas geradas e polimórficas, e percentual de polimorfismo dos 18 iniciadores ISSR utilizados na caracterização das amostras de antúrio em estudo.....	88
Tabela 3 –	Marcadores ISSR ideais para caracterização molecular das cultivares de antúrio Luau, Sublime, Maré e Jureia, a partir de amostras de folha (obtidas de mudas estabelecidas <i>in vitro</i> por organogênese indireta) e de calos embriogênicos (obtidos por embriogênese indireta de segmentos nodais).....	90
Tabela 4 –	Iniciadores monomórficos empregados na caracterização molecular de amostras de DNA de folhas e calos embriogênicos de cultivares de antúrio.....	91
Tabela 5 –	Matriz de dissimilaridade obtida para as oito amostras de folha (F) e calo (C) de antúrio estudadas, indicando a distância genética entre cada uma delas. Amostras: 1 - Luau F; 2 - Sublime F; 3 - Maré F; 4 - Jureia F; 5 - Luau C; 6 - Sublime C; 7 - Maré C; 8 - Jureia C.....	91
Tabela 6 –	Ordem crescente da distância genética entre amostras de folha (F) e calo (C) de antúrio, indicando as amostras com maior similaridade (menor distância) e dissimilaridade genética (maior distância). Amostras: 1 - Luau F; 2 - Sublime F; 3 - Maré F; 4 - Jureia F; 5 - Luau C; 6 - Sublime C; 7 - Maré C; 8 - Jureia C.....	92
Tabela 7 –	Agrupamento das amostras de folha (F) e calo (C) de antúrio, pelo método de UPGMA, utilizando o coeficiente de Jaccard. Amostras: 1 - Luau F; 2 - Sublime F; 3 - Maré F; 4 - Jureia F; 5 - Luau C; 6 - Sublime C; 7 - Maré C; 8 - Jureia C.....	95

SUMÁRIO

1	REVISÃO DE LITERATURA.....	16
1.1	A Floricultura no Brasil e no Mundo.....	16
1.2	Descrição e Importância do Antúrio.....	18
1.3	A Propagação do Antúrio.....	20
1.4	A Cultura de Tecidos.....	20
1.4.1	<i>Morfogênese in vitro</i>.....	21
1.5	A Embriogênese Somática.....	23
1.5.1	<i>Indução à Embriogênese Somática</i>.....	24
1.5.1.1	<i>Genótipo e Explante</i>.....	25
1.5.1.2	<i>Meio de Cultura</i>.....	25
1.5.1.3	<i>Reguladores de Crescimento</i>.....	27
1.5.2	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura</i>.....	27
1.6	Técnicas Moleculares na Descrição de Cultivares.....	28
1.6.1	<i>Marcadores Genéticos</i>.....	29
1.6.2	<i>Marcadores Moleculares</i>.....	30
1.6.2.1	<i>Marcadores ISSR</i>.....	31
1.6.3	<i>Caracterização e Proteção de Cultivares</i>.....	32
2	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34

	CAPÍTULO I – INDUÇÃO À EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM DUAS CULTIVARES DE ANTÚRIO.....	46
--	--	-----------

1	INTRODUÇÃO.....	48
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	50
2.1	Indução à Embriogênese Somática.....	50
2.2	Microscopia Eletrônica de Varredura.....	52
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
3.1	Indução à Embriogênese Somática.....	53
3.1.1	<i>Oxidação (%)</i>.....	53
3.1.2	<i>Formação de Calos Embriogênicos (%)</i>.....	57

3.2	Microscopia Eletrônica de Varredura.....	68
4	CONCLUSÕES.....	72
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73

**CAPÍTULO II – IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES ISSR PARA
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE QUATRO CULTIVARES DE ANTÚRIO** 78

1	INTRODUÇÃO.....	80
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	82
2.1	Extração de DNA.....	82
2.2	Amplificação do DNA.....	83
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	86
3.1	Extração de DNA.....	86
3.2	Amplificação do DNA.....	87
4	CONCLUSÕES.....	96
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97
	APÊNDICE A.....	99

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 A Floricultura no Brasil e no Mundo

O comércio mundial de flores e plantas ornamentais, além de movimentar bilhões de dólares anualmente, é extremamente dinâmico, envolvendo um grande número de países produtores e consumidores, bem como uma variada carteira de produtos (LIMA JÚNIOR *et al.*, 2015).

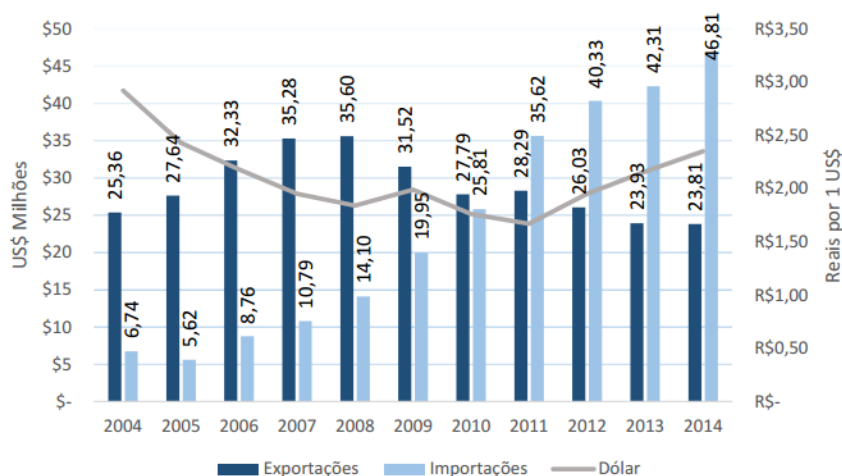
A Europa tem se destacado historicamente como importante centro de produção e consumo de produtos ornamentais (VAN HUYLENBROECK, 2010). No entanto, com a globalização, o mercado de flores abriu espaço para novos polos de produção, com destaque para Colômbia, Quênia, Equador, Etiópia (LIMA JÚNIOR *et al.*, 2015) e Costa Rica (VAN HUYLENBROECK, 2010).

No Brasil, o agronegócio de flores e plantas ornamentais também vem se expandindo (SEBRAE, 2015). Essa expansão deve-se às condições favoráveis do País para a produção de flores, folhagens e outros derivados, ao longo de todo ano a um custo reduzido, conferindo ao produto brasileiro condições para se firmar no mercado mundial (FRANÇA; MAIA, 2008).

Em todo o mundo, a floricultura movimenta no mercado produtor algo em torno de US\$ 18 bilhões, e por volta de US\$ 54 bilhões no mercado consumidor. Mais especificamente no mercado produtor brasileiro, anualmente, são movimentados US\$ 380 milhões, no atacadista US\$ 595 milhões e no varejista US\$ 1,41 bilhões (ALONSO; SILVA, 2016). Em 2014, a atividade obteve faturamento de mais de R\$ 5,4 bilhões, o que comprova o seu tamanho e importância na economia nacional. Nos anos de 2012 e 2013, esse montante foi de R\$ 4,8 bilhões e R\$ 5 bilhões, respectivamente, representando crescimento médio anual de 6,7 % (LIMA JÚNIOR *et al.*, 2015).

Na figura 1 pode-se observar que as importações cresceram quase seis vezes de 2004 a 2014, alcançando o valor de US\$ 46,8 milhões no último ano de análise. Esse comportamento representa um mercado interno com demanda aquecida e crescente pelos produtos de flores e plantas ornamentais. Em contrapartida as exportações, nos dez anos avaliados, apesar de oscilarem, diminuíram 6,1 % e alcançaram o valor de US\$ 23,8 milhões em 2014 (LIMA JÚNIOR *et al.*, 2015).

Figura 1 - Exportações e importações brasileiras de flores e plantas ornamentais.





Fonte: Elaborada por Lima Júnior e colaboradores (2015) a partir de SECEX/MIDIC e Banco Central.

Apesar de ainda não apresentar destaque no mercado mundial de flores e plantas ornamentais (JUNQUEIRA; PEETZ, 2009), o Brasil se mostra cada vez mais preparado para oferecer produtos em quantidade e com qualidade, tendo potencial para tornar-se um grande produtor e exportador de flores e plantas ornamentais, com ênfase especial para as tropicais (ANEFALOS; TOMBOLATO; RICORDI, 2010).

A floricultura tropical é tida como um negócio lucrativo que vem se expandindo em todo o mundo (JUNQUEIRA; PEETZ, 2011). Este setor tem tido bastante relevância na região do Nordeste Brasileiro, pois esta apresenta clima quente, com pequena variação de temperatura no decorrer do ano e forte luminosidade, possibilitando o cultivo não só de espécies tropicais, como também de outras numerosas espécies ornamentais, tanto a campo aberto, como sob a proteção de casa de vegetação, viveiros ou estufas (BRAINER; OLIVEIRA, 2006). Portanto, o cultivo e a comercialização de flores e plantas ornamentais, principalmente das espécies tropicais, têm obtido avanços relevantes nesta região, especialmente nos Estados de Pernambuco, Bahia, Alagoas e Ceará (JUNQUEIRA; PEETZ, 2008).

O Ceará é o principal estado da Região Nordeste envolvido com o agronegócio da floricultura. Um resumo das vantagens e desvantagens para a produção de flores no Estado está apresentado na figura 2 (LIMA JÚNIOR *et al.*, 2015).

Figura 2 – Vantagens e desvantagens da produção de flores e plantas ornamentais no estado do Ceará.

Vantagens	Desvantagens
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Proximidade com os principais países importadores; ▪ Aeroporto com câmara refrigerada; ▪ Condições edafoclimáticas uniformes; ▪ Vários ecossistemas no estado. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Infraestrutura precária; ▪ Ausência de central de comercialização; ▪ Escassez de água; ▪ Assistência técnica precária; ▪ Falta de organização dos produtores. 

Fonte: Elaborada por Lima Júnior e colaboradores (2015) a partir de entrevistas com produtores e especialistas.

1.2 Descrição e Importância do Antúrio

Dentre as flores tropicais que têm apresentado interesse econômico, o cultivo do antúrio (*Anthurium andraeanum* Linden) em vaso e como flor de corte, tem boa aceitação nos mercados interno e externo. A cultura pode ser explorada em pequenas propriedades e apresenta um elevado valor de comercialização. Dessa forma, existem perspectivas favoráveis para elevar a sua produção, comercialização e consumo, em ambos os mercados (ANEFALOS, TOMBOLATO; RIDORDI, 2010).

O antúrio é pertencente à família Araceae e ao gênero *Anthurium* Schott., ordem Alismatales, classe Liliopsida. Esse gênero é o maior e o mais complexo das aráceas, exclusivamente tropical e abundante em áreas florestais das Américas do Sul e Central (CASTRO; TOMBOLATO, 2012). As plantas são monocotiledôneas, semi-herbáceas e eretas. Podem ser hemiepífitas trepadeiras, terrestres, epífitas, litófitas, raramente helófitas ou reófitas (SANTOS, 2009), destacando-se pela beleza de suas folhagens (MAIRA; ALEXANDER; VARGAS, 2010).

Do ponto de vista comercial, a principal espécie do gênero é o *Anthurium andraeanum* Linden, bastante utilizado como flor de corte, folhagem e planta de vaso, bem como no paisagismo (CARVALHO *et al.*, 2013). A espécie desperta grande interesse do público consumidor devido ao tamanho, coloração e longa durabilidade pós-colheita das inflorescências (CASTRO *et al.*, 2004).

A estrutura conhecida por flor no antúrio é, na verdade, uma inflorescência em espiga, denominada espádice, protegida por uma bráctea colorida denominada

espata, a qual é responsável pela atração de agentes polinizadores (TOMBOLATO; CASTRO, 2005; GUIMARÃES *et al.*, 2008). As flores verdadeiras do antúrio são hermafroditas e apresentam o fenômeno da protoginia. Nesse fenômeno os órgãos sexuais femininos atingem primeiramente a maturidade e tornam-se receptivos, enquanto as flores masculinas ainda encontram-se imaturas. O resultado desse processo é que a autofecundação é dificultada e os cruzamentos naturais entre plantas diferentes favorecidos (TOMBOLATO; CASTRO, 2005).

O programa de melhoramento genético de antúrios, conduzido pelo Instituto Agrônomo (IAC), em Campinas, SP, desde 1980, foi responsável pelo desenvolvimento das primeiras variedades brasileiras, para cultivo e plantio comercial tanto para flor de corte quanto para planta de vaso. Esse programa se baseia na seleção de plantas de menor custo e bem adaptadas às condições climáticas do País, as quais são produzidas para competir com as cultivares importadas (TOMBOLATO *et al.*, 2004a). Dentre as principais variedades de antúrio lançadas pelo IAC estão Luau, Jureia, Sublime e Maré (Figura 3).

Figura 3 - Inflorescências de antúrio (*Anthurium andraeanum*) cvs. IAC Luau (A), Jureia (B), Sublime (C) e Maré (D).



Fonte: David dos Santos Júnior (A e B) e Antônio Fernando Caetano Tombolato (C e D).

1.3 A Propagação do Antúrio

O antúrio é uma planta de fecundação cruzada, assim, é naturalmente propagado por sementes. Porém, esta espécie também pode ser propagada vegetativamente pelos métodos convencionais de divisão de touceiras ou estaquia, além da micropropagação, por cultura de tecidos vegetais (FUZITANI; NOMURA, 2004; TOMBOLATO *et al.*, 2004b).

A propagação por sementes é um processo lento e gera progênes heterogêneas devido à polinização cruzada (BEJOY; SUMITHA; ANISH, 2008). Por outro lado, a propagação vegetativa convencional possibilita a disseminação de pragas e doenças, além de limitar a quantidade de mudas disponíveis (TOMBOLATO *et al.*, 2004a). Dessa forma, a propagação *in vitro* tem sido bastante utilizada como importante método para a produção massiva de mudas da espécie, permitindo a uniformização das características (MAIRA; ALEXANDER; VARGAS, 2010).

Portanto, para o antúrio, o uso da biotecnologia, especialmente com a utilização de técnicas da cultura de tecidos, propicia uma forma alternativa de propagação das plantas, além de proporcionar perspectivas novas e promissoras para o melhoramento e para a conservação dos recursos genéticos dessa espécie (YUNUS *et al.*, 2012).

1.4 A Cultura de Tecidos

Na cultura de tecidos a produção de mudas ocorre independente da época do ano devido ao controle dos fatores climáticos (SILVA; SOUZA; GOMES, 2008). Este controle das condições ambientais durante a propagação permite aperfeiçoar a interação entre fatores abióticos (nutricionais, luminosos, temperatura etc.) e bióticos (hormonais e genéticos), resultando em plantas saudáveis, vigorosas e geneticamente superiores, que podem ser multiplicadas massivamente (ALVES *et al.*, 2008), totalmente livres de pragas e doenças (DIAS *et al.*, 2011), e com a conservação da identidade genética do material propagado (FUZITANI; NOMURA, 2004). As mudas produzidas são obtidas em grande quantidade e em curto espaço de tempo (QUIRINO *et al.*, 2009). Portanto, a prática constitui-se excelente ferramenta para clonar plantas em escala comercial (ALVES *et al.*, 2008). Dessa forma, vários trabalhos têm sido conduzidos com a

cultura de tecidos de antúrio, visando à avaliação do seu potencial morfogênético na obtenção de mudas (GANTAIT; MANDAL, 2010).

A aplicação mais prática e difundida da cultura de tecidos é a micropropagação *in vitro* (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). As principais etapas da prática de micropropagação são: seleção e preparação da planta mãe; estabelecimento *in vitro* de uma cultura asséptica; multiplicação dos propágulos; alongamento; enraizamento; e aclimatização (GEORGE, 1993; GEORGE; HALL; KLERK, 2008).

A regeneração de plantas através da cultura de tecidos baseia-se no princípio da totipotência, proposto pelo fisiologista Haberlandt, que em 1902, enunciou que cada célula vegetal possuía o potencial genético para regenerar uma planta inteira (RAO; RAVISHANKAR, 2002). A totipotência está estreitamente relacionada à interação entre os processos de indução, competência, determinação e diferenciação celular, que resulta na morfogênese *in vitro* (CHRISTIANSON; WARNICK, 1983).

As respostas morfogênicas podem ocorrer através de duas rotas de regeneração: organogênese ou embriogênese, as quais são influenciadas e determinadas pelos fitorreguladores, tipo de explante, genótipo, meio de cultura e condições de cultivo (HOU; JIA, 2004; WU; CHEN; CHANG, 2004; PARAMAGEETHAM; BABU; RAO, 2004; PARK *et al.*, 2005).

1.4.1 Morfogênese *in vitro*

Na via de morfogênese *in vitro* chamada de organogênese a planta é regenerada a partir de meristemóides formados no tecido cultivado, os quais podem se originar de forma direta ou indireta. A organogênese ocorre de forma direta quando há a formação de meristemas ou gemas diretamente sobre o explante, e de forma indireta quando há a formação de calo precedente ao processo de regeneração de gemas (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Na via embriogênica de morfogênese *in vitro* a planta é regenerada a partir de embriões somáticos formados no tecido cultivado. Na embriogênese também ocorrem as formas direta e indireta para regeneração das plantas. Na embriogênese direta os embriões somáticos se formam na superfície do explante sem passar pela fase

de calo. Na embriogênese indireta os embriões somáticos se formam na superfície do calo (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

O calo é um tecido formado a partir de um ferimento em resposta da lesão (SMITH, 2000), sendo definido como massa de células desorganizadas (TORRES; CALDAS, 1990), as quais apresentam diferentes estágios de diferenciação e, conseqüentemente, diferentes graus de determinação, podendo adquirir novas competências mediante a presença de um mensageiro químico específico (GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1999; QUIROZ-FIGUEROA *et al.*, 2006). Na embriogênese, o calo apresenta algumas peculiaridades, que são a coloração branco opaca para amarelo claro e a origem de estruturas globulares representando embriões somáticos, que aparecem na superfície do calo após, aproximadamente, duas semanas de cultivo (VASIL; VASIL; LU, 1984).

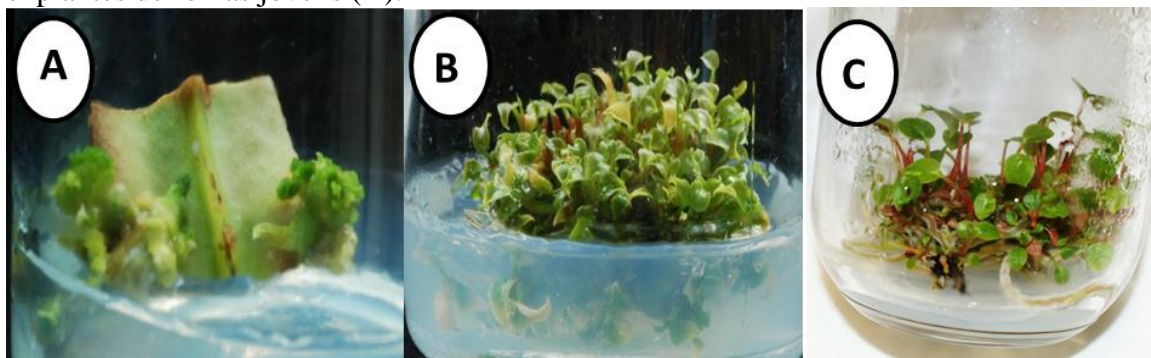
As brotações formadas via organogênese caracterizam-se por serem estruturas monopolares e apresentarem ampla conexão vascular dos órgãos formados com o explante (ANDRADE, 2005). De forma oposta, a embriogênese somática é um processo de regeneração de plantas de estruturas bipolares, ou seja, constituídas de ápice caulinar e radicular, similares a embriões zigóticos, porém sem envolvimento com a fusão de gametas, e com a presença de um sistema vascular fechado, ou seja, sem conexão vascular com os tecidos do explante inicial (PINHEIRO, 2010).

O antúrio tem sido propagado tradicionalmente mediante a organogênese indireta, por meio do cultivo *in vitro* de explantes foliares, indução de calos, e posterior formação de gemas adventícias (Figura 4). Contudo, esse método proporciona taxas de multiplicação relativamente baixas e inconsistentes, com a provável ocorrência de variação somaclonal nas mudas obtidas (TE-CHATO; SUSANON; SONTIKUN, 2006; BAUTISTA *et al.*, 2008), a qual do ponto de vista clonal não é desejada, porém desperta o interesse dos melhoristas por ser nova fonte de variabilidade genética, fornecendo perspectivas de seleção *in vitro* ou *ex vitro* de plantas com características de interesse agrônômico (TABARES *et al.*, 1991).

A embriogênese somática apresenta algumas vantagens sob as limitações encontradas na morfogênese *in vitro* pela rota organogenética (PARROT; MERKLE; WILLIAMS, 1991), as quais fazem da embriogênese uma alternativa viável para a produção *in vitro* do antúrio em larga escala e isentas de patógenos, além de ampliar a

possibilidade de estudos para o melhoramento genético da espécie, como também para a obtenção de novas variedades (PINHEIRO, 2010).

Figura 4 – Mudanças de antúrio (*Anthurium andraeanum*) cv. Eidibel estabelecidas *in vitro* (C) a partir de organogênese indireta, ou seja, por meio da formação de calo (B), em explantes de folhas jovens (A).



Fonte: David dos Santos Júnior (A e B) e Cláudio de Norões Rocha (C).

1.5 A Embriogênese Somática

A embriogênese somática é definida como o processo pelo qual células haploides ou somáticas, sob condições específicas de indução, através de uma série de modificações estruturais e bioquímicas originam embriões somáticos, por via de regeneração direta ou indireta, os quais se desenvolvem por meio de diferentes estádios, dando origem a uma planta sem que ocorra a fusão de gametas (TAUTORUS *et al.*, 1991; QUIROZ-FIGUEROA *et al.*, 2006; PEREIRA *et al.*, 2007). Esses estádios por que passa o embrião somático seguem o mesmo padrão de desenvolvimento do embrião zigótico, ou seja, ocorre a passagem pelos estádios globular, cordiforme, torpeda e cotiledonar, num processo ontogenético, no qual no final ocorre a formação de uma estrutura bipolar, constituída de ápice caulinar e radicular (GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1999; JURGENS; MAYER, 1992).

Por haver grande similaridade de desenvolvimento entre embriões somáticos e zigóticos, a embriogênese somática *in vitro* contribui para estudos fisiológicos, genéticos e bioquímicos que norteiam o desenvolvimento embrionário (ZIMMERMAN, 1993), sendo ideal para investigar o processo de diferenciação em plantas, bem como a expressão dos mecanismos de totipotência da célula vegetal, incluindo-se abordagens diferenciais da competência celular (PARROT; MERKLE; WILLIAMS, 1991; TAUTORUS *et al.*, 1991).

A regeneração de plantas via embriogênese somática inclui cinco passos: 1 - iniciação das culturas embriogênicas pelo cultivo do explante primário em meio suplementado com reguladores de crescimento, principalmente auxinas, mas muitas vezes também citocininas; 2 - proliferação das culturas embriogênicas em meio sólido ou líquido suplementado com reguladores de crescimento de modo semelhante à iniciação; 3 - pré-maturação de embriões somáticos em meio sem reguladores de crescimento para inibir a proliferação e estimular a formação do embrião somático; 4 - maturação dos embriões somáticos pelo cultivo em meio suplementado com ácido abscísico (ABA) e/ou com o potencial osmótico reduzido; e 5 - regeneração de plantas em meio sem reguladores de crescimento (GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1999).

Na espécie *A. andraeanum*, os primeiros trabalhos com embriogênese somática foram conduzidos por Kuehnle, Chein e Sugi, em 1992, constatando resposta morfo genética genótipo dependente. Depois desse primeiro trabalho, vários outros foram conduzidos com a embriogênese somática em antúrio (HAMIDAH; KARIM; DEBERGH, 1997; JIE, 2006; TE-CHATO; SUSANON; SONTIKUN, 2006; XIN *et al.*, 2006; BAUTISTA *et al.*, 2008; BEYRAMIZADE; AZADI, 2008; PINHEIRO, 2010; PINHEIRO *et al.*, 2013a,b; PINHEIRO, 2014; PINHEIRO, *et al.*, 2014; BHATTACHARYA *et al.*, 2016).

1.5.1 Indução à Embriogênese Somática

Indução é o desencadeamento de um processo morfo genético pela exposição do explante a um estímulo físico, químico ou biológico. Embora esse processo envolva o controle da expressão gênica, não é um fenômeno genético, uma vez que não há modificação alélica ou genotípica (GUERRA; NODARI, 2006).

Na indução da embriogênese somática, por meio de estímulos ambientais ou químicos, células somáticas adquirem competência para originar uma linhagem de células-filhas que irão formar embriões somáticos. O termo célula embriogênica tem sido empregado para designar aquelas células que já não necessitam mais de estímulos para produzir os embriões somáticos (JONG; SCHMIDT; VRIES, 1993). Células em transição do estado somático para o embriogênico são chamadas de células competentes, determinadas para a embriogênese, que devem conter um receptor inativo

que seria ativado pela presença de um ligante próprio para disparar o programa embriogênico (FEHÉR, PASTERNAK; DIDITS, 2003).

A indução da embriogênese somática é influenciada por diversos fatores, entre os quais podem se destacar os diferentes genótipos e tipos de explante, estádios de desenvolvimento dos explantes, composição do meio de cultura, tipo e concentração do regulador de crescimento utilizado (LITZ; CHAVEZ; MOON, 1998; CHALUPA, 1999; CARNEROS *et al.* 2009; PRAKASH; GURUMURTHI, 2009).

1.5.1.1 Genótipo e Explante

A capacidade de induzir embriões somáticos está sob controle genético, de forma que genótipos de uma determinada espécie podem diferir no seu potencial embriogênico (LAMB *et al.*, 2002; MAY; TRIGIANO, 1991; VAN DER VALK *et al.*, 1992; BERED *et al.*, 1996; SUN *et al.* 2003). Em geral, os explantes jovens oriundos de estruturas reprodutivas, como embriões imaturos, cotilédones, inflorescências e hipocótilos são os mais responsivos. No entanto, outros tecidos também podem ser utilizados como explantes na embriogênese com resultados satisfatórios, como ápices caulinares, folhas, pecíolos e raízes (PORTO *et al.*, 2010).

É importante ressaltar que o estágio de desenvolvimento e o estado fisiológico dos tecidos presentes nos explantes são aspectos importantes. Dentro de um determinado genótipo, a sensibilidade das células dos explantes aos fitoreguladores não é a mesma e, portanto, alguns explantes são competentes para a embriogênese e outros não (GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1999; JIMÉNEZ, 2005).

1.5.1.2 Meio de Cultura

O meio de cultura é uma solução nutritiva que suporta de forma adequada o crescimento do material vegetal. A constituição dos meios de cultura deve ser baseada nas exigências das plantas, visando atender necessidades específicas (GUERRA; NODARI, 2006). Portanto, a seleção e o desenvolvimento de um meio de cultura são essenciais para qualquer trabalho em cultura de tecidos de plantas.

A partir do meio mais utilizado em cultura de tecidos, o meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), Pierik e colaboradores (PIERIK, 1976; PIERIK; LEEUWEN; RIGTER, 1979) testaram várias modificações em sua composição para a propagação do antúrio para os diferentes estágios da micropropagação (P1: estabelecimento, P2: multiplicação e P3: alongamento e enraizamento), obtendo sucesso. Por esta razão, a metodologia proposta por Tombolato, Quirino e Costa (1998) para propagação *in vitro* das variedades lançadas pelo Instituto Agrônomo (IAC), emprega o meio Pierik (PIERIK, 1976). Trabalhos na literatura, como o de Pierik, Leeuwen e Rigter (1979), Schiavinato *et al.* (2008), Rivero-Bautista *et al.* (2008), Pinheiro *et al.* (2009), Pinheiro (2010), Carvalho *et al.* (2011), Carvalho *et al.* (2012) e Pinheiro *et al.* (2014), ratificam que o meio Pierik (PIERIK, 1976) é o mais indicado de uma forma geral para cultura de tecidos com antúrio, tanto pela via organogênica como embriogênica de morfogênese *in vitro*. Dentre os meios formulados por Pierik (1976), o meio P1 é aquele utilizado como base para a embriogênese somática do antúrio, também chamado de ESA para as etapas de indução dos calos embriogênicos e proliferação das culturas embriogênicas; ESB para a etapa de maturação dos embriões somáticos; e ESC para a etapa de germinação dos embriões somáticos (Tabela 1) (CARVALHO *et al.*, 2012).

Tabela 1 – Meios de cultura ESA (etapas 1: indução de calos embriogênicos e 2: proliferação das culturas embriogênicas), ESB (etapa 3: maturação dos embriões somáticos) e ESC (etapa 4: germinação dos embriões somáticos) utilizados na produção de mudas micropropagadas de antúrio, (*Anthurium andraeanum*) via embriogênese somática [PIERIK (1976), modificado]

Meio de cultura componente ⁽¹⁾	ESA	ESB	ESC
	mg L ⁻¹		
Nitrato de amônio (NH ₄ NO ₃)	825	825	825
Nitrato de potássio (KNO ₃)	950	950	950
Sulfato de magnésio hepta-hidratado (MgSO ₄ .7H ₂ O)	185	185	185
Fosfato monobásico de potássio (KH ₂ PO ₄)	85	85	85
Cloreto de cálcio tetra-hidratado (CaCl ₂ .4H ₂ O)	220	220	220
Sacarose	20.000	20.000	20.000
ANA	1,86	-	-
Cinetina	-	0,10	0,50
Ágar (Merck®)	6.500	-	6.500

⁽¹⁾ Este meio deve ser adicionado de microelementos, FeEDTA, mio-inositol e vitaminas do meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962).

Fonte: Carvalho e colaboradores, 2012.

1.5.1.3 Reguladores de Crescimento

A composição e concentração dos reguladores de crescimento no meio de cultivo são fatores determinantes no crescimento e no padrão de desenvolvimento da maioria dos sistemas de cultura de tecidos (FERREIRA; HU, 1998). Dessa forma, reguladores de crescimento de plantas são substâncias chave para a indução da embriogênese somática (QUIROZ-FIGUEROA *et al.*, 2006). De uma maneira geral a embriogênese somática é induzida por auxinas fortes, ou seja, mais estáveis à degradação. Reguladores vegetais desta natureza estimulam a divisão celular e desencadeiam os processos de desdiferenciação (modelos indiretos) e rediferenciação (modelos diretos), tornando as células comprometidas à formação de embriões (GEORGE, 1993; GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1999).

O ácido 2,4-diclorofenóxiacético (2,4-D) e o ácido naftalenoacético (ANA) são, nesta ordem, as auxinas mais utilizadas na indução de embriogênese somática (RAEMAKERS; JACOBSEN; VISSER, 1995), as quais são, nessa ordem de importância, comumente empregadas em trabalhos de indução à embriogênese somática do antúrio (KUEHNLE; CHEN; SUGII, 1992; HAMIDAH; KARIM; DEBERGH, 1997; JIE, 2006; XIN *et al.*, 2006; BAUTISTA *et al.*, 2008; BEYRAMIZADE; AZADI, 2008; PINHEIRO, 2010; PINHEIRO *et al.*, 2013a,b; PINHEIRO *et al.*, 2014; BHATTACHARYA *et al.*, 2016). Porém, outras auxinas também podem exercer papel satisfatório na indução de embriogênese somática, são elas: ácido indol-acético (AIA), ácido indol butírico (AIB), picloram e dicamba (SILVA, 2012). De acordo com Guerra e Noradi (2006) as concentrações das auxinas nos meios podem variar de 0,01 a 10 mg/L.

1.5.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

Durante a embriogênese somática indireta, normalmente ocorre a formação de diferentes tipos de calos, sendo que nem todos eles podem possuir potencial para gerar plantas. O acompanhamento citológico e ultraestrutural durante a embriogênese somática é uma importante ferramenta que permite distinguir células de calos com potencial embriogênico das células dos calos não embriogênicos e identificar possíveis

falhas durante a formação do embrião somático (FILIPPI; APPEZZATO-DA-GLORIA; RODRIGUEZ, 2001; MOURA *et al.*, 2008; STEINER *et al.*, 2005).

Em relação ao acompanhamento ultraestrutural da embriogênese somática, tem-se, entre outras técnicas, a microscopia eletrônica de varredura, a qual foi introduzida como ferramenta de pesquisa por volta de 1950 (ALVES, 2004). O microscópio eletrônico de varredura envolve certa complexidade de mecanismos para a aquisição da imagem, no entanto, o resultado final proporcionado consiste de imagens com alto poder de resolução, que se situa na ordem de 2 a 5 nm, e de fácil interpretação (ALVES; PERINA, 2012). Assim, devido à alta profundidade de campo, o microscópio eletrônico de varredura confere aspecto tridimensional às imagens (ALVES, 2004). Portanto, sua utilização é bastante adequada para avaliar a estrutura superficial de uma dada amostra (DIAS, 2013). Dessa forma, a técnica permite a identificação e o acompanhamento do desenvolvimento de calos embriogênicos (DIAS; PASQUAL; CARVALHO, 2013), a qual já vem sendo aplicada em trabalhos desenvolvidos com a embriogênese somática em antúrio (KUEHNLE; CHEN; SUGII, 1992; JIE, 2006; BHATTACHARYA *et al.*, 2016).

1.6 Técnicas Moleculares na Descrição de Cultivares

No que se refere à embriogênese, tanto a iniciação do processo por via zigótica, como somática, é ativada por diferentes sinais e frequentemente começam a partir de diferentes tecidos, e isto ainda não é totalmente entendido. No entanto, sabe-se que vários genes, relacionados com a diferenciação celular, morfogênese e transdução de sinal, são expressos durante a embriogênese. Assim, pesquisas na área de biologia molecular têm sido utilizadas para investigar este processo (IKEDA; UMEHARA; KAMADA, 2006).

Além do importante papel na embriogênese, a biologia molecular, por meio da utilização de marcadores moleculares, tem sido empregada para diversos fins na genética e melhoramento de plantas, os quais vêm sendo executados com sucesso em várias culturas (TOPPA; JADOSKI, 2013).

Os marcadores moleculares de DNA têm sido utilizados para marcação de genes de resistência a doenças, insetos e pragas; avaliação e caracterização de germoplasma; estudos de divergência genética em populações; identificação de

genitores com caracteres superiores; introgressão gênica e seleção assistida por marcadores; desenvolvimento de mapas genéticos de ligação; determinação de grupos heteróticos e associação com regiões genômicas que afetam heterose; reconstituição de *pedigrees*; testes de pureza genética; seleção de resistência a patógenos exóticos ainda inexistentes em determinada região; associação com caracteres quantitativos; estudos de interação genótipo-ambiente; processos legais; entre outros (RAFALSKI; TINGEY, 1993; PEREIRA; LEE, 1995; FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; MILACH, 1998a; 1998b).

1.6.1 Marcadores Genéticos

Marcadores genéticos, ou descritores genéticos, são quaisquer características, processos bioquímicos ou fragmentos de DNA que permitem a distinção de indivíduos geneticamente diferentes (BORÉM, 1997). Os marcadores genéticos utilizados em plantas podem ser morfológicos, bioquímicos ou moleculares (ALMEIDA *et al.*, 2009).

Os marcadores morfológicos são controlados por genes associados a caracteres morfológicos, em geral, características fenotípicas de fácil visualização, como nanismo, deficiência de clorofila, cor de pétala ou morfologia foliar (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). A descrição dos marcadores fenotípicos depende do desenvolvimento da planta e sua expressão gênica pode ser influenciada por ação gênica de dominância, pela pleiotropia e epistasia, além dos fatores ambientais (SMITH; SMITH, 1992; PECCHIONI *et al.*, 1996).

Os marcadores bioquímicos baseados em proteínas e enzimas surgiram na década de 1970. Eles foram os primeiros marcadores a serem utilizados com várias aplicações, como por exemplo no estudo de dispersão de espécies, na análise de filogenias, na acessibilidade à variabilidade genética existente, na detecção de ligação gênica com caracteres mono e poligênicos, na identificação de cultivares, na introgressão gênica, na avaliação de germoplasma, e de forma mais limitada, na seleção indireta de caracteres agronômicos (BORÉM, 1997).

Dez anos após os primeiros trabalhos com descritores de proteínas e enzimas, na década de 1980, surgiram os marcadores de DNA, com capacidade de detectar variação genética adicional. O avanço principal que essas técnicas trazem é a

possibilidade de acessar diretamente o genótipo de um indivíduo, evitando, assim, a expressão do fenótipo e a influência do ambiente sobre este. Também, enquanto os descritores bioquímicos amostram apenas as regiões ativas na expressão gênica, os de DNA permitem uma ampla amostragem do genoma de um indivíduo, sendo obtidos em grande número. Assim, mutações que ocorrem em regiões não codificadoras de genes podem ser identificadas com análise de DNA, mas não com a análise de proteínas e enzimas, bem como morfológica (MILACH, 1999).

1.6.2 Marcadores Moleculares

Os tipos de marcadores moleculares disponíveis diferenciam-se pela metodologia empregada para revelar variabilidade em nível de DNA, variando quanto à habilidade de detectar diferenças entre indivíduos, custo, facilidade de uso, consistência e repetibilidade. Assim, os principais tipos de marcadores moleculares podem ser classificados em dois grupos, conforme a metodologia utilizada para identificá-los: hibridização ou amplificação de DNA por PCR (Polymerase Chain Reaction) (MILACH, 1998b).

Os marcadores identificados por hibridização são os marcadores RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). Já aqueles marcadores baseados em amplificação por PCR são os do tipo RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), Microsatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeats*) e ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) (MILACH, 1998a; MARTINS; XAVIER; RUMJANEK, 2003). Alguns desses marcadores podem ter natureza co-dominante (RFLPs e SSR), ou seja, permitem a identificação de genótipos heterozigotos e homozigotos, gerando mais informação em nível genético, e podem ter natureza dominante (RAPD e ISSR), ou seja, não possibilitam distinguir genótipos heterozigotos dos homozigotos dominantes (CRUZ, 2008). Além de diferirem na dominância, cada marcador tem suas características peculiares e estas devem ser levadas em consideração na escolha do qual utilizar em uma análise (PRECZENHAK, 2013).

1.6.2.1 Marcadores ISSR

Os ISSR são marcadores baseados em microssatélites, no entanto não necessitam de conhecimento prévio da sequência do genoma, mostrando-se ótimas ferramentas a serem empregadas em estudos iniciais de espécies. Um único *primer* composto por uma sequência do microssatélite usualmente de 16 a 25 pares de bases de comprimento é utilizado para amplificar principalmente as sequências inter-SSR de diferentes tamanhos. Estes *primers* podem estar desancorados ou usualmente ancorados na extremidade 5' ou 3' por 1 a 4 bases de purina ou pirimidina. Os alelos polimórficos ocorrem sempre que em um genoma esteja faltando a sequência repetida ou exibem uma deleção ou inserção que modifica a distância entre as repetições. Para os *primers* ancorados na posição 5', há maiores chances de polimorfismos, pois estes ocorrem também devido às diferenças no comprimento do microssatélite. As sequências de repetições e de nucleotídeos ancorados são selecionadas aleatoriamente. Embora ISSR sejam iniciadores dominantes, possuem a vantagem de analisar *loci* múltiplos em uma única reação (ZIETKIEWICZ; RAFALKI; LABUDA, 1994; GOULÃO; OLIVEIRA, 2001; LIU; WENDEL, 2001; PATZAK, 2001; REDDY; SARLA; SIDDIQ, 2002; SOUZA *et al.*, 2005).

A PCR é utilizada para amplificar regiões entre microssatélites idênticos orientados em direções opostas, ou seja, inversamente orientados. Os iniciadores são construídos a partir das próprias sequências simples repetidas (SSR) proporcionando amplo arranjo de possíveis produtos amplificáveis (WOLFE; LISTON, 1998; SOUFRAMANIEN; GOPALAKRISHNA, 2004). Essa metodologia é considerada simples, rápida e eficiente. Os produtos amplificáveis são geralmente de 200 a 2000 pares de base de comprimento e apresentam alta reprodutibilidade possivelmente devido ao uso de iniciadores longos na qual permite um subsequente uso de alta temperatura de anelamento (BORNET; BRANCHARD, 2001; REDDY; SARLA; REDDY, 2002). O método fornece resultados altamente reprodutíveis e gera abundante polimorfismo em muitos sistemas. A maioria dos trabalhos tem usado eletroforese no gel de agarose com coloração por brometo de etídeo ou eletroforese no gel de poliacrilamida e coloração com nitrato de prata (BLAIR *et al.*, 1999; LIU; WENDEL, 2001).

Dessa forma, ISSRs têm provado serem úteis em estudos genéticos, especialmente em detecção clonal e diversidade para várias culturas (SALIMATH *et al.*,

1995; OLIVEIRA; RICHTER; BENNETZEN, 1996), incluindo-se o antúrio, espécie em que os ISSR podem ser promissores no acesso da diversidade genética e caracterização molecular (JAU-YUEH; KENG-CHANG; MING-JEN, 2001; GANTAIT; SINNIHAH, 2011; BULDEWO; PILLAY; JAUFEEERALLY-FAKIM, 2012; KANG *et al.*, 2013; SOUZA NETO *et al.*, 2014; VENKAT *et al.*, 2014).

1.6.3 Caracterização e Proteção de Cultivares

A Lei de Proteção de Cultivares de nº 9.456, sancionada em 25 de abril de 1997, é clara e pontual a respeito dos requisitos necessários para que uma cultivar possa ser protegida. A cultivar deve ser comprovadamente distinta, homogênea e estável. Por distinta, a Lei define “a cultivar que se distingue claramente de qualquer outra cuja a existência na data do pedido de proteção seja reconhecida”. A característica de distinguibilidade deve ser comprovada para que possa ser efetuado o pedido de proteção (MILACH, 1999).

Há um número quase ilimitado de descritores de DNA disponíveis e esses possibilitam o amplo acesso da variabilidade genética em diversas espécies vegetais, com potencial de distinção de genótipos morfológicamente similares e geneticamente aparentados. Nesse sentido, a caracterização molecular de uma cultivar é um passo muito importante no processo de proteção legal dos materiais desenvolvidos pelo melhorista, pela descrição detalhada desses materiais, pois o uso de descritores confiáveis e de natureza genética é indispensável nesse caso (MILACH, 1999).

Um sistema com base em marcadores de DNA permite a identificação de um padrão único de combinação alélica, como uma impressão digital (*fingerprinting*) para cada cultivar (GUIMARÃES *et al.*, 2009), a qual tem sido utilizada para mapeamento de ligação do genoma, teste de identidade de cultivares, determinação da relação de parentesco e da variação genética, análise de populações e de *pedigree*, localização de loco para doenças e epidemiologia (LANDEGREN *et al.*, 1980). Dessa forma, a caracterização de variedades, linhagens ou híbridos por meio de marcadores de DNA tem sido de grande importância na proteção do direito intelectual do melhorista, sendo utilizada como prova legal em processos jurídicos que envolvem disputas de direito autoral (SMITH, 1989; LANZA; GUIMARÃES; SCHUSTER, 2000).

Novas variedades de antúrio têm sido continuamente introduzidas em cultivo e a identificação destas através de caracteres morfológicos se torna dificultada (BULDEWO; PILLAY; JAUFEEERALLY-FAKIM, 2012), já que cultivares diferentes apresentam descritores morfológicos semelhantes. Dessa forma, há a necessidade de que a caracterização morfológica seja complementada por outro recurso para que ocorra de forma mais precisa, como os marcadores moleculares. Portanto, estes são bastante empregados em trabalhos conduzidos com diversas culturas, inclusive ornamentais, como os antúrios (JAU-YUEH; KENG-CHANG; MING-JEN, 2001; RANAMUKHAARACHCHI; HUNNY; GUY, 2001; NOWBUTH *et al.*, 2005; PUCHOOA, 2005; ANDRADE *et al.*, 2009; KHAN; PANKAJAKSAN, 2010; GANTAIT; SINNIHAH, 2011; SOUZA NETO *et al.*, 2011; GE *et al.*, 2012; YU *et al.*, 2012; WANG; CHUANG, 2013; WANG *et al.*, 2013; SOUZA NETO, 2014; BHATTACHARYA *et al.*, 2016), sendo que a utilização destes na caracterização dos genótipos é umas das técnicas que podem contribuir efetivamente para o sucesso do cultivo da cultura (CASTRO *et al.*, 2004).

2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, C. M. A.; LIMA, S. E. N.; LIMA, G. S. A.; BRITO, J. Z.; DONATO, V. M. T. S.; SILVA, M. V. Caracterização molecular de cultivares de cana-de-açúcar utilizando marcadores ISSR. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, Edição Especial, p. 1771 -1776, 2009.
- ALONSO, A. M.; SILVA, J. C. S. Floricultura no Distrito Federal: perspectivas para o fortalecimento da cadeia produtiva de flores. **Jornal Dia de Campo/ Artigos Especiais**. 2016. Disponível em: <
<http://www.diadecampo.com.br/zpublisher/materias/Materia.asp?id=20718&secao=Artigos%20Especiais>>. Acesso em: junho de 2016.
- ALVES, E. **Introdução à microscopia eletrônica**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2004. 88 p.
- ALVES, E.; PERINA, F. J. Apostila do curso introdutório à microscopia eletrônica de varredura e microanálise de raios x. Lavras: UFLA/FAEPE, 2012. 63 p.
- ALVES, C.; OLIVEIRA, J. R.; REIS, E. S.; CORRÊA, R. M.; SOUZA, J.; SILVA, J. C. O.; PAULA, J. C. R.; RODRIGUES, L. H. F.; SOUZA, M. A.; MENDONÇA, M. R. A Cultura de tecidos na agricultura. *In: I Jornada Científica e VI FIPA do CEFET*, 2008, Bambuí (MG). **Anais...** Bambuí: CEFET, 2008. 4 p.
- ANDRADE, W. F. **Atuação de “pulse” na organogênese de Eucalyptus grandis cultivado in vitro**. 2005. 55 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) - Escola superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba (SP), 2005.
- ANDRADE, I. M.; MAYO, S. J.; VAN DEN BERG, C.; FAY, M. F.; CHESTER, M.; LEXER, C.; KIRKUP, D. Genetic variation in natural populations of *Anthurium sinuatum* and *A. pentaphyllum* var. *pentaphyllum* (Araceae) from north-east Brazil using AFLP molecular markers. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 159, p. 88-105, 2009.
- ANEFALOS, L. C.; TOMBOLATO, A. F. C.; RICORDI, A. Panorama atual e perspectivas futuras da cadeia produtiva de flores tropicais: o caso do antúrio. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 16, n. 1, p. 107-111, 2010.
- BAUTISTA, N. R.; PEÑALVER, D. A.; RODRÍGUEZ, R. B.; CHIU, W. C.; LÓPEZ, R. C.; TERRY, F. J.; PERALTA, M. P.; MARTÍNEZ, O. G. Embriogênese somática em (*Anthurium andraeanum* Lind.) variedad ‘Lambada’. **Ra Ximhai**, México, v. 4, n. 1, p. 135-149, 2008.
- BEJOY, M.; SUMITHA, V. R.; ANISH, N. P. Foliar regeneration in *Anthurium andraeanum* Hort. cv. Agnihothi. **Biotechnology**, Pakistan, v. 7, n.1, p. 134-138, 2008.
- BERED, F.; SERENO, M. J. C. M.; CARVALHO, F. I. F.; FEDERIZZI, L. C.; DORNELLES, A. L. C.; LANGE, C. E.; HANDEL, C. L. Avaliação da embriogênese somática em cultivares de aveia (*Avena sativa* L.). **Ciência Rural**, v. 26, n. 3, p. 371-375, 1996.

- BEYRAMIZADE, E.; AZADI, P.; MII, M. Optimization of factors affecting organogenesis and somatic embryogenesis of *Anthurium andreanum* Lind ‘Tera’. Propag Ornament Plant, v. 8, p. 198–203, 2008.
- BHATTACHARYA, C.; DAM, A.; KARMAKAR, J.; BANDYOPADHYAY, T. K. Direct somatic embryogenesis and genetic homogeneity assessment of regenerated plants of *Anthurium andraeanum* Linden cv. Fantasia. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, p. 1-8, 2016.
- BLAIR, M. W.; PANAUD, O.; MCCOUCH, S. R. Inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 98, p. 780-792, 1999.
- BORÉM, A. Melhoramento de plantas. Viçosa : UFV, 1997. 547p.
- BORNET, B; BRANCHARD, M. Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat ISSR Markers; reproducible and specific tools for genome fingerprinting. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 19, p. 209-215, 2001.
- BRAINER, M. S. C. P.; OLIVEIRA, A. A. P. Perfil da floricultura no Nordeste brasileiro. In: XLIV Congresso da SOBER (Sociedade Brasileira de Economia , Administração e Sociologia Rural). Questões Agrárias, Educação no Campo e Desenvolvimento. Fortaleza (CE). **Anais...** Fortaleza: 2006. 20 p.
- BULDEWO, S.; PILLAY, M.; JAUFEEALLY-FAKIM, Y. Genetic diversity in *Anthurium andraeanum* cultivars in Mauritius. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 103, p. 16737-16744, 2012.
- CARNEROS, E.; CELESTINO, C.; KLIMASZEWSKA, K.; PARK, Y. S.; TORIBIO, M.; BONGA, J. M. Plant regeneration in Stone pine (*Pinus pinea* L.) by somatic embryogenesis. **Plant Cell Tiss Organ Cult.**, v. 98, p. 167-178, 2009.
- CARVALHO, A. C. P. P.; PINHEIRO, M. V. M.; DIAS, G.M. G.; BARROS, L.M. Estiolamento *In Vitro*: Uma Alternativa para a Produção de Mudanças Micropropagadas de Antúrio. **Embrapa Agroindústria Tropical /Circular Técnica**, **36**. Fortaleza, CE: Embrapa Agroindústria Tropical, 2011. 8 p.
- CARVALHO, A. C. P. P.; PINHEIRO, M. V. M.; MARTINS, F. B.; CRUZ, A. C. F.; OTONI, W. C. Produção de Mudanças Micropropagadas de Antúrio (*Anthurium andraeanum*) cv. Eidibel por Embriogênese Somática. **Embrapa Agroindústria Tropical/ Circular Técnica**, **41**. Fortaleza, CE: Embrapa Agroindústria tropical, 2012. 14 p.
- CARVALHO, A. C. P. P.; PINHEIRO, M. V. M.; MARTINS, F. B.; CRUZ, A. C. F.; OTONI, W. C.; TOMBOLATO, A. F. C; CASTRO, A. C. R. Micropropagação do Antúrio. In: JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. S. **Aspectos práticos da micropropagação de plantas**, Brasília (DF), p. 227-257, 2013.

- CASTRO, A.C.; RESENDE, L.V.; GUIMARÃES, W.N.R.; LOGES, V. Uso de técnicas moleculares em estudo de diversidade genética em antúrio. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 10, n. 1/2, p. 6-9, 2004.
- CASTRO, A. C. R.; TOMBOLATO, A. F. C. Aspectos botânicos. *In*: CASTRO, A. C. R.; TERAPO, D.; CARVALHO, A. C. P. P. e LOGES, V. **Antúrio**. Brasília (DF), p. 15-18, 2012.
- CHALUPA, V. Somatic embryogenesis in linden (*Tilia* spp.). *In*: JAIN, S.M.; GUPTA, P.K.; NEWTON, R.J (ed) **Somatic embryogenesis in woody plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, v. 5, p. 31-43, 1999.
- CHRISTIANSON, M.L.; WARNICK, D. A. Competence and determination in the process of in vitro shoot organogenesis. **Development Biology**, v. 35, p. 288-293, 1983.
- CRUZ, C. D. **Programa Genes: Diversidade Genética**. Editora UFV. Viçosa (MG). 278 p. 2008.
- DIAS, M. M.; PASQUAL, M.; ARAÚJO, A. G.; SANTOS, V. A.; OLIVEIRA, A. C.; RODRIGUES, V. A. Concentrações de reguladores vegetais no estiolamento *in vitro* de ananás do campo. **Revista Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 2, p. 513-520, 2011.
- DIAS, G. G.; PASQUAL, M.; CARVALHO, A. C. P. P. Indução de calos embriogênicos em bastão do imperador *in vitro*. **Scientia Agraria Paranaensis**, Mal. Cdo. Rondon, v. 12, n. 4, p. 293-300, 2013.
- DIAS, G. M. G. **Caracterização morfológica e citométrica de genótipos e resposta de silício no cultivo *in vitro* de antúrio**. 2013. 117 p. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras (MG), 2013.
- FEHÉR, A.; PASTERNAK, T. P.; DUDITS, D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 74, p. 201-228. 2003.
- FERREIRA, M.E.; GRATAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3 Ed. **Embrapa-CENARGEN: Documentos**, 20. Brasília (DF), 1998. 220 p.
- FERREIRA, A. G.; HU, C. Y. Cultura de embriões. *In*: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI; EMBRAPA-CNPH, v. 1, p. 371-393, 1998.
- FILIPPI, S. B.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; RODRIGUEZ, A. P. M. Variações morfológicas de embriões somáticos obtidos a partir de inflorescências de bananeira. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 58, n. 4, p. 711-716, 2001.
- FRANÇA, C. A. M.; MAIA, M. B. R. Panorama do agronegócio de flores e plantas ornamentais no Brasil. *In*: XLVI Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural (SOBER), 2008, Porto Velho (RO). **Anais...** Porto Velho: 2008. 10 p.

- FUZITANI, E. J.; NOMURA, E. S. Produção de mudas *in vitro*. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 10, n. 1/2, p. 14-17, 2004.
- GANTAIT, S.; MANDAL, N. Tissue culture of *Anthurium andreanum*: a significant review and future prospective. **International Journal of Botany**, Pakistan, v. 6, n. 3, p. 207-219, 2010.
- GANTAIT, S.; SINNIH, U. R. Morphology, flow cytometry and molecular assessment of *ex-vitro* grown micropropagated anthurium in comparison with seed germinated plants. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 64, p. 13991-13998, 2011.
- GE, Y.; ZHANG, F.; SHEN, X.; YU, Y.; PAN, X.; LIU, X.; LIU, J.; PAN, G.; TIAN, D. Genetic variations within a collection of anthuriums unraveled by morphological traits and AFLP markers. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 45, p. 34-40, 2012.
- GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture: The technology**. Exegetics Limited, England, 1 ed., v. 1, p. 285-455, 1993.
- GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, J. D. **Plant propagation by tissue culture**, Volume 1. The 9-Background, Springer, 2008.
- GOULÃO, L.; OLIVEIRA, C. M. Molecular characterization of cultivars of apple (*Malus x domestica* Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers. **Euphytica**, v. 122, p. 81-89, 2001.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A.; Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética em plantas**. Brasília: Embrapa - SPI, v. 1, p. 183-260, 1998.
- GUERRA, P. G.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, I. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI; EMBRAPA-CNPq, v. 2, p. 533-568, 1999.
- GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. **Material Didático de Biotecnologia**. Florianópolis: Edição da Steinmayer, 41 p, 2006.
- GUIMARÃES, J. A.; CASTRO, A. C. R.; MESQUITA, A. L. M.; BRAGA SOBRINHO, R.; AZEVEDO, F. R. **Manual de Reconhecimento e Controle das Principais Pragas do Antúrio no Estado do Ceará**. Fortaleza : Embrapa Agroindústria Tropical, 2008. 21 p.
- GUIMARÃES, C. T.; MAGALHÃES, J. V.; LANZA, M. A.; SCHUSTER, I. Marcadores e suas aplicações no melhoramento genético de plantas. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 30, n. 253, 2009.
- HAMIDAH, M.; KARIN, A. G. A.; DEBERGH, P. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Anthurium scherzerianum*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 48, n. 3, p. 189-193, 1997.

HOU, S.W.; JIA, J.F. High frequency plant regeneration from *Astragalus melilotoides* hypocoty and stem explants via somatic embryogenesis and organogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 79, p. 95-100, 2004.

IKEDA, M.; UMEHARA, M.; KAMADA, H. Embryogenesis-related genes: its expression and roles during somatic and zygotic embryogenesis in carrot and Arabidopsis. **Plant Biotechnology**, New York, v. 23, n. 10, p. 153-161, 2006.

JAU-YUEH, W.; KENG-CHANG, C.; MING-JEN, F. A comparative analysis of genetic similarity among *Anthurium andraeanum* cultivars by using ISSR and RAPD marker. **Journal of Agricultural Research**, China, v. 48, n. 4, p. 52-63, 2001.

JIE, X. W. **Somatic embryogenesis and physiological and biochemical characteristics of *Anthurium***, 2006. Dissertation (Master's thesis in Ornamental Plants and Horticulture) – Nanjing Agricultural University (NAU). China, 2006.

JIMÉNEZ, V. M. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. **Plant Growth Regulation**, v. 47, p. 91-110, 2005.

JONG, A. J.; SCHMIDT, E. D. L.; VRIES, S. C. Early events in higher-plant embryogenesis. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 22, n. 2, p. 367-377, 1993.

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

JUNQUEIRA, A. H. e PEETZ, M. S. A floricultura brasileira no contexto da crise econômica e financeira mundial. **Agriannual**. FNP-INformaEconomics, São Paulo, v.1, p.324-333, 2009.

JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, M. S. Balanço do comércio exterior da floricultura brasileira. **Hórtica consultoria e treinamento**, 2011.

JURGENS, G.; MAYER, U. *Arabidopsis*. In: BARD, J. (Ed.). **Embryos: a colour atlas of developing embryos**. London: Wolfe, p. 32-37, 1992.

KANG, L.; WANG, Y.; ZHANG, C.; DUAN, J. ;CAO, D. Botanical characters and molecular identification of hybrids from three *Anthurium* varieties. **Acta Agriculturae Boreali - Occidentalis Sinica**, 2013.

KHAN, Y. J.; PANKAJAKSAN, M. Genetic diversity among commercial varieties of *Anthurium andraeanum* Linden using RAPD markers. **Journal of Plant Genetics and Transgenics**, v. 1, p. 11-15, 2010.

KUEHNLE, A. R.; CHEN, F. C.; SUGII, N. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Anthurium andraeanum* hybrids. **Plant Cell Reports**, New York, v. 11, n. 9, p. 438-442, 1992.

LAMB, C.R.C.; MILACH, S.C.K.; PASQUALI, G.; BARRO, R.S. Embriogênese somática e regeneração de plantas a partir de embrião maduro de aveia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 2, p. 123-130, 2002.

- LANDEGREN, U.; KAISER, R.; CASKEY, C.T.; HOOD, L. DNA diagnostics. Molecular techniques and automation. **Science**, v. 242, p. 229-237, 1980.
- LANZA, M. A.; GUIMARÃES, C. T.; SCHUSTER, I. Aplicação de Marcadores Moleculares no Melhoramento Genético. **Informe Agropecuário EPAMIG**, v. 21, n. 204, p. 97-108, 2000.
- LIMA JÚNIOR, J. C.; NAKATANI, J. K.; MONACO NETO, L. C.; KALAKI, R. B.; CAMARGO, R. B. **Mapeamento e quantificação da cadeia de flores e plantas ornamentais do Brasil**. São Paulo: OCESP, 2015.
- LIU, B.; WENDEL, J. F. Intersimple sequence repeat (ISSR) polymorphisms as a genetic marker system in cotton. **Molecular Ecology Notes**, v. 1, p. 205-208, 2001.
- LITZ, R. E.; CHAVEZ, V. C.; MOON, P. A. Induction of embryogenic cultures from mature-phase tropical and subtropical trees and control of somatic embryo maturation and germination. *In*: MANTELL, S.H.; BRUNS, S.; TRAGARDH, C.; VIANA, A.M. (Ed.). **Recent advances in biotechnology for conservation and management.**, Stockholm: International Foundation for Science, p. 232-243, 1998.
- MAIRA, O.; ALEXANDER, M.; VARGAS, T.E. Micropropagation and organogenesis of *Anthurium andreaum* Lind cv Rubrun. *In*: JAIN, S.M.; OCHATT, S.J. (Ed.). **Protocols for in vitro propagation of ornamental plants, methods in molecular biology**. Totowa, New Jersey: Humana Press Edition, p.3-14, 2010.
- MARTINS, C.M.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G. Utilização de RAPD como marcador molecular em plantas. Embrapa Agrobiologia. **Documentos**, 166. 39 p. Seropédica, 2003.
- MAY, R. A.; TRIGIANO, R. N. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaves of *Dendranthema grandiflora*. **Jounal American Society Horticulturæ Science**, v. 116, n. 2, p. 366-371, 1991.
- MILACH, S.C.K. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: Editora UFRGS. 1998a. 141 p.
- MILACH, S.C.K. Marcadores de DNA. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 5, p.14-17, 1998b.
- MILACH, S.C.K. Uso de marcadores moleculares na caracterização de cultivares. *In*: QUEIROZ, M. A.; GOEDERT, C. O.; RAMOS, S. R. R. (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste brasileiro**. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999.
- MOURA, E.F.; VENTRELLA, M.C.; MOTOIKE, S.Y.; SÁ JÚNIOR, A.Q.; CARVALHO, M.; MANFIO, C.E. Histological study of somatic embryogenesis induction on zygotic embryos of macaw palm (*Acrocomia aculeate* (Jacq.) Lodd. ex Martius). **Plant Cell Tissue Organ Culture**, Lavras, v. 95, p. 175-184, 2008.

- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v. 25, n. 3, p. 473-497, 1962.
- NOWBUTH, P.; KHITTOO, G.; BAHORUN, T.; VENKATASAMY, S. Assessing genetic diversity of some *Anthurium andraeanum* Hort. cut-flower cultivars using RAPD Markers. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, p. 1189–1194, 2005.
- OLIVEIRA, A.C.; RICHTER, T.; BENNETZEN, J.L. Regional and racial specificities in sorghum germplasm assessed with DNA markers. **Genome**, v. 39, p. 579-58, 1996.
- PARAMAGEETHAM, C.; BABU, G. P.; RAO, J.V.S. Somatic embryogenesis in *Centella asiatica* L. an important medicinal and nutraceutical plant of India. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 79, p. 19-24, 2004.
- PARK, S. Y.; AHN, J.K.; LEE, W.Y.; MURTHY, H.N.; PAEK, K.Y. Mass production of *Eleutherococcus koreanum* plantlets via somatic embryogenesis from root cultures and accumulation of eleutherosides in regenerants. **Plant Science**, v. 168, n. 5, p. 1221-1225, 2005.
- PARROT, W. A.; MERKLE, S. A.; WILLIAMS, E.G. Somatic embryogenesis: potential for use in propagation and gene transfer systems. *In*: MURRAY, D.R. **Advanced methods in plant breeding and biotechnology**. Melkham: Redwood, p.158-200, 1991.
- PATZAK, J. Comparison of RAPD, STS, ISSR and AFLP molecular methods used for assessment of genetic diversity in hop (*Humulus lupulus* L.). **Euphytica**, Wageningen, v. 121, p. 9-18, 2001.
- PECCHIONI, N.; FACCIOLI, P.; MONETTI, A.; STANCA, A.M., TERZI, V. Molecular markers for genotype identification in small grain cereals. **Journal of Plant Breeding and Genetics**, v. 50, p. 203-219, 1996.
- PEREIRA, M.G.; LEE, M. Identification of genomic regions affecting plant height in sorghum and maize. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 90, p. 380-388, 1995.
- PEREIRA, A. R.; CARVALHO, S. P.; PASQUAL, M.; SANTOS, F. C. Embriogênese somática direta em explantes foliares de *Coffea arabica* L. cv. Acaiá Cerrado: efeito de citocinina e ácido giberélico. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 332-336, 2007.
- PIERIK, R. L. M. *Anthurium andraeanum* Lindl. plantlets produced from callus tissuescultivated in vitro. *Physiologia Plantarum*, Oxford, v. 37, p. 80-82, 1976.
- PIERIK, R. L. M.; LEEUWEN, P. V.; RIGTER, G. C. M. Regeneration of leaf explants of *Anthurium andraeanum* Lindl. *in vitro*. **Netherlands Journal of Agricultural Science**, v. 27, p. 221-226, 1979.

PINHEIRO, M. V. M.; DIAS, G. M. G.; CARVALHO, A. C. P. P. e BARROS, L. de 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.

PINHEIRO, M. V. M. **Propagação in vitro de antúrio (*Anthurium andraeanum* cv. Eidibel) via embriogênese somática**. 2010. 67 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Departamento de Biologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa (MG), 2010.

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

PINHEIRO, M. V. M.; MARTINS, F.B. ; REGO, E. R.; CARVALHO, A. C. P. P.; OLIVEIRA, E. J.; OTONI, W.C. Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration of *Anthurium andraeanum* cv. 'Eidibel'. **Acta Horticulturae**. 2013a.

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

PINHEIRO, M. V. M.; MARTINS, F. B.; CRUZ, A. C. F.; CARVALHO, A. C. P. P.; OLIVEIRA, E. J.; OTONI, W. C. Somatic embryogenesis in anthurium (*Anthurium andraeanum* cv. Eidibel) as affected by different explants. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 36, n. 1, p. 87-98, 2014.

PRAKASH, M. G.; GURUMURTHI, K. Effects of type of explants and age, plant growth regulators and medium strength on somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus camaldulensis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 2009.

PORTO, J. M. P.; PAIVA, P. D. O.; PAIVA, R.; CARVALHO, M. A. F.; SOUZA, A. C.; SILVA, L. C. Análise citoquímica de calos embriogênicos de ipê-branco. *In: XIX CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFLA. Anais...* 2010.

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

PRECZENHAK, A. P. **Diversidade genética estimada por meio de marcadores moleculares e morfoagronômicos em acessos de mini-tomate**. 2013. 67 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava (PR), 2013.

QUIRINO, Z. B. R.; BARBOZA, S. B. S. C.; VIÉGAS, P. R. A.; LEDO, A. S. Multiplicação *in vitro* do Abacaxizeiro Ornamental var. *Ananas comosus erectifolius*, em meio líquido e gelificado. **Boletim de pesquisa e desenvolvimento**, 40, Aracajú (SE), 2009.

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

RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. Genetic diagnostics in plant breeding: RAPDs, microsatellites, and machines. **Trends in Genetics**, v. 9, p. 275-280, 1993.

RANAMUKHAARACHCHI, D. G.; HENNY, R. J.; GUY, C. L. DNA fingerprinting to identify nine anthurium pot plant cultivars and examine their genetic relationships. **Horticultural Science**, v. 36, p. 758 -760, 2001.

RAO, S.; RAVISHANKAR, G. A. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 20, p. 101-153, 2002.

REDDY, M.P.; SARLA, N.; REDDY, E. A. Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) polymorphism and application plant breeding. **Euphytica**, n. 128, p. 9-17, 2002.

RIVERO-BAUTISTA, N.; AGRAMONTE-PEÑALVER, D.; BARBÓN-RODRÍGUEZ, R., CAMACHO-CHIU, W.; COLLADO-LÓPEZ, R.; JIMÉNEZ-TERRY, F.; PÉREZ-PERALTA, M.; GUTIÉRREZ-MARTÍNEZ, O. Embriogénesis somática en (*Anthurium andraeanum* lind.) variedad ‘Lambada’. **Ra Ximhai**, v. 4, n. 1, p. 135-149, 2008.

SALIMATH, S.S.; OLIVEIRA A.C.; GODWIN, I.D.; BENNETZEN, J.L. Assessment of genome origins and genetic diversity in the genus *Eleusine* with DNA markers. **Genome**, v. 38, p. 757-763, 1995.

SANTOS, A. P. B. A Beleza, a popularidade, a toxicidade e a importância econômica de espécies de Aráceas. **Revista Virtual de Química**, v. 3, n. 3, 2009.

SCHIAVINATO, Y. O.; LUCON, T. N.; TOMBOLATO, A. F. C.; BARBOSA, W.; VEIGA, R. F. A. Micropropagação de *Anthurium plowmannii* Croat. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v. 4, n. 1, p. 15-20, 2008.

SEBRAE. Flores e plantas ornamentais no Brasil. **Estudos mercadológicos**, v.1, 2015.

SILVA, K. J. D.; SOUZA, V. A. B.; GOMES, R. L. F. Efeito da altura de mudas na adaptação pós-cultivo *in vitro* de abacaxizeiro ornamental. **Revista Ceres**, v. 55, n. 6, p. 551-555, 2008.

SILVA, D. P. C. **Embriogênese somática e potencial uso de marcadores moleculares embriogênicos em *Byrsonima intermedia* A. Juss. (murici-pequeno)**. 2012. 125 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras (MG), 2012.

SMITH, J.S.C. The characterization and assessment of genetic diversity among maize (*Zea mays* L.) hybrids that are widely grown in France: chromatographic data and isozymic data. **Euphytica**, v. 43, p. 73-85, 1989.

SMITH, J.S.C.; SMITTH, O.S. Fingerprinting crop varieties. **Advances in Agronomy**, v. 47, p. 85-140, 1992.

SMITH, R. H. Callus induction, *In*: SMITH, R. **Plant Tissue Culture**. Techniques and experiments. 2 ed. California: Academic press, p. 83-105, 2000.

SOUFRAMANIEN, J. GOPALAKRISHNA, T. A. comparative analysis of genetic diversity in blackgram genotypes using RAPD and ISSR markers. **Theoretical Applied Genetics**, v. 109, n. 8, 1687-1693, 2004.

SOUZA, V. Q.; PEREIRA, A. S.; KOPP, M. M.; COIMBRA, J. L. M.; CARVALHO, F. I. F.; LUZ, V. K.; OLIVEIRA, A. C. Dissimilaridade genética em mutantes de aveia tolerantes e sensíveis a ácidos orgânicos. **Bragantia**, Campinas, v. 64, n. 4, p. 569-575, 2005.

SOUZA NETO, J. D.; DIAS, M. A.; CABRAL, P. D. S.; ALVES, D. S.; SOUZA, F. B.; SOARES, T. C. B. Caracterização molecular (fingerprinting) de genótipos de antúrio. *In*: XIV Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e X Encontro Latino Americano de Pós-Graduação. **Anais...** Universidade do Vale do Paraíba. 2011.

SOUZA NETO, J. D.; SOARES, T. C. B.; MOTTA, L. B.; CABRAL, P. D. S.; SILVA, J. A. Molecular characterization of *Anthurium* genotypes by using DNA fingerprinting and SPAR markers. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 3, p. 4766-4775, 2014.

SUN, Y.; ZANG, X.; JIN, S.; LING, S.; NIE, Y. Somatic embryogenesis and plant regeneration in wild cotton (*Gossypium klotzschianum*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 75, p. 247-253, 2003.

STEINER, N.; VIEIRA, F. N.; SARA, M. S.; GUERRA, M. P. Effect of carbon source on morphology and histodifferentiation of *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 48, n. 6, p. 895-903, 2005.

TABARES, E.; PACHÓN, I.; ROCA, W.M. Variación somaclonal y su aplicación al mejoramiento de cultivos. *In*: ROCA, W.M.; MROGINSKI, L.A. (Eds.) **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones**, p. 339-360. Cali: CIAT, 1991.

TAUTORUS, T. E.; FOWKE, L. C.; DUNSTAN, D. I. Somatic embryogenesis in conifers. **Canadian Journal of Botany**, v. 69, p. 1873-1899, 1991.

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

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

TOMBOLATO, A. F. C.; FURLANI, P. R.; CASTRO, C. E. F.; MATHES, L. A. F.; TAGLIACOZZO, G. M. D.; SAES, L. A.; RIVAS, E. B.; COUTINHO, L. N.; BERGAMANN, E. C.; LEME, J. M. Antúrio: *Anthurium andraeanum* Lindl. In: TOMBOLATO, A. F. C.; FURLANI, P. R.; CASTRO, C. E. F. de; MATHES, L. A. F.; TAGLIACOZZO, G. M. D.; SAES, L. A.; RIVAS, E. B.; COUTINHO, L. C.; BERGMAN, E. C.; IMENES, D. L.; COSTA, A. M.; LEME, J. M. C. (Ed.). **Cultivo comercial de plantas ornamentais**. Campinas: Instituto Agrônomo de Campinas, p. 61-94, 2004a.

TOMBOLATO, A.F.C.; UZZO, R.P.; CASTRO, A.C.R.; SAKAI, 2809 M.; SAES, L.A. Recursos genéticos e melhoramento do antúrio (*Anthurium andraeanum* Linden) no IAC–APTA. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 10, p. 1-5, 2004b.

TOMBOLATO, A. F. C.; CASTRO, A. C. R. Araceae. In: TERAQ, D.; CARVALHO, A. C. P. P.; BARROSO, T. C. S. F. **Flores tropicais: tropical flowers**. Brasília (DF): Embrapa Informação Tecnológica; Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, p. 42-57, 2005.

TOPPA, E. V.; JADOSKI, C. J.; O uso de marcadores moleculares no melhoramento genético de plantas. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 12, n.1, p. 1-5, 2013.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Ed.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP; EMBRAPA-CNPq, 1990. 433 p.

VAN DER VALK, P.; SCHOELTEN, O.; VERTASPEN, F.; JANSEN, R.; DONS, J. High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration from zygotic-derived callus cultures of three *Allium* species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 39, p. 181-191, 1992.

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

VASIL, V.; VASIL, I. K.; LU, C. Somatic embryogenesis in long-term callus culture in *Zea mays* L. (Gramineae). **American Journal of Botany**, Baltimore, v. 71, p. 158-161, 1984.

VENKAT, S. K.; BOMMISSETTY, P.; PATIL, M. S.; REDDY, L.; CHENNAREDDY, A. The genetic linkage maps of *Anthurium* species based on RAPD, ISSR and SRAP markers. **Scientia Horticulturae**, v. 178, p. 132–137, 2014.

WANG, C.; NIU, J.; ZHAN, G.; PAN, H.; REN, Y. Analysis of genetic relationships of *Anthurium andraeanum* varieties using SRAP markers. **Journal of Plant Genetics and Transgenics**, v. 14, n. 4, p. 759–763, 2013.

WANG, J. -Y.; CHUANG, K. -C. Development of novel microsatellite markers for effective applications in *Anthurium* cultivar identification. **Euphytica**, v. 189, p. 421–431, 2013.

- WOLFE, A. D.; LISTON, A. **Contributions of PCR- based methods to plant systematics and evolutionary biology**. In: "plant Molecular Systematics II" (D.E. Soltis, P.S. Soltis, and J.J. Doyle, eds.). Kluwer, Boston, p.43-46, 1998.
- WU, I.F.; CHEN, J.T.; CHANG, W.C. Effects of auxins and cytokinins on embryo formation from rootderived callus of *Oncidium* 'Gower Ramsey'. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 77, p. 107-109, 2004.
- XIN, W.; XU, B.; WANG, G. D.; GUO, W. M.; WEN, F. D.; JIN, J. P. Somatic embryogenesis and plant regeneration of *Anthurium andraeanum*. **Acta Horticulturae Sinica**, v. 33, p. 1281–1286, 2006.
- YU, C.; JIN, M. -Y.; ZHANG, B. -Z.; MING, J.; YUAN, S. -X.; WANG, Z.; CHU, L. -H.; LIU C. Genetic linkage map of *Anthurium andraeanum* based on SRAP molecular markers. **Acta Horticulturae Sinica**, v. 39, p. 1151–1158, 2012.
- YUNUS, M.F.; AZIZ, M.A.; KADIR, M.A.; RASHID, A.A. *In vitro* propagation of *Etilingera elatior* (Jack) (torch ginger). **Scientia Horticulturae**, v. 135, p. 145-150, 2012.
- ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, v. 20, p. 173-183, 1994.
- ZIMMERMAN, J. L. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. **Plant Cell**, Oxford, v. 5, p. 1411-1423, 1993.

CAPÍTULO I – INDUÇÃO À EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM DUAS CULTIVARES DE ANTÚRIO

Resumo - A micropropagação comercial do antúrio (*Anthurium andraeanum* Linden) se dá por organogênese indireta. No entanto, a embriogênese somática pode resultar em mudas com maior conformidade clonal e menor número de variantes. Os calos embriogênicos podem ser distinguidos dos calos não embriogênicos por acompanhamento ultraestrutural das células, utilizando-se da microscopia eletrônica de varredura (MEV). Assim, objetivou-se com esse trabalho estabelecer um protocolo de indução à embriogênese somática das cultivares de antúrio Jureia e Luau. Foram utilizados segmentos nodais como explantes, sendo o meio de cultura utilizado, o ESA (Pierik, 1976 modificado). O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, conduzido em ensaio fatorial 2 x 3 x 5 (cultivar x regulador de crescimento x concentração), com 30 tratamentos em arranjo de parcelas subdivididas no tempo. Quando diferenças significativas foram detectadas, os fatores quantitativos foram estudados utilizando análises de regressão e os fatores qualitativos foram estudados utilizando-se teste de Tukey (para os reguladores de crescimento) e teste F (para as cultivares). Realizou-se a MEV para identificação dos calos com características embriogênicas. Com o auxílio da MEV, confirmou-se que as estruturas formadas em meio de indução à embriogênese somática correspondiam a calos embriogênicos. Constatou-se que a cultivar Jureia apresentou percentual de oxidação significativamente maior que a cultivar Luau, e o meio com adição de ANA é aquele mais propenso a ocorrer oxidação. A cultivar que obteve as maiores médias quanto à proliferação de calos embriogênicos foi a cultivar de antúrio Luau, e o meio que propiciou a maior formação de calos embriogênicos, com maiores vantagens do ponto de vista econômico, foi aquele adicionado de ANA, com nível ótimo de formação de calos na concentração de 7,5 μM , aos 75 dias de permanência em meio de indução à embriogênese somática. Assim, para indução à embriogênese somática das cultivares de antúrio Luau e Jureia, é indicado que o meio ESA seja suplementado com o regulador de crescimento ANA, na concentração de 7,5 μM . Os explantes devem permanecer em meio de indução à embriogênese somática, até os 75 dias após a inoculação.

Palavras-chave: Micropropagação. Calos embriogênicos. Análise ultraestrutural.

INDUCTION OF SOMATIC EMBRYOGENESIS IN TWO ANTHURIUM'S CULTIVARS

Abstract - Anthurium's commercial micropropagation traditionally occurs by indirect organogenesis. However, somatic embryogenesis may result in plants with greater clonal compliance and fewer variants. Embryogenic calli can be distinguished from non embryogenic ones by ultrastructural monitoring of cells using scanning electron microscopy (SEM). Thus, the aim of this study was to establish an induction protocol for somatic embryogenesis of anthurium's cultivars Jureia and Luau. Nodal segments were used as explants and the culture medium used was ESA (Pierik, 1976 modified). The experimental design was completely randomized, conducted in factorial assay 2 x 3 x 5 (cultivar x growth regulator x concentration), with 30 treatments in arrangement of subdivided plots in time. When significant differences were detected, the quantitative factors were studied using regression analysis and the qualitative factors were studied using Tukey test (for growth regulators) and F test (for cultivars). SEM was performed to identify calli with embryogenic characteristics. With the assistance of SEM, it was confirmed that the structures formed corresponded to embryogenic calli. It was found that Jureia showed oxidation percentage significantly higher than the cultivar Luau, and the medium with the addition of NAA is the one more prone to the occurrence of oxidation. The cultivar that had the highest averages about the proliferation of embryogenic calli was Luau, and the medium that provided the increased formation of embryogenic calli, with also advantages from the economic point of view, was the one supplemented with NAA. The great level of embryogenic calli formation occurred at a concentration of 7.5 μ M, after 75 days of permanence of the explants in the medium of somatic embryogenesis inducing. Thus, for induction of somatic embryogenesis of the anthurium's cultivars Luau and Jureia, it is indicated the ESA medium supplemented with the plant growth regulator NAA at a concentration of 7.5 μ M. The explants should remain in induction medium for somatic embryogenesis, even 75 days after inoculation.

Keywords: Micropropagation. Embryogenic calli. Ultrastructural analysis.

1 INTRODUÇÃO

A floricultura tropical é classificada como um negócio lucrativo, representando um segmento proeminente e em expansão nos mercados de plantas ornamentais (LUZ *et al.*, 2005; JUNQUEIRA; PEETZ, 2011).

Dentre as espécies tropicais cultivadas, por apresentar grande beleza exótica, durabilidade e resistência pós-colheita das inflorescências (em média de 25 a 30 dias, podendo chegar a 40 dias) e das folhagens, o antúrio é largamente utilizado na floricultura como flor de corte, folhagem ou planta envasada (CARVALHO *et al.*, 2011). Do ponto de vista comercial, a principal espécie do gênero é o *Anthurium andraeanum* Linden (CARVALHO *et al.*, 2013).

As flores do antúrio são hermafroditas, porém possuem fecundação cruzada devido ao fenômeno da protoginia. Assim, na natureza, o antúrio é normalmente propagado por sementes, gerando, portanto, progênies heterogêneas (CARVALHO *et al.*, 2011). No entanto, visando à manutenção das características desejadas pela obtenção de mudas com uniformidade genética, o antúrio pode ser propagado assexuadamente.

A reprodução vegetativa do antúrio pode ser feita tradicionalmente por divisão de touceiras e estaquia, e por micropropagação. À exceção da propagação *in vitro*, estes métodos apresentam como desvantagens o baixo número de mudas produzidas, ciclo reprodutivo longo e a possibilidade de disseminação de pragas e doenças, presentes nas plantas matrizes, às mudas propagadas (MARTIN *et al.*, 2003; TOMBOLATO *et al.*, 2004; PUCHOOA, 2005). Por outro lado, a micropropagação permite a obtenção de maior taxa de multiplicação em menor período de tempo, independente da época do ano, qualidade fitossanitária e estabilidade genética das mudas produzidas (CARVALHO *et al.*, 2009).

Na micropropagação comercial do antúrio as mudas têm sido obtidas, tradicionalmente, mediante a organogênese indireta. Esse método proporciona taxas de multiplicação relativamente baixas e inconsistentes, com a provável ocorrência de variação somaclonal nas mudas obtidas (TE-CHATO; SISONON; SONTIKUN, 2006; BAUTISTA *et al.*, 2008). No entanto, a embriogênese somática é uma outra via de morfogênese *in vitro* que pode ser utilizada para obtenção das mudas de antúrio.

A embriogênese somática é uma técnica por meio da qual uma única célula vegetal ou grupo de células de tecidos dá origem ao embrião somático, uma estrutura bipolar organizada, sem conexões com o tecido materno, sendo morfológicamente semelhante ao embrião zigótico (GAJ, 2004; MA *et al.*, 2012; ALCANTARA *et al.*, 2014). A formação dos embriões pode ser direta, quando estes são originados diretamente a partir do explante, e indireta, quando há a fase intermediária de calo. Essa técnica permite propagação clonal de mudas em larga escala com menores chances de obtenção de plantas variantes, pois em plantas regeneradas através da embriogênese, os genes expressos são menos tolerantes às mutações em relação àquelas regeneradas pela rota organogênica (PARROT; MERKLE; WILLIAMS, 1991).

A indução da embriogênese somática é uma etapa crucial para o estabelecimento de culturas embriogênicas *in vitro*. O processo de indução depende do genótipo, tipo e estágio de desenvolvimento do explante, da composição do meio de cultura e das condições de cultivo (LITZ *et al.*, 1998; HOU; JIA, 2004; PARAMAGEETHAM; BABU; RAO, 2004). Destes, destacam-se os reguladores de crescimento, sendo a classe das auxinas considerada como o principal indutor (NISHIWAKI *et al.*, 2000). O ácido 2,4-diclorofenóxiacético (2,4-D) e o ácido naftalenoacético (ANA) são, nesta ordem, as auxinas mais utilizadas na indução de embriogênese somática (RAEMAKERS; JACOBSEN; VISSER, 1995). Porém, outras auxinas também podem exercer papel satisfatório na indução de embriogênese somática, como o picloram (ácido 4-amino- 3,5,6 - tricloro picolínico) (SILVA, 2012).

É importante salientar que na indução à embriogênese somática indireta ocorre a formação de diferentes tipos de calos. O acompanhamento ultraestrutural destas estruturas pode ser feito utilizando-se, entre outras técnicas, a microscopia eletrônica de varredura, ferramenta que permite auxiliar a distinção de células de calos embriogênicos dos não embriogênicos (FILIPPI; APPEZZATO-DA-GLORIA; RODRIGUEZ, 2001; ALVES, 2004; STEINER *et al.*, 2005; MOURA *et al.*, 2008).

Visando otimizar a produção *in vitro* de mudas de antúrio pelo uso da técnica de embriogênese somática, objetivou-se com esse trabalho estabelecer um protocolo de indução à embriogênese somática indireta a partir de segmentos nodais para as cultivares de antúrio (*Anthurium andraeanum* Linden) lançadas pelo Instituto Agrônômico (IAC), Jureia e Luau.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Indução à embriogênese somática

O trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, pertencente à Embrapa Agroindústria Tropical (CNPAT), em Fortaleza (CE).

Como material vegetal, foram utilizadas mudas, estabelecidas *in vitro*, de *Anthurium andraeanum* cvs. Jureia e Luau, cedidas pelo Instituto Agrônomo (IAC), em Campinas, São Paulo. Essas mudas foram obtidas a partir da organogênese indireta, segundo protocolo de Tombolato, Quirino e Costa (1998). A partir dessas mudas, foram obtidos os explantes para indução à embriogênese somática, os quais constaram de segmentos nodais desfolhados com aproximadamente 1,0 cm de comprimento, contendo uma gema (meristema axilar).

O meio de cultura básico utilizado foi o ESA (Tabela 1), acrescido dos microelementos, FeEDTA, mio-inositol e vitaminas do meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), contendo 20 g L⁻¹ de sacarose, solidificado com *Gelzan*® a 1,8 g L⁻¹, e pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, realizada a 121 °C, por 15 minutos.

Tabela 1 – Meio de cultura ESA utilizado nas etapas de indução de calos embriogênicos e proliferação das culturas embriogênicas, para produção de mudas micropropagadas de antúrio (*Anthurium andraeanum*), via embriogênese somática [PIERIK (1976), modificado]

Meio de Cultura (Componentes)	ESA (mg L ⁻¹)
Nitrato de amônio (NH ₄ NO ₃)	825
Nitrato de potássio (KNO ₃)	950
Sulfato de magnésio hepta-hidratado (MgSO ₄ .7H ₂ O)	185
Fosfato monobásico de potássio (KH ₂ PO ₄)	85
Cloreto de cálcio tetra-hidratado (CaCL ₂ .4H ₂ O)	220
Sacarose	20000

Fonte: Priscila Bezerra dos Santos Melo.

Os explantes foram inoculados, horizontalmente, um por tubo de ensaio (de dimensões de 150 mm x 25 mm), contendo 10 mL de meio de cultura, sob condições assépticas, em capela de fluxo laminar. Os tubos de ensaio foram vedados com tampa de polipropileno envolta por película esticável aderente (PVC) e as culturas foram

mantidas em câmara de crescimento a 25 ± 2 °C, permanecendo no escuro por um período de 90 dias.

O experimento foi conduzido em ensaio fatorial 2 x 3 x 5: cultivares de antúrio estudadas (Luau e Jureia); tipo da auxina adicionado ao meio de cultivo (2,4 D - ácido 2,4-diclorofenóxiacético; ANA - ácido naftalenoacético; e Picloram - ácido 4-amino - 3, 5,6 - tricloro picolínico) e diferentes concentrações utilizadas dessas auxinas (0; 2,5; 5,0; 7,5; e 10 μ M), totalizando 30 tratamentos. Cada tratamento foi replicado 5 vezes, com cada repetição constituída por 6 tubos de ensaio. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em esquema de parcelas subdivididas no tempo, devido às avaliações periódicas que foram realizadas durante os 90 dias de inoculação no escuro (15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias). Nesses períodos foram avaliadas a formação de calos com características embriogênicas [calos semi-friáveis, de coloração amarela e crescimento radial, de acordo com Pinheiro (2010)] e a oxidação do material inoculado. Os explantes considerados oxidados apresentavam escurecimento dos tecidos lesados, causado por liberação de compostos polifenólicos (GEORGE; SHERRINGTON, 1984). A partir da observação de presença (1) ou ausência (0) de calos embriogênicos e material oxidado, os dados coletados nas repetições pertencentes a cada tratamento foram expressos em porcentagem (P%), os quais foram transformados para $\text{arc sen } \sqrt{P\%/100}$. Essa transformação homogeneiza a variância experimental, que é uma das exigências estatísticas para a validade dos testes de significância e dos intervalos de confiança para as médias dos tratamentos (HADDAD; VENDRAMIM, 2000). Dessa forma, os dados de porcentagem obtidos como resultados do presente estudo foram transformados para maior precisão na interpretação dos resultados.

Os dados obtidos foram comparados pelo teste F da análise de variância em esquema de parcela subdividida no tempo. Quando diferenças significativas foram detectadas, os fatores quantitativos foram estudados utilizando-se análise de regressão, e os fatores qualitativos utilizando-se teste de Tukey (para os reguladores de crescimento) e teste F (para as cultivares), a 5 % de probabilidade.

2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

Para análise dos aspectos anatômicos das estruturas formadas a partir dos explantes de antúrio das cultivares Luau e Jureia, submetidos à indução de embriogênese somática no meio ESA + 7,5 μ M de ANA, foram recolhidas amostras aos 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63 e 70 dias (duas amostras por data), após inoculação dos explantes. Esse meio foi escolhido pela eficiência na formação de calos embriogênicos para as cultivares correspondentes (resultados do presente estudo).

No Laboratório de Microscopia, as amostras coletadas foram fixadas em solução Karnovsky, diluída em solução tampão fosfato 0,2 M de pH 7,2, por um período mínimo de 48h e acondicionadas em geladeira. Em seguida, as amostras foram lavadas com três trocas de tampão fosfato de 10 minutos cada, pós-fixadas em tetróxido de ósmio (1%) por 1 hora, lavadas em água destilada e desidratadas em soluções de etanol de concentração crescente (20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90%), por 15 minutos cada, e em solução 100% de álcool, por 3 vezes, de 15 minutos cada. As amostras foram então, secas em aparelho de secagem ao ponto crítico, marca Quorum, montadas em stubs e recobertas com platina em metalizadora. Por fim, foram levadas ao microscópio eletrônico de varredura (MEV) Tescan, sob uma voltagem de aceleração de 15 Kv, para a obtenção das imagens, as quais foram processadas digitalmente.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Indução a embriogênese somática

O experimento envolveu diferentes fatores que influenciaram as respostas, quanto à oxidação e formação de calos embriogênicos, de explantes de *Anthurium andraeanum*, submetidos à indução de embriogênese somática. As análises de variância dos dados coletados, para as características avaliadas, demonstraram que estes fatores apresentaram efeito isolado (principal) e de interação sobre as respostas que foram obtidas. No entanto, quando um fator interfere em outro, o efeito principal já não é mais importante, porque as interações são mais consistentes, e representam melhor a realidade. Dessa forma, para apresentação dos resultados, foram consideradas apenas as interações que apresentaram nível de significância a 5%, pelo teste F.

3.1.1 Oxidação (%)

As cultivares e os reguladores de crescimento apresentaram efeito de interação significativo para a característica oxidação (Tabela 2).

Tabela 2 – Desdobramento do efeito da interação entre cultivares e reguladores de crescimento, referente à oxidação e presença de calos embriogênicos, durante 90 dias após a inoculação de segmentos nodais em meio de indução à embriogênese somática de *Anthurium andraeanum*. Fortaleza-CE, 2016

Regulador de crescimento	Características Avaliadas			
	Calos Embriogênicos (%)		Oxidação (%)	
	Cultivares			
	Jureia	Luau	Jureia	Luau
2,4 D	7,13 Bb	10,60 Ab	35,14 Ab	22,90 Bb
ANA	12,24 Ba	17,97 Aa	42,31 Aa	39,82 Aa
Picloram	7,99 Bb	16,12 Aa	20,72 Ac	15,94 Bc

*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, na linha, e minúscula, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) e F ($p < 0,05$).

Fonte: Priscila Bezerra dos Santos Melo.

A cultivar Jureia foi aquela que apresentou a maior média (42,31 %), embora esta não tenha se diferenciado estatisticamente da cultivar Luau (39,82%), quando ambas foram submetidas à indução de embriogênese somática em meio de cultura com adição do regulador de crescimento ANA, o qual exibiu taxa de oxidação estatisticamente superior, quando comparado aos demais reguladores de crescimento utilizados no experimento. Dessa forma, as cultivares Jureia e Luau apresentaram o mesmo comportamento em relação às auxinas.

A oxidação prejudica o desenvolvimento dos explantes, além de ser um fator de redução da taxa de multiplicação (CARNEIRO, 1997). Assim, é importante observar os resultados em que a taxa de oxidação foi mínima, os quais foram verificados para o regulador de crescimento Picloram, proporcionando taxa de oxidação estatisticamente inferior para as duas cultivares de antúrio utilizadas (20,72% para Jureia; e 15,94 % para Luau), sendo que para a cultivar Luau, a oxidação foi estatisticamente mais baixa do que aquela obtida pela cultivar Jureia. Dessa forma, nota-se que o meio adicionado de Picloram é menos propenso à oxidação dos seguimentos nodais nele inoculados, e que a cultivar Luau é menos sensível aos fatores que podem causar a oxidação, a qual além de ser altamente dependente da espécie e do genótipo, bem como do tipo de explante utilizado, também pode ser influenciada por danos físicos e químicos no momento da excisão e desinfestação. Assim, essas etapas devem ser executadas cuidadosamente, de maneira a minimizar o impasse (TEIXEIRA, 2001). Além disso, a oxidação fenólica também pode ser minimizada pela modificação dos ambientes, e pelo uso de antioxidantes (MONACO; SÖNDAHL; CARVALHO, 1977).

A interação entre os tipos de reguladores de crescimento e os níveis de concentração destes, teve efeito significativo para a característica oxidação (%). Na comparação de médias, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), estudou-se o desdobramento do efeito dos reguladores de crescimento para cada nível de concentração (Tabela 3).

O maior nível verificado para a característica está associado ao meio com adição de ANA, o qual apresentou média estatisticamente superior aos demais reguladores de crescimento, nas concentrações de 2,5 (39,87%), 5,0 (45,99%) e 10,0 μM (56,16%). Para a concentração de 7,5 μM , a taxa de oxidação não apresentou diferença estatística para ANA (53,55 %) e 2,4 D (49,05 %). As menores taxas de oxidação foram constatadas no meio com adição de Picloram, cuja menor média foi associada à concentração de 2,5 μM (2,43 %).

Tabela 3 – Desdobramento do efeito dos reguladores de crescimento para cada nível de concentração, referente à oxidação e presença de calos embriogênicos, durante 90 dias após a inoculação de segmentos nodais em meio de indução à embriogênese somática de *Anthurium andraeanum*. Fortaleza-CE, 2016

Concentração dos reguladores de crescimento (μM)	Características Avaliadas					
	Calos Embriogênicos (%)			Oxidação (%)		
	Reguladores de Crescimento					
	2,4 D	ANA	Picloram	2,4 D	ANA	Picloram
0	0 A	0 A	0 A	9,74 A	9,74 A	9,74 A
2,5	9,33 B	21,28 A	4,87 B	8,38 B	39,87 A	2,43 C
5	15,47 A	16,01 A	9,42 A	28,44 B	45,99 A	16,75 C
7,5	9,87 B	23,81 A	21,93 A	49,05 A	53,55 A	24,83 B
10	9,66 B	14,41 B	24,22 A	49,50 B	56,16 A	37,88 C

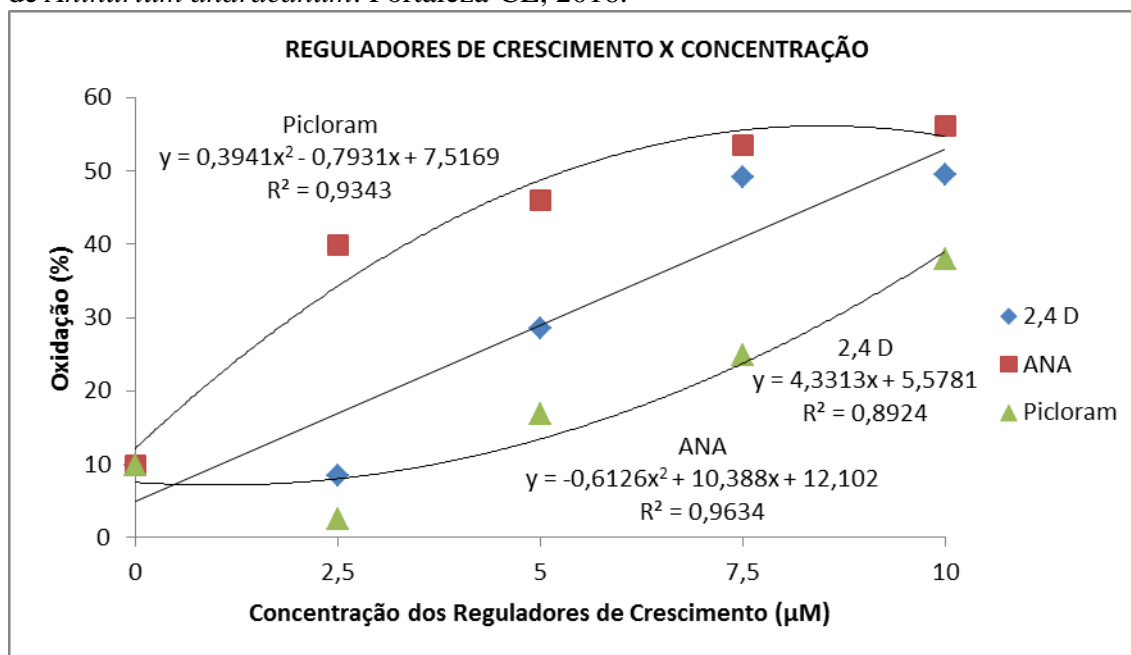
*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).
Fonte: Priscila Bezerra dos Santos Melo.

Pela análise de regressão da figura 1, pode-se observar, por meio das linhas de tendência, o comportamento de cada regulador com relação à taxa de oxidação, em função das concentrações adicionadas ao meio de cultura.

A análise de regressão para o regulador de crescimento 2,4 D, demonstra que o modelo estatístico se ajustou aos dados em regressão linear ($R^2 = 0,8924$). Para esse regulador de crescimento, houve um aumento proporcional da taxa de oxidação com relação ao incremento da concentração. Assim, o pico da taxa de oxidação coincidiu com a máxima concentração do regulador de crescimento (10 μM). Para os reguladores de crescimento ANA e Picloram, as análises de regressão demonstram que os modelos estatísticos se ajustaram aos dados em regressão quadrática ($R^2 = 0,9634$ para ANA; $R^2 = 0,9343$ para Picloram). Para ANA, o resultado da análise de regressão constou do aumento acentuado da taxa de oxidação com o incremento da concentração até o nível de 2,5 μM , a partir desse ponto o aumento da taxa de oxidação se dá de forma paulatina. Para Picloram, a taxa de oxidação aumentou de forma gradativa até a concentração 5 μM , quando o aumento desta taxa passou a ser mais acentuado, em função do aumento da concentração. Esses resultados revelam que a concentração dos reguladores de crescimento influencia a oxidação dos tecidos vegetais *in vitro*, sendo

que quanto menor a concentração dos reguladores de crescimento no meio de cultivo, menor a oxidação.

Figura 1 – Análise de regressão do desdobramento do efeito dos níveis de concentração para cada um dos reguladores de crescimento, referente à oxidação, durante 90 dias após a inoculação de segmentos nodais em meio de indução à embriogênese somática de *Anthurium andraeanum*. Fortaleza-CE, 2016.



Fonte: Priscila Bezerra dos Santos Melo.

Bassan e colaboradores (2006) consideram que a ocorrência de compostos fenólicos pode estar ligada a processos de regulação de crescimento, especialmente em relação às auxinas que, dependendo da concentração nos tecidos, induzem à síntese desses compostos. No entanto, a adição ao meio de cultivo de compostos antioxidantes, como cisteína, ácido ascórbico e adsorventes, como carvão ativado e PVP, pode ser decisiva na prevenção à oxidação, a qual é mais acentuada nas fases iniciais de cultivo (TEIXEIRA, 2001). A redução da luminosidade na câmara de fluxo laminar durante a excisão dos explantes, e a manutenção da cultura no escuro no início do cultivo, também são consideradas benéficas, pois a luz induz à produção de fenóis na planta (MARKS; SIMPSON, 1990). No presente estudo, os explantes das cultivares Luau e Juréia foram mantidos, em meio de indução à embriogênese somática, no escuro por 90 dias. Outros trabalhos desenvolvidos com antúrio, também avaliaram a taxa oxidação dos explantes de acordo com os tratamentos empregados (PINHEIRO, 2010; PINHEIRO, 2014; PINHEIRO *et al.*, 2014).

3.1.2 Formação de Calos Embriogênicos (%)

As cultivares e os reguladores de crescimento apresentaram efeito de interação significativo para a característica formação de calos embriogênicos (%) (Tabela 2).

Pode ser verificado na tabela 2, que o mínimo percentual de calos embriogênicos foi obtido no meio adicionado de 2,4 D para a cultivar Luau (10,60 %), e 2,4 D (7,13 %) e Picloram (7,99 %) para a cultivar Jureia. Em contrapartida, o maior percentual de calos embriogênicos foi obtido no meio acrescido de ANA para a cultivar Jureia (12,24 %), e ANA (17,97 %) e Picloram (16,12 %) para a cultivar Luau, os quais não apresentaram diferença estatística. No entanto, o regulador de crescimento ANA (25 g – R\$ 167,00) apresenta vantagem econômica quando comparado ao regulador de crescimento Picloram (10 g – R\$ 187,00) (SIGMA-ALDRICH[®], 2016a,b). Assim, conclui-se que o meio adicionado de ANA é aquele mais indicado para a embriogênese somática das cultivares de antúrio Jureia e Luau.

Ainda analisando a tabela 2, é válido observar que para a cultivar Luau, as médias com relação ao percentual de calos embriogênicos obtidos, sempre foram estatisticamente superiores do que aquelas apresentadas pela cultivar Jureia, o que pode ser explicado pelas menores taxas de oxidação dos explantes de Luau, revelando que esta cultivar possui maior potencial para formação de calos embriogênicos.

A interação entre os tipos de reguladores de crescimento e os níveis de concentração destes, teve efeito significativo para a característica formação de calos embriogênicos (%). Na comparação de médias, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), estudou-se o desdobramento do efeito dos reguladores de crescimento para cada nível de concentração (Tabela 3).

Na análise de comparação de médias, pode-se constatar que para a concentração 0 μM , representando o meio sem adição dos reguladores de crescimento, não houve formação de calos embriogênicos. Esse resultado aponta para a necessidade de incorporação ao meio de cultura, de fontes de reguladores de crescimento para desencadear o processo morfogênico de embriogênese somática nos segmentos nodais de antúrio, cultivares Jureia e Luau.

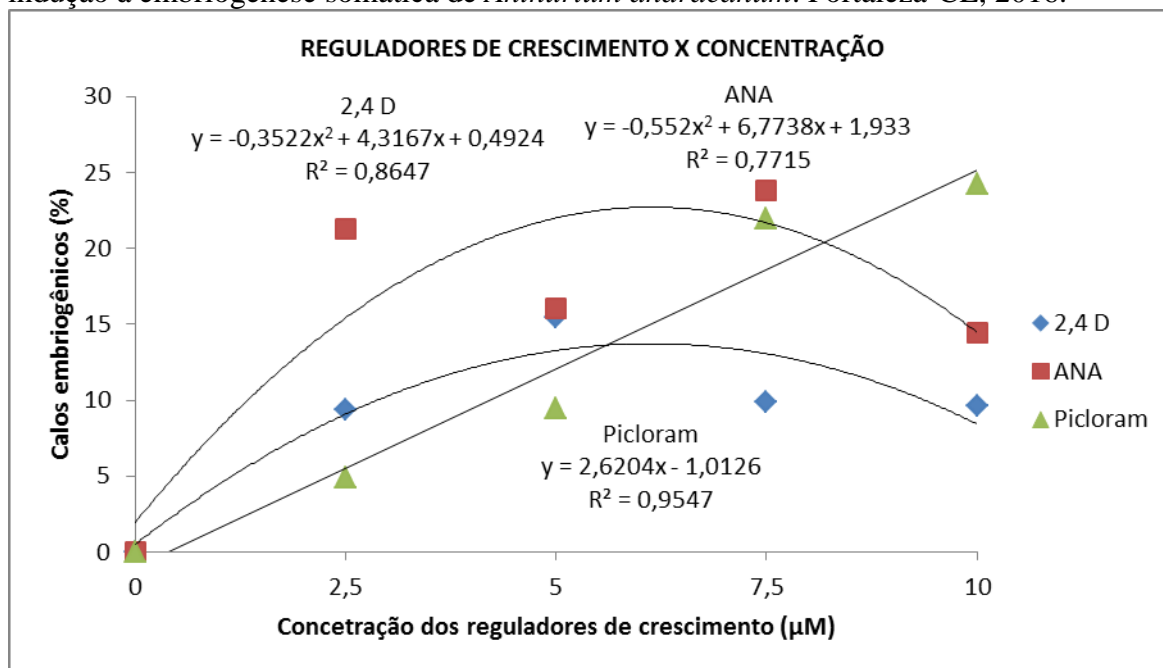
Para a concentração 2,5 μM , o maior percentual de presença de calos embriogênicos está associado ao meio com adição de ANA (21,28 %). Para as

concentrações de 5 e 7,5 μM , as maiores médias também estão associadas ao meio ANA (16,01 % e 23,81 %, respectivamente), embora estas não difiram estatisticamente do percentual de calos embriogênicos no meio com adição de Picloram para as mesmas concentrações (9,42 % para 5 μM e 21,93 para 7,5 μM). Para a concentração de 10 μM , o percentual de calos embriogênicos estatisticamente superior foi obtido no meio Picloram (24,22 %). No entanto, este resultado ocorreu na concentração máxima empregada no estudo (10 μM). Dessa forma, por mais que o meio adicionado de ANA apresente maiores taxas de oxidação, esta é a auxina que, ainda assim, demonstra maior potencial para formação de calos embriogênicos para as cultivares de antúrio Juréia e Luau, necessitando de menores níveis de concentração para a indução à embriogênese somática, o que implica em redução de custos quando comparada às auxinas 2,4 D e Picloram. Portanto, entre as auxinas testadas, enfatiza-se mais uma vez, que ANA é a mais adequada para a indução à embriogênese somática nas cultivares de antúrio estudadas.

As auxinas desempenham importante papel na indução à embriogênese somática, etapa esta primordial para obtenção de mudas oriundas de embriões somáticos. Dessa forma, estes reguladores de crescimento têm sido bastante aplicados em pesquisas envolvendo a embriogênese somática. Em antúrio, estas pesquisas são em sua maioria conduzidas com as auxinas ANA e 2,4 D. Corroborando com o presente estudo, em que ANA foi a principal auxina responsável pela indução à embriogênese somática nas cultivares de antúrio Jureia e Luau, Pinheiro (2010) obteve resultado semelhante em trabalho desenvolvido com *Anthurium andraeanum* cultivar Eidibel. Neste estudo o autor também testou diferentes fontes de auxinas, bem como diferentes níveis de concentração. O resultado que o autor obteve foi que a auxina ANA, na concentração de 10 μM , proporcionou resultados superiores no estabelecimento de calos embriogênicos em segmentos nodais da cultivar estudada (1,23), sendo estes resultados expressos em número de calos embriogênicos formados. Bhattacharya e colaboradores (2016) obtiveram os melhores resultados para obtenção de calos embriogênicos em meio suplementado com ANA (2,68 μM) e BA (0,27 μM), a partir de explante de folha. Outros autores obtiveram sucesso em trabalhos conduzidos com a auxina 2,4 D para induzirem embriões somáticos em antúrio, como nas pesquisas de Kuehnle, Chen e SugII (1992); Hamidah, Karin e Debergh (1997); Jie (2006); Xin e colaboradores (2006); Bautista e colaboradores (2008) e Beyramizade e Azadi (2008).

Pela análise de regressão da figura 2, pode-se observar, por meio das linhas de tendência, o comportamento de cada regulador com relação à presença de calos embriogênicos (%), em função das concentrações adicionadas ao meio de cultura.

Figura 2 – Análise de regressão do desdobramento do efeito dos níveis de concentração para cada um dos reguladores de crescimento, referente à presença de calos embriogênicos, durante 90 dias após a inoculação de segmentos nodais em meio de indução à embriogênese somática de *Anthurium andraeanum*. Fortaleza-CE, 2016.



Fonte: Priscila Bezerra dos Santos Melo.

As análises de regressão para os reguladores de crescimento 2,4 D e ANA, demonstram que os modelos estatísticos se ajustaram aos dados em regressão quadrática ($R^2 = 0,8647$ para 2,4 D; $R^2 = 0,7715$ para ANA). Para estes reguladores de crescimento, as linhas de tendência indicam um aumento gradativo do percentual de calos embriogênicos com relação ao incremento da concentração. No entanto, a partir da concentração 5 μ M, para 2,4 D ocorre uma estagnação do aumento do percentual de calos embriogênicos, havendo uma queda neste percentual, em função do aumento dos níveis de concentração. O mesmo ocorre para ANA, porém a estagnação do aumento do percentual de calos embriogênicos se dá a partir da concentração 7,5 μ M, sendo este o ponto ótimo para se obter maior percentual de calos embriogênicos para as cultivares Jureia e Luau. Os resultados obtidos para 2,4 D e ANA, indicam que à medida que os níveis de concentração aumentam, esses reguladores de crescimento apresentam efeito inibitório gradual da embriogênese somática para as cultivares de antúrio Luau e Jureia.

Ainda pode-se ressaltar, analisando a linha de tendência, que a inibição à embriogênese somática pode chegar ao nível de se tornar nula mediante ao incremento continuado para além da concentração de 10 μM dos reguladores de crescimento 2,4 D e ANA. Porém, estes resultados só podem ser confirmados mediante nova condução experimental, empregando-se concentrações mais elevadas desses reguladores de crescimento.

Para Picloram, a análise de regressão demonstra que o modelo estatístico se ajustou aos dados em regressão linear ($R^2 = 0,9547$), havendo um aumento continuado do percentual de calos embriogênicos formados, em função do incremento dos níveis de concentração, atingindo a média máxima, superior estatisticamente as demais, quando empregado ao meio de cultivo na concentração de 10 μM . A linha de tendência indica que ainda podem ser empregadas concentrações mais elevadas, com conseqüente aumento do percentual de calos embriogênicos. Assim, uma continuidade no estudo do comportamento desse fator deve ocorrer a fim de identificar o ponto crítico de formação de calos embriogênicos.

Para as interações concentração x cultivar, cultivar x períodos de avaliação e concentração x períodos de avaliação, só houve efeito significativo para a característica avaliada presença de calos embriogênicos.

Quanto ao desdobramento do efeito das cultivares para cada nível de concentração (Tabela 4), a análise comparativa pelo teste F ($p < 0,05$) entre as cultivares de antúrio Jureia e Luau, revela que a cultivar Luau, dos níveis de concentração 2,5 μM (15,18 %) à 7,5 μM (22,48 %), apresenta médias de percentual de calo embriogênico estatisticamente superior às médias apresentadas para a cultivar Jureia. Para a concentração 10 μM , as cultivares apresentaram resultados significativamente similares (16,99 % para Luau; 15,20 % para Jureia).

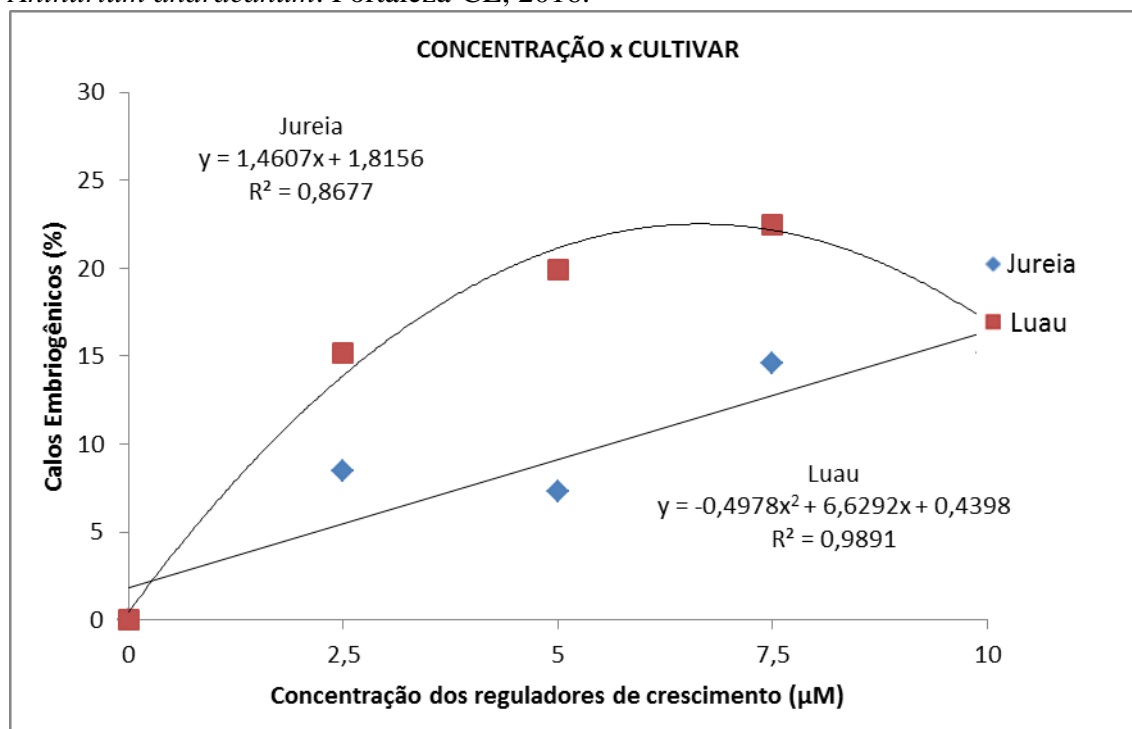
Pela análise de regressão da figura 3, pode-se observar, por meio das linhas de tendência, o comportamento de cada cultivar com relação à presença de calos embriogênicos (%), em função das concentrações adicionadas ao meio de cultura.

Tabela 4 – Desdobramento do efeito das cultivares para cada nível de concentração, referente à presença de calos embriogênicos, durante 90 dias após a inoculação de segmentos nodais em meio de indução à embriogênese somática de *Anthurium andraeanum*. Fortaleza-CE, 2016

Concentração dos reguladores de crescimento (μM)	Calos Embriogênicos (%)	
	Jureia	Luau
0	0 A	0 A
2,5	8,47 B	15,18 A
5	7,33 B	19,91 A
7,5	14,59 B	22,48 A
10	15,20 A	16,99 A

*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, na linha, não diferem entre si pelo teste F ($p < 0,05$).
 Fonte: Priscila Bezerra dos Santos Melo.

Figura 3 – Análise de regressão do desdobramento do efeito dos níveis de concentração para cada cultivar, referente à presença de calos embriogênicos, durante 90 dias após a inoculação de segmentos nodais em meio de indução à embriogênese somática de *Anthurium andraeanum*. Fortaleza-CE, 2016.



Fonte: Priscila Bezerra dos Santos Melo.

A análise de regressão para a cultivar Jureia demonstra que o modelo estatístico se ajustou aos dados em regressão linear ($R^2 = 0,8677$). Assim, à medida que há o incremento da concentração dos reguladores de crescimento no meio de cultura, maior o percentual de calos embriogênicos obtidos para a cultivar. Dessa forma, a maior média obtida para a característica avaliada (15,20 %), coincide com o maior nível de concentração dos reguladores de crescimento (10 μM).

Para a cultivar Luau, a análise de regressão demonstra que o modelo estatístico se ajustou aos dados em regressão quadrática ($R^2 = 0,9891$), em que o incremento nos níveis de concentração dos reguladores de crescimento, resulta no aumento do percentual de calos embriogênicos até a concentração de 7,5 μM , onde verifica-se maior média (22,48 %). Após esse ponto, o percentual de calos embriogênicos decresce com o aumento da concentração dos reguladores de crescimento.

Guerra, Torres e Teixeira (1999) afirmam que a sensibilidade da célula em responder a um estímulo depende das substâncias endógenas presentes. Assim, esses resultados indicam que os níveis endógenos de hormônios com efeito sobre a embriogênese somática devem ser maiores na cultivar Luau, pois esta necessita de menores concentrações de reguladores de crescimento para formação de calos embriogênicos, alcançando o ponto crítico de formação de calos quando os reguladores de crescimento tem concentração de 7,5 μM , a partir da qual o incremento dos níveis de concentração passa a inibir a embriogênese somática. Para a cultivar Jureia, os níveis de endógenos de hormônios com efeito sobre a embriogênese somática devem ser menores, portanto, para esta cultivar, são necessárias maiores níveis de concentração de reguladores de crescimento para ocorrência da embriogênese somática com maior eficiência. Assim, até a concentração estudada nesse experimento, não se pôde encontrar o ponto crítico de formação de calos embriogênicos para a cultivar Jureia. Assim, nova condução experimental pode ser realizada para definir o potencial de formação de calos embriogênicos para a cultivar Jureia.

Quanto ao desdobramento do efeito das cultivares para cada período de avaliação (Tabela 5), a análise comparativa pelo teste F ($p < 0,05$) entre as cultivares de antúrio Jureia e Luau, revela que para o período de avaliação de 15 dias não houve formação de calos embriogênicos para as duas cultivares estudadas. Aos 30 dias de inoculação em meio de indução à embriogênese somática foram observados os

primeiros calos embriogênicos, e para este período de avaliação, as cultivares Luau e Jureia apresentaram médias estatisticamente iguais (4,36 % e 5,01 %, respectivamente). A partir dos 45 dias de avaliação da formação de calos embriogênicos, as médias para a cultivar Luau apresentaram-se estatisticamente superiores àquelas apresentadas para a cultivar Jureia. Para Luau e Jureia as máximas médias de percentual de calos embriogênicos (14,98 % para Jureia; 25,73 % para Luau) se deram no período mais elevado de avaliação, aos 90 dias. Esses fatos afirmam a hipótese anteriormente discutida de que a cultivar Luau apresenta maior potencial na formação de calos embriogênicos.

Tabela 5 – Desdobramento do efeito das cultivares para cada período de avaliação, referente à presença de calos embriogênicos, durante 90 dias após a inoculação de segmentos nodais em meio de indução à embriogênese somática de *Anthurium andraeanum*. Fortaleza-CE, 2016

Períodos de avaliação (dias)	Calos Embriogênicos (%)	
	Cultivares	
	Jureia	Luau
15	0 A	0 A
30	5,01 A	4,36 A
45	7,44 B	12,12 A
60	12,88 B	21,84 A
75	14,39 B	25,46 A
90	14,98 B	25,73 A

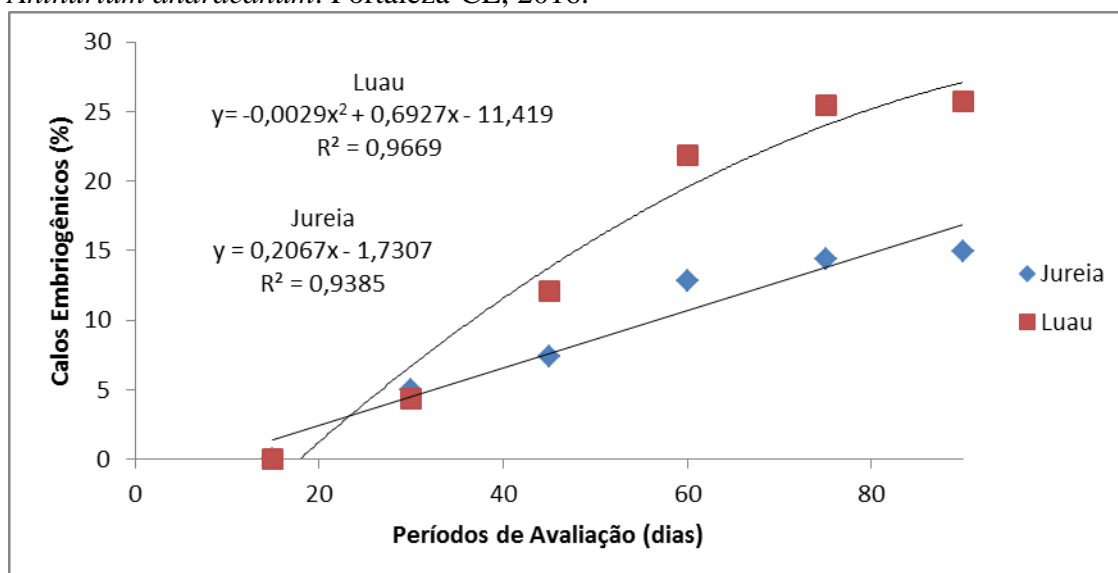
*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, na linha não diferem entre si pelo teste F ($p < 0,05$).
Fonte: Priscila Bezerra dos Santos Melo.

Em relação ao período inicial de formação de calos embriogênicos, o trabalho de Bautista e colaboradores (2008), obteve resultado similar. Trabalhando com segmentos de folha de *Anthurium andraeanum* Lind. variedade Lambada, estes autores observaram a presença de calos a partir da quarta semana de cultivo *in vitro*. Este mesmo período foi observado para formação de calos embriogênicos de *Anthurium andraeanum* Tera, a partir de explantes de folha, por Beyramizade e Azadi (2008). Em estudo conduzido por Bhattacharya e colaboradores (2016) o resultado não foi diferente. Neste estudo, para *Anthurium andraeanum* cultivar Fantasia, a partir de explantes de

folha, após 28 dias de cultivo em meio de indução à embriogênese somática, surgiram os primeiros embriões somáticos. Pinheiro (2010) observou a formação dos primeiros calos embriogênicos de *Anthurium andraeanum* cultivar Eidibel, a partir de segmento nodal e pecíolo, após a quinta semana de cultivo em meio de indução à embriogênese somática. Estes resultados revelam que, para antúrio, são necessários, pelo menos, cerca de quatro semanas para que ocorra a morfogênese *in vitro* pela rota embriogênica.

Pela análise de regressão da figura 4, pode-se observar, por meio das linhas de tendência, o comportamento de cada cultivar com relação à presença de calos embriogênicos (%), em função dos períodos de avaliação.

Figura 4 – Análise de regressão do desdobramento do efeito dos períodos de avaliação para cada cultivar, referente à presença de calos embriogênicos, durante 90 dias após a inoculação de segmentos nodais em meio de indução à embriogênese somática de *Anthurium andraeanum*. Fortaleza-CE, 2016.



Fonte: Priscila Bezerra dos Santos Melo.

A análise de regressão para a cultivar Jureia demonstra que o modelo estatístico se ajustou aos dados em regressão linear ($R^2 = 0,9385$). Assim, há um aumento proporcional no percentual de calos embriogênicos, em função do maior período de permanência no meio de indução à embriogênese somática.

Para a cultivar Luau, a análise de regressão demonstra que o modelo estatístico se ajustou aos dados em regressão quadrática ($R^2 = 0,9385$). Dessa forma, a cultivar apresenta acentuado aumento do percentual de calos embriogênicos, em função do maior período de permanência no meio de indução à embriogênese somática, até o

período de avaliação de 60 dias (21, 84 %), quando este aumento passa a ser gradual, até atingir maior percentual de calos embriogênicos, aos 90 dias de avaliação.

Esses resultados mostram que, para as cultivares de antúrio Jureia e Luau, quanto maior a permanência dos explantes em meio de indução à embriogênese somática, maior o percentual de calos obtidos, até o período de 90 dias. Apesar de que as duas cultivares se comportam dessa forma, para a cultivar Luau o percentual de calos embriogênicos aumenta de forma estatisticamente superior, ou seja, para obter um mesmo percentual de calos embriogênicos, é necessário maior tempo de permanência *in vitro* dos explantes da cultivar Jureia, e menos tempo para os explantes pertencentes à cultivar Luau.

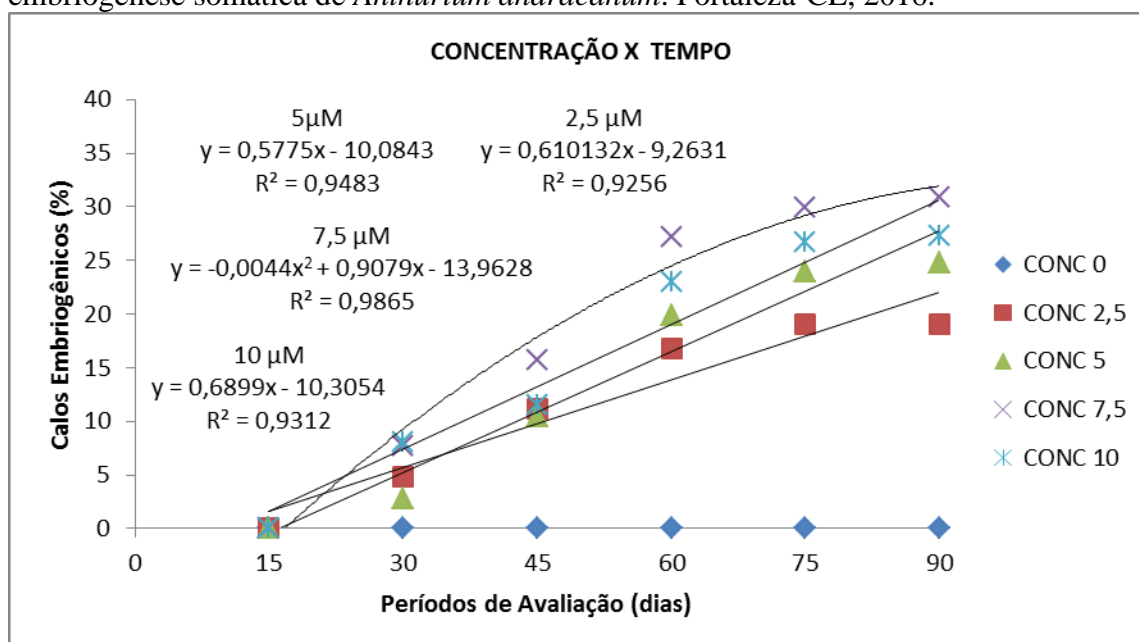
Os resultados dos desdobramentos mostrando os diferentes efeitos das cultivares Luau e Jureia nas interações com os reguladores de crescimento, concentrações destes reguladores e períodos de avaliação, são pertinentes. Jie (2006), induziu embriogênese somática em cinco cultivares de antúrio, e destas, apenas uma (cultivar Sonate) apresentou significativa diferença no potencial de indução à embriogênese somática, com maior sensibilidade a esta rota de morfogênese *in vitro*. Guerra, Torres e Teixeira (1999) afirmam que as respostas às condições de cultivo podem variar quanto à fonte de explante e em função da espécie estudada. Krishnaraj e Vasil (1995) acrescentam que o genótipo é considerado um fator muito importante no desenvolvimento e na fisiologia dos explantes e, portanto, nas respostas destes em cultura de tecidos. Assim, em virtude da variedade de respostas morfogênicas propiciadas pela genótipo-dependência, os procedimentos de propagação *in vitro* devem apresentar especificações quanto aos diferentes genótipos de *Anthurium*.

É importante também ressaltar que o tipo de explante utilizado no presente estudo foi responsivo para a embriogênese somática. Este fato é relevante, pois dentro de um determinado genótipo, alguns explantes podem ser competentes para a embriogênese e outros não (GUERRA; TORRES; TEIXEIRA, 1999; JIMÉNEZ, 2001; 2005), o que pode ser confirmado para antúrio em pesquisa conduzida por Pinheiro e colaboradores (2014). Estes autores utilizaram como explantes segmentos nodais contendo apenas um nó, pecíolo, segmentos de raiz sem o ápice, folhas completas e folhas seccionados perpendicularmente à nervura central, para indução à embriogênese somática em antúrio cultivar Eidibel. Os explantes mais competentes para a indução de calos embriogênicos foram derivados a partir de pecíolos e segmentos nodais; sendo os

explantes de segmento nodal mais sensíveis. Em contraste, os explantes de folha inteira, folha seccionada e segmentos de raiz não produziram calos embriogênicos, tornando-se oxidados após cinco semanas em cultura.

A figura 5 apresenta a análise de regressão do desdobramento da interação entre os períodos de avaliação e níveis de concentração dos reguladores de crescimento, referente à presença de calos embriogênicos.

Figura 5 – Análise de regressão do desdobramento do efeito da interação entre períodos de avaliação e níveis de concentração, referente à presença de calos embriogênicos, durante 90 dias após a inoculação de segmentos nodais em meio de indução à embriogênese somática de *Anthurium andraeanum*. Fortaleza-CE, 2016.



Fonte: Priscila Bezerra dos Santos Melo.

Para a concentração 0 µM, a regressão não foi significativa, já que não houve formação de calo embriogênico para os meios sem adição de regulador de crescimento. Para os níveis de concentração 2,5, 5,0 e 10 µM, as análises de regressão demonstraram que os modelos estatísticos se ajustaram aos dados em regressão linear ($R^2 = 0,9256$; $R^2 = 0,9483$; $R^2 = 0,9312$, respectivamente). Assim, estes níveis de concentração apresentaram médias de percentual de calos embriogênicos que aumentaram, em função do aumento do tempo de permanência em meio de indução à embriogênese somática. No entanto, este aumento foi mais acentuado para as concentrações de 5,0 e 10 µM, enquanto para o nível de 2,5 µM, o aumento ocorreu de forma mais paulatina, apresentando médias de percentual de calo embriogênico

inferiores àquelas apresentadas para os demais níveis de concentração dos reguladores de crescimento, obtendo maior média de 19,8 %, aos 90 dias de avaliação. Para os níveis de concentração 5,0 e 10 μM , o aumento das médias de percentual de calos embriogênicos ocorreu de forma similar, sendo que para estes níveis de concentração as médias máximas foram de 24,74 % e 25,81%, respectivamente.

Para o nível de concentração 7,5 μM , a análise de regressão demonstrou que o modelo estatístico se ajustou aos dados em regressão quadrática ($R^2 = 0,9865$). Assim, para este nível de concentração, as médias de percentual de calos embriogênicos apresentaram um aumento, em função do tempo de permanência em meio de indução à embriogênese somática, que ocorreu de forma mais acentuada até os 60 dias (25,64 %). A partir desse período, o aumento do percentual de calos embriogênicos passou a ocorrer de forma mais gradual. Esse fato demonstra uma estabilidade na formação de calos embriogênicos, o que pode ser atribuída à uma provável perda da capacidade de indução à embriogênese somática pelo tempo prolongado de permanência dos explantes no meio de indução, com 7,5 μM de concentração dos reguladores de crescimento. É importante observar que a partir dos 45 dias de permanência no meio de cultivo, as médias obtidas pelo nível de concentração de 7,5 μM , se apresentaram superiores àquelas apresentadas pelos demais níveis de concentração, alcançando o máximo de percentual de calos embriogênicos no período de avaliação de 90 dias (30,88 %). No entanto, apesar deste período apresentar as maiores médias para todas as concentrações, estas são bem similares àquelas verificadas aos 75 dias de avaliação, o que significa uma economia de tempo de 15 dias para obtenção de calos embriogênicos a uma taxa similar.

Esses resultados evidenciam que para as cultivares de antúrio Jureia e Luau, dentre os cinco níveis de concentração testados, o mais adequado para obter calos embriogênicos em maior quantidade e menor período de tempo é a concentração de 7,5 μM , e o período de 75 dias é ideal para obtenção de percentual de calos embriogênicos satisfatório, segundo o potencial de formação de calos embriogênicos pelas cultivares em estudo.

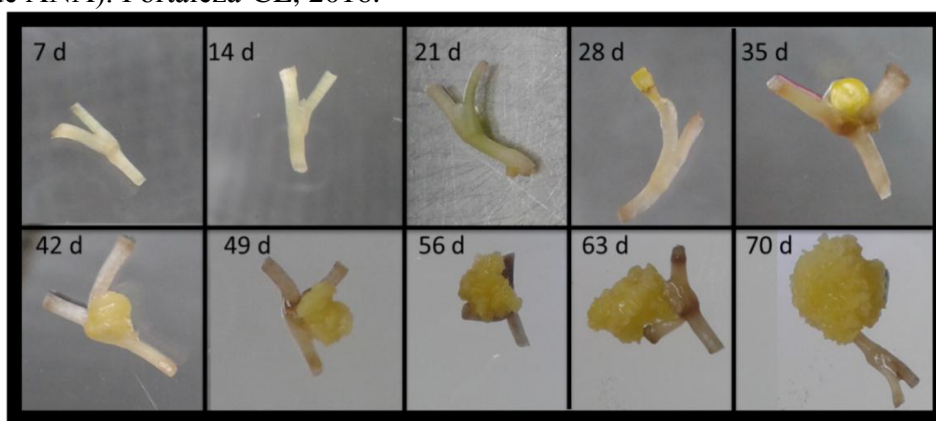
Com relação à hipótese de perda do potencial embriogênico discutido anteriormente, Guerra, Torres e Teixeira (1999) ressaltam que a manutenção prolongada das culturas embriogênicas em meio com 2,4 D pode induzir variações genéticas e epigenéticas afetando seu potencial embriogênico. Além disso, os embriões somáticos

podem tornar-se habituados durante períodos prolongados de subcultivos em 2,4 D, resultando na perda de potencial de maturação, e conseqüentemente, da capacidade de conversão dos embriões em plantas.

3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

As amostras coletadas para realização da microscopia eletrônica de varredura podem ser observadas, a partir do 7º dia de cultivo em meio de indução à embriogênese somática, nas figuras 6 e 7, para Jureia e Luau, respectivamente.

Figura 6 – Amostras de explantes de segmento nodal ($\pm 1,0$ cm de tamanho) de *Anthurium andraeanum* cultivar Luau, utilizadas na microscopia eletrônica de varredura, para análise tridimensional das estruturas formadas aos 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63 e 70 dias (d) de cultivo em meio de indução à embriogênese somática (ESA + 7,5 μ M de ANA). Fortaleza-CE, 2016.



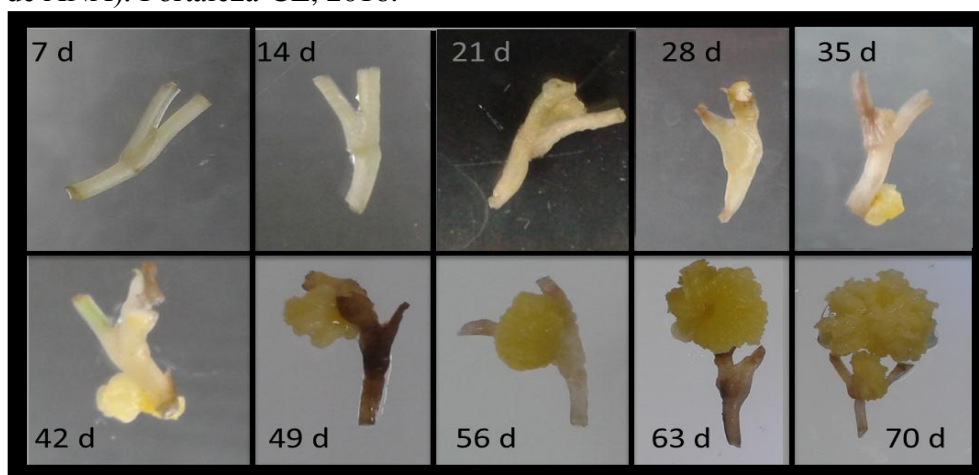
Fonte: Priscila Bezerra dos Santos Melo.

Pode-se visualizar que as estruturas formadas no decorrer dos 70 dias em que os explantes foram submetidos ao meio de indução à embriogênese somática, apresentaram-se friáveis, de coloração amarela e de crescimento radial. Em outras palavras, os calos que foram formados possuem células com formato arredondado (isodiamétrico) e mais facilmente separáveis umas das outras. Essas células possuem características meristemáticas, sendo promissoras quando se busca a embriogênese somática. Estas mesmas observações foram feitas por Pinheiro (2010), para as estruturas formadas em explantes nodais de antúrio cultivar Eidibel, após a quinta semana de cultivo em meio ESA adicionado de 10 μ M de ANA.

Ainda analisando-se as mesmas figuras, pode-se observar que as duas cultivares apresentaram desenvolvimento de calos de forma similar, e que o registro

dessas estruturas só ocorreu, para as duas cultivares, a partir dos 21 dias de cultivo em meio de indução à embriogênese somática.

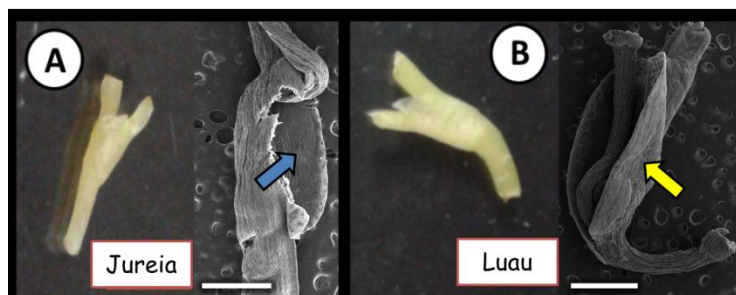
Figura 7 – Amostras de explantes de segmento nodal ($\pm 1,0$ cm de tamanho) de *Anthurium andraeanum* cultivar Jureia, utilizadas na microscopia eletrônica de varredura, para análise tridimensional das estruturas formadas aos 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63 e 70 dias (d) de cultivo em meio de indução à embriogênese somática (ESA + 7,5 μ M de ANA). Fortaleza-CE, 2016.



Fonte: Priscila Bezerra dos Santos Melo.

Para as cultivares Jureia e Luau, o aspecto tridimensional dos explantes antes de serem submetidos ao cultivo em meio de cultura de indução à embriogênese somática, pode ser observado na figura 8. Nota-se que não há intumescimento das células e que uma bainha recobre a gema.

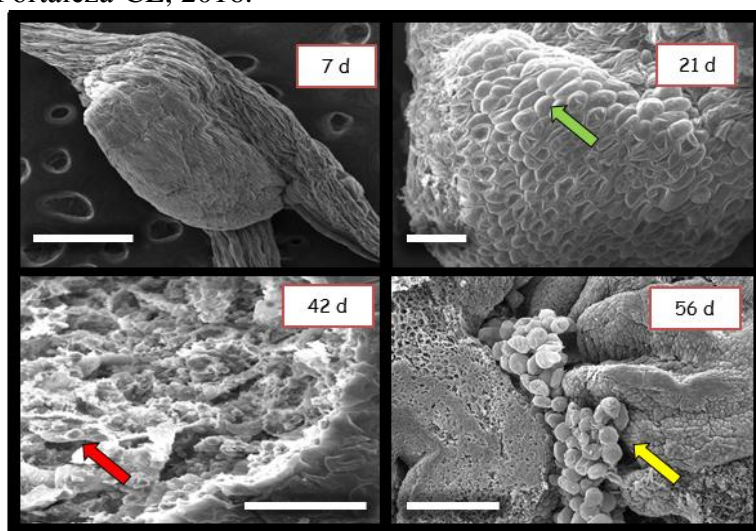
Figura 8 – Amostras de explantes de segmento nodal ($\pm 1,0$ cm de tamanho) das cultivares de *Anthurium andraeanum* Jureia (figura A) e Luau (figura B), antes do cultivo em meio de cultura de indução à embriogênese somática, e suas respectivas imagens ultraestruturais, obtidas por microscopia eletrônica de varredura. A seta azul indica as células do explante sem presença de intumescimento na figura A, e a seta amarela indica a bainha que recobre a gema do explante na figura B. Barras: 1mm. Fortaleza-CE, 2016.



Fonte: Priscila Bezerra dos Santos Melo.

A partir da microscopia eletrônica de varredura, foram selecionadas as imagens que apresentaram as informações mais relevantes sobre o desenvolvimento dos calos embriogênicos, para as cultivares Jureia e Luau (Figuras 9 e 10, respectivamente).

Figura 9 – Imagens, obtidas por microscopia eletrônica de varredura, das amostras de explantes de segmento nodal de *Anthurium andraeanum* cultivar Jureia, correspondentes aos 7, 21, 42 e 56 dias de cultivo em meio de indução à embriogênese somática (ESA + 7,5 μ M de ANA). A seta verde indica células intumescidas e alongadas. A seta vermelha indica células com formato arredondado. A seta amarela indica células individualizadas. Barras: 500 μ m (7 d); 100 μ m (21 d); 50 μ m (42 d); 200 μ m (56 d). Fortaleza-CE, 2016.



Fonte: Priscila Bezerra dos Santos Melo.

Aos 7 dias de cultivo, as amostras das cultivares Jureia e Luau, apresentaram aspecto estrutural similar àquele observado nas amostras de 0 dias de cultivo. Porém, aos 21 dias de cultivo, as amostras correspondentes as duas cultivares, apresentaram intumescimento proeminente, indicando intensa divisão celular. A partir do intumescimento, as células passaram de formato alongado para um formato arredondado. Aos 42 dias de cultivo, foi possível visualizar nitidamente estas células por dentro da estrutura do calo, para as cultivares Jureia e Luau. Com a medida do passar do tempo, as células foram se tornando cada vez mais individualizadas, as quais passaram a ser semelhantes à embriões somáticos em estágio globular. As imagens das amostras dos 56 dias, para Jureia e 70 dias para Luau, demonstram essas observações.

Resultados similares foram relatados por Pinheiro (2014). Por microscopia eletrônica de varredura e análises histológicas, este autor acompanhou o desenvolvimento de embriões somáticos em antúrio Eidibel. Apenas aos 15 dias, em

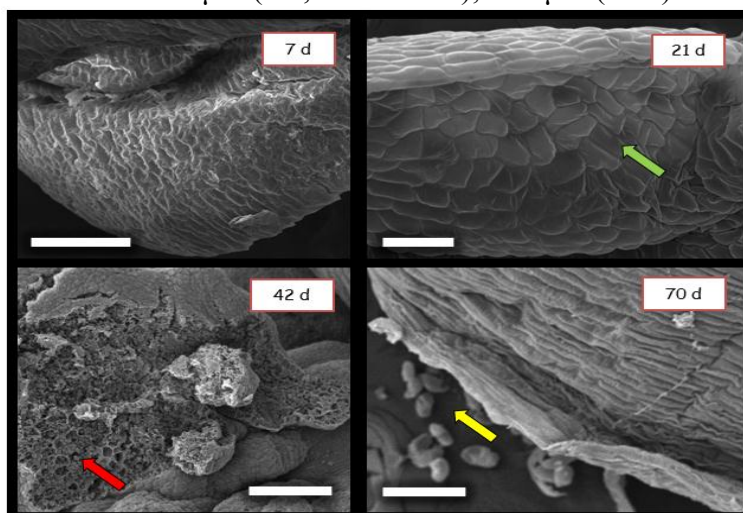
meio de indução de embriogênese somática, o meristema axilar dos explantes apresentou intumescimento. Aos 40-45 dias os calos embriogênicos tornaram-se visíveis, após rompimento da epiderme do segmento nodal. Aos 50-55 dias foi possível observar a formação de calos embriogênicos friáveis, a partir da diferenciação das células meristemáticas. Aos 90 dias houve o aumento do tamanho dos calos embriogênicos de coloração amarela, sendo evidenciados embriões somáticos.

O formato isodiamétrico é característico de células meristemáticas (MURASHIGE; SKOOG, 1962), sendo que os calos embriogênicos são compostos, em sua maioria, por células meristemáticas com dimensões relativamente pequenas e com citoplasma denso (APPEZZATO-DA-GLÓRIA; CARMELLO-GUERREIRO, 2003).

Em trabalho desenvolvido por Jie (2006), a indução à embriogênese somática em cinco cultivares de antúrio foi acompanhada por microscopia eletrônica de varredura. Os resultados mostraram que as células de calos embriogênicos eram pequenas e isométricas. Foram identificadas, ainda, massas celulares que consistiam em muitas células embriogênicas, as quais tinham formato esférico.

Dessa forma, com base nas observações que foram feitas no presente estudo, constata-se que as estruturas formadas nos explantes de antúrio Jureia e Luau corresponderam a calos embriogênicos.

Figura 10 – Imagens, obtidas por microscopia eletrônica de varredura, das amostras de explantes de segmento nodal de *Anthurium andraeanum* cultivar Luau, correspondentes aos 7, 21, 42 e 70 dias de cultivo em meio de indução à embriogênese somática (ESA + 7,5 μ M de ANA). A seta verde indica células intumescidas e alongadas. A seta vermelha indica células com formato arredondado. A seta amarela indica células individualizadas. Barras: 200 μ m (7 d, 42 d e 70 d); 100 μ m (21 d). Fortaleza-CE, 2016.



Fonte: Priscila Bezerra dos Santos Melo.

4 CONCLUSÕES

A indução à embriogênese somática é viável como primeira etapa na obtenção de mudas de antúrio (*Anthurium andraeanum*), a partir de embriões somáticos, para as cultivares Luau e Jureia.

A microscopia eletrônica de varredura é eficiente para identificar a formação de calos embriogênicos durante a embriogênese somática de Luau e Jureia.

A adição de auxina, ao meio de cultura ESA (Pierik, 1976 modificado), é necessária para que ocorra a formação de calos embriogênicos, a partir de segmentos nodais das cultivares Jureia e Luau. O início de formação destes calos se dá com aproximadamente 4 semanas.

Entre as cultivares estudadas, a cultivar Luau é a mais responsiva à embriogênese somática, e a cultivar Jureia mais propensa a sofrer oxidação a partir de explantes de segmentos nodais.

Para obtenção de uma eficiente indução à embriogênese somática das cultivares de antúrio Luau e Jureia, é indicado que o meio ESA seja suplementado com o regulador de crescimento ANA, na concentração de 7,5 μM . Os explantes devem permanecer em meio de indução à embriogênese somática, até os 75 dias após a inoculação.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALCANTARA, G.B.; DIBAX, R.; OLIVEIRA, R.A.; BESPALHOK FILHO, J.C.; DAROS, E. Plant regeneration and histological study of the somatic embryogenesis of sugarcane (*Saccharum* spp.) cultivars RB855156 and RB72454. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 36, p. 63-72, 2014.
- ALVES, E. **Introdução à microscopia eletrônica**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2004. 88 p.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. **Anatomia Vegetal**; Viçosa - Editora UFV, 438p, 2003.
- BASSAN, J. S.; REINIGER, L. R. S.; ROCHA, B. H. G.; SEVERO, C. R. P.; FLORES, 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, v. 16, n. 4, p. 381- 390, 2006.
- BAUTISTA, N. R.; PEÑALVER, D. A.; RODRÍGUEZ, R. B.; CHIU, W. C.; LÓPEZ, R. C.; TERRY, F. J.; PERALTA, M. P.; MARTÍNEZ, O. G. Embriogénesis somática en (*Anthurium andraeanum* Lind.) variedad „Lambada“. **Ra Ximhai**, México, v. 4, n. 1, p. 135-149, 2008.
- BEYRAMIZADE, E.; AZADI, P.; MII, M. Optimization of factors affecting organogenesis and somatic embryogenesis of *Anthurium andreanum* Lind ‘Tera’. **Propag Ornament Plant**, v. 8, p. 198–203, 2008.
- BHATTACHARYA, C.; DAM, A.; KARMAKAR, J.; BANDYOPADHYAY, T. K. Direct somatic embryogenesis and genetic homogeneity assessment of regenerated plants of *Anthurium andraeanum* Linden cv. Fantasia. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, p. 1-8, 2016.
- CARNEIRO, I.F. **Adequação de técnicas de cultura *in vitro* da obtenção de mudas de bananeira (Musa AAB) cultivar Maçã**. 1997. 106f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 1997.
- CARVALHO, A. C. P. P.; PINHEIRO, M. V. M.; DIAS, G. M. G.; MORAIS, J. P. S. Multiplicação *in vitro* de abacaxi ornamental por estiolamento e regeneração de brotações. **Revista Horticultura Brasileira**, v. 27, n. 1, p. 103-108, 2009.
- CARVALHO, A. C. P. P.; PINHEIRO, M. V. M.; DIAS, G.M. G.; BARROS, L.M. Estiolamento *In Vitro*: Uma Alternativa para a Produção de Mudas Micropropagadas de Antúrio. **Embrapa Agroindústria Tropical /Circular Técnica**, 36. Fortaleza, CE: Embrapa Agroindústria Tropical, 2011. 8 p.
- CARVALHO, A. C. P. P.; PINHEIRO, M. V. M.; MARTINS, F. B.; CRUZ, A. C. F.; OTONI, W. C.; TOMBOLATO, A. F. C; CASTRO, A. C. R. Micropropagação do Antúrio. *In*: JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. S. **Aspectos práticos da micropropagação de plantas**, Brasília (DF), p. 227-257, 2013.

- FILIPPI, S. B.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; RODRIGUEZ, A. P. M. Variações morfológicas de embriões somáticos obtidos a partir de inflorescências de bananeira. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 58, n. 4, p. 711-716, 2001.
- GAJ, M.D. Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh **Plant Growth Regulation**, v. 43, p. 27-47, 2004.
- GEORGE, E.F.; SHERRINGTON, P.D. **Plant propagation by tissue culture**. Hants: Exegetics Limited, 1984. 709p
- GUERRA, P. G.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. *In*: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, I. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI; EMBRAPA-CNPQ, v. 2, p. 533-568, 1999.
- HADDAD, M. L.; VENDRAMIM, J. D. Comparação de porcentagens observadas com casos extremos de 0 a 100%. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 30, n.4. 2000.
- HAMIDAH, M.; KARIN, A. G. A.; DEBERGH, P. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Anthurium scherzerianum*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 48, n. 3, p. 189-193, 1997.
- HOU, S.W.; JIA, J.F. High frequency plant regeneration from *Astragalus melilotoides* hypocoty and stem explants via somatic embryogenesis and organogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 79, p. 95-100, 2004.
- JIE, X. W. **Somatic embryogenesis and physiological and biochemical characteristics of *Anthurium***, 2006. Dissertation (Master's thesis in Ornamental Plants and Horticulture) – Nanjing Agricultural University (NAU). China, 2006.
- JIMÉNEZ, V. M. Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 13, p. 196-223, 2001.
- JIMÉNEZ, V. M. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. **Plant Growth Regulation**, v. 47, p. 91-110, 2005.
- JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, M. S. Balanço do comércio exterior da floricultura brasileira. **Hórtica consultoria e treinamento**, 2011.
- 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.
- KUEHNLE, A. R.; CHEN, F. C.; SUGII, N. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Anthurium andraeanum* hybrids. **Plant Cell Reports**, New York, v. 11, n. 9, p. 438-442, 1992.

- LITZ, R. E.; CHAVEZ, V. C.; MOON, P. A. Induction of embryogenic cultures from mature-phase tropical and subtropical trees and control of somatic embryo maturation and germination. *In*: MANTELL, S.H.; BRUNS, S.; TRAGARDH, C.; VIANA, A.M. (Ed.). **Recent advances in biotechnology for conservation and management.**, Stockholm: International Foundation for Science, p. 232-243, 1998.
- LUZ, P. B.; ALMEIDA, E. F. A.; PAIVA, P. D. O.; RIBEIRO, T. R. Cultivo de flores tropicais. **Informe Agropecuário**, v. 26, n. 227, p. 67-72, 2005.
- MA, J.; HE, Y.; WU, C.; LIU, H.; HU, Z.; SUN, G. Cloning and molecular characterization of a SERK gene transcriptionally induced during somatic embryogenesis in *Ananas comosus* cv. Shenwan. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 30, p. 195-203, 2012.
- 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**, Ashford Kent, v. 65, n. 2, p.103-111, 1990.
- MARTIN, K. P.; DOMINIC, J.; MADASSERY, J.; PHILIP V. J. Direct shoot regeneration from lamina explants of two commercial cut flower cultivars of *Anthurium andraeanum* Hort. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 39, p. 500-504, 2003.
- MONACO, L.C.; SÖNDAHL, M.R.; CARVALHO, A.. Applications of tissue culture in the improvement of coffee. *In*: REINERT, J.; BAJAJ, Y.P.S. **Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture**. Berlin: Springer-Verlag, p.109-126, 1977.
- MOURA, E.F.; VENTRELLA, M.C.; MOTOIKE, S.Y.; SÁ JÚNIOR, A.Q.; CARVALHO, M.; MANFIO, C.E. Histological study of somatic embryogenesis induction on zygotic embryos of macaw palm (*Acrocomia aculeate* (Jacq.) Lodd. ex Martius). **Plant Cell Tissue Organ Culture**, Lavras, v. 95, p. 175-184, 2008.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v. 25, n. 3, p. 473-497, 1962.
- NISHIWAKI, M.; FUJINO, K.; KODA, Y.; MASUDA, K.; KIKUTA, Y. Somatic embryogenesis induced by the simple application of abscisic acid to carrot (*Daucus carota* L.) seedlings in culture. **Planta**, Berlin, v. 211, n. 5, p. 756-759, 2000.
- PARAMAGEETHAM, C.; BABU, G. P.; RAO, J. V. S. Somatic embryogenesis in *Centella asiatica* L. an important medicinal and nutraceutical plant of India. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 79, p. 19-24, 2004.
- PARROT, W. A.; MERKLE, S. A.; WILLIAMS, E.G. Somatic embryogenesis: potential for use in propagation and gene transfer systems. *In*: MURRAY, D.R. **Advanced methods in plant breeding and biotechnology**. Melkham: Redwood, p.158-200, 1991.

- PIERIK, R. L. M. *Anthurium andraeanum* Lindl. plantlets produced from callus tissuescultivated in vitro. *Physiologia Plantarum*, Oxford, v. 37, p. 80-82, 1976.
- PINHEIRO, M. V. M. **Propagação in vitro de antúrio (*Anthurium andraeanum* cv. Eidibel) via embriogênese somática**. 2010. 67 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Departamento de Biologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa (MG), 2010.
- PINHEIRO, M. V. M. **Propagação fotoautotrófica de *Etinglera elatior* 'Porcelana' e aspectos anatômicos e caracterização e expressão do gene *SERK* na embriogênese somática em *Anthurium andraeanum* 'Eidibel'**. 2014. Tese (Doutorado em Botânica) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa (MG), 2014.
- PINHEIRO, M. V. M.; MARTINS, F. B.; CRUZ, A. C. F.; CARVALHO, A. C. P. P.; OLIVEIRA, E. J.; OTONI, W. C. Somatic embryogenesis in anthurium (*Anthurium andraeanum* cv. Eidibel) as affected by different explants. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 36, n. 1, p. 87-98, 2014.
- PUCHOOA, D. *In vitro* mutation breeding of Anthurium by gamma radiation. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 7, n. 1, p. 11-20, 2005.
- RAEMAKERS, C. J. J. M.; JACOBSEN, E.; VISSER, R. G. F. Secondary somatic embryogenesis and applications in plant breeding. **Euphytica**, v. 81, p. 93-107, 1995.
- SIGMA-ALDRICH®. A parto f merck. 2016a. Disponível em:<
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/1naphthaleneaceticacid186218687311?lang=pt®ion=BR>>. Acesso em: ago/2016.
- SIGMA-ALDRICH®. A parto f merck. 2016b. Disponível em:<
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/picloram24146191802111?lang=pt®ion=BR>>. Acesso em: ago/2016.
- SILVA, D. P. C. **Embriogênese somática e potencial uso de marcadores moleculares embriogênicos em *Byrsonima intermedia* A. Juss. (murici-pequeno)**. 2012. 125 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras (MG), 2012.
- STEINER, N.; VIEIRA, F. N.; SARA, M. S.; GUERRA M. P. Effect of carbon source on morphology and histodifferentiation of *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 48, n. 6, p. 895-903, 2005.
- TE-CHATO, S.; SUSANON, T.; SONTIKUN, Y. Cultivar, explant type and culture medium influencing embryogenesis and organogenesis in *Anthurium* spp. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 28, n. 4, p. 717-722, 2006.
- TEIXEIRA, J. B. **Limitações ao processo de cultivo in vitro de espécies lenhosas**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001.

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

TOMBOLATO, A. F. C.; FURLANI, P. R.; CASTRO, C. E. F. de; MATHES, L. A. F.; TAGLIACOZZO, G. M. D.; SAES, L. A.; RIVAS, E. B.; COUTINHO, L. C.; BERGMAN, E. C.; IMENES, D. L.; COSTA, A. M.; LEME, J. M. C. (Ed.). **Cultivo comercial de plantas ornamentais**. Campinas: Instituto Agronômico de Campinas, p. 61-94, 2004.

XIN, W.; XU, B.; WANG, G. D.; GUO, W. M.; WEN, F. D.; JIN, J. P. Somatic embryogenesis and plant regeneration of *Anthurium andraeanum*. **Acta Horticulturae Sinica**, v. 33, p. 1281–1286, 2006.

CAPÍTULO II – IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES ISSR PARA CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE QUATRO CULTIVARES DE ANTÚRIO

Resumo - O antúrio é uma flor tropical de grande importância para o mercado de ornamentais, apresentando elevado valor de comercialização. A principal espécie de importância econômica do gênero é o *Anthurium andraeanum* Linden. Como forma de contribuir para o sucesso do cultivo do antúrio e proteção de cultivares, é de suma importância que estas sejam precisamente caracterizadas. A caracterização das cultivares da espécie, por meio de marcadores moleculares, é uma ferramenta bastante útil para atender o critério de distinguibilidade de cultivares. Assim, objetivou-se com esse trabalho identificar marcadores moleculares para caracterização das cultivares de antúrio Sublime, Luau, Jureia e Maré, utilizando-se amostras de DNA de calos embriogênicos, obtidos por embriogênese somática indireta, e folhas oriundas de mudas estabelecidas *in vitro*, obtidas por organogênese indireta. Foi realizada a extração de DNA a partir das amostras coletadas para cada cultivar. Foram selecionados 18 marcadores ISSR para caracterização molecular das cultivares de antúrio. Os produtos da PCR foram visualizados por eletroforese e, posteriormente, foram coletados dados de presença (1) e ausência (0) de bandas, as quais foram utilizadas para construir a matriz de dissimilaridade genética, utilizando-se o coeficiente de Jaccard. O método de agrupamento foi o UPGMA, obtendo-se o dendrograma por análise multivariada. Foi constatado que todos os marcadores ISSR utilizados apresentaram polimorfismo e foram eficientes para caracterizar e diferenciar as amostras de antúrio estudadas. Pôde-se identificar marcadores cultivar-específicos. Quanto às distâncias genéticas, a cultivar Sublime revelou-se como a geneticamente mais estável, e a cultivar Maré, como a mais instável. Estes resultados permitem um maior conhecimento das características inerentes de cada cultivar avaliada, sendo aplicáveis para fins de otimização das condições de cultivo, indicação dos melhores cruzamentos para obtenção de híbridos e até mesmo, na proteção das cultivares.

Palavras-chave: Proteção de cultivares. *Fingerprinting*. Identidade genética.

IDENTIFICATION OF ISSR MARKERS FOR MOLECULAR CHARACTERIZATION OF FOUR ANTHURIUM'S CULTIVARS

Abstract - Anthurium is a tropical flower of great importance for the ornamental market, with marketing value. The main species of economic importance of the genus is the *Anthurium andraeanum* Linden. The precise characterization of anthurium's cultivars contribute to the success of anthurium cultivation and is very much important for cultivars protection. The characterization of cultivars by molecular markers is a useful tool to meet the criterion of distinctness of cultivars. Thus, the aim of this study was to identify molecular markers for the characterization of the anthurium's cultivars Sublime, Luau, Jureia and Maré, using DNA samples from embryogenic calli, obtained by indirect somatic embryogenesis, and leaves of *in vitro* established plantlets, obtained by indirect organogenesis. DNA extraction was performed using the samples collected for each cultivar. It was selected 18 ISSR markers for the molecular characterization of the anthurium's cultivars. The PCR products were visualized by electrophoresis and thereafter, data of presence (1) or absence (0) of bands was collected, which were used to construct a genetic dissimilarity matrix, using the Jaccard coefficient. The grouping method used was the UPGMA and the dendrogram was obtained by multivariate analysis. It was found that all ISSR markers used, exhibited polymorphism and that they were efficient to characterize and differentiate anthurium's samples studied. It was possible to identify markers cultivar specific. As for the genetic distances, it was found that the cultivar Sublime is the most genetically stable among the studied cultivars, and the cultivar Maré the most unstable. These results allow a better understanding of the inherent characteristics of each cultivar evaluated, and they can be apply for optimization purposes of the best conditions of cultivation, crosses indication to obtain hybrids and even to the cultivars protection.

Keywords: Cultivars protection. *Fingerprinting*. Genetic identity.

1 INTRODUÇÃO

Dentre as flores tropicais que têm apresentado interesse econômico, o cultivo do antúrio (*Anthurium andraeanum* Linden) em vaso e como flor de corte, apresenta boa aceitação nos mercados interno e externo. Dessa forma, existem perspectivas favoráveis para elevar a sua produção, comercialização e consumo, em ambos os mercados (ANEFALOS, TOMBOLATO; RICORDI, 2010).

Os esforços voltados para obtenção de uma propagação cada vez mais eficiente da cultura têm proporcionado uma área de cultivo do antúrio que cresce continuamente desde 1991, com a evolução de sua tecnologia de cultivo, uniformidade de plantas e material básico livre de doenças e vírus. Tais características foram conseguidas através do uso da cultura de tecidos, pelo uso de variedades e tecnologias que contribuíram para o aumento da produtividade e expansão de mercado (VAN HERK *et al.*, 1998). No entanto, uma das técnicas que ainda podem contribuir efetivamente para o sucesso do cultivo de antúrio é a caracterização dos genótipos da espécie, por meio da utilização de marcadores moleculares (CAIXETA *et al.*, 2009).

Os marcadores moleculares podem acessar diretamente o genótipo de um indivíduo, evitando, assim, a expressão do fenótipo e a influência do ambiente sobre este (MILACH, 1999). Dessa forma, são tidos como ferramentas úteis para detecção de variações no genoma, aumentando o poder da análise genética de plantas (CAIXETA *et al.*, 2009), o que permite o conhecimento inerente das características específicas de cada cultivar para fim de melhoramento (CASTRO *et al.*, 2004) e a precisa distinção de indivíduos geneticamente diferentes (BORÉM, 1997), atendendo o requisito de distinguibilidade da Lei de Proteção de Cultivares de nº 9.456 (MILACH, 1999).

São vários os tipos de marcadores moleculares disponíveis e estes se diferenciam pela metodologia empregada para revelar variabilidade em nível de DNA. Os principais tipos de são identificados por hibridização ou amplificação de DNA por PCR (Polymerase Chain Reaction) (MILACH, 1998).

Dentre os marcadores moleculares identificados por PCR estão os ISSR, os quais representam uma das classes mais recentes. Esses marcadores apresentam alto grau de polimorfismo, baixo custo e alta reprodutibilidade, sendo ideais para serem empregados em estudos de diversidade genética, correlações filogenéticas, dentre outros (LIMA, 2012).

Visando contribuir para a otimização das condições de cultivo, indicação dos melhores cruzamentos para obtenção de híbridos e a proteção de cultivares, objetivou-se com esse trabalho identificar marcadores moleculares ISSR para caracterização molecular das cultivares de antúrio Sublime, Luau, Jureia e Maré, utilizando-se DNA de calos embriogênicos, oriundos de embriogênese somática indireta, e folhas, oriundas de mudas estabelecidas *in vitro*, por organogênese indireta.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular, pertencente à Embrapa Agroindústria Tropical (CNPAT), em Fortaleza (CE).

Como material vegetal, foram utilizadas as cultivares de *Anthurium andraeanum* Jureia, Luau, Maré e Sublime, cedidas pelo Instituto Agronômico (IAC), em Campinas, São Paulo.

2.1 Extração de DNA

A extração de DNA seguiu o protocolo de Cavalcanti (2004), com modificações (Apêndice A), o qual utiliza o tampão de extração CTAB 2 %, cujos componentes são: 100 mM de TRIS-HCL (pH 8,0); 20 mM de EDTA (etilenodiamino tetra-acético); 1,4 M de NaCl; 2% de CTAB (brometo de cetil-trimetilamônio) e 2% de PVP 40 (polivinilpirrolidona).

Para cada cultivar, foram coletadas duas amostras para a extração do DNA, as quais foram constituídas de folhas de mudas de antúrio, pré-estabelecidas *in vitro* por organogênese indireta, e calos embriogênicos, obtidos por embriogênese somática indireta. As mudas pré-estabelecidas *in vitro* estavam sendo mantidas em meio Pierik sem adição de reguladores de crescimento. O meio de indução dos calos embriogênicos foi o ESA + 10 µM de ANA. Esse meio foi utilizado por ser eficiente na indução à embriogênese somática em antúrio (PINHEIRO, 2010). Assim, o material vegetal utilizado no experimento constou de oito amostras: duas amostras diferentes de DNA para cada uma das quatro cultivares. A identificação dessas amostras está apresentada na tabela 1.

Os DNAs extraídos foram quantificados em espectrofotômetro NanoDrop 2000 e, em seguida, diluídos em água ultra pura (miliQ) para a concentração de 10 ng/µl. A partir das soluções diluídas realizaram-se as reações de PCR. Os DNAs extraídos foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose a 1,8%, preparado em TBE (90 mM Tris-ácido bórico/ 1 mM EDTA) com concentração final 1X, corado com brometo de etídio. O peso molecular de cada fragmento amplificado foi estimado com base no marcador de DNA 1 kb ladder (Invitrogen).

Tabela 1 – Identificação das amostras de DNA utilizadas para a condução do experimento de identificação de marcadores moleculares ISSR, para a caracterização molecular do antúrio. Fortaleza-CE, 2016

Identificação das Amostras de Antúrio	Cultivar	Identificação das Amostras de DNA
1	Luau	Folha (LF)
2	Sublime	Folha (SF)
3	Maré	Folha (MF)
4	Jureia	Folha (JF)
5	Luau	Calo (LC)
6	Sublime	Calo (SC)
7	Maré	Calo (MC)
8	Jureia	Calo (JC)

Fonte: Priscila Bezerra dos Santos Melo.

2.2 Amplificação do DNA

Foram realizados testes preliminares de amplificação com 63 iniciadores ISSR da marca IDT (Integrated DNA Technologies), utilizando-se DNA de folhas e calos embriogênicos de duas cultivares de antúrio selecionadas ao acaso. Estes iniciadores foram escolhidos com base na temperatura de anelamento (47 a 54 °C) da PCR. Após a amplificação, foi feita a eletroforese, permitindo a visualização do produto da PCR em gel de agarose. Assim, com base nos melhores resultados quanto à amplificação em termos de polimorfismo e nitidez das bandas geradas, dos 63 iniciadores testados, foi possível selecionar 27 para serem aplicados na amplificação das quatro cultivares de antúrio em estudo. Por fim, foram selecionados 18 iniciadores, os quais apresentaram polimorfismo na amplificação de todas as amostras de antúrio.

As reações de amplificação foram feitas em um volume final de 25 µl, compostas por: 2,5 µl de tampão de reação 10x; 1,0 µl de MgCl₂ 50 mM; 0,50 µl de dNTPs (2,5 mM/nucleotídeo); 2,0 µl de DNA (10 ng/µl); 2,0 µl de cada iniciador (10µM); 0,2 µl de Taq DNA polymerase platinum (5 U/µl) e água miliQ para completar o volume da reação.

A PCR foi realizada nas seguintes condições: 5 minutos a 94 °C (desnaturação inicial), seguindo-se de 40 ciclos de desnaturação (94 °C por 1 minuto),

anelamento (47 a 55 °C, dependendo do iniciador, por 1 minuto) e extensão (72 °C por 1 minuto). Após os 40 ciclos, seguiu-se uma etapa de extensão final (72 °C por 5 minutos). As reações de amplificação foram realizadas em dois termocicladores, sendo um do modelo TC 512, e o outro do modelo FLEXIGENE, ambos da TECHNE. As reações foram preparadas isoladamente.

Após a amplificação, foi feita a eletroforese, na qual os produtos da PCR foram separados em gel de agarose (1,8%), corados com brometo de etídeo (0,5 µg/µL) e submetidos a 90 volts por 2 horas. Posteriormente, os géis foram visualizados sob luz UV e fotografados em fotodocumentador.

Foram feitas análises visuais dos géis de agarose para cada iniciador utilizado na amplificação das amostras de DNA de folhas e calos embriogênicos, de cada uma das cultivares de antúrio estudadas. A partir dos padrões de bandas obtidos com os marcadores ISSR foi elaborada uma matriz binária de dados, com base na presença (1) e ausência (0) de bandas. Com estas informações, foi calculada a porcentagem de polimorfismo total e por cada iniciador utilizado, por meio da *expressão 1* e a distância genética (dissimilaridade genética) entre as amostras, por meio do complemento do coeficiente de Jaccard (S_j), de acordo com a *expressão 2*.

$$P = \frac{nbp}{ntb} \times 100 \quad \text{Expressão 1}$$

Onde,

P: é a porcentagem de polimorfismo;

nbp: é o número de bandas polimórficas; e

ntb: é o número total de bandas.

$$S_j = \frac{A}{(A+B+C)} \quad \text{Expressão 2}$$

Em que,

A: presença da mesma banda em ambos os indivíduos (1-1);

B: presença da banda em um indivíduo e ausência no outro (1-0); e

C: ausência da banda em um indivíduo e presença no outro (0-1).

A partir da matriz de dissimilaridade genética, foi utilizado o método de agrupamento UPGMA (Método de média aritmética não ponderada) para a obtenção do dendrograma, utilizando-se análise multivariada. Também foi calculado o coeficiente de correlação cofenético (r), para avaliar a consistência do padrão de agrupamento, sendo que valores próximos à unidade indicam melhor representação (CRUZ, CARNEIRO; 2003).

O ponto de corte do dendrograma foi definido com base na estimativa da dissimilaridade genética média (D_{gm}):

$$D_{gm} = \frac{\sum D_{gij}}{N}$$

Onde,

D_{gij} : dissimilaridade genética entre os indivíduos i e j ;

N : número de pares obtidos.

As análises estatísticas foram realizadas no programa computacional Genes (CRUZ, 2008).

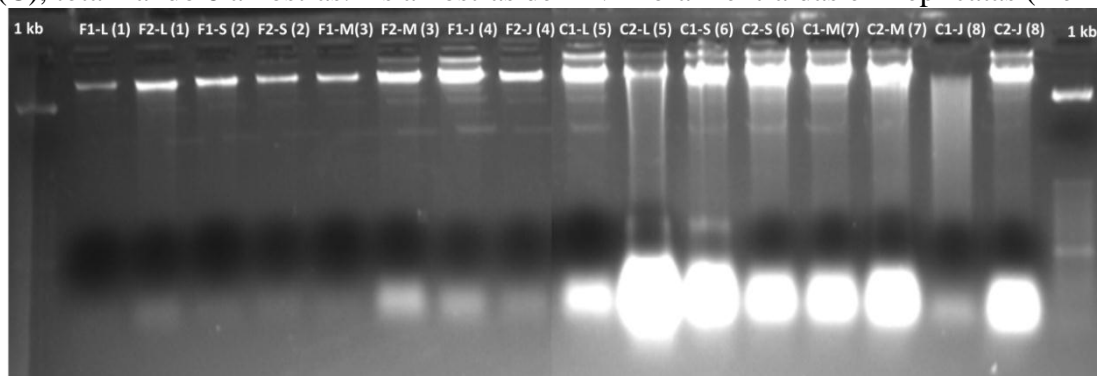
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Extração de DNA

Os DNAs extraídos das diferentes amostras obtidas para cada cultivar, estão expostos na figura 1. Com a quantificação dos DNAs extraídos, pode-se analisar a pureza destes, sendo verificada pelas relações A_{260}/A_{280} , as quais variaram de 2 a 2,2. Razões entre 1,8 e 2,2 são consideradas ideais (PARPINELLI; RIBEIRO, 2009). Assim, as amostras obtidas apresentaram boa qualidade, o que é essencial para prosseguir para a etapa de PCR, pois a integridade do DNA é fundamental para a nitidez e reprodutibilidade dos produtos de amplificação (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

As quantidades de DNA extraídas foram suficientes para realização de todas as reações, sendo observadas em maior abundância quando este foi extraído de amostras de calo embriogênico. A partir dos 30 dias de indução à embriogênese somática da cultivar de antúrio Eidibel, Pinheiro (2014) verificou, por meio de análises anatômicas, tanto em células em divisão, quanto em calos embriogênicos, grupo de células com citoplasma denso, núcleo grande e nucléolo evidente. Assim, a maior quantidade de DNA é explicada pela grande abundância de material nuclear das células de calo embriogênico, as quais apresentam alta taxa de divisão celular.

Figura 1 – Visualização dos DNAs extraídos em gel de eletroforese a 1,8% de agarose, em TBE. A primeira e última colunas correspondem ao marcador 1 kb da invitrogen. As demais colunas são as amostras dos DNAs de antúrio Luau (L), Sublime (S), Maré (M) e Jureia (J), a partir de folhas (F) de mudas estabelecidas *in vitro* e calos embriogênicos (C), totalizando 8 amostras. As amostras de DNA foram extraídas em replicatas (1 e 2).



Fonte: Priscila Bezerra dos Santos Melo.

3.2 Amplificação do DNA

Na tabela 2 estão listados os 18 marcadores selecionados para análise da diversidade genética entre as oito amostras (1-FL; 2-FS; 3-FM; 4-FJ; 5-CL; 6-CS; 7-CM e 8-CJ) de antúrio, os quais amplificaram um total de 175 fragmentos, havendo variação no número destes para cada iniciador. O número total de fragmentos polimórficos foi de 158, correspondendo a 90,28% de polimorfismo. Os polimorfismos individuais variaram de 57,14% (I 825) a 100% (I 810, I 811, I 817, I 826, I 828, I 844, I 855, I 856, I 858, I 859 e I 878). A média de fragmentos polimórficos gerados por iniciador foi de 8,78. O alto nível de polimorfismo indica que os iniciadores utilizados no presente trabalho são úteis para a caracterização das diferentes amostras de antúrio estudadas.

Souza Neto e colaboradores (2014), trabalhando com a caracterização molecular de 20 genótipos de *Anthurium andraeanum*, obtiveram uma média de 13,76 fragmentos polimórficos gerados por iniciador ISSR, correspondendo a 91,05 % de polimorfismo. Em experimento conduzido por Venkat e colaboradores (2014) com a construção de mapa genético entre duas espécies de antúrio (*Anthurium ornatum* e *Anthurium andraeanum*), cada primer ISSR produziu entre um e dois fragmentos polimórficos, com 100 % de polimorfismo total. Estes resultados, independentemente das médias de fragmentos polimórficos geradas por primer, são similares em termos de polimorfismo total aos obtidos no presente estudo, o que indica que os marcadores ISSR são eficientes em detectar polimorfismo na espécie de antúrio estudada. Gantait e Sinniah (2011), em experimento conduzido com *Anthurium andreanum* cultivar CanCan, submeteram amostras de DNA de plantas, obtidas por micropropagação e derivadas de sementes, a uma análise sobre a integridade genética explorando iniciadores ISSR, os quais exibiram um padrão monomórfico de bandas, revelando assim, a manutenção da identidade genética das plantas obtidas pelos diferentes métodos de propagação. Com este resultado pode-se concluir que a utilização de marcadores ISSR para caracterização de cultivares de antúrio é uma ferramenta confiável.

Tabela 2 – Identificação, bandas geradas e polimórficas, e percentual de polimorfismo dos 18 iniciadores ISSR utilizados na caracterização das amostras de antúrio em estudo.

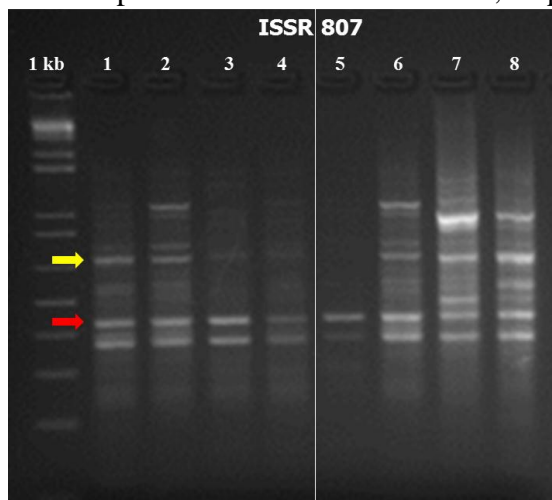
Iniciador ISSR	(Sequência 5' → 3')	Bandas geradas	Bandas polimórficas	Polimorfismo (%)
807	5' AGA GAG AGA GAG AGA GT	8	6	75,00
810	5' GAG AGA GAG AGA GAG AT	5	5	100,00
811	5' GAG AGA GAG AGA GAG AC	7	7	100,00
817	5' CAC ACA CAC ACA CAC AA	8	8	100,00
818	5' CAC ACA CAC ACA CAC AG	9	8	88,89
825	5' ACA CAC ACA CAC ACA CT	7	4	57,14
826	5' ACA CAC ACA CAC ACA CC	7	7	100,00
828	5' TGT GTG TGT GTG TGT GA	13	13	100,00
829	5' TGT GTG TGT GTG TGT GC	9	8	88,89
844	5' CT CT CT CT CT CT CT CT RC	11	11	100,00
846	5' CAC ACA CAC ACA CAC ART	15	12	80,00
847	5' CAC ACA CAC ACA CAC ARC	13	8	61,54
849	5' GTG TGT GTG TGT GTG TYA	11	9	81,82
855	5' AC AC AC AC AC AC AC AC YT	8	8	100,00
856	5' ACA CAC ACA CAC ACA CYA	11	11	100,00
858	5' TGT GTG TGT GTG TGT GRT	12	12	100,00
859	5' TGT GTG TGT GTG TGT GRC	11	11	100,00
878	5' GGA TGG ATG GAT GGA T	10	10	100,00
Total		175	158	90,28

*Nucleotídeos degenerados: R: A,G; Y: C,T.

Fonte: Priscila Bezerra dos Santos Melo.

Na figura 2 pode-se observar o perfil de amplificação de um dos iniciadores ISSR (I 807), escolhido por apresentar pelo menos um produto com padrão adequado [(presença (1) ou ausência de bandas (0)]. O padrão de amplificação encontrado apresentou um grande número de bandas, sendo esta uma característica dos marcadores ISSR.

Figura 2 – Padrão de amplificação de oito amostras de antúrio, utilizando o iniciador I 807. A primeira coluna corresponde ao marcador 1 kb da invitrogen. As quatro posteriores colunas são as amostras dos DNAs de antúrio de folhas: 1- Luau; 2- Sublime; 3- Maré; 4- Jureia. As quatro posteriores colunas são as amostras dos DNAs de antúrio de calos embriogênicos: 5- Luau; 6- Sublime; 7- Maré; 8- Jureia. As setas amarela e vermelha, indicam bandas polimórficas e monomórficas, respectivamente.



Fonte: Priscila Bezerra dos Santos Melo.

Apesar de todos os iniciadores selecionados, de uma maneira geral, apresentarem-se eficientes na caracterização molecular das cultivares de antúrio empregadas no trabalho, pôde-se selecionar os iniciadores ideais para caracterização molecular de cada cultivar, em particular. A seleção desses marcadores se dá pela identificação de marcadores que detectam polimorfismo capaz de diferenciar apenas uma cultivar das demais. Esta seleção pode ser visualizada na tabela 3, cuja análise permite verificar que as amostras de DNA de calos embriogênicos, possuem maior ou igual número de marcadores específicos, quando comparados às amostras de folhas. Esse resultado pode ser explicado pela diferença do estágio fisiológico entre as duas amostras de DNA para cada cultivar. O tecido da folha já está diferenciado, enquanto o tecido do calo embriogênico está em processo de desdiferenciação e rediferenciação. Assim, maiores são as chances de serem geradas mutações e, portanto, maior o número de sequências específicas que podem ser reconhecidas pelos marcadores moleculares. Em trabalho desenvolvido por Buldewo, Pillay e Jaufeerally-Fakim (2012) com a identificação da diversidade genética entre 12 cultivares de *Anthurium andraeanum*, marcadores ISSR exibiram polimorfismos únicos úteis para a distinção mais facilitada de algumas dessas cultivares.

A seleção de marcadores específicos para caracterização molecular de determinada cultivar, é muito importante para a proteção de cultivares e propicia que o melhorista tenha mais facilidade em identificar uma nova cultivar para lançamento.

Tabela 3 – Marcadores ISSR ideais para caracterização molecular das cultivares de antúrio Luau, Sublime, Maré e Jureia, a partir de amostras de folha (obtidas de mudas estabelecidas *in vitro* por organogênese indireta) e de calos embriogênicos (obtidos por embriogênese indireta de segmentos nodais)

Cultivar	Amostra de DNA com informação particular de presença ou ausência de bandas	Iniciadores ISSR selecionados
Luau	Folha	847
	Calo	811, 828, 858, 878
Sublime	Folha	828, 846
	Calo	807, 817
Maré	Folha	811, 825, 856
	Calo	818, 828, 846, 847, 859, 878
Jureia	Folha	847, 858, 878
	Calo	828, 844, 849

Fonte: Priscila Bezerra dos Santos Melo.

A análise da matriz de dados binários permitiu observar que alguns marcadores moleculares não apresentaram diferença na caracterização molecular de folhas e calos embriogênicos pertencentes a uma mesma cultivar. Esses marcadores estão listados na tabela 4, bem como as cultivares correspondentes. A igualdade genética entre as duas amostras de DNA utilizadas para caracterização molecular de uma mesma cultivar, já é um fato esperado, pois o genótipo é a constituição genética elementar de um indivíduo, assim, salvo por eventos genéticos extraordinários, ele não deve mudar. No entanto, à exceção dos marcadores listados na tabela 3, a caracterização molecular provida pelos demais iniciadores, para as amostras de folha e calo embriogênico de uma mesma cultivar, foi distinta. Esse fato pode ser explicado pela maior tendência à ocorrência de mutações em células de calos embriogênicos, pois estas

ainda não estão diferenciadas, gerando polimorfismo entre amostras de uma mesma cultivar.

De acordo com a tabela 4, verifica-se que para as cultivares Luau, Maré e Jureia, foi apontado apenas um marcador monomórfico na caracterização de folhas e calos embriogênicos pertencentes à mesma cultivar, diferente do que ocorreu para a cultivar Sublime, quando seis marcadores moleculares apresentaram-se monomórficos. Com base no que já foi discutido, esse fato indica que a cultivar Sublime tem maior estabilidade genética do que as demais cultivares, e assim o polimorfismo entre as duas amostras de DNA é mínimo (distância genética: 0,239).

Tabela 4 – Iniciadores monomórficos empregados na caracterização molecular de amostras de DNA de folhas e calos embriogênicos de cultivares de quatro cultivares de antúrio

Cultivar	Iniciadores ISSR monomórficos
Luau	825
Sublime	818, 825, 829, 847, 849, 858
Maré	849
Jureia	811

Fonte: Priscila Bezerra dos Santos Melo.

A partir dos dados de presença (1) e ausência (0) de bandas observadas com a eletroforese, foi gerada uma matriz com a distância genética entre as amostras de antúrio, a qual está apresentada na tabela 5.

Tabela 5 – Matriz de dissimilaridade obtida para as quatro amostras de folha (F) e quatro amostras de calo (C) de antúrio estudadas, indicando a distância genética entre cada uma delas. Amostras: 1 - Luau F; 2 - Sublime F; 3 - Maré F; 4 - Jureia F; 5 - Luau C; 6 - Sublime C; 7 - Maré C; 8 - Jureia C

	1	2	3	4	5	6	7	8
1	0	0,511	0,477	0,362	0,400	0,465	0,570	0,381
2		0	0,586	0,560	0,569	0,239	0,623	0,545
3			0	0,500	0,579	0,547	0,508	0,500
4				0	0,299	0,534	0,625	0,444
5					0	0,587	0,635	0,519

6	0	0,539	0,450
7		0	0,463
8			0

Fonte: Priscila Bezerra dos Santos Melo.

Para melhor observação das distâncias genéticas, estas foram listadas em ordem crescente na tabela 6. Os valores mais baixos de distância genética representam as amostras mais similares, e os valores mais altos, as amostras mais distantes geneticamente. A distância genética entre as amostras variou de 0,239 a 0,635. Os menores índices de dissimilaridade foram observados entre as amostras 2 e 6 (0,239), e 4 e 5 (0,299). Em contrapartida, os maiores índices de dissimilaridade foram observados entre as amostras 2 e 7 (0,623), 4 e 7 (0,625) e 5 e 7 (0,635).

Tabela 6 – Ordem crescente da distância genética entre amostras de folha (F) e calo (C) de antúrio, indicando as amostras com maior similaridade (menor distância) e dissimilaridade genética (maior distância). Amostras: 1 - Luau F; 2 - Sublime F; 3 - Maré F; 4 - Jureia F; 5 - Luau C; 6 - Sublime C; 7 - Maré C; 8 - Jureia C

Amostras	Distância Genética	Amostras	Distância Genética
2 e 6	0,239	4 e 6	0,534
4 e 5	0,299	6 e 7	0,539
1 e 4	0,362	2 e 8	0,545
1 e 8	0,381	3 e 6	0,547
1 e 5	0,400	2 e 4	0,560
4 e 8	0,444	2 e 5	0,569
6 e 8	0,450	1 e 7	0,570
7 e 8	0,463	3 e 5	0,579
1 e 6	0,465	1 e 3	0,586
1 e 3	0,477	5 e 6	0,587
3 e 4; 3 e 8	0,500	2 e 7	0,623
3 e 7	0,508	4 e 7	0,625
1 e 2	0,511	5 e 7	0,635
5 e 8	0,519		

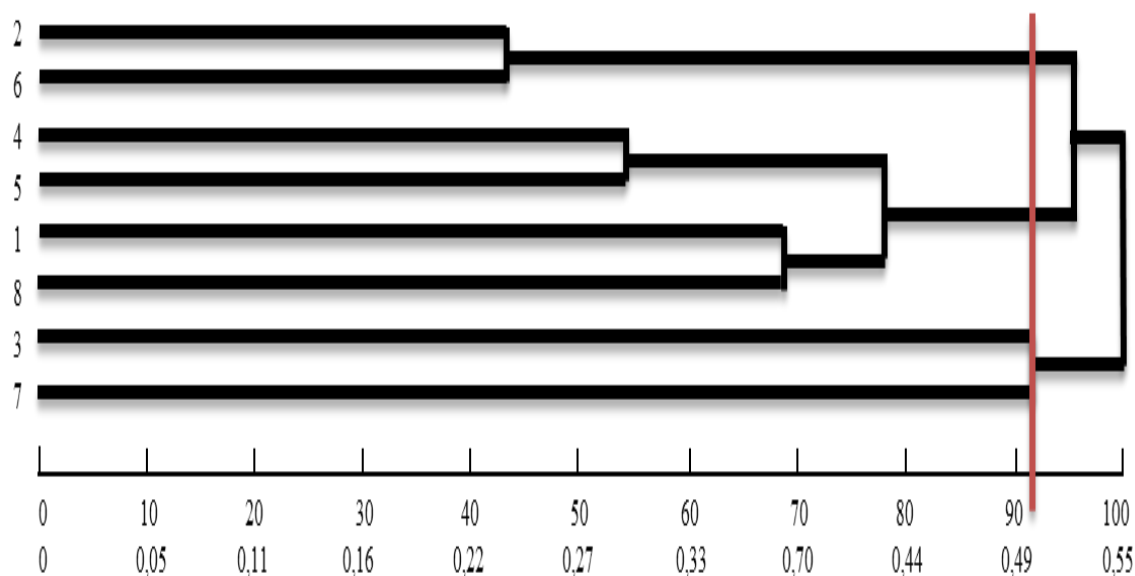
Fonte: Priscila Bezerra dos Santos Melo.

Quanto maior a dissimilaridade obtida entre diferentes genótipos, maiores as chances de estes serem considerados promissores em processos de melhoramento genético, e possíveis genitores de novas variedades. Já o cruzamento entre genótipos de antúrio que apresentem baixa dissimilaridade não é interessante para programas de melhoramento da espécie, devido à baixa heterogenia dos genótipos e consequente baixa probabilidade de ocorrerem novas variantes a partir deste cruzamento (SOUZA NETO *et al.*, 2011). Assim, as plantas provenientes das amostras 2 e 5, correspondentes às amostras de folha de Sublime e à amostra de calo embriogênico de Luau, respectivamente, podem ser utilizadas para cruzamento com plantas provenientes da amostra 7, correspondente à amostra de calo embriogênico de Maré, obtendo-se progênes variantes. No entanto, o melhorista deve considerar os caracteres mais apropriados que devem ser selecionados nos genitores, para obtenção de genótipos superiores.

As diferentes distâncias genéticas verificadas no presente estudo, revelando proximidade, bem como distância genética relevante entre diferentes cultivares de *Anthurium andraeanum*, podem ser verificadas, de forma similar, em outros trabalhos desenvolvidos com a caracterização molecular da espécie. Em pesquisa conduzida por Buldewo, Pillay e Jaufeerally-Fakim (2012) marcadores ISSR foram utilizados na identificação da diversidade genética entre 12 cultivares de *Anthurium andraeanum*. As distâncias genéticas entre os diferentes genótipos variaram de 0,24 a 0,78, revelando ampla variabilidade genética entre os genótipos em estudo. O trabalho desenvolvido por Souza Neto e colaboradores (2014) envolveu 20 genótipos de antúrio, os quais tiveram a diversidade genética estimada com a utilização de marcadores ISSR e RAPD. Os autores geraram uma matriz binária conjunta para estes marcadores. Os maiores valores de similaridade corresponderam a 0,27, entre os genótipos SA 01 e SA 02, os quais compartilhavam muitas características comuns, sendo inadequados para cruzamentos. Já os genótipos SA 01 e NA 33, que compartilhavam apenas uma característica em comum, apresentaram a maior dissimilaridade, de 0,914. Assim, segundo Souza Neto e colaboradores (2011) o cruzamento entre os genótipos SA 01 e SA 02 não seria viável para obtenção de novas variantes. Já os genótipos SA 01 e NA 33, por apresentarem grande dissimilaridade entre si, podem ser considerados promissores em processos de melhoramento genético e possíveis genitores de novas variedades.

A partir da matriz de distâncias genéticas, utilizando-se o método de agrupamento UPGMA, por meio do coeficiente de Jaccard, foi gerado o dendrograma de dissimilaridade genética (Figura 3), com ponto de corte de 0,50, o qual foi obtido pela distância genética média. O valor do coeficiente de correlação cofenética (CCC) calculado foi de 0,8522. De acordo com Rohlf (1970), valores de coeficiente de correlação cofenética menores que 0,7 indicam inadequação do método. Assim, o valor do coeficiente obtido no presente trabalho indica boa representatividade do dendrograma de dissimilaridade genética gerado para as amostras de antúrio em estudo.

Figura 3 – Dendrograma de dissimilaridade genética entre quatro amostras de folha (F) e quatro amostras de calo (C) de antúrio. Grupos formados: I (2 - Sublime F; 6 - Sublime C); II (1 - Luau F; 4 - Jureia F; 5 - Luau C; 8 - Jureia C); Grupo III (3 - Maré F); Grupo IV (7 - Maré C).



Fonte: Priscila Bezerra dos Santos Melo.

O ponto de corte, gerado pela distância genética média, resultou na divisão das amostras em quatro grupos, os quais podem ser observados na tabela 7. No primeiro grupo estão as amostras 2 e 6, as quais correspondem às amostras de folha e calo embriogênico da mesma cultivar (Sublime). Assim, por mais que haja distância genética entre amostras de uma mesma cultivar, esta tenderá a ser mínima.

O mesmo ocorre com o segundo grupo, no qual as amostras 1 e 5, e 4 e 8, correspondem às amostras de folha e calo embriogênico das mesmas cultivares de antúrio, Luau e Jureia, respectivamente. No entanto, é importante observar que dentro

do grupo, as amostras 4 e 5 são aquelas mais próximas geneticamente, bem como as amostras 1 e 8. Porém, as quatro amostras integrantes do grupo possuem maior similaridade genética, quando relacionados às amostras em grupos distintos.

Os grupos III e IV, são os mais afastados geneticamente dos demais, sendo compostos pelas amostras 3 e 7, respectivamente, correspondendo, nesta ordem, às amostras de folha e calo embriogênico da cultivar Maré. Diferentemente dos casos anteriores, os dois tipos de amostras de DNA da cultivar Maré, possuem distância genética bem superior, não estando ligados pelo agrupamento de similaridade genética.

Esses resultados são similares ao caso anteriormente discutido sobre diferenças na caracterização molecular entre amostras de DNA de folhas e calos embriogênicos, para uma mesma cultivar. Assim, ele pode ser explicado da mesma maneira, com a ressalva de que nesse caso, a comparação é feita entre e dentro dos grupos formados, porém, segue o mesmo raciocínio, ou seja, a cultivar Sublime é aquela que possui maior estabilidade genética e a cultivar Maré, a menor, além de possuir a maior distância genética entre as amostras de antúrio estudadas. Por fim, quando comparadas às cultivares Sublime e Maré, as cultivares Sublime e Jureia são mais próximas geneticamente entre si. Estes resultados enfatizam que, dentre as cultivares estudadas, a cultivar Maré é aquela mais indicada para ser usada em programas de melhoramento genético d antúrio.

Tabela 7 – Agrupamento das amostras de folha (F) e calo (C) de antúrio, pelo método de UPGMA, utilizando o coeficiente de Jaccard. Amostras: 1 - Luau F; 2 - Sublime F; 3 - Maré F; 4 - Jureia F; 5 - Luau C; 6 - Sublime C; 7 - Maré C; 8 - Jureia C

Grupo	Amostras
I	2 e 6
II	1, 4, 5 e 8
III	3
IV	7

Fonte: Priscila Bezerra dos Santos Melo.

A caracterização molecular de cultivares de antúrio, a partir de DNA de diferentes tecidos, possivelmente é uma novidade na área de pesquisa dessa espécie, sendo o presente trabalho um dos primeiros desenvolvidos com este estudo.

4 CONCLUSÕES

O protocolo de extração de DNA utilizado neste trabalho foi eficiente para obtenção de DNA de qualidade e em quantidade satisfatória, a partir de amostras de folhas e calos embriogênicos pertencentes às cultivares de antúrio Luau, Sublime, Maré e Jureia.

Os marcadores ISSR selecionados para amplificação das amostras de DNA foram eficientes em detectar polimorfismos entre as cultivares.

Foram distinguidos marcadores polimórficos específicos para caracterização molecular de cada uma das amostras de DNA das cultivares, o que pode garantir maior eficiência nos processos de lançamento de novas cultivares, bem como na proteção legal destas.

Amostras de DNA de folhas e calos embriogênicos podem apresentar diferentes graus de polimorfismo, para uma mesma cultivar, sendo que Sublime é a cultivar geneticamente mais estável e Maré, a menos estável.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANEFALOS, L. C.; TOMBOLATO, A. F. C.; RICORDI, A. Panorama atual e perspectivas futuras da cadeia produtiva de flores tropicais: o caso do antúrio. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 16, n. 1, p. 107-111, 2010.
- BORÉM, A. Melhoramento de plantas. Viçosa : UFV, 1997. 547p.
- BULDEWO, S.; PILLAY, M.; JAUFEEERALLY-FAKIM, Y. Genetic diversity in *Anthurium andraeanum* cultivars in Mauritius. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 103, p. 16737-16744, 2012.
- CAIXETA, E.T.; OLIVEIRA, A.C.B.; BRITO, G.G.; SAKIYAMA, N.S. Tipos de Marcadores Moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. **Marcadores Moleculares**. 2 ed. Minas Gerais:Ed. Folha de Viçosa, 2009.
- CASTRO, A.C.; RESENDE, L.V.; GUIMARÃES, W.N.R.; LOGES, V. Uso de técnicas moleculares em estudo de diversidade genética em antúrio. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 10, n. 1/2, p. 6-9, 2004.
- CAVALCANTI, J.J.V. **Genetic Mapping and QTL Identification in Cashew (*Anacardium occidentale* L.)**. 2004. 178f. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) - The University of Reading, UR, Inglaterra, 2004.6. 279p.
- CRUZ, C. D. **Programa Genes: Diversidade Genética**. Editora UFV. Viçosa (MG). 278 p. 2008.
- CRUZ, C. D.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: UFV, 2003. 585 p.
- FERREIRA, M.E.; GRATAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3 Ed. **Embrapa-CENARGEN: Documentos, 20**. Brasília (DF), 1998. 220 p.
- GANTAIT, S.; SINNIH, U. R. Morphology, flow cytometry and molecular assessment of *ex-vitro* grown micropropagated anthurium in comparison with seed germinated plants. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 64, p. 13991-13998, 2011.
- LIMA, E. N. **Diversidade genética de clones de aceroleira e reação à *Lasiodiplodia theobromae***. 2012. 81 f. Dissertação (Mestrado em Melhoramento Vegetal/ Agronomia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza (CE), 2012.
- MILACH, S.C.K. Marcadores de DNA. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 5, p.14-17, 1998.
- MILACH, S.C.K. Uso de marcadores moleculares na caracterização de cultivares. In: QUEIROZ, M. A.; GOEDERT, C. O.; RAMOS, S. R. R. (Ed.). **Recursos genéticos e**

melhoramento de plantas para o Nordeste brasileiro. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999.

PARPINELLI, R. S.; RIBEIRO, R. P. Estudo comparativo de protocolos de extração de DNA em diferentes tecidos de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Global science and technology**, v. 02, n. 01, p. 22-33, 2009.

PINHEIRO, M. V. M. **Propagação in vitro de antúrio (*Anthurium andraeanum* cv. Eidibel) via embriogênese somática.** 2010. 67 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Departamento de Biologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa (MG), 2010.

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

ROHLF, F. J. Adaptive hierarchical clustering schemes. **Systematic Zoology**, v.19, n.1, p.58-82, 1970.

SOUZA NETO, J. D.; DIAS, M. A.; CABRAL, P. D. S.; ALVES, D. S.; SOUZA, F. B.; SOARES, T. C. B. Caracterização molecular (fingerprinting) de genótipos de antúrio. *In*: XIV Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e X Encontro Latino Americano de Pós-Graduação. **Anais...** Universidade do Vale do Paraíba. 2011.

SOUZA NETO, J. D.; SOARES, T. C. B.; MOTTA, L. B.; CABRAL, P. D. S.; SILVA, J. A. Molecular characterization of *Anthurium* genotypes by using DNA fingerprinting and SPAR markers. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 3, p. 4766-4775, 2014.

VAN HERK, M. V., VAN KOPPEN, M.; SMEDING, S.; VAN DER ELZEN, C. J., VAN ROSMALEN, N.; VAN DIJK, J.; LONT, A. and VAN SPINGELEN, J. **Cultivation Guide Anthurium:** global know-how for growers around the Globe. 1st. ed. Holanda: Anthura B.V., 140p, 1998.

APÊNDICE A – PROTOCOLO DE CALVALCANTE (2004), COM MODIFICAÇÕES

1. Pesar aproximadamente 1 g dos materiais vegetais selecionados (folhas e calos embriogênicos) de cada variedade.
 2. Colocar o material vegetal no microtubo de 2 ml , adicionar cuidadosamente nitrogênio líquido, e triturar o material com o auxílio de um bastão até obter um pó bem fino. Colocar o microtubo aberto no gelo e fechar o anterior.
 3. Adicionar 700 µl de Tampão de Extração CTAB 2% + PVP 2% em cada microtubo.
 4. Homogeneizar no vortex por alguns instantes, e pôr no banho-maria.
 5. Deixar no banho-maria a 65 °C por três minutos.
 6. Mexer bem, invertendo os tubos de duas a três vezes.
 7. Na capela de exaustão, adicionar 700 µl de solução de clorofórmio + álcool isoamílico (24:1).
 8. Mexer bem, invertendo os tubos por 2 a 3 minutos.
 9. Centrifugar por 10 min a 13000 rpm (velocidade máxima).
 10. Cuidadosamente, transferir a fase superior para um novo microtubo (com auxílio de pipeta de 200 µl).
 11. Repetir os passos 7, 8, 9 e 10.
 12. Adicionar 450 µl (2/3 do volume) de isopropanol gelado (-20 °C) para precipitar o DNA.
 13. Mexer bem, invertendo cinco vezes.
 14. Centrifugar a 13000 rpm por 5 min.
 15. Descartar o sobrenadante (todo o líquido do microtubo) e inverter os microtubos em papel toalha.
 16. Lavar o pellet de DNA: adicionar 500 µl de etanol 70% gelado e inverter os microtubos de 2 a 3 vezes, cuidadosamente.
 17. Centrifugar a 13000 rpm por 5 min.
 18. Remover, cuidadosamente, o etanol, com auxílio de pipeta de 200 µl.
 19. Secar o DNA, deixando os tubos abertos para evaporar o etanol, em temperatura ambiente por 12 horas.
 20. Suspender novamente o DNA em 50 µl de TE.
 21. Adicionar RNase na concentração final de 10 ug/ml (1,5 ug/ul em 50 ul de TE), e incubar por 30 min a 37 °C para que o RNA possa ser digerido.
 22. Armazenar a -20 °C.
- Obs.:** Os microtubos devem estar marcados para diferenciar os genótipos.