

Referências

- LEDO, A. S.; LAMEIRA, O. A.; BENBADIS, A. K.; MENEZES, I. C. de ; OLIVEIRA, M. do S. P.; MEDEIROS FILHO, S. Somatic embryogenesis from zygotic embryos of Euterpe oleracea Mart. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v. 24, n. 3, p. 601-603, 2002.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- NOGUEIRA, O. L.; FIGUEIREDO, F. J. C.; MULLER, A. A. Sistema de produção de açai. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2006. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Acai/SistemaProducaoAcai_2ed/paginas/autores.htm>. Acesso em: 28 fev. 2007.

Parte 2 - Capítulo 3

Micropropagação de Antúrio

Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho
Marcos Vinícius Marques Pinheiro
Fabrina Bolzan Martins
Ana Claudia Ferreira da Cruz
Wagner Campos Otoni
Antonio Fernando Caetano Tombolato
Ana Cecília Ribeiro de Castro

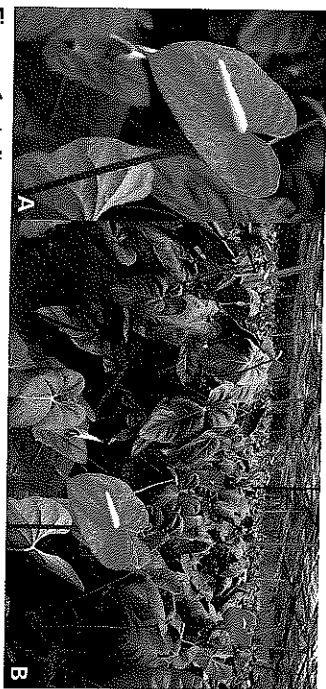
Introdução

Entre as plantas ornamentais cultivadas, os antúrios merecem destaque. Pertencem à família Araceae e ao gênero *Anthurium* Schott. A maioria das suas 800 espécies é ornamental, sendo aproximadamente 130 dessas encontradas no Brasil (CASTRO et al., 2004; TOMBOLATO et al., 2004; LIENDO; MOGOLLÓN, 2009). O *Anthurium andraeanum* Linden (Figura 1A) é a espécie deste gênero que apresenta maior importância econômica e a segunda flor tropical mais comercializada no mundo, atrás apenas das orquídeas (Castro et al., 2004; Tombolato et al., 2004). É largamente utilizado no paisagismo e na floricultura, como flor de corte, folhagem ou planta envasada.

Embora sejam característicos de regiões tropicais, os antúrios são produzidos em estufas por todo o mundo. Aproximadamente 90% de sua comercialização ocorrem em praticamente todos os países da Europa, principalmente na Holanda. No Brasil, a produção comercial de antúrio concentra-se principalmente em regiões subtropicais, como na região Sudeste, no Vale do Ribeira (Figura 1B), Holambra e Atibaia, em São Paulo, onde são cultivados em telados (TOMBOLATO; CASTRO, 2005). Na região Nordeste, destacam-se os Estados de Pernambuco, Ceará e Bahia, que vem apresentando atividade de maior expressão, focando os mercados interno e externo (CALDARI JUNIOR, 2004; CUQUEL; GROSSI, 2004).

Sua produção comercial é crescente, impulsionada pelas demandas nacional e internacional, pela introdução de novas cultivares importadas e pelo desenvolvimento de variedades nacionais, que levam vantagens em relação às importadas, pois possuem menor custo na aquisição das mudas, além de serem mais rústicas e melhor adaptadas às nossas condições climáticas (LEME; HONÓRIO, 2004).

Os antúrios são plantas semi-herbáceas, eretas e o que normalmente se conhece por flor é na verdade um conjunto formado por uma espádice e pela espata (Figura 2A-H). A espádice é uma inflorescência constituída por flores minúsculas e dispostas em espiral (Figura 2I), protegida por uma folha modificada (bráctea colorida) denominada espata. Suas flores são hermafroditas e apresentam o fenômeno de protoginia, em que os órgãos sexuais femininos atingem primeiramente a maturidade e tornam-se receptivos, enquanto as estruturas masculinas ainda encontram-se imaturas, dificultando a autofecundação e favorecendo o cruzamento natural entre plantas diferentes (TOMBOLATO et al., 2004; TOMBOLATO; CASTRO, 2005).



Fotos: David dos Santos Júnior

Figura 1. Inflorescência de antúrio cv. Eidibel tipo espiga (espádice) e folha modificada (espata), estruturas comumente chamadas de flor (A) e plantio comercial de antúrio, sob cultivo protegido, na região do Vale do Ribeira, em São Paulo (B).

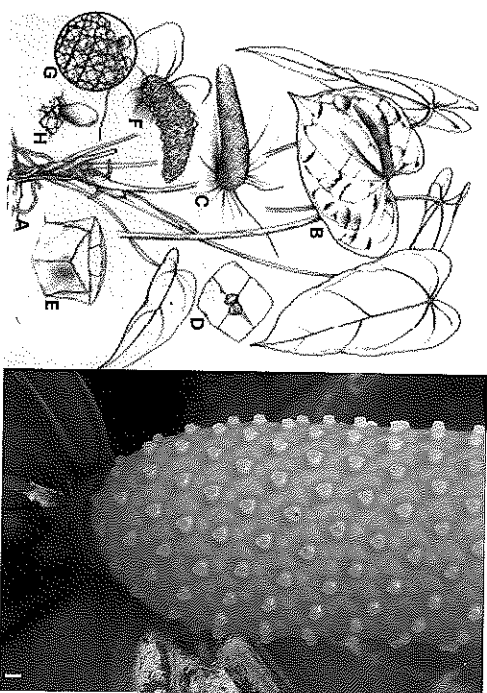
Desenho esquemático: Frank Silva
Foto: David dos Santos Júnior

Figura 2. Desenho esquemático das partes componentes do antúrio: raiz (A), inflorescência (espádice e espata) (B), espádice (C), flor (vista frontal) (D), flor (vista lateral) (E), inflorescência (F), fruto tipo baga (G), detalhe do fruto (H) com flores femininas receptivas (I).

Atualmente, o antúrio constitui a principal espécie de flor tropical de interesse econômico no Brasil (ANEFALOS et al., 2010). Seu cultivo intensifica-se a cada ano por causa, principalmente, do programa de melhoramento do Instituto Agrônômico (IAC, Campinas, São Paulo). O IAC desenvolveu as primeiras cultivares de antúrio com o objetivo de criar plantas bem adaptadas às condições climáticas do Brasil, e que permitissem o cultivo e a exploração comercial para flor de corte e planta de vaso (TOMBOLATO et al., 2004). Leme (2004) relata que as cultivares nacionais, desenvolvidas pelo IAC, possuem vantagens competitivas quando comparadas com as variedades importadas.

Dessa forma, nos plantios brasileiros são utilizadas variedades/cultivares de diferentes procedências, melhoradas no Brasil e na Europa, além de algumas seleções de coleções particulares (CASTRO et al., 2004).

Propagação

O antúrio pode ser propagado tanto por meio sexuado quanto assexuado.

A propagação sexuada, isto é, por sementes (Figura 3), é um processo lento, levando geralmente três anos para iniciar o florescimento e cinco anos para atingir o ápice da produção comercial. Além disso, as progênies obtidas são heterogêneas, resultando em plantas desuniformes em vigor, tamanho e produtividade, e exibindo variações notáveis no tamanho, forma e cor das inflorescências (TOMBOLATO et al., 2004). Entretanto, em programas de melhoramento genético, o uso da propagação sexuada é a principal forma para a obtenção de novas variedades. Depois de selecionadas, as novas progênies devem ser propagadas vegetativamente, para a fixação e manutenção das características desejadas.

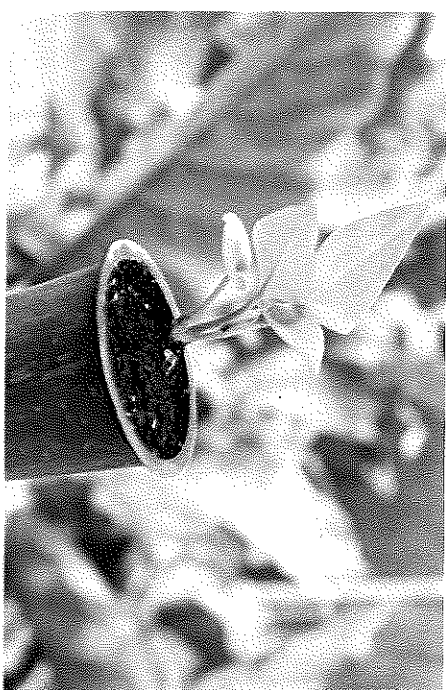


Foto: Cláudio de Norões Rocha

Figura 3. Muda de antúrio cv. Cananéia obtida a partir da germinação de sementes em tubete.

A propagação assexuada ou vegetativa é feita convencionalmente por divisão de touceiras ou por estacaquia. Esses métodos apresentam como desvantagens o baixo número de mudas produzidas e a possibilidade de disseminação de pragas e doenças (HAMIDAH et al., 1997; MARTIN et al., 2003; TOMBOLATO et al., 2004; VIÉGAS et al., 2007).

Além desses dois métodos, vem sendo utilizada a micropropagação, também conhecida por propagação *in vitro*, uma importante modalidade da cultura de tecidos. Esse método propicia a obtenção de um grande número de plantas idênticas à planta matriz, sendo uma modalidade de propagação vegetativa.

Dessa forma, a micropropagação tem sido bastante utilizada para a produção massal de clones de variedades de antúrio, o que permite a uniformidade das plantas produzidas (FUZITANI; NOMURA, 2004; MAIRA et al., 2010). Destaca-se que, atualmente, a maioria das variedades de antúrio disponíveis para comercialização como plantas de vaso, no

mercado internacional, é produzida por cultura de tecidos (MAIRA et al., 2010). Além disso, o uso dessa técnica tem sido sugerido como alternativa para o aumento da produção de antúrio (JAHAN et al., 2009).

Anafalos et al. (2010) realizaram uma pesquisa visando ampliar o conhecimento sobre flores tropicais, com ênfase em antúrio e na adoção de novas tecnologias. Constatou-se que 97% dos entrevistados (produtores, profissionais e técnicos) consideram que a utilização de mudas micropropagadas de antúrio representa bom investimento no setor de flores, desde que haja garantia de qualidade do produto, com produção de clones melhorados, com maior homogeneidade e resistência a pragas e doenças.

Micropropagação

Tendo em vista que um dos principais fatores limitantes para o cultivo do antúrio é a disponibilidade de mudas em quantidade e de qualidade, sua produção em laboratório se torna uma alternativa para atingir este propósito.

A grande produção de mudas só ocorre mediante a cultura in vitro, uma vez que, pelo método tradicional de propagação, apenas algumas unidades de plantas podem ser obtidas anualmente (TOMBOLATO et al., 2004).

Como muitas das variedades de antúrio são híbridas, a clonagem in vitro tem permitido a uniformização de características, tais como: época de floração, coloração, tamanho e forma das flores, entre outros aspectos (FUZITANI; NOMURA, 2004).

No Brasil, o primeiro registro de micropropagação de antúrio é o de Castro et al. (1986). Embora, atualmente, existam outros grupos conduzindo ensaios nesta área, a

técnica mais empregada ainda é a desenvolvida pelo IAC (TOMBOLATO; QUIRINO, 1996; TOMBOLATO et al., 1998; TOMBOLATO et al., 2002; TOMBOLATO et al., 2004).

Os antúrios são propagados, via organogênese indireta a partir de várias fontes de explantes, como folhas (PIERIK et al., 1974; PIERIK, 1975; TENG, 1997; PUCHOOA, 2005; NHUT et al., 2006; VIÉGAS et al., 2007; BEYRAMIZADE et al., 2008; ATAK; ÇELIK, 2009; YU et al., 2009), pecíolos (KUEHNLE; SUGIL, 1991; YU et al., 2009), gemas axilares (KUNISAKI, 1980), frutos (SANTOS et al., 2005), sementes (SCHIAVINATO et al., 2008; MAIRA et al., 2010), raízes (CHEN et al., 1997), anteras (WINARTO et al., 2010; WINARTO et al., 2011a; WINARTO et al., 2011b; WINARTO; SILVA, 2012) ou meristemas (ATAK; ÇELIK, 2009). No entanto, o antúrio tem sido propagado tradicionalmente mediante a organogênese indireta de secções do limbo de folha jovem com posterior indução de calos e formação de gemas adventícias (TOMBOLATO; QUIRINO, 1996; TOMBOLATO et al., 1998). Entretanto, esse método proporciona taxas de multiplicação relativamente baixas e inconsistentes, com provável ocorrência de variação somaclonal nas mudas obtidas (TE-CHATO et al., 2006; BAUTISTA et al., 2008).

Após o estabelecimento in vitro do antúrio, alguns autores relatam a utilização de diferentes explantes para a etapa de multiplicação da cultura, como folhas, segmentos nodais e internodais (TE-CHATO et al., 2006), e segmentos nodais estiolados (PINHEIRO et al., 2009; CARVALHO et al., 2011).

Para o aprimoramento da clonagem de plantas, vem se utilizando, como forma de propagação in vitro, a embriogênese somática. Segundo George et al. (2008), a regeneração de plantas por esse sistema ocorre a partir da indução, proliferação, maturação, germinação dos embriões somáticos e conversão em plantas.

A embriogênese somática, uma das principais técnicas de propagação *in vitro*, permite a produção massiva de plantas e a redução de mão-de-obra, possibilitando diminuir significativamente o custo por unidade produzida, além dos embriões somáticos poderem ser produzidos de forma sincronizada, com alto grau de uniformização e conformidade clonal (YEUNG, 1995).

A partir de 1990, foi descrita a indução de embriogênese somática em antúrio com a utilização de explantes de folha, pecíolo, segmentos nodais, segmentos internodais e raízes de plantas previamente estabelecidas *in vitro* (KUEHNLE et al., 1992; HAMIDAH et al., 1997; DUQUENNE et al., 2007; BAUTISTA et al., 2008; FITCH et al., 2011; PINHEIRO et al., 2012). No entanto, a maioria destes autores se limitou a estudar as primeiras etapas da embriogênese somática, não relatando os estádios posteriores de desenvolvimento dos embriões somáticos até a conversão em plantas, como sugerido por (PINHEIRO et al., 2013a; PINHEIRO et al., 2013b).

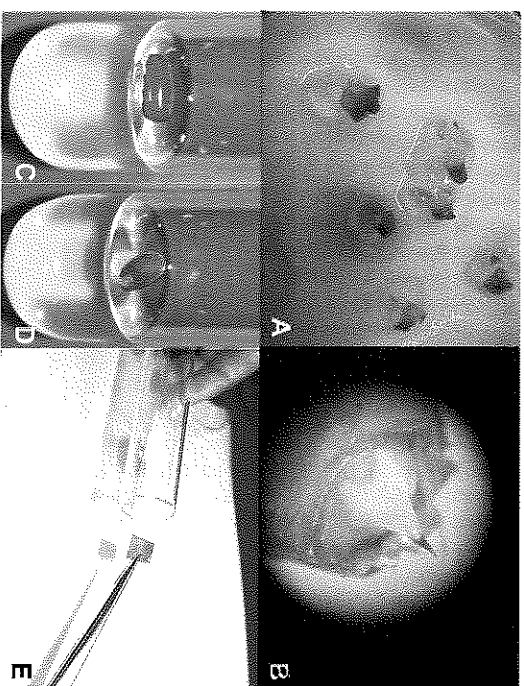
Como os protocolos publicados na literatura não se adaptam para o uso geral, em decorrência da genótipo-especificidade das respostas morfológicas dos antúrios, é necessário desenvolver processos mais eficientes e/ou adaptar os métodos já existentes, de forma a aplicá-los às diferentes variedades de antúrio (LIGHTBOURN; PRASAD, 1990).

Protocolos para Micropropagação

Como já mencionado, existem vários protocolos para a micropropagação do antúrio disponíveis na literatura. Entretanto, é importante ressaltar que, via de regra, são necessários alguns ajustes para a obtenção de resultados

satisfatórios em diferentes genótipos. De modo geral, a metodologia empregada envolve as seguintes etapas: a) escolha do material vegetal, preparação e inoculação dos explantes no meio de cultura; b) indução de partes aéreas e/ou multiplicação dos propágulos, por meio de vários recultivos e/ou subcultivos; c) alongamento e enraizamento das brotações produzidas; e d) aclimatização (transplante das mudas obtidas em substrato adequado).

Na fase de estabelecimento, na qual se faz a seleção dos explantes, a desinfestação e a inoculação do material em meio nutritivo, em condições assépticas, pode-se empregar vários tipos de explantes, tais como: sementes (Figura 4A), meristemas (Figura 4B), frutos com sementes (Figura 4C), frutos sem sementes (Figura 4D) e secções de folhas (Figura 4E), sendo esses os mais utilizados.



Fotos: (A e B) Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho (C, D e E) Cláudio de Norões Rocha

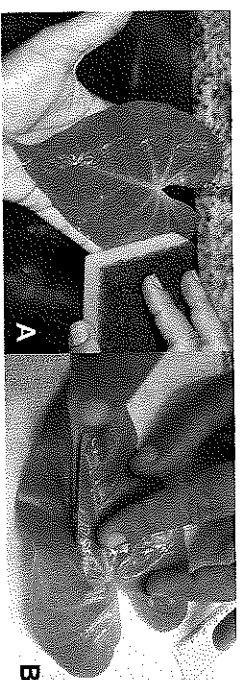
Figura 4. Tipos de explantes empregados no estabelecimento *in vitro* do antúrio: sementes (A), meristema (B), fruto com sementes (C), fruto sem sementes (D) e secção foliar (E).

Organogênese Indireta por Explante Foliar

De acordo com metodologia desenvolvida por Tombolato et al. (1998), os seguintes passos são necessários para induzir organogênese indireta em segmentos de folhas de antúrio:

Material Vegetal e Desinfestação

O material vegetal a ser empregado são folhas jovens e terras que deverão ser lavadas em água corrente e detergente, com auxílio de esponja bem macia (Figura 5A). As folhas são cortadas na região próxima à nervura central (Figura 5B), em segmentos de aproximadamente 8 cm de comprimento e 3 cm de largura. O comprimento do segmento vai depender do tamanho da folha a ser utilizada.



Fotos: (A) Cláudio de Norões Rocha (B) Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho

Figura 5. Lavagem da folha de antúrio com água corrente e detergente, com auxílio de uma esponja (A) e folha de antúrio sendo cortada na região próxima à nervura central (B).

Em capela de fluxo laminar, os segmentos foliares são colocados em recipiente esterilizado e mergulhados em álcool 70% por 5 segundos, deixando-os escorrer depois para retirar o excesso da solução. Em seguida, os segmentos são transferidos para outro recipiente também esterilizado contendo solução de hipoclorito de cálcio a 1,5% com 3 a 4 gotas de detergente (para cada 100 mL de solução), sob agitação durante 10 minutos. Após esse período, o material deve ser enxaguado por três vezes em água destilada autoclavada. Cada enxague deverá durar aproximadamente 1 minuto e ser efetuado, preferencialmente, em frascos esterilizados separados.

Inoculação dos Explantes

- 1) Após a desinfestação superficial, colocar as secções foliares sobre papel de filtro estéril e cortar os segmentos, com auxílio de pinça e bisturi autoclavados, de forma que fiquem com 1 cm de largura e 7 cm de comprimento (Figura 6A).
- 2) Cortar transversalmente cada segmento em secções de 1 cm², de maneira em que a nervura central fique na região mediana do explante (Figura 6B).
- 3) Inocular os explantes, preferencialmente um explante por tubo de ensaio, contendo meio de cultura P1 (Tabela 1), com 1/3 da região mais apical submersa no meio de cultura.
- 4) Colocar os frascos contendo os explantes em câmara escura, a 25 °C, para induzir a formação de calo (organogênese indireta).
- 5) Após 2 a 3 meses, transferir os frascos contendo folhas com formação de calos, para o claro em sala de crescimento, com 16 horas de fotoperíodo e densidade de fluxo de fótons de 30 μmol/m²/s.

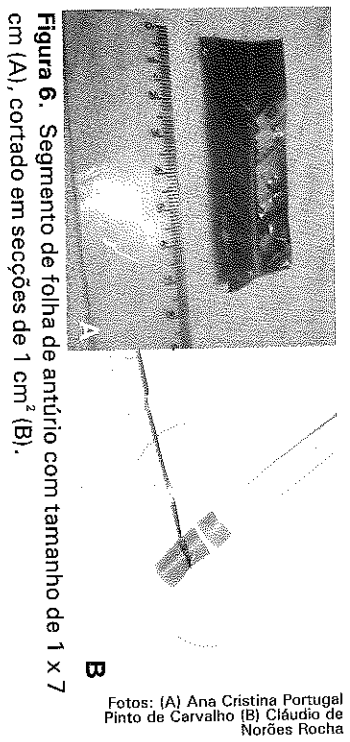


Figura 6. Segmento de folha de antúrio com tamanho de 1 x 7 cm (A), cortado em secções de 1 cm² (B).

Fotos: (A) Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho (B) Cláudio de Norões Rocha

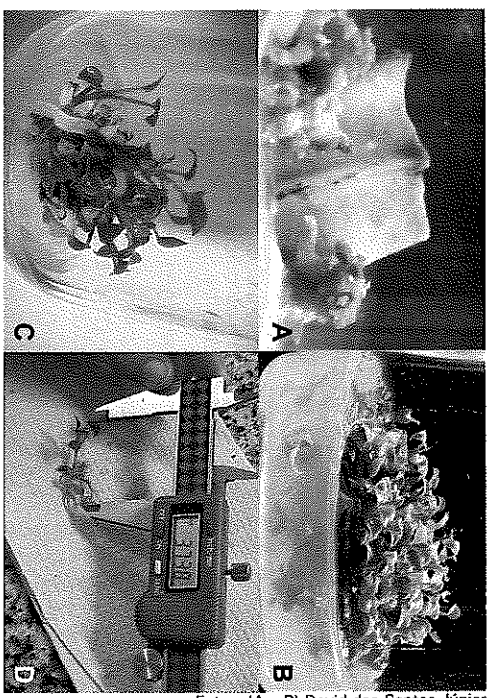
Multiplicação

- 1) Quando os calos apresentarem início de formação de clorofila (Figura 7A), aguardar de 10 a 15 dias, e depois transferi-los para o meio de cultura P2.
- 2) Manter as culturas em sala de crescimento com regime de 16 horas de luz, temperatura de 25 °C e densidade de fluxo de fótons de 30 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$.

Alongamento e Enraizamento

- 1) Decorridos 2 meses, quando os brotos atingirem aproximadamente 1 cm de altura (Figura 7B), transferi-los para o meio P3, onde permanecerão por mais 2 a 3 meses. Nessas condições, alguns brotos podem dar início à formação de raízes (Figura 7C).
- 2) Posteriormente, transferir as plantas mais desenvolvidas e vigorosas para o meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) sem regulador de crescimento, enquanto as plantas menores devem permanecer no meio P3.

- 3) Após 2 a 3 meses, aclimatizar as mudas (Figura 7D) em substrato comercial, adicionado de vermiculita e fibra de coco (ou pó de coco seco), e mantê-las em casa de vegetação.



Fotos: (A e B) David dos Santos Júnior (C e D) Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho

Figura 7. Explante foliar de antúrio inoculado em meio de cultura P1, com detalhe da nervura central e a formação de calos nas extremidades que ficam em contato com o meio de cultura (A); brotações de antúrio regeneradas a partir de calos formados em explante foliar, em meio de cultura P2 (B); mudas de antúrio regeneradas em meio de cultura P3 (C); e muda micropropagada de antúrio cv. Eidiel, com desenvolvimento adequado para ser aclimatizada (D).

Tabela 1. Meios de cultura P1, P2 e P3 utilizados em diferentes etapas da micropropagação do antúrio (PIERIK, 1976).

Componentes ⁽¹⁾	mg/L		
	P1	P2	P3
NH ₄ NO ₃	825	825	206
KNO ₃	950	950	950
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	185	185
KH ₂ PO ₄	85	85	85
CaCl ₂ ·4H ₂ O	440	220	220
Sacarose	30.000	20.000	20.000
BAP	-	1	-
2,4-D	0,08	-	-
Zea (Zeatina)	1	-	-

⁽¹⁾Todos os meios são acrescidos dos micronutrientes, FeEDTA, mio-inositol e vitaminas do meio MS, pH corrigido para 6,0, solidificados com ágar e autoclavados a 1 atm e temperatura de 120°C, durante 20 minutos.

Fonte: Tomblato et al. (1998).

Organogênese Indireta por Explante de Fruto

É importante mencionar que esta metodologia, desenvolvida por Santos et al. (2005), deve ser ajustada para que possa ser utilizada na produção em larga escala de mudas de diferentes cultivares de antúrio. Entretanto, os resultados preliminares indicam que é possível induzir a formação de calos em frutos de antúrio sem sementes, com a posterior regeneração de plantas completas. Dentre as vantagens deste método, pode-se citar a redução do tempo e dos custos na obtenção das mudas.

Material Vegetal e Desinfestação

Frutos maduros sem semente são empregados como material vegetal inicial.

As espádices contendo os frutos maduros (Figura 8A) deverão ser lavadas com água corrente e sabão líquido (recomenda-se digluconato de clorexidina a 2%) ou detergente comum, com auxílio de uma esponja bem macia.

Na Bancada do Laboratório

- 1) Colocar a espádice em placa de Petri e pulverizar com uma solução de antibiótico (rifampicina de sódio a 12,10 µM), deixando o material vegetal por 2 horas.
- 2) Em recipiente adequado, desinfestar a espádice com álcool 70% por 2 minutos.
- 3) A seguir, em outro recipiente, mergulhar a espádice numa solução de hipoclorito de cálcio a 2,5% por 10 minutos.
- 4) E, posteriormente, em outro recipiente, colocar a espádice em solução de carbenzim a 50% (p/v) por 2 horas.
- 5) Retirar os frutos maduros da espádice.

Na Capela de Fluxo Laminar

- 1) Colocar os frutos maduros em recipiente esterilizado e mergulhá-los em álcool 70% por 2 minutos.
- 2) Transferir os frutos maduros para outro recipiente esterilizado contendo solução de hipoclorito de cálcio a 2,5%, deixando-os sob agitação durante 10 minutos.
- 3) Lavar os frutos maduros, três vezes sucessivamente, com água destilada autoclavada. Cada enxague deverá durar, aproximadamente, 1 minuto e ser efetuado, preferencialmente, em frascos separados, no qual serão utilizados três frascos, sendo um para cada enxague.

Inoculação dos Explantes

- 1) Após a desinfestação superficial, colocar os frutos maduros numa placa de Petri esterilizada e retirar a(s) semente(s) com auxílio de pinça e bisturi previamente esterilizados por flambagem.
- 2) Após a remoção da(s) semente(s), os frutos (Figura 8B) são inoculados em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura MS suplementado com 18,08 μM de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético).
- 3) Colocar os tubos de ensaio contendo os explantes em câmara de crescimento a 25 °C, sob fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons de 30 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$.

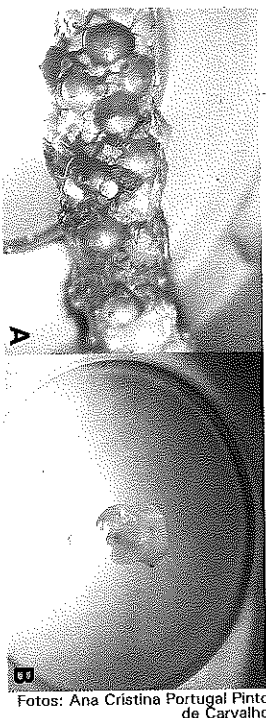


Figura 8. Espádice de antúrio, cv. Cananéia, contendo vários frutos maduros para excisão (A) e o seu fruto maduro sem semente (B).

Fotos: Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho

Multiplicação

- 1) Após 30 dias, quando os calos apresentarem uma coloração branca a bege (Figura 9A), indicando calos de origem organogênica, transferi-los para meio de cultura MS, solidificado com ágar, adicionado de 0,89 μM de BAP (6-benzilaminopurina).

- 2) Depois de 30 dias, os calos apresentarão início de formação de clorofila (Figura 9B), e após mais 30 dias ocorrerá a formação de plantas (Figura 9C).
- 3) Durante todo o processo, manter as culturas em sala de crescimento com regime de 16 horas de luz, temperatura de 25 °C e densidade de fluxo de fótons de 30 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$.

As brotações obtidas podem ser multiplicadas por meio de sucessivos subcultivos mediante a inoculação de segmentos nodais em meio de cultura P2, diretamente, a partir do seccionamento das mudas, ou indiretamente, via brotos estiolados (PINHEIRO et al., 2009).

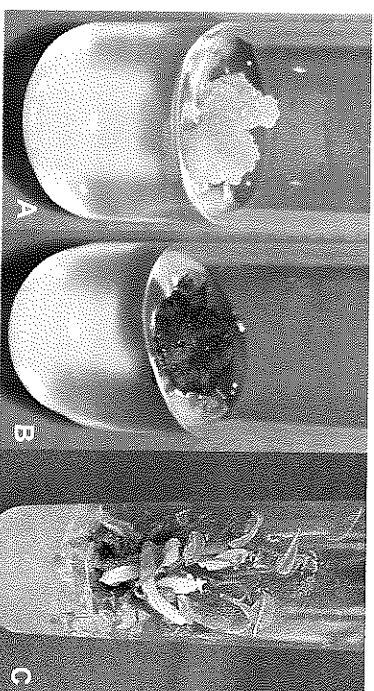


Figura 9. Calo de antúrio, cv. Cananéia, de coloração bege, formado a partir de explantes de fruto sem semente, em meio de cultura contendo 2,4-D (A); de coloração verde após transferência para o meio de cultura com BAP (B); e plantas regeneradas a partir desses calos em meio de cultura contendo BAP (C).

Fotos: (A e B) Cláudio de Norões Rocha
(C) Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho

Micropropagação por Segmento Nodal

Este protocolo, desenvolvido por Pinheiro et al. (2010), consta das seguintes etapas:

Material Vegetal

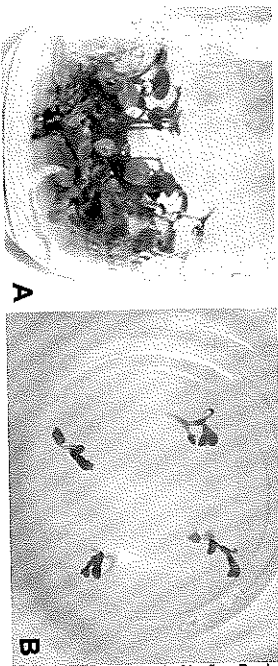
Como explantes, são empregados segmentos caulinares contendo dois nós, obtidos por meio do seccionamento de mudas estabelecidas in vitro (Figura 10A).

Inoculação dos Explantes em Capela de Fluxo Laminar

- 1) Inocular quatro explantes por frasco de vidro transparente com capacidade de 220 mL (Figura 10B), contendo 30 mL do meio de cultura de Pierik (1976), solidificado com ágar, adicionado de $2,22 \mu\text{M}$ de BAP.
- 2) Manter as culturas em sala de crescimento, a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, densidade de fluxo de fótons de $30 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ e fotoperíodo de 12 horas.

Subcultivos

Realizar os subcultivos em intervalos de 30 dias.



Fotos: Cláudio de Norões Rocha

Figura 10. Mudras de antúrio, cv. Eridibel, estabelecidas in vitro (A) e explantes provenientes dessas mudras inoculados em meio de cultura Pierik (1976), contendo $2,22 \mu\text{M}$ de BAP (B).

Micropropagação por Estiolamento

Protocolo desenvolvido por Pinheiro et al. (2009), que tem como base o estiolamento das brotações de antúrio. O estiolamento é uma técnica em que se obtém o desenvolvimento de brotos, caules ou partes desses, na ausência de luz, o que causa crescimento, geralmente alongado, e com coloração amarela ou branca, em razão da ausência de clorofila (HARTMANN; KESTER, 1990). O estiolamento retarda a lignificação e reduz as propriedades mecânicas dos tecidos, induzindo o enraizamento nas brotações estioladas (BIASI, 1996).

A micropropagação por meio de segmentos nodais estiolados in vitro foi proposta por Kiss et al. (1995), sendo desenvolvida inicialmente para o abacaxizeiro comestível (*Ananas comosus* var. *comosus*). Este método tem a vantagem de evitar lesões na zona de regeneração, impedindo e/ou reduzindo a formação de calo e, consequentemente, proporcionando baixos níveis de variabilidade fenotípica. Embora a produção de mudas in vitro por esta técnica já tenha sido relatada para algumas culturas, este é o primeiro registro para o antúrio, e consta das seguintes etapas:

Material Vegetal

Os explantes são obtidos a partir de mudas estabelecidas in vitro (Figura 10A), que são seccionadas em segmentos caulinares (microestacas) com tamanho médio de 5 cm, contendo em torno de três a cinco nós, que devem ser totalmente desfolhados.

Etapa 1: Indução ao Estiolamento

- 1) Inocular os explantes, em capela de fluxo laminar, perpendicularmente, um por tubo de ensaio (150 mm x 25 mm) contendo 10 mL do meio de cultura de Pierik (1976), solidificado com ágar, sem a adição de reguladores de crescimento.
- 2) Manter as culturas sob temperatura de 25 °C, no escuro, por 60 dias.
- 3) Verificar se o estiolamento in vitro ocorre apenas nos brotos que se desenvolvem a partir das gemas axilares, presentes nos nós (Figura 11A).

Etapa 2: Obtenção das Mudas

Para esta etapa, com o uso de capela de fluxo laminar, deve-se coletar as plantas com brotos estiolados in vitro da Etapa 1, e constará dos seguintes passos:

- 1) Seccionar os brotos estiolados em segmentos contendo apenas dois nós.
- 2) Colocar os explantes horizontalmente, um por tubo de ensaio (150 mm x 25 mm) contendo 10 mL do meio de cultura de Pierik (1976), solidificado com ágar e suplementado com 2,22 μ M de BAP.
- 3) Manter as culturas em câmara de crescimento com temperatura de 25 °C, fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons de 30 μ mol/m²/s, por 60 dias de cultivo (Figura 11B).

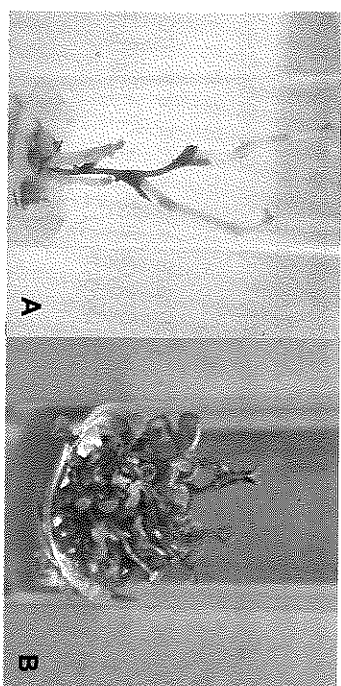


Figura 11. Segmento caulinar de antúrio, cv. Edibel, contendo de 3 a 5 nós, totalmente desfolhado, sob condições de estiolamento in vitro (A); e em multiplicação de mudas a partir de secções de brotos estiolados (B).

Alongamento e Enraizamento das Mudas

Após 60 dias de cultivo em meio Pierik (1976), sem regulador de crescimento, deixando-as nesse meio por 2 meses.

Propagação in vitro por Embriogênese Somática

Este protocolo, desenvolvido por Pinheiro (2010), Carvalho et al. (2012), Pinheiro et al. (2013a) e Pinheiro et al. (2013b) possui as seguintes etapas:

Material Vegetal

Mudas previamente estabelecidas in vitro (Figura 12A) são seccionadas para a obtenção dos explantes.

Deve-se constar os seguintes passos:

- 1) Em capela de fluxo laminar, secionar os brotos em segmentos nodais contendo um nó (Figura 12B).

- 2) Inocular horizontalmente nove segmentos nodais por placa de Petri (90 mm x 15 mm), contendo 25 mL de meio Pierik (1976), adicionado de 10 μM de ANA, 20 g/L de sacarose e 6,5 g/L de ágar (Figura 12C).
- 3) Manter as culturas em câmara de crescimento com temperatura de 25 °C e na ausência de luz por 60 dias, para a indução dos calos embriogênicos (Figura 12D).

Proliferação dos Calos Embriogênicos

- 1) Em capela de fluxo laminar, os calos embriogênicos, com cerca de 0,5 cm a 1 cm, devem ser subdivididos e inoculados, nove por placa de Petri (90 cm x 15 mm), contendo o mesmo meio de cultura para indução da embriogênese somática, relatado no item anterior.
- 2) Manter as culturas em câmara de crescimento com temperatura de 25 °C, no escuro, por 60 dias.
- 3) A cada 60 dias de cultivo, sob condições assépticas, subcultivar os calos (Figura 12E) seccionando-os ao meio e inocular em novas placas de Petri contendo o mesmo meio de cultura para dar continuidade ao processo de indução da embriogênese somática. Os calos embriogênicos, devem ter textura friável e coloração amarelo-clara (Figura 12D-E), para alcançar desenvolvimento embrionário posterior.

Maturação dos Embriões Somáticos

Devem ser utilizados calos embriogênicos, provenientes do meio de proliferação, com cerca de 90 mg de massa fresca (Figura 12E), e inoculados sob condições assépticas em Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL de meio líquido Pierik (1976) acrescido de 0,47 μM de cinetina (6-furfurilaminopurina).

As culturas devem ser mantidas em sala de crescimento, com temperatura de 25 °C, no escuro; os Erlenmeyers devem ser cobertos por folha de papel alumínio, sob agitação orbital de 100 rpm, por 45 dias.

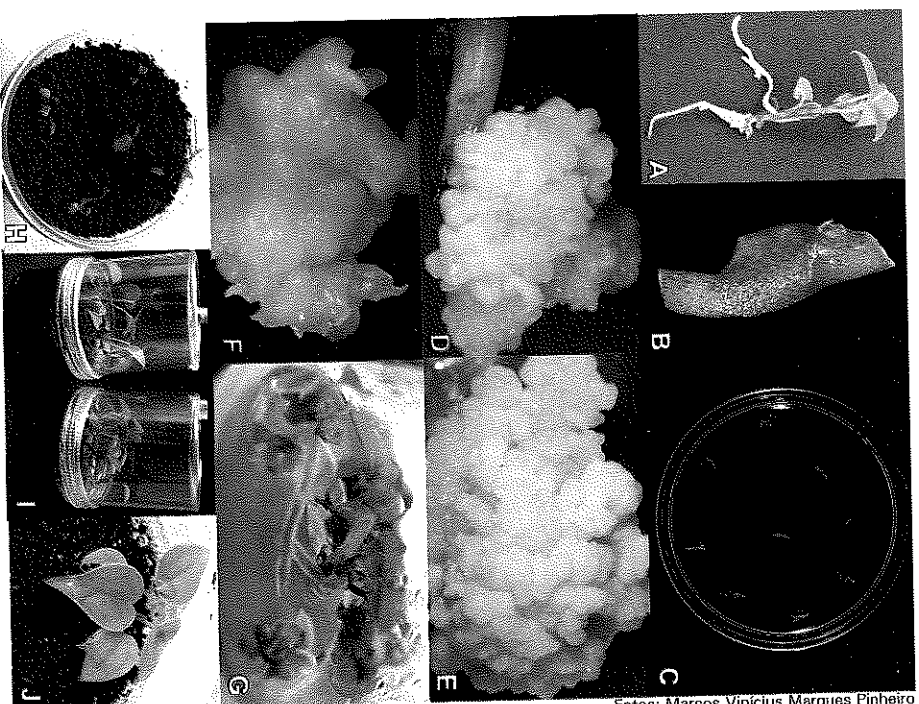
Germinação dos Embriões Somáticos e Conversão em Plantas

São utilizados cinco calos com embriões somáticos em fase de maturação (Figura 12F), e inoculados em Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL de meio Pierik (1976) acrescido de 2,32 μM de cinetina, 20 g/L de sacarose e 6,5 g/L de ágar.

Manter as culturas em câmara de crescimento à temperatura de 25 °C, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 30 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, por 45 dias de cultivo.

Aclimatização de Plantas Provenientes da Embriogênese Somática

Após 45 dias, as mudas (Figura 12G) devem ser transplantadas para frascos especiais com tampa, para conservar a umidade interna do ambiente elevada, contendo substrato comercial (Figura 12H), e manter em bancada de laboratório à temperatura ambiente (em torno de 28 ± 2 °C), sob luz artificial de 50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ e luz natural indireta, durante dois meses (Figura 12I). Após esse período, transferir as plantas individualmente para copos plásticos de 300 cm³, contendo substrato comercial e cultivar por três meses em casa de vegetação com temperatura e umidade controladas (Figura 12J). Com esse procedimento, a taxa de sobrevivência é de aproximadamente 65%.



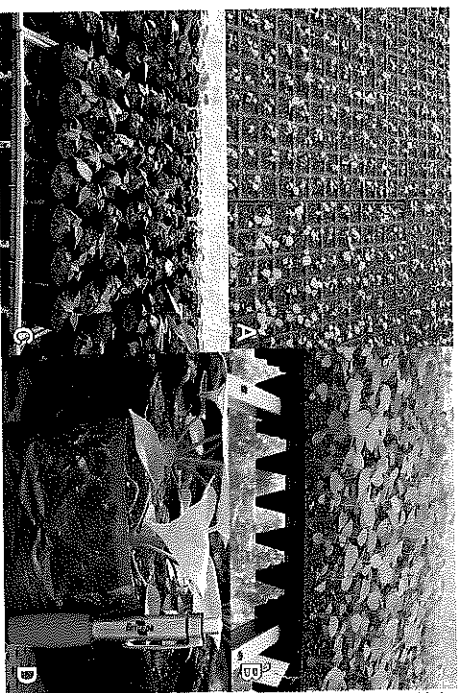
Fotos: Marcos Vinicius Marques Pinheiro

Figura 12. Muda micropropagada de antúrio, cv. Eidibel, previamente estabelecida in vitro, em desenvolvimento adequado para a excisão dos explantes para indução da embriogênese somática (A); segmento nodal contendo uma gema axilar (B); segmentos nodais inoculados horizontalmente em placa de Petri (C); segmento nodal com formação de calos embriogênicos, após etapa de indução (D); calo embriogênico subcultivado a cada 60 dias de cultivo, no mesmo meio de indução, evidenciando embriogênese somática secundária (E); calos embriogênicos com embriões somáticos em fase de maturação (F); plantas completas obtidas a partir da conversão de embriões somáticos (G); plantas em início de aclimatização sob luz fluorescente e luz natural indireta à temperatura ambiente (H-I); detalhe do frasco especial utilizado para aclimatização das mudas (I); planta com três meses de idade em casa de vegetação, sob condições controladas (J).

Aclimatização

Seguindo protocolo produzido por Tombolato et al. (1998), a aclimatização das mudas micropropagadas de antúrio, obtidas a partir da organogênese indireta por explante foliar ou por explante de fruto, da multiplicação por segmento nodal na presença de luz ou na ausência de luz via estiolamento, obedecerá à seguinte sequência:

- 1) Retirar, do meio de cultura, as mudas bem desenvolvidas com sistema radicular adequado (Figura 7C).
- 2) Lavar as raízes em água corrente para eliminar todo o meio de cultura.
- 3) Plantar as mudas em bandejas plásticas ou de isopor, contendo, como substrato, fibra de coco curtida e umedecida com solução nutritiva composta pela metade da concentração dos macronutrientes do MS.
- 4) Cobrir as bandejas com cobertura de plástico transparente e mantê-las em câmara de cultivo com densidade de fluxo de fótons de $30 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25°C .
- 5) Remover as bandejas após 30 a 40 dias para condições de temperatura ambiente e eliminar a cobertura de plástico, para melhor adaptação das mudas (Figura 13A-B).
- 6) Transferir as plantas individualmente, decorridos mais 15 dias, para recipientes contendo substrato (terra argilosa + areia + matéria orgânica, na proporção 1:1:1) e mantê-las em casa de vegetação com 70% de sombreamento (Figura 13C-D).



Fotos: David dos Santos Júnior

Figura 13. Mudanças micropropagadas de antúrio cv. Eidibel, plantadas em bandejas plásticas, aproximadamente aos 30 (A) e 60 dias (B) de aclimatização; em sacos plásticos, aproximadamente aos 90 dias de aclimatização (C) e em destaque (D).

Referências

- 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.
- ATAK, Ç.; ÇELİK, Ö. Micropropagation of *Anthurium andraeanum* from leaf explants. *Pakistan Journal of Botany*, v. 41, p. 1155-1161, 2009.
- BAUTISTA, N. D. R.; PEÑALVER, D. A.; RODRÍGUEZ, R. B.; CHIU, W. C.; LÓPEZ, R. C.; TERRY, F. J.; PERALTA, M. P.; MARTÍNEZ, O. G. Embriogénesis somática en (*Anthurium andraeanum* Lind.) variedad 'Lambada'. *Revista de Sociedad, Cultura y Desarrollo Sustentable*, México, v. 4, n. 1, p. 135-149, 2008.
- BEYRAMIZADE, E.; AZADI, P.; MILL, M. Optimization of factors affecting organogenesis and somatic embryogenesis of *Anthurium andraeanum* lind. 'Tera'. *Propagation of Ornamental Plants*, Sofia, v. 8, n. 4, p. 198-203, 2008.
- BIASI, L. A. Emprego do estiolamento na propagação de plantas. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 26, n. 2, p. 309-314, 1996.
- CALDARI JUNIOR, P. Técnicas de cultivo do antúrio (*Anthurium andraeanum*). *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental*, Campinas, v. 10, n. 1/2, p. 42-44, 2004.
- 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. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2011 (Embrapa Agroindústria Tropical. Circular Técnica, 36., 8p.)
- CARVALHO, A. C. P. P.; PINHEIRO, M. V. M.; MARTINS, F. B.; CRUZ, A. C. F.; OTONI, W. C. Produção de mudas micropropagadas de antúrio (*Anthurium andraeanum*) cv. Eidibel por embriogénesis somática. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2012. (Embrapa Agroindústria Tropical Circular Técnica, 41). 14p.
- CASTRO, A. C.; RESENDE, L. V.; GUMARÃES, 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, C. E. F.; FONSECA, M. S.; SONDahl, M. R.; MAVTHES, L. A. F. Propagação vegetativa do antúrio in vitro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 3., 1982, Salvador, Anais... Campinas: Instituto de Botânica, 1986. p. 13-25.
- CHEN, F. C.; KUEHNLE, A. R.; SUGIL, N. *Anthurium* roots for micropropagation and *Agrobacterium tumefaciens* mediated gene transfer. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Hague, v. 49, n. 1, p. 71-74, 1997.
- CUQUEL, F. L.; GROSSI, M. L. Produção de antúrio no litoral do Estado do Paraná. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental*, Campinas, v. 10, n. 1/2, p. 35-37, 2004.
- DUQUENNE, B.; EECKHAUT, T.; WERBROUCK, S.; HUYLENBROECK, J. Effect of enzyme concentrations on protoplast isolation and protoplast culture of *Spathiphyllum* and *Anthurium*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Hague, v. 91, n. 2, p. 165-173, 2007.
- FITCH, M. M. M.; LEONG, T. C. W.; HE, X.; MCCAFFERTY, H. R. K.; ZHU, Y. J.; MOORE, P. H.; GONSALVES, D.; ALDWINCKLE, H. S.; ATKINSON, H. J. Improved Transformation of *Anthurium*. *Hortscience*, Alexandria, v. 46, n. 3, p. 358-364, 2011.
- 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.

- GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. D. **Plant Propagation by Tissue Culture**. Netherlands, 2008. 508p.
- HAMIDAH, M.; KARIM, A. G. A.; DEBERGH, P. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Anthurium scherzerianum*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Hague, v. 48, n. 3, p. 189-193, 1997.
- HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E. **Propagación de plantas: principios y prácticas**. México: Continental, 1990. 760p.
- JAHAN, M. T.; ISLAM, M. R.; KHAN, R.; MAMUN, A. N. K. AHMED, G.; HAKIM, L. In vitro clonal propagation of *Anthurium (Anthurium andraeanum L.)* using callus culture. **Plant Tissue Culture e Biotechnology**, Rehovet, v. 19, n. 1, p. 61-69, 2009.
- KISS, E.; KISS, J.; GYULAI, G.; HESZKY, L. E. A novel method for rapid micropropagation of pineapple. **HortScience**, Alexandria, v. 30, n. 1, p. 127129, 1995.
- KUEHNLE, A. R.; CHEN, F.-C.; SUGIL, N. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Anthurium andraeanum* hybrids. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 11, p. 438-442, 1992.
- KUEHNLE, A. R.; SUGIL, N. Callus induction and plantlet regeneration in tissue cultures of Hawaiian anthuriums. **HortScience**, Alexandria, v. 26, n. 9, p. 919-921, 1991.
- KUNISAKI, J. T. *In vitro* propagation of *Anthurium andraeanum* Lindl. **HortScience**, Alexandria, v. 15, n. 4, p. 508-509, 1980.
- LEME, J. M. **Resfriamento e conservação de antúrio 'IAC Eidbel'**. 2004. 119p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- LEME, J. M.; HONÓRIO, S. L. Pedronização e qualidade de antúrio. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 10, n. 1/2, p. 48-50, 2004.
- LIENDO, M.; MOGOLLÓN, N. Multiplicación clonal *in vitro* del anturio (*Anthurium andraeanum* Lind. cv. Nicoyal). **Bioagro**, Barquisimeto, v. 21, n. 3, p. 179-182, 2009.
- LIGHTBOURN, G. J.; PRASAD, P. V. D. *In vitro* techniques for rapid multiplication of four varieties of *Anthurium andraeanum* in Jamaica. **Proceedings of the Interamerican Society for Tropical Horticulture**, v. 34, p. 3-5, 1990.
- MAIRA, O.; ALEXANDER, M.; VARGAS, T. E. Micropropagation and Organogenesis of *Anthurium andraeanum* Lind cv. Rubrun. In: JAIN, S. M.; OCHATT, S. J. (Ed.). **Protocols for In Vitro Propagation of Ornamental Plants, Methods in Molecular Biology**. Totowa, New Jersey: Humana Press Edition, 2010. p. 3-14.
- MARTIN, K.; JOSEPH, D.; MADASSER, J.; PHILIP, V. Direct shoot regeneration from lamina explants of two commercial cut flower cultivars of *Anthurium andraeanum* Hort. In **Vitro Cellular e Developmental Biology -Plant**, Columbia, v. 39, p. 500-504, 2003.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Oxford, v. 15, p. 473-497, 1962.
- NHUT, D. T.; NGUYEN, D.; VY, N. N. H.; KHUE, C. D.; KHIEM, D. V.; VINH, D. N. Impact of *Anthurium* spp. genotype on callus induction derived from leaf explants, and shoot and root regeneration capacity from callus. **Journal of Applied Horticulture**, v. 8, n. 2, p. 135-137, 2006.
- PIERIK, R. L. M. Callus multiplication of *Anthurium andraeanum* Lindl. in liquid media. **Netherlands Journal of Agricultural Science**, v. 23, p. 299-302, 1975.
- PIERIK, R. L. M. *Anthurium andraeanum* plantlets produced from callus tissues cultivated in vitro. **Physiologia Plantarum**, Oxford, v. 37, n. 1, p. 8082, 1976.
- PIERIK, R. L. M.; STEEGMANS, H. H. M.; VAN DER MEYS, J. A. J. Plantlet formation on callus tissues of *Anthurium andraeanum* Lindl. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 2, p. 193-198, 1974.
- PINHEIRO, M. V. M. **Propagação in vitro de antúrio (*Anthurium andraeanum* cv. Eidbel) via embriogênese somática**. 2010. 67p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- PINHEIRO, M. V. M.; DIAS, G. M. G.; CARVALHO, A. C. P. P.; BARROS, L. M. Micropropagação de antúrio 'IAC Eidbel' por meio da indução ao estriamento e regeneração de plantas. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 15, n. 2, p. 133-142, 2009.
- PINHEIRO, M. V. M.; DIAS, G. M. G.; CARVALHO, A. C. P. P.; BARROS, L. M. Meio de cultura, concentração de BAP e fotoperíodo na micropropagação de antúrio 'Eidbel' por segmentos caulinares. **Plant Cell Culture e Micropropagation**, Lavras, v. 6, n. 1, p. 10-17, 2010.

- 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* (In Press), 2012.
- PINHEIRO, M. V. M.; MARTINS, F. B.; CRUZ, A. C. F.; CARVALHO, A. C. P. P.; VENTRELLA, M. C.; OTONI, W. C. Maturation of *Anthurium andraeanum* cv. Eidibel somatic embryos from explants of nodal segments. *In Vitro Cellular and Developmental Biology -Plant* (In Press), 2013a.
- PINHEIRO, M. V. M.; MARTINS, F. B.; RÉGO, 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. (ISHS)* (In Press), 2013b.
- PUCHOOA, D. *In Vitro* Mutation Breeding of Anthurium by Gamma Radiation. *International Journal of Agriculture and Biology*, Faisalabad, v. 7, n. 1, p. 11-20, 2005.
- SANTOS, M. R. A. D.; TIMBÓ, A. L. D. O.; CARVALHO, A. C. P. P. D.; MORAIS, J. P. S. Callus induction and plant regeneration from *Anthurium andraeanum* Lindl. fruits. *Plant Cell Culture e Micropropagation*, Lavras, v. 1, n. 2, p. 77-79, 2005.
- SCHIAVINATO, Y. O.; NOGUEIRALUCON, T. N.; TOMBOLATO, A. F. C.; BARBOSA, W.; VEIGA, R. F. D. A. Micropropagação de *Anthurium plowmannii* Croat. *Plant Cell Culture e Micropropagation*, Lavras, v. 4, n. 1, p. 15-20, 2008.
- TE-CHATO, S.; SUSANON, T.; SONTIKUN, Y. Cultivar, explant type and culture medium influencing embryogenesis and organogenesis in *Anthurium* spp. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, Songkla, v. 28, n. 4, p. 717-722, 2006.
- TENG, W.-L. Regeneration of *Anthurium* adventitious shoots using liquid or raft culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Hague, v. 49, n. 2, p. 153156, 1997.
- TOMBOLATO, A. F. C.; CASTRO, A. C. R. Antúrio. In: TERAQ, D.; CARVALHO, A. C. P. P. D.; BARROSO, T. C. D. S. F. (Ed.). *Flores Tropicais, Tropical Flowers*. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2005.
- TOMBOLATO, A. F. C.; QUIRINO, E. A. Multiplicação in vitro de novas seleções de *Anthurium andraeanum* Lindl. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental*, Campinas, v. 2, n. 1, p. 37-46, 1996.
- TOMBOLATO, A. F. C.; QUIRINO, E. A.; COSTA, A. M. M. Antúrio (*Anthurium andraeanum* Lindl.). In: TOMBOLATO, A. F. C.; COSTA, A. M. M. (Ed.). *Micropropagação de plantas ornamentais*. Campinas: Instituto Agronômico, 1998, p. 18-21. (IAC. Boletim técnico, 174).
- TOMBOLATO, A. F. C.; RIVAS, E. B.; BERGMANN, L. C.; IMENES, S. D. L.; FURLANI, P. R.; CASTRO, C. E. F. D.; MATHES, L. A. F.; SAES, L. A.; COSTA, A. M. M.; TAGLIACCOZZO, G. M. D.; LEME, J. M. *Cultivo de antúrio: produção comercial*. Campinas: Instituto Agronômico, 2002. 47p.
- TOMBOLATO, A. F. C.; UZZO, R. P.; CASTRO, A. C. R.; SAKAI, M.; SAES, L. A. Recursos genéticos e melhoramento do antúrio (*Anthurium andraeanum* Linden) no IAC-APTA. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental*, Campinas, v. 10, n. 1/2, p. 1-5, 2004.
- VIÉGAS, J.; ROCHA, M. T. R. D.; FERREIRA-MOURA, I.; ROSA, D. L. D.; SOUZA, J. A. D.; CORRÊA, M. G. S.; SILVA, J. A. T. D. *Anthurium andraeanum* (Linden ex André) culture: *in vitro* and *ex vitro*. *Floriculture and Ornamental Biotechnology*, v. 1, n. 1, p. 61-65, 2007.
- WINARTO, B.; MATTJIK, N. A.; SILVA, J. A. T. D.; PURWITO, A.; MARWOTO, B. Ploidy screening of anthurium (*Anthurium andraeanum* Linden ex André) regenerants derived from anther culture. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v. 127, p. 86-90, 2010.
- WINARTO, B.; RACHIMAWATI, F.; PRAMANIK, D.; SILVA, J. A. T. da. Morphological and cytological diversity of regenerants derived from half-anther cultures of anthurium. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Hague, v. 105, p. 363-374, 2011a.
- WINARTO, B.; RACHIMAWATI, F.; SILVA, J. A. T. da. New basal media for half-anther culture of *Anthurium andraeanum* Linden ex André cv. Tropical. *Plant Growth Regulation*, Dordrecht, v. 65, p. 513-529, 2011b.
- WINARTO, B.; SILVA, J. A. T. da. Influence of isolation technique of halfanthers and of initiation culture medium on callus induction and regeneration in *Anthurium andraeanum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Hague, v. 110, p. 401-411, 2012.
- YEUNG, E. C. Structural and developmental patterns in somatic embryogenesis. In: THORPE, T. A. (Ed.). *In vitro embryogenesis in plants*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995. p. 205-247.
- YU, Y.-X.; LIU, L.; LIU, J.-X.; WANG, J. Plant Regeneration by Callus-Mediated Protocorm-Like Body Induction of *Anthurium andraeanum* Hort. *Agricultural Sciences in China*, v. 8, n. 5, p. 572-577, 2009.