

MARCOS VINÍCIUS MARQUES PINHEIRO

**PROPAGAÇÃO FOTOAUTOTRÓFICA DE *Etinglera elatior* 'Porcelana' E  
ASPECTOS ANATÔMICOS E CARACTERIZAÇÃO E EXPRESSÃO DO GENE  
*SERK* NA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM *Anthurium andraeanum* 'Eidibel'**

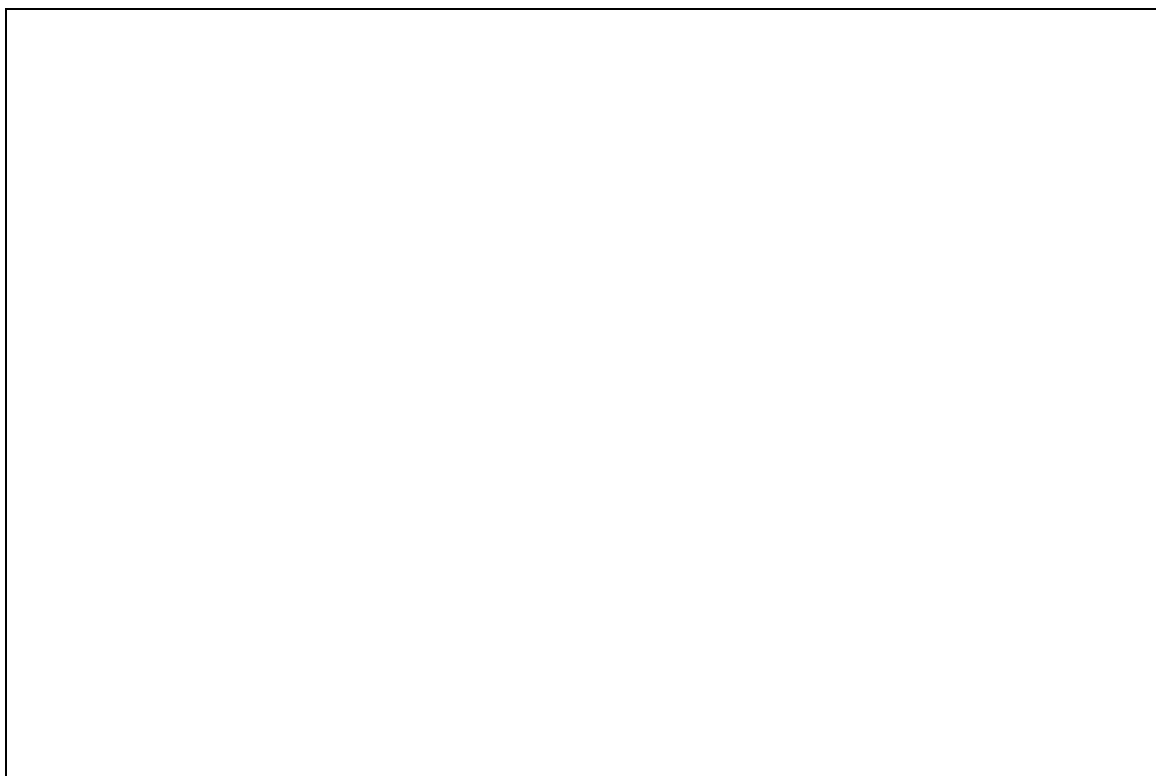
Tese apresentada à Universidade Federal de  
Viçosa, como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em Botânica,  
para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA

MINAS GERAIS - BRASIL

2014

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

A large, empty rectangular box with a thin black border, occupying the lower half of the page. It is intended for the cataloging record, which is currently blank.

MARCOS VINÍCIUS MARQUES PINHEIRO

**PROPAGAÇÃO FOTOAUTOTRÓFICA DE *Etinglera elatior* 'Porcelana' E  
ASPECTOS ANATÔMICOS E CARACTERIZAÇÃO E EXPRESSÃO DO GENE  
*SERK* NA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM *Anthurium andraeanum* 'Eidibel'**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 18 de fevereiro de 2014

---

Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Santos

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Renata Maria S. Alves Meira

---

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

---

Dra. Andréa Dias Koehler  
(Co-orientadora)

---

Prof. Dr. Wagner Campos Otoni  
(Orientador)

*Aos meus pais Dion e Celina, e a  
minha esposa Fabrina,  
pelas orações, pelo amor e  
apoio irrestrito,*

**Dedico**

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), ao Programa de Pós-Graduação em Botânica e ao Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), pela realização do curso de doutorado e deste trabalho.

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

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro.

Aos meus orientadores Wagner Campos Otoni e Ana Cristina P. P. de Carvalho pelos ensinamentos, pela confiança e pela amizade. Serei eternamente grato.

Aos professores Marcelo de Oliveira Santos e Renata Maria Strozi Alves Meira, e a Dra. Andréa Dias Koehler, por aceitarem participar como membros da banca examinadora, pelos ensinamentos e valiosas sugestões/críticas dadas aos trabalhos.

Ao professor Francisco A. O. Tanaka pela amizade, co-orientação e por abrir as portas do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada à Agricultura (NAP/MEPA – ESALQ/USP).

À Ana Claudia Ferreira da Cruz, pela amizade e importante auxílio no Laboratório de Anatomia Vegetal.

Ao grupo “SERK” pela amizade e ajuda mútua.

Ao amigo Wagner Campos Otoni, pelo exemplo de caráter, competência e profissionalismo.

Aos meus pais, Dion e Celina, pela educação, pelas orações, por me ensinarem o valor do trabalho e pelo exemplo de vida

Aos irmãos, pelo amor, apoio, e por entenderem a busca dos meus sonhos tão longe de casa.

À minha esposa Fabrina, pelo amor, dedicação e paciência, e pelo auxílio nas estatísticas e confecções de gráficos dos trabalhos.

Aos colegas do LCTII pela amizade, companheirismo e brincadeiras.

Aos inesquecíveis amigos do curso de Fisiologia Vegetal (Mestrado), por terem feito essa etapa em Viçosa tão divertida e menos estressante.

A todos aqueles que não foram mencionadas, mas colaboraram de alguma forma, para o desenvolvimento deste trabalho.

## BIOGRAFIA

MARCOS VINÍCIUS MARQUES PINHEIRO, filho de Dion Pinheiro Filho e de Celina Maria Marques Pinheiro, nasceu em 25 de setembro de 1982, em Ubajara, Ceará.

Concluiu o 1º grau em 1997, e o 2º grau em 2001, no Colégio Christus, em Fortaleza, Ceará.

Em março de 2003, ingressou no Curso de Agronomia da Universidade Federal do Ceará, concluindo o curso em dezembro de 2007.

Em março de 2008, ingressou no Curso de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, em nível de Mestrado, na Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais, concluindo os requisitos necessários à obtenção do título de *Magister Scientiae* em 23 de fevereiro de 2010.

Em março de 2010, iniciou o Curso de Pós-Graduação em Botânica, em nível de Doutorado, na Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais, concluindo os requisitos necessários à obtenção do título de *Doctor Scientiae* em 18 de fevereiro de 2014.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	viii
<b>ABSTRACT</b> .....	x
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	1
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	6
<b>CAPÍTULO I</b>	
<b>Propagação fotoautotrófica de bastão-do-imperador [<i>Etilingera elatior</i> (Jack) R. M. Smith] (Zingiberaceae)</b> .....	12
Resumo .....	12
Abstract.....	13
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	17
<i>Material vegetal e condições de cultivo</i> .....	17
<i>Alongamento e enraizamento de bastão-do-imperador em caixas de ventilação forçada de ar</i> .....	17
<i>Parâmetros de crescimento</i> .....	17
<i>Quantificação de pigmentos fotossintéticos</i> .....	18
<i>Caracterização anatômica, histoquímica e densidade estomática das folhas</i> .....	18
<i>Aclimatização das plantas</i> .....	19
<i>Delineamento experimental e análise estatística</i> .....	19
<b>RESULTADOS</b> .....	21
<i>A atmosfera enriquecida com CO<sub>2</sub> melhora o desenvolvimento plantas de E. elatior cv. Porcelana durante a fase de alongamento e enraizamento in vitro</i> .....	21
<i>Atmosfera enriquecida com CO<sub>2</sub> aumenta os pigmentos fotossintéticos, sem causar alterações na densidade estomática de plantas de Etilingera elatior cv. Porcelana durante a fase de alongamento e enraizamento in vitro</i> .....	24
<i>Características morfológicas, anatômicas e histoquímicas das folhas de plantas de Etilingera elatior cv. Porcelana, diferem entre os tratamentos</i> .....	26
<i>Atmosfera enriquecida com CO<sub>2</sub> aumenta a sobrevivência de plantas de E. elatior cv. Porcelana em condições ex vitro</i> .....	31
<b>DISCUSSÃO</b> .....	34
<i>A atmosfera enriquecida com CO<sub>2</sub> melhora o crescimento in vitro de plantas de E. elatior cv. Porcelana, durante a fase de alongamento e enraizamento in vitro</i> .....	34

<i>Atmosfera enriquecida com CO<sub>2</sub> aumenta os pigmentos fotossintéticos, sem causar alterações na densidade estomática de plantas de E. elatior cv. Porcelana durante a fase de alongamento e enraizamento in vitro</i> .....	35
<i>Características morfológicas, anatômicas e histoquímicas das folhas de plantas de Etlíngera elatior cv. Porcelana, diferem entre os tratamentos</i> .....	36
<i>Atmosfera enriquecida com CO<sub>2</sub> aumenta a sobrevivência de plantas de Etlíngera elatior cv. Porcelana em condições ex vitro</i> .....	38
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	40
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	41
<b>CAPÍTULO II</b>	
<b>Embriogênese somática de antúrio [<i>Anthurium andraeanum</i> (Linden ex André) cv. Eidibel] (Araceae): caracterização histoquímica e estrutural</b> .....	47
Resumo .....	47
Abstract.....	48
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	49
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	52
<i>Material vegetal e condições de cultivo</i> .....	52
<i>Indução de embriogênese somática</i> .....	52
<i>Preparo das amostras para análises histológicas</i> .....	52
<i>Microscopia de luz</i> .....	53
<i>Microscopia eletrônica de varredura</i> .....	53
<i>Microscopia eletrônica de transmissão</i> .....	53
<b>RESULTADOS</b> .....	55
<i>Alterações morfohistológicas dos segmentos nodais durante a indução de embriogênese somática</i> .....	55
<i>Caracterização histoquímica da indução de embriogênese somática</i> .....	58
<b>DISCUSSÃO</b> .....	64
<i>Alterações estruturais da indução da embriogênese somática</i> .....	64
<i>Mobilização de reservas da embriogênese somática</i> .....	65
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	66
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	68
<b>CAPÍTULO III</b>	
<b>Clonagem, caracterização molecular e análise da expressão do gene <i>SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE (SERK)</i> na embriogênese</b>	



somática em antúrio [ <i>Anthurium andraeanum</i> (Linden ex André) cv. Eidibel] (Araceae).....	75
Resumo .....	75
Abstract.....	76
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	77
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	80
<b>Material vegetal e condições de cultivo</b> .....	80
<i>Indução de embriogênese somática</i> .....	80
<i>Maturação de embriões somáticos</i> .....	80
<b>Microscopia de luz</b> .....	81
<b>Clonagem e caracterização do gene <i>SERK</i> de <i>A. andraeanum</i></b> .....	81
<i>Extração, quantificação e verificação da integridade do RNA total</i> .....	81
<i>Síntese de cDNA fita simples (Superscript II – Invitrogen<sup>TM</sup>)</i> .....	82
<i>Amplificação, purificação e clonagem da sequência codificadora de <i>SERK</i></i> .....	82
<i>Sequenciamento dos clones e análise das sequências</i> .....	84
<i>Análise filogenética</i> .....	84
<b>Análise da expressão espacial do gene <i>SERK</i> durante a embriogênese somática de <i>A. andraeanum</i> por hibridização <i>in situ</i></b> .....	85
<i>Coleta e preparo dos tecidos</i> .....	85
<i>Síntese da sonda senso e anti-senso marcadas com digoxigenina</i> .....	86
<i>Reação de hibridização</i> .....	86
<i>Reação de pós-hibridização e detecção imunológica</i> .....	87
<b>RESULTADOS</b> .....	88
<b>Alterações estruturais dos segmentos nodais durante a indução da embriogênese somática em <i>A. andraeanum</i></b> .....	88
<b>Clonagem da provável sequência codificadora de <i>SERK</i> em <i>A. andraeanum</i></b> .....	90
<b>Análise dos homólogos de <i>SERK</i> por meio das sequências de nucleotídeos</b> .....	90
<b>Análise da sequência de aminoácidos da proteína <i>SERK</i> de <i>A. andraeanum</i></b> .....	91
<b>Análise filogenética</b> .....	94
<b>Caracterização do padrão de expressão de <i>SERK</i> por hibridização <i>in situ</i></b> .....	96
<b>DISCUSSÃO</b> .....	99
<b>Alterações estruturais dos segmentos nodais durante a indução da embriogênese somática em <i>A. andraeanum</i></b> .....	99
<b>Expressão do gene <i>SERK</i> na embriogênese somática de <i>A. andraeanum</i></b> .....	100

<b>Comparação entre AanSERK-like e SERK de outras espécies .....</b>	<b>102</b>
<b>AGRADECIMENTOS .....</b>	<b>104</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>105</b>
<b>CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>113</b>

## RESUMO

PINHEIRO, Marcos Vinícius Marques, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2014. **Propagação fotoautotrófica de *Etinglera elatior* 'Porcelana' e aspectos anatômicos e caracterização e expressão do gene *SERK* na embriogênese somática em *Anthurium andraeanum* 'Eidibel'**. Orientador: Wagner Campos Otoni. Co-orientadores: Andrea Dias Koehler e Francisco André Ossamu Tanaka

O uso da biotecnologia, especialmente com a utilização de técnicas da cultura de tecidos, proporciona uma forma alternativa de propagação das plantas, além de ser importante ferramenta para o melhoramento e conservação dos recursos genéticos. As espécies desse estudo, bastão-do-imperador [*Etinglera elatior* cv. Porcelana (Zingiberaceae)] e antúrio [*Anthurium andraeanum* cv. Eidibel (Araceae)] têm elevada importância econômica na floricultura mundial, sendo fundamentais o domínio e o aprimoramento de técnicas biotecnológicas aplicadas à propagação *in vitro*. Nesse tipo de propagação, de modo especial aplicada à ornamentais, prima pela otimização dos sistemas de propagação em larga escala. Na propagação *in vitro* convencional, o sistema de vedação dos frascos restringe, entre outros, as trocas gasosas, além de dificultar a absorção de água e nutrientes, aumentando as perdas do material vegetal durante a aclimatização. No presente trabalho, para bastão-do-imperador, realizou-se a propagação fotoautotrófica associada ao enriquecimento da atmosfera dos frascos com CO<sub>2</sub>, com o intuito de rusticificar as vitroplantas ainda em condições *in vitro*, com grandes benefícios à sobrevivência, com o aumento da tolerância aos estresses impostos às plantas na fase de aclimatização, aproximando-as daquelas produzidas em campo. Para antúrio, o desenvolvimento de técnicas eficientes de propagação *in vitro* proporcionou perspectivas novas e promissoras para o melhoramento do antúrio, capazes de ampliar a produção comercial e o abastecimento do mercado brasileiro e mundial. Dentre essas técnicas destaca-se a embriogênese somática, pois pode ser aplicada com sucesso em sistema de produção de plantas em larga escala, além de ser um sistema ideal para estudos anatômicos, estruturais e moleculares envolvidos na aquisição de competência embriogênica e de grupos de genes especificamente expressos durante a embriogênese somática. O presente trabalho contribuiu na geração de conhecimentos a cerca da propagação *in vitro* das espécies a partir das técnicas de

propagação fotoautotrófica, em bastão-do-imperador, caracterizando as respostas morfofisiológicas das plantas submetidas a condições de crescimento heterotrófico, fotomixotrófico e fotoautotrófico; e da propagação *in vitro* do antúrio via embriogênese somática, abordando alterações estruturais e o acúmulo de reservas envolvidas durante a ontogênese dos calos embriogênicos, além de caracterizar e analisar a expressão do gene *SERK* nessa espécie.

## ABSTRACT

PINHEIRO, Marcos Vinícius Marques, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2014. **Photoautotrophic propagation of *Etinglera elatior* 'Porcelana': anatomical features, characterization and expression of gene SERK in somatic embryogenesis of *Anthurium andraeanum* 'Eidibel'**. Adviser: Wagner Campos Otoni. Co-Adviser: Andrea Dias Koehler e Francisco André Ossamu Tanaka

The use of biotechnology, particularly with the use of tissue culture techniques, provides an alternative way of plant propagation, as well as being an important tool for breeding and genetic resources conservation. The species of this study, torch ginger [*Etinglera elatior* cv. Porcelana (Zingiberaceae)] and anthurium [*Anthurium andraeanum* cv. Eidibel (Araceae)] present a high economic importance in the global floriculture, being fundamental the domain and enhancement of biotechnological techniques applied to *in vitro* propagation. This kind of propagation, especially applied to ornamentals, stands out for the optimization of large-scale propagation. In conventional *in vitro* propagation, the flasks sealing system restricts, among other things, gas exchange, and hinders the absorption of water and nutrients, increasing losses in the plant material during acclimatization. In the present study, with torch ginger, the photoautotrophic propagation was performed associated with CO<sub>2</sub>-enriched atmosphere flasks, with the aim of hardening the plantlets even *in vitro*, with great benefits to survival and increased tolerance to stresses imposed on plants during the acclimatization phase, approaching those produced in the field. To anthurium, the development of efficient *in vitro* propagation techniques provided new and promising perspectives for the breeding of the specie, able to expand commercial production and supply of Brazilian and worldwide market. Among these techniques highlights the somatic embryogenesis, which can be successfully applied in plant production system for large-scale, besides being an ideal system for anatomical, structural and molecular studies involved in the acquisition of embryogenic competence and clusters of genes specifically expressed during somatic embryogenesis. This work contributed to the generation of knowledge about *in vitro* propagation of the species from photoautotrophic propagation techniques, in torch ginger, characterizing the morphophysiological responses of plants submitted to heterotrophic, photomixotrophic and photoautotrophic growth conditions; and *in vitro* propagation of anthurium via

somatic embryogenesis, addressing structural changes and the accumulation of reserves involved during ontogeny of embryogenic callus, besides characterizing and analyze the expression of SERK gene in this species.

## INTRODUÇÃO GERAL

A indústria de flores compreende o cultivo e a comercialização de flores de corte, folhagens, e plantas de vaso; neste último caso, as plantas podem ser vendidas para fins de paisagismo e urbanismo (Van Huylenbroeck, 2010; Chandler & Brugliera, 2011). Tradicionalmente, a Europa tem sido importante centro de produção e consumo de produtos ornamentais, caracterizando-se ainda por uma elevada diversidade de produtos. Dentre os principais produtores estão Holanda, Itália, Alemanha, Espanha, Reino Unido e França; com destaque para a Holanda, o principal país exportador de flores do mundo, produzindo flores de corte, plantas de vaso, bulbos, plantas anuais e perenes, entre outras (Barros et al., 2008; Van Huylenbroeck, 2010).

Com a globalização, o mercado mundial de flores, antes dominado apenas por países europeus, abriu espaços para novos polos de produção, com destaque para Índia, China, Quênia, Etiópia, Colômbia, Equador e Costa Rica (Van Huylenbroeck, 2010; Chandler & Brugliera, 2011). Na Colômbia e no Equador, 90% da produção interna são exportadas para outros países, diferentemente do que ocorre no Brasil, em que a produção é mais voltada para o mercado interno, devido o consumo *per capita* ser relativamente elevado em determinadas regiões brasileiras (Barros et al., 2008).

Dentre os indicativos que contribuem para a expansão da floricultura no Brasil estão as dimensões continentais e as condições climáticas, favorecendo tanto o cultivo de flores temperadas quanto tropicais. Com isso, torna-se possível produzir flores e folhagens durante o ano inteiro a custos reduzidos e competitivos, conferindo ao produto brasileiro condições para se firmar no mercado mundial (França & Maia, 2008). A produção brasileira está distribuída principalmente nos Estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Santa Catarina, Pernambuco e Rio Grande do Sul (Sologuren & Juliatti, 2007).

Destaca-se as espécies tropicais pertencentes às famílias Araceae, Bromeliaceae, Heliconiaceae, Musaceae, Orchidaceae e Zingiberaceae (Leme & Honório, 2004). Na família Araceae, o gênero *Anthurium* Schott, é considerado a segunda flor tropical mais comercializada no mercado mundial, superada apenas pelas espécies da família Orchidaceae (Castro et al., 2004; Tombolato et al., 2004). São plantas herbáceas tropicais, epífitas ou hemiepífitas e nativas de regiões quentes da América Tropical, destacando-se pela beleza de suas folhagens (Castro et al., 2004; Tombolato et al., 2004; Nhut et al., 2006; Liendo & Mogollón, 2009; Maira et al., 2010). Mais de 600 espécies

35 do gênero *Anthurium* são ornamentais e cerca de 130 espécies são encontradas no Brasil  
36 (Castro et al., 2004; Tombolato et al., 2004). Dentre estas destaca-se o *Anthurium*  
37 *andraeanum*, preferido pelo público devido ao tamanho e colorido de suas flores e pela  
38 grande durabilidade pós-colheita, por isso tem sido uma das espécies mais cultivadas  
39 como flor de corte e plantas de vaso (Castro et al., 2004).

40 Já na família Zingiberaceae, destaca-se comercialmente a espécie *Etilingera*  
41 *elatio* (Jack) R. M. Smith, planta tropical, nativa da Malásia e Indonésia (Yunus et al.,  
42 2012; Santos et al., 2013), conhecida popularmente como bastão-do-imperador. É  
43 ornamental e medicinal, herbácea, rizomatosa, ereta, florífera e perene, podendo atingir  
44 de 3 a 6 metros de altura, com folhas dispostas em espiral (Rescarolli & Zaffari, 2009;  
45 Chan et al., 2011a). Possui inflorescências grandes e atraentes, com brácteas vistosas, o  
46 que proporciona grande aceitação no mercado interno e externo no Brasil (Castro, 1998;  
47 Bezerra & Loges, 2005). Essa espécie possui quatro cultivares, ‘Porcelana’  
48 (inflorescências com brácteas acetinadas de coloração rosa-claro); ‘Red Torch’  
49 (brácteas vermelhas); ‘Pink Torch’ (brácteas de coloração rosa-escura) e ‘Tulip Torch  
50 Ginger’ (brácteas rubras, em formato de tulipa) (Ribeiro et al., 2012), sendo  
51 consideradas plantas de elevado valor ornamental (Lins & Coelho, 2003; Chan et al.,  
52 2011b; Yunus et al., 2012). No Brasil, vem sendo cultivada há muitos anos,  
53 principalmente na região Nordeste, com destaque para os estados de Pernambuco e  
54 Alagoas que exportam suas flores para outros estados brasileiros (Bezerra & Loges,  
55 2005), como também para os Estados Unidos da América, Canadá, Holanda, Alemanha,  
56 Dinamarca, Bélgica, França e Japão (Ribeiro et al., 2012).

57 No Sul da Ásia o bastão-do-imperador é uma das plantas medicinais mais  
58 populares, pois possui muitos fitoquímicos de propriedades antimicrobianas e  
59 antissépticas (Abdelwahab et al., 2010), sendo utilizado contra funções citotóxicas,  
60 inibição da tirosinase (enzima que catalisa a oxidação de fenóis) e atividades  
61 hepatoprotetoras, anti-hipertensivas e antioxidantes (Abdelmageed et al., 2011; Chan et  
62 al., 2011a; Chan et al., 2011b; Karim & Munir, 2011). Vários componentes  
63 antioxidantes têm sido isolados a partir de *E. elatio* (Chang et al., 2012), sendo que  
64 essas propriedades são mais expressas nas folhas, quando comparadas com as  
65 inflorescências ou os rizomas (Chan et al., 2011b).

66 A muda representa um dos principais insumos, tanto pelo custo na implantação  
67 do plantio, quanto pela garantia de sucesso esperado no investimento e na oferta de  
68 produtos de boa qualidade, para os mercados consumidores, nacional e internacional



69 (Cabral, 2004). Dessa forma, a obtenção de mudas pode tornar-se um fator limitante no  
70 cultivo comercial das plantas tropicais.

71 O uso da biotecnologia, especialmente com a utilização de técnicas da cultura de  
72 tecidos, proporciona uma forma alternativa de propagação das plantas, além de ser  
73 importante para o melhoramento e a conservação dos recursos genéticos. Para *E.*  
74 *elator*, ainda são limitantes as informações a cerca da cultura de tecidos e propagação  
75 dessa espécie (Yunus et al., 2012).

76 A propagação *in vitro*, quando utilizado o sistema de vedação convencional,  
77 previne a desidratação das culturas e do meio de cultura, além de evitar a  
78 contaminação (Pinheiro et al., 2013). No entanto, nesse tipo de vedação ocorre elevada  
79 concentração de etileno e reduzida concentração de CO<sub>2</sub>; restringem-se o fluxo de  
80 fótons fotossinteticamente ativos e as trocas gasosas, diminuindo as taxas de  
81 transpiração e de fotossíntese das plantas; dificultando a absorção de água e nutrientes,  
82 causando redução da taxa de crescimento e desenvolvimento dos explantes, resultando  
83 em elevadas perdas durante a aclimatização, devido à mortalidade das plantas (Nguyen  
84 & Kozai, 2005; Zobayed, 2006; Xiao et al., 2011). Entretanto, esses problemas podem  
85 ser solucionados por meio do uso de um sistema que proporcione o cultivo do material  
86 vegetal em condições fotoautotróficas.

87 Para isso, vem sendo utilizadas membranas porosas permeáveis a gases  
88 (Saldanha et al., 2012), pois permitem maior eficiência das trocas gasosas, diminuindo o  
89 acúmulo de etileno e, assim, facilitando a aclimatização das plantas produzidas (Xiao et  
90 al., 2011). Essas mudanças no microambiente dos frascos de cultivo, promovidas pelas  
91 trocas gasosas, favorecem a manutenção da concentração de CO<sub>2</sub>, estimulam a  
92 fotossíntese e reduzem a concentração de etileno e a umidade relativa dentro dos frascos  
93 (Kozai & Kubota, 2001). A propagação fotoautotrófica associada ao enriquecimento da  
94 atmosfera dos frascos com CO<sub>2</sub>, tem como principal objetivo rustificar as vitroplantas  
95 ainda *in vitro*, com grandes benefícios à sobrevivência das mesmas pelo aumento da  
96 tolerância aos estresses impostos às plantas na fase de aclimatização, aproximando-as  
97 àquelas produzidas em campo.

98 Para o antúrio, o desenvolvimento de técnicas eficientes de propagação *in vitro*  
99 tem proporcionado perspectivas novas e promissoras para o melhoramento dessa  
100 espécie, capazes de ampliar a produção e o abastecimento do mercado brasileiro.  
101 Atualmente, grande parte dos antúrios disponíveis no mercado é produzida por técnicas  
102 de cultura de tecidos (Maira et al., 2010). Para o constante aprimoramento da clonagem

103 dos antúrios, vem se utilizando, como forma de propagação *in vitro*, a embriogênese  
104 somática.

105 Comparativamente às demais técnicas, a embriogênese somática permite a  
106 produção em larga escala de plantas, possibilitando reduzir significativamente o custo  
107 por unidade de muda produzida. Em condições apropriadas os embriões somáticos  
108 podem ser produzidos de forma sincronizada, com elevado grau de uniformização  
109 clonal e conformidade genética, o que torna a embriogênese somática uma importante  
110 ferramenta para o melhoramento genético de plantas (Von Arnold et al., 2002; Chen et  
111 al., 2010; Lu et al., 2011; Pinto et al., 2011; Sivanesan et al., 2011). Esta técnica possui  
112 outras aplicações, como: produção de sementes sintéticas; conservação de  
113 germoplasma, por criopreservação; manipulação genética, pelo desenvolvimento de  
114 plantas transgênicas (Quiroz-Figueroa et al., 2006; Bakhshaie et al., 2010; Capelo et al.,  
115 2010; Khan et al., 2010; Konieczny et al., 2010; Ming-Hua & Sen-Rong, 2010;  
116 Parimalan et al., 2010), entre outras. Além disso, a embriogênese somática é um sistema  
117 ideal para estudo das características morfológicas, fisiológicas, eventos moleculares e  
118 bioquímicos que ocorrem durante o processo de embriogênese em plantas superiores  
119 (Zakizadeh et al., 2010; You et al., 2011).

120 Durante este processo, algumas alterações morfológicas e bioquímicas ocorrem  
121 em resposta às alterações nos padrões de expressão gênica (Santos et al., 2005). No  
122 entanto, a base molecular dos mecanismos genéticos e bioquímicos que regulam a  
123 propriedade de competência à embriogênese em células vegetais ainda não estão  
124 elucidadas (Santa-Catarina et al., 2004; Pérez-Núñez et al., 2009; Ma et al., 2012).

125 A partir da utilização de marcadores moleculares e da localização de células  
126 competentes, foi possível complementar os métodos tradicionais de identificação de  
127 células envolvidas na formação de embriões somáticos (Schmidt et al., 1997),  
128 resultando na identificação de vários grupos de genes expressos durante a embriogênese  
129 somática (Ito et al., 2005; Pérez-Núñez et al., 2009). Destacando-se os genes da família  
130 *SERK* (*SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE*) (Schmidt et al.,  
131 1997), envolvidos em conferir competência às células embriogênicas em plantas (Ito et  
132 al., 2005; Santos et al., 2005; Santos et al., 2009).

133 A embriogênese somática tem sido relatada por vários autores para o gênero  
134 *Anthurium*, porém ainda não foram descritos estudos sobre os aspectos histológicos e  
135 moleculares envolvidos na caracterização do potencial embriogênico de *A. andraeanum*.

136           Considerando todos os aspectos apresentados anteriormente, para *E. elatior* e *A.*  
137 *andraeanum*, nota-se que há a necessidade de estudos mais aprofundados a cerca dessas  
138 espécies ornamentais. Com esse estudo vislumbra contribuir na geração de  
139 conhecimentos acerca da propagação *in vitro* de *E. elatior* cv. Porcelana a partir das  
140 técnicas de propagação fotoautotrófica, caracterizando as respostas morfofisiológicas  
141 das plantas submetidas a condições de crescimento heterotrófico, fotomixotrófico e  
142 fotoautotrófico. Como também, pretende-se compreender os fatores que atuam  
143 diretamente ou indiretamente no processo de embriogênese somática de *A. andraeanum*  
144 cv. Eidibel. Para isso, objetiva-se caracterizar a origem e o padrão de divisão celular  
145 durante a embriogênese somática indireta, determinando alterações estruturais e o  
146 acúmulo de reservas envolvidos durante a ontogênese dos calos embriogênicos, além de  
147 caracterizar a expressão do gene *SERK*, e analisar via hibridização *in situ* a função das  
148 células competentes.  
149

150 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

151

152 ABDELMAGEED, A.H.A.; FARIDAH, Q.Z.; NUR AMALINA, A.; YAACOB, M.  
153 The influence of organ and post-harvest drying period on yield and chemical  
154 composition of the essential oils of *Etilingera elatior* (Zingiberaceae). **Journal of**  
155 **Medicinal Plants Research**, v.5, p.3432-3439, 2011.

156 ABDELWAHAB, S.I.; ZAMAN, F.Q.; MARIOD, A.A.; YAACOB, M.;  
157 ABDELMAGEED, A.H.; KHAMIS, S. Chemical composition, antioxidant and  
158 antibacterial properties of the essential oils of *Etilingera elatior* and *Cinnamomum*  
159 *pubescens* Kochummen. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.90,  
160 p.2682-2688, 2010.

161 BAKHSHAIE, M.; BABALAR, M.; MIRMASOUMI, M.; KHALIGHI, A. Somatic  
162 embryogenesis and plant regeneration of *Lilium ledebourii* (Baker) Boiss., an  
163 endangered species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.102, p.229-235, 2010.

164 BARROS, L.M.; CARVALHO, A.C.P.P.; BONGERS, F.J.G.; BAIMA, S. O  
165 agronegócio da floricultura no Brasil. In: ALBUQUERQUE, A.C.S.; SILVA, A.G.  
166 (Ed.). **Agricultura Tropical: quatro décadas de inovações tecnológicas,**  
167 **institucionais e políticas**. Brasília: DF: Embrapa Informações Tecnológicas, 2008.  
168 p.881-904.

169 BEZERRA, F.C.; LOGES, V. Zingiberaceae. In: TERAIO, D.; CARVALHO, A.C.P.P.;  
170 BARROSO, T.C.S.F. (Ed.). **Flores tropicais**. Brasília: Embrapa Informações  
171 Tecnológicas, 2005. p.225.

172 CABRAL, J.B. Controle de produção industrial de plantas *in vitro*. **Revista Brasileira**  
173 **de Horticultura Ornamental**, v.10, p.22-23, 2004.

174 CAPELO, A.M.; SILVA, S.; BRITO, G.; SANTOS, C. Somatic embryogenesis  
175 induction in leaves and petioles of a mature wild olive. **Plant Cell, Tissue and Organ**  
176 **Culture**, v.103, p.237-242, 2010.

177 CASTRO, A.C.; RESENDE, L.V.; GUIMARÃES, W.N.R.; LOGES, V. Uso de  
178 técnicas moleculares em estudo de diversidade genética em antúrio. **Revista Brasileira**  
179 **de Horticultura Ornamental**, v.10, p.6-9, 2004.

180 CASTRO, C.E.F. Cadeia produtiva de flores e plantas ornamentais. **Revista Brasileira**  
181 **de Horticultura Ornamental**, v.4, p.1-46, 1998.

182 CHAN, E.W.C.; LIM, Y.Y.; WONG, S.K. Phytochemistry and pharmacological  
183 properties of *Etilingera elatior*: A review. **Pharmacognosy Journal**, v.3, p.6-10, 2011a.

184 CHAN, E.W.C.; NG, V.P.; TAN, V.V.; LOW, Y.Y. Antioxidant and antibacterial  
185 properties of *Alpinia galanga*, *Curcuma longa*, and *Etilingera elatior* (Zingiberaceae).  
186 **Pharmacognosy Journal**, v.3, p.54-61, 2011b.

187 CHANDLER, S.; BRUGLIERA, F. Genetic modification in floriculture. **Biotechnology**  
188 **Letters**, v.33, p.207-214, 2011.

189 CHANG, Y.Q.; TAN, S.N.; YONG, J.W.H.; GE, L. Determination of flavonoids in  
190 *Costus speciosus* and *Etilingera elatior* by liquid chromatography-mass spectrometry.  
191 **Analytical Letters**, v.45, p.345-355, 2012.

192 CHEN, A.H.; YANG, J.L.; NIU, Y.D.; YANG, C.P.; LIU, G.F.; YU, C.Y.; LI, C.H.  
193 High-frequency somatic embryogenesis from germinated zygotic embryos of  
194 *Schisandra chinensis* and evaluation of the effects of medium strength, sucrose, GA<sub>3</sub>,  
195 and BA on somatic embryo development. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**  
196 v.102, p.357-364, 2010.

197 FRANÇA, C.A.M.; MAIA, M.B.R. **Panorama do agronegócio de flores e plantas**  
198 **ornamentais no Brasil**. 2008. Disponível em:  
199 <[www.fit.ufsc.br/disciplinas\\_download.php?cod=954](http://www.fit.ufsc.br/disciplinas_download.php?cod=954)>. Acesso em: 12 de dezembro de  
200 2009.

201 ITO, Y.; TAKAYA, K.; KURATA, N. Expression of SERK family receptor-like protein  
202 kinase genes in rice. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and**  
203 **Expression**, v.1730, p.253-258, 2005.

204 KARIM, A.; MUNIR, S. A newly developed method for rapid propagation of an  
205 important culinary and medicinal herb (*Etilingera elatior*). **Insight**  
206 **Ethnopharmacology**, v.1, p.3-4, 2011.

207 KHAN, T.; REDDY, V.S.; LEELAVATHI, S. High-frequency regeneration via somatic  
208 embryogenesis of an elite recalcitrant cotton genotype (*Gossypium hirsutum* L.) and

209 efficient *Agrobacterium*-mediated transformation. **Plant Cell, Tissue and Organ**  
210 **Culture** v.101, p.323-330, 2010.

211 KONIECZNY, R.; PILARSKA, M.; TULEJA, M.; SALAJ, T.; ILNICKI, T. Somatic  
212 embryogenesis and plant regeneration in zygotic embryos of *Trifolium nigrescens*  
213 (Viv.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.100, p.123-130, 2010.

214 KOZAI, T.; KUBOTA, C. Development a photoautotrophic micropropagation system  
215 for woody plants. **Journal of Plant Research** v.114, p.525-537, 2001.

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

218 LIENDO, M.; MOGOLLÓN, N. Multiplicación clonal *in vitro* del anturio (*Anthurium*  
219 *andraeanum* Lind. cv. Nicoya). **Bioagro**, v.21, p.179-182, 2009.

220 LINS, S.R.O.; COELHO, R.S.B. Antracnose em inflorescências de bastão do imperador  
221 (*Etilingera elatior*): Ocorrência e métodos de inoculação. **Summa Phytopatológica**,  
222 v.29, p.355-358, 2003.

223 LU, J.; VAHALA, J.; PAPPINEN, A. Involvement of ethylene in somatic  
224 embryogenesis in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ**  
225 **Culture**, p.1-9, 2011.

226 MA, J.; HE, Y.; WU, C.; LIU, H.; HU, Z.; SUN, G. Cloning and molecular  
227 characterization of a SERK gene transcriptionally induced during somatic  
228 embryogenesis in *Ananas comosus* cv. Shenwan. **Plant Molecular Biology Reporter**,  
229 v.30, p.195-203, 2012.

230 MAIRA, O.; ALEXANDER, M.; VARGAS, T.E. Micropropagation and organogenesis  
231 of *Anthurium andreanum* Lind cv Rubrun. In: JAIN, S.M.; OCHATT, S.J. (Ed.).  
232 **Protocols for in vitro propagation of ornamental plants, methods in molecular**  
233 **biology**. Totowa, New Jersey: Humana Press Edition, 2010. p.3-14.

234 MING-HUA, Y.; SEN-RONG, H. A simple cryopreservation protocol of *Dioscorea*  
235 *bulbifera* L. embryogenic calli by encapsulation-vitrification. **Plant Cell, Tissue and**  
236 **Organ Culture**, v.101, p.349-358, 2010.

237 NGUYEN, Q.T.; KOZAI, T. Photoautotrophic micropropagation of woody species. In:  
238 KOZAI, T.; AFREEN, F.; ZOBAYED, S.M.A. (Ed.). **Photoautotrophic (sugar-free**  
239 **medium) micropropagation as a new micropropagation and transplant production**  
240 **system**. Dordrecht: Springer, 2005. p.123-146.

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

245 PARIMALAN, R.; GIRIDHAR, P.; RAVISHANKAR, G.A. Enhanced shoot  
246 organogenesis in *Bixa orellana* L. in the presence of putrescine and silver nitrate. **Plant**  
247 **Cell, Tissue and Organ Culture**, v.105, p.285-290, 2010.

248 PÉREZ-NÚÑEZ, M.T.; SOUZA, R.; SÁENZ, L.; CHAN, J.L.; ZÚÑIGA-AGUILAR,  
249 J.J.; OROPEZA, C. Detection of a *SERK*-like gene in coconut and analysis of its  
250 expression during the formation of embryogenic callus and somatic embryos. **Plant**  
251 **Cell Reports**, v.28, p.11-19, 2009.

252 PINHEIRO, M.V.M.; MARTINS, F.B.; XAVIER, A.; OTONI, W.C. Trocas gasosas  
253 influenciam na morfogênese *in vitro* de duas cultivares de oliveira (*Olea europaea* L.).  
254 **Revista Árvore**, v.37, p.19-29, 2013.

255 PINTO, D.L.P.; ALMEIDA, A.M.R.; RÊGO, M.M.; SILVA, M.L.; OLIVEIRA, E.J.;  
256 OTONI, W.C. Somatic embryogenesis from mature zygotic embryos of commercial  
257 passionfruit (*Passiflora edulis* Sims) genotypes. **Plant Cell, Tissue and Organ**  
258 **Culture**, v.107, p.521-530, 2011.

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

263 RESCAROLLI, C.L.S.; ZAFFARI, G.R. Produção de mudas de *Etilingera elatior* (Jack)  
264 R.M. Sm. através da cultura de tecidos vegetais *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas**  
265 **Medicinais**, v.11, p.190-195, 2009.

- 266 RIBEIRO, T.R.; ALMEIDA, E.F.A.; FRAZÃO, J.E.M.; CARVALHO, J.G. Bastão-do-  
267 imperador. In: PAIVA, P.D.O.; ALMEIDA, E.F. (Ed.). **Produção de flores de corte**.  
268 Lavras: UFLA, 2012. p.90-103.
- 269 SALDANHA, C.W.; OTONI, C.G.; DE AZEVEDO, J.L.F.; DIAS, L.L.C.; DO RÊGO,  
270 M.M.; OTONI, W.C. A low-cost alternative membrane system that promotes growth in  
271 nodal cultures of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Plant Cell,**  
272 **Tissue and Organ Culture**, v.110, p.413-422, 2012.
- 273 SANTA-CATARINA, C.; HANAI, L.R.; DORNELAS, M.C.; VIANA, A.M.; FLOH,  
274 E.I.S. *SERK* gene homolog expression, polyamines and amino acids associated with  
275 somatic embryogenic competence of *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae). **Plant**  
276 **Cell, Tissue and Organ Culture**, v.79, p.53-61, 2004.
- 277 SANTOS, E.M.; AZEVEDO, B.M.; MARINHO, A.B.; CARVALHO, A.C.P.P.;  
278 SARAIVA, K.R. Aclimatização de mudas micropropagadas de Bastão do Imperador em  
279 diferentes volumes de recipientes. **Revista Ceres**, v.60, p.134-137, 2013.
- 280 SANTOS, M.D.O.; ROMANO, E.; YOTOKO, K.S.C.; TINOCO, M.L.P.; DIAS,  
281 B.B.A.; ARAGÃO, F.J.L. Characterisation of the cacao *somatic embryogenesis*  
282 *receptor-like kinase (SERK)* gene expressed during somatic embryogenesis. **Plant**  
283 **Science**, v.168, p.723-729, 2005.
- 284 SANTOS, M.O.; ROMANO, E.; VIEIRA, L.S.; BALDONI, A.B.; ARAGÃO, F.J.L.  
285 Suppression of *SERK* gene expression affects fungus tolerance and somatic  
286 embryogenesis in transgenic lettuce. **Plant Biology**, v.11, p.83-89, 2009.
- 287 SCHMIDT, E.D.L.; GUZZO, F.; TOONEN, M.A.J.; DE VRIES, S.C. A leucine-rich  
288 repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form  
289 embryos. **Development**, v.124, p.2049-2062, 1997.
- 290 SIVANESAN, I.; LIM, M.Y.; JEONG, B.R. Somatic embryogenesis and plant  
291 regeneration from leaf and petiole explants of *Campanula punctata* Lam. var. *rubriflora*  
292 Makino. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.107, p.365-369, 2011.
- 293 SOLOGUREN, F.J.; JULIATTI, F.C. Doenças fúngicas em plantas ornamentais em  
294 Uberlândia-MG. **Bioscience Journal**, v.23, p.42-52, 2007.



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

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

301 VON ARNOLD, S.; SABALA, I.; BOZHKO, P.; DYACHOK, J.; FILONOVA, L.  
302 Developmental pathways of somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ**  
303 **Culture**, v.69, p.233-249, 2002.

304 XIAO, Y.; NIU, G.; KOZAI, T. Development and application of photoautotrophic  
305 micropropagation plant system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.105, p.149-  
306 158, 2011.

307 YOU, C.; FAN, T.; GONG, X.; BIAN, F.; LIANG, L.; QU, F. A high-frequency cyclic  
308 secondary somatic embryogenesis system for *Cyclamen persicum* Mill. **Plant Cell,**  
309 **Tissue and Organ Culture**, v.107, p.233-242, 2011.

310 YUNUS, M.F.; AZIZ, M.A.; KADIR, M.A.; RASHID, A.A. In vitro propagation of  
311 *Etilingera elatior* (Jack) (torch ginger). **Scientia Horticulturae**, v.135, p.145-150, 2012.

312 ZAKIZADEH, H.; STUMMANN, B.M.; LÜTKEN, H.; MÜLLER, R. Isolation and  
313 characterization of four somatic embryogenesis receptor-like kinase (*RhSERK*) genes  
314 from miniature potted rose (*Rosa hybrida* cv. Linda). **Plant Cell, Tissue and Organ**  
315 **Culture**, v.101, p.331-338, 2010.

316 ZOBAYED, S. Aeration in plant tissue culture. In: DUTTA GUPTA, S.; IBARAKI, Y.  
317 (Ed.). **Plant tissue culture engineering**. Dordrecht: Springer, 2006. p.313-327.

318

## CAPÍTULO I

319

320 **Propagação fotoautotrófica de bastão-do-imperador [*Etilingera elatior* (Jack) R. M.**  
321 **Smith] (Zingiberaceae)**

322

323 **Resumo** - O bastão-do-imperador é cultivado principalmente para a produção de flores  
324 de corte e plantas medicinais. Para isso, novas técnicas de cultura de tecidos  
325 proporcionam alternativas de propagação para essa espécie, além de otimizar a  
326 qualidade das mudas produzidas. Dentre essas encontra-se a propagação fotoautotrófica  
327 associada ao enriquecimento com dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), técnica utilizada para  
328 aproximar as condições de cultivo *in vitro* daquelas produzidas em condições de campo.  
329 O objetivo foi avaliar o enriquecimento de CO<sub>2</sub>, tipo de vedação e concentração de  
330 sacarose em *Etilingera elatior* cv. Porcelana. Como explantes, utilizaram-se plantas  
331 estabelecidas *in vitro* (~3 cm de altura), inoculadas em frascos contendo 60 mL de MS +  
332 0,54 µM de ácido naftalenoacético (ANA), três concentrações de sacarose (0; 15 ou 30  
333 g L<sup>-1</sup>), e 6,5 g L<sup>-1</sup> de ágar Merck®, vedados com tampas sem orifícios ou com  
334 membranas. Após 45 dias em caixas de ventilação forçada de ar (360 ou 1000 µmol  
335 mol<sup>-1</sup> de CO<sub>2</sub>) em sala de crescimento (25 ± 2°C, fotoperíodo de 16 horas e irradiância  
336 de 60 µmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>), avaliaram-se: altura da planta, porcentagem de oxidação, número de  
337 brotos, massa fresca e seca da planta, pigmentos fotossintéticos (clorofila *a* e *b*,  
338 clorofilas totais e carotenoides), densidade estomática, porcentagem de sobrevivência à  
339 aclimatização, e características anatômicas das folhas. A adição de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose  
340 produziu plantas com maior altura. A massa fresca foi maior no sistema de 1000 µmol  
341 mol<sup>-1</sup> de CO<sub>2</sub> com tampas com membranas. A massa seca total da planta foi maior  
342 quando adicionado 15 ou 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose. Para pigmentos fotossintéticos, o uso de  
343 membranas e 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose foi superior em 1000, quando comparado a 360 µmol  
344 mol<sup>-1</sup> de CO<sub>2</sub>; já para 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, foi superior em 360 µmol mol<sup>-1</sup> de CO<sub>2</sub>. O  
345 uso tampas com membranas, da concentração de CO<sub>2</sub> e da adição de sacarose  
346 favoreceram a sobrevivência das plantas. Para a propagação da espécie deve-se utilizar  
347 o sistema fotomixotrófico.

348

349 **Palavras-chave:** Trocas gasosas, enriquecimento de CO<sub>2</sub>, crescimento fotomixotrófico,  
350 sacarose

351



## 383 INTRODUÇÃO

384

385 O mercado de plantas ornamentais vem manifestando grande interesse em  
386 representantes da família Zingiberaceae, tanto para a produção de flores de corte quanto  
387 em projetos de paisagismo. Além de fornecer produtos na área ornamental, espécies  
388 dessa família apresentam também produtos úteis na área de alimentos, condimentos,  
389 medicamentos, perfumes, corantes, óleos essenciais, produtos de estética (Jaafar et al.,  
390 2007; Yunus et al., 2012), entre outros.

391 Dentre as espécies dessa família, destaca-se comercialmente a *Etilingera elatior*  
392 (Jack) R. M. Smith, planta tropical, ornamental e medicinal, herbácea, rizomatosa, ereta,  
393 florífera e perene (Rescarolli & Zaffari, 2009; Chan et al., 2011a) nativa da Malásia e  
394 Indonésia (Yunus et al., 2012; Santos et al., 2013), conhecida popularmente como  
395 bastão-do-imperador. Essa espécie possui quatro cultivares, ‘Porcelana’ (inflorescências  
396 com brácteas acetinadas de coloração rosa-claro); ‘Pink Torch’ (brácteas de coloração  
397 rosa-escura); ‘Red Torch’ (brácteas vermelhas); e ‘Tulip Torch Ginger’ (brácteas  
398 rubras, em formato de tulipa) (Lins & Coelho, 2003; Chan et al., 2011b; Ribeiro et al.,  
399 2012; Yunus et al., 2012).

400 Atualmente é uma das 30 plantas medicinais mais populares na indústria  
401 farmacêutica, com elevada demanda na Malásia e recentemente cultivada em escala  
402 comercial na Austrália, Havaí, Tailândia e Costa Rica, para a produção de flores de  
403 corte (Chan et al., 2011a; Yunus et al., 2012). No Brasil vem sendo cultivada apenas  
404 para suprir a demanda da floricultura nacional, como flores de corte ou para paisagismo.

405 O bastão-do-imperador possui muitos fitoquímicos de propriedades  
406 antimicrobianas e antissépticos (Abdelwahab et al., 2010), sendo utilizado contra  
407 atividades citotóxicas, inibição da tirosinase (enzima que catalisa a oxidação de fenóis),  
408 atividades hepatoprotetoras, anti-hipertensivas e antioxidantes (Abdelmageed et al.,  
409 2011; Chan et al., 2011a; Chan et al., 2011b; Karim & Munir, 2011).

410 A cultura de tecidos é uma técnica alternativa de propagação das plantas e uma  
411 importante ferramenta para o melhoramento genético de bastão-do-imperador, no  
412 entanto, ainda são limitadas as informações a cerca tanto da cultura de tecidos quanto da  
413 propagação dessa espécie (Yunus et al., 2012).

414 Na propagação *in vitro*, o sistema de vedação convencional previne a  
415 desidratação das culturas e do meio de cultivo, além de evitar a contaminação (Zobayed,  
416 2006; Pinheiro et al., 2013; Saldanha et al., 2013). Esse método tradicional, em que as

417 plantas são produzidas em frascos vedados com reduzidas trocas gasosas, pode-se  
418 resultar em plantas com certas características peculiares, tais como parte aérea pouco  
419 desenvolvida, menor quantidade de cera cuticular e epicuticular nas folhas, redução nos  
420 tecidos com resistência mecânica (colênquima e esclerênquima), maior conteúdo de  
421 água, estômatos não funcionais e folhas delgadas e pequenas, com baixa atividade  
422 fotoautotrófica (Kozai & Kubota, 2001; Xiao et al., 2011). Nesse sistema convencional  
423 ocorre ainda elevada concentração de etileno e de outros gases voláteis no interior dos  
424 frascos; reduzida concentração de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>); elevadas concentrações de  
425 açúcares; restrita absorção de água e nutrientes; reduzido fluxo de fótons  
426 fotossinteticamente ativos e diminuição das trocas gasosas. Com isso, restringe a taxa  
427 de crescimento e desenvolvimento, acarretando assim, em elevadas perdas durante a  
428 aclimatização, devido à mortalidade das plantas (Nguyen & Kozai, 2005; Zobayed,  
429 2006; Kozai, 2010; Xiao et al., 2011). A pequena concentração de CO<sub>2</sub> no interior dos  
430 frascos associada à baixa incidência luminosa causam redução nas taxas de transpiração  
431 e fotossíntese das plantas, forçando ao desenvolvimento de um crescimento  
432 heterotrófico ou fotomixotrófico, devido à absorção da principal fonte de carbono  
433 disponível para a planta, mediante a adição de açúcares ao meio de cultura (Nguyen &  
434 Kozai, 2005).

435 A produção *in vitro* de mudas sob baixa atividade fotossintética ocorre  
436 principalmente devido à adição de concentrações elevadas de açúcares exógenos. A  
437 redução de açúcares no meio de cultivo possui diversas vantagens, dentre estas, pode-se  
438 destacar a prevenção do rápido crescimento de bactérias e de fungos no meio de cultivo,  
439 redução de custos e aumento na sobrevivência das plantas durante o estágio de  
440 aclimatização (Kozai & Kubota, 2001). A redução do teor de sacarose ou mesmo a  
441 eliminação por completo, a utilização de luz natural, o aumento da concentração de  
442 CO<sub>2</sub>, bem como a redução nas concentrações de O<sub>2</sub> *in vitro* são alternativas que  
443 melhoram o crescimento e a competência fotossintética de várias espécies.

444 Dessa forma, o ideal para a propagação *in vitro* seria manter as mesmas  
445 condições ambientais de cultivo no campo, como: fluxo de fótons fotossinteticamente  
446 ativos, concentração de CO<sub>2</sub>, manutenção das trocas gasosas, entre outras (Xiao et al.,  
447 2011). Para isso, vem sendo utilizadas membranas porosas permeáveis a gases (Kozai,  
448 2010; Saldanha et al., 2012), pois elas permitem a maior eficiência das trocas gasosas,  
449 diminuindo o acúmulo de etileno e, assim, facilitando a aclimatização das plantas  
450 produzidas (Xiao et al., 2011). Essas mudanças no microambiente dos frascos de

451 cultivo, promovidas pelas trocas gasosas, favorecem a manutenção da concentração de  
452 CO<sub>2</sub>, estimulam a fotossíntese e reduzem a concentração de etileno e a umidade relativa  
453 dentro dos frascos (Kozai & Kubota, 2001; Chanemougasoundharam et al., 2004;  
454 Alvarez et al., 2012). O uso de tampas com membranas porosas tem ainda influência  
455 positiva sobre estabelecimento das culturas, além de aumentar a qualidade e quantidade  
456 de brotos e diminuir a ocorrência de clorose e senescência das folhas (Rodrigues et al.,  
457 2012).

458 Assim, a aplicação destas técnicas alternativas no processo de propagação *in*  
459 *vitro* convencional, e as consequências desfavoráveis ao desenvolvimento das plantas  
460 resultantes deste ambiente, poderiam ser minimizadas ou evitadas pela modificação  
461 desse sistema convencional, e assim, aproximando-o ao máximo das condições de  
462 campo.

463 O objetivo desse estudo foi analisar o potencial fotoautotrófico de mudas de *E.*  
464 *elatior* cv. Porcelana, propagadas *in vitro* em sistema de enriquecimento com CO<sub>2</sub>,  
465 caracterizando as respostas morfofisiológicas das plantas submetidas a condições de  
466 crescimento heterotrófico, fotomixotrófico e fotoautotófico.

467

## 468 MATERIAL E MÉTODOS

469

### 470 *Material vegetal e condições de cultivo*

471 Como material vegetal, utilizaram-se brotações de *E. elatior* cv. Porcelana  
472 previamente estabelecidas *in vitro*, a partir de rizomas. Essas brotações foram  
473 subcultivadas a cada 30 dias, em condições heterotróficas, em meio MS (Murashige &  
474 Skoog, 1962) acrescido com 6,66  $\mu\text{M}$  de 6-benziladenina (BA), 0,54  $\mu\text{M}$  de ANA, 3%  
475 de sacarose, 100  $\text{mg L}^{-1}$  de mio-inositol e solidificado com 6,5  $\text{g L}^{-1}$  de ágar Merck®  
476 (Darmstadt, Alemanha). O pH foi ajustado para 5,8, anteriormente à autoclavagem a  
477 121 °C e 1,5 atm por 15 minutos. O material vegetal foi mantido em sala de  
478 crescimento, com temperatura de  $25 \pm 2$  °C, com irradiância luminosa de  $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$   
479 a partir de dois tubos fluorescentes (Luz do Dia Especial, 40 W, Osram, Brazil).

480

### 481 *Alongamento e enraizamento de bastão-do-imperador em caixas de ventilação forçada* 482 *de ar*

483 Os explantes utilizados foram brotações, com aproximadamente 3 cm de altura,  
484 contendo de três a quatro folhas, sem presença de raízes. Os explantes foram inoculados  
485 em frascos de vidro de 300 mL vedados com tampas rígidas de polipropileno sem  
486 orifício; e tampa rígida de polipropileno com dois orifícios cobertos por membranas  
487 porosas a gases, segundo proposto na metodologia de Saldanha et al. (2012). Foram  
488 adicionados aos frascos, 60 mL de meio MS acrescido com 0,54  $\mu\text{M}$  de ANA, três  
489 doses de sacarose (0; 15 ou 30  $\text{g L}^{-1}$ ), 100  $\text{mg L}^{-1}$  de mio-inositol e solidificado com 6,5  
490  $\text{g L}^{-1}$  de Agar Merck®, e o pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121 °C e  
491 1,5 atm por 15 minutos. As culturas foram mantidas em sala de crescimento, por 45  
492 dias, em caixas de ventilação forçada de ar ( $360$  e  $1000 \mu\text{mol mol}^{-1}$  de  $\text{CO}_2$ ), seguindo  
493 metodologia proposta por Saldanha et al. (2013; 2014), com temperatura de  $25 \pm 2$  °C, e  
494  $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de irradiância luminosa a partir de dois tubos fluorescentes (Sylvania  
495 HO T12, Luz do Dia, 110 W, São Paulo, Brazil).

496

### 497 *Parâmetros de crescimento*

498 Após 45 dias de cultivo foram avaliadas as seguintes características: altura da  
499 planta (cm), porcentagem de oxidação, número de brotos e massa fresca e seca da planta  
500 (g). As amostras de peso seco foram determinadas após peso constante, alcançado em  
501 estufa a 70 °C, por 48 horas.

502

503 *Quantificação de pigmentos fotossintéticos*

504 Para a determinação dos pigmentos fotossintéticos, clorofila *a* e *b*, clorofilas  
505 totais e carotenoides, foi seguida a metodologia proposta por Wellburn (1994). Dois  
506 discos foliares (de uma folha, do segundo par de folhas completamente expandidas),  
507 com 6 mm de diâmetro cada, e incubadas em 2 mL de dimetilsulfóxido (DMSO)  
508 saturado com CaCO<sub>3</sub> (Santos et al., 2008), permanecendo em tubos mantidos no escuro  
509 por 48 horas, à temperatura ambiente. Após o período de incubação, foi determinada a  
510 absorvância das amostras em espectrofotômetro Genesys 10 UV/Visible (Thermo  
511 Scientific, Madison, WI) utilizando cubeta de quartzo de 10 mm de caminho ótico. Os  
512 comprimentos de ondas e as equações para o cálculo das concentrações de clorofilas *a*,  
513 *b*, clorofilas totais e carotenoides também foram baseados pela metodologia descrita por  
514 Wellburn (1994).

515

516 *Caracterização anatômica, histoquímica e densidade estomática das folhas*

517 Para os estudos anatômicos e histoquímicos, utilizou-se a porção média das  
518 folhas completamente expandidas (da segunda folha, do mesmo par em que foi utilizado  
519 para as variáveis de pigmentos fotossintéticos e densidade estomática), sendo fixada em  
520 solução de Karnovsky (glutaraldeído 2,5% + paraformaldeído 2,5% em tampão  
521 cacodilato 0,05M, pH 7,2) (Karnovsky, 1965). Posteriormente, as amostras foram  
522 desidratadas em série etílica e incluídas em metacrilato (Historessin, Leica Instruments,  
523 Heidelberg, Alemanha). Para montagem das lâminas, cortes transversais da porção  
524 média das folhas, com 5 µm de espessura, foram obtidos em micrótomo rotativo de  
525 avanço automático (RM2155, Leica Microsystems Inc., Deerfield, EUA). Para a  
526 caracterização estrutural, as amostras foram mantidas por 10 minutos e coradas com  
527 azul de toluidina pH 4,0 (O'Brien & McCully, 1981). Para a caracterização histoquímica,  
528 secções transversais da porção média das folhas foram submetidas ao sudan black, para  
529 evidenciar a presença de lipídios; ao ácido periódico/reagente de Schiff (PAS), para  
530 caracterizar a presença de amido, mucilagens, polissacarídeos; azul de toluidina e lugol,  
531 para evidenciar amido; e xylydine Ponceau (XP), para detecção de proteínas. As  
532 amostras foram montadas em Permout e as imagens capturadas utilizando  
533 fotomicroscópio (AX70TRF, Olympus Optical, Tóquio, Japão) equipado com o sistema  
534 U-Photo.



535 Para a variável densidade estomática (número de estômatos por mm<sup>2</sup> de área  
536 foliar), foi realizada a impressão das epidermes abaxial e adaxial, segundo Segatto et al.  
537 (2004). Para tal, utilizaram-se folhas (segunda folha, do mesmo par em que foi utilizado  
538 para as variáveis de pigmentos fotossintéticos e estudos anatômicos e histoquímicos),  
539 no qual foram coladas com cola instantânea sobre lâminas de vidro, técnica conhecida  
540 por impressão de epiderme. A densidade estomática foi calculada a partir de imagens  
541 realizadas utilizando o mesmo fotomicroscópio citado anteriormente.

542

#### 543 *Aclimatização das plantas*

544 Após 45 dias de cultivo *in vitro*, as plantas foram submetidas à etapa de  
545 aclimatização em condições *ex vitro*, transferindo-se para recipientes plásticos (de  
546 capacidade de 300 mL) contendo aproximadamente 260 cm<sup>3</sup> de substrato comercial  
547 Plantmax<sup>®</sup>, permanecendo em bancada, sob condições de temperatura ambiente (cerca  
548 de 28 ± 2 °C), luminosidade artificial de 50 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> e luz natural indireta. Após esse  
549 período, realizou-se avaliação da variável porcentagem de sobrevivência à  
550 aclimatização.

551

#### 552 *Delineamento experimental e análise estatística*

553 O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), em esquema  
554 fatorial 2 x 2 x 3, sendo duas concentrações de CO<sub>2</sub> (360 e 1000 μmol mol<sup>-1</sup>), dois tipos  
555 de vedação (com tampas rígidas de polipropileno sem orifício; e tampa rígida de  
556 polipropileno com dois orifícios cobertos por membranas porosas a gases) e três  
557 concentrações de sacarose (0; 15 e 30 g L<sup>-1</sup>). Para as variáveis altura da planta (cm),  
558 porcentagem de oxidação, número de brotos, massa fresca e seca da planta (g), foi  
559 realizado o DIC com 12 tratamentos, seis repetições cada, e a unidade experimental  
560 composta por um frasco contendo quatro plantas/repetição. (Tabela 1). Para pigmentos  
561 fotossintéticos (clorofila *a*, *b*, clorofilas totais e carotenoides) também foi realizado com  
562 12 tratamentos, com três repetições, e cada repetição composta por dois discos foliares.  
563 Já para a variável densidade estomática, também foi realizado DIC, com 12 tratamentos,  
564 três repetições, sendo cada repetição constituída de três áreas em mm<sup>2</sup>. Já para a  
565 variável porcentagem de sobrevivência das plantas à aclimatização, realizou-se com 12  
566 tratamentos, quatro repetições, e unidade experimental composta por uma  
567 planta/repetição. Todas as variáveis avaliadas foram submetidas ao teste de Shapiro-  
568 Wilk, para verificar a normalidade dos dados.

569

570 **Tabela 1.** Tratamentos utilizados na caracterização das fases de alongamento e  
571 enraizamento in vitro, em caixas de ventilação forçada de ar, e de aclimatização de  
572 bastão-do-imperador, *Etilingera elatior* cv. Porcelana.

<b>Código</b>	<b>Tratamento</b>
T1	360 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ CO <sub>2</sub> + tampa sem membrana + MS com 0 g L <sup>-1</sup> sacarose
T2	360 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ CO <sub>2</sub> + tampa sem membrana + MS com 15 g L <sup>-1</sup> sacarose
T3	360 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ CO <sub>2</sub> + tampa sem membrana + MS com 30 g L <sup>-1</sup> sacarose
T4	360 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ CO <sub>2</sub> + tampa com membrana MS com + 0 g L <sup>-1</sup> sacarose
T5	360 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ CO <sub>2</sub> + tampa com membrana MS com + 15 g L <sup>-1</sup> sacarose
T6	360 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ CO <sub>2</sub> + tampa com membrana + MS com 30 g L <sup>-1</sup> sacarose
T7	1000 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ CO <sub>2</sub> + tampa sem membrana + MS com 0 g L <sup>-1</sup> sacarose
T8	1000 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ CO <sub>2</sub> + tampa sem membrana + MS com 15 g L <sup>-1</sup> sacarose
T9	1000 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ CO <sub>2</sub> + tampa sem membrana + MS com 30 g L <sup>-1</sup> sacarose
T10	1000 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ CO <sub>2</sub> + tampa com membrana + MS com 0 g L <sup>-1</sup> sacarose
T11	1000 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ CO <sub>2</sub> + tampa com membrana + MS com 15 g L <sup>-1</sup> sacarose
T12	1000 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ CO <sub>2</sub> + tampa com membrana + MS com 30 g L <sup>-1</sup> sacarose

573

574 Por não seguirem as pressuposições da normalidade, as variáveis porcentagens  
575 de oxidação e de sobrevivência de plantas à aclimatização foram transformadas para  
576  $\sqrt{x}$  ; e número de brotos para  $\sqrt{x+0,5}$  . Todas as variáveis foram submetidas à análise  
577 de variância, comparando-se as médias dos tratamentos pelo teste de Tukey ( $p<0,05$ ).  
578 Com exceção da variável porcentagem de sobrevivência das plantas à aclimatização, na  
579 qual utilizou-se o teste de Scott Knott, com 5% de significância. Os gráficos foram  
580 apresentados com médias não transformadas. Todas as análises estatísticas foram  
581 realizadas utilizando o programa GENES (Cruz, 2013).

582

583 **RESULTADOS**

584

585 *A atmosfera enriquecida com CO<sub>2</sub> melhora o desenvolvimento plantas de E. elatior cv.*  
586 *Porcelana durante a fase de alongamento e enraizamento in vitro*

587       Pela análise de variância, as variáveis altura da planta e porcentagem de  
588 oxidação, diferiram ( $p < 0,05$ ) apenas para a interação tipos de vedação e concentrações  
589 de sacarose, a 5% de probabilidade, pelo teste F. Para a variável número de brotos,  
590 ocorreram diferenças ( $p < 0,05$ ) nas interações tipos de vedação e concentrações de  
591 sacarose; e concentrações de CO<sub>2</sub> e tipos de vedação. Já para a variável massa fresca  
592 total da planta, houve diferença apenas para a interação concentrações de CO<sub>2</sub> e tipos de  
593 vedação. Para a massa seca total da planta, houve diferença estatística, pelo teste F,  
594 apenas para concentrações de sacarose.

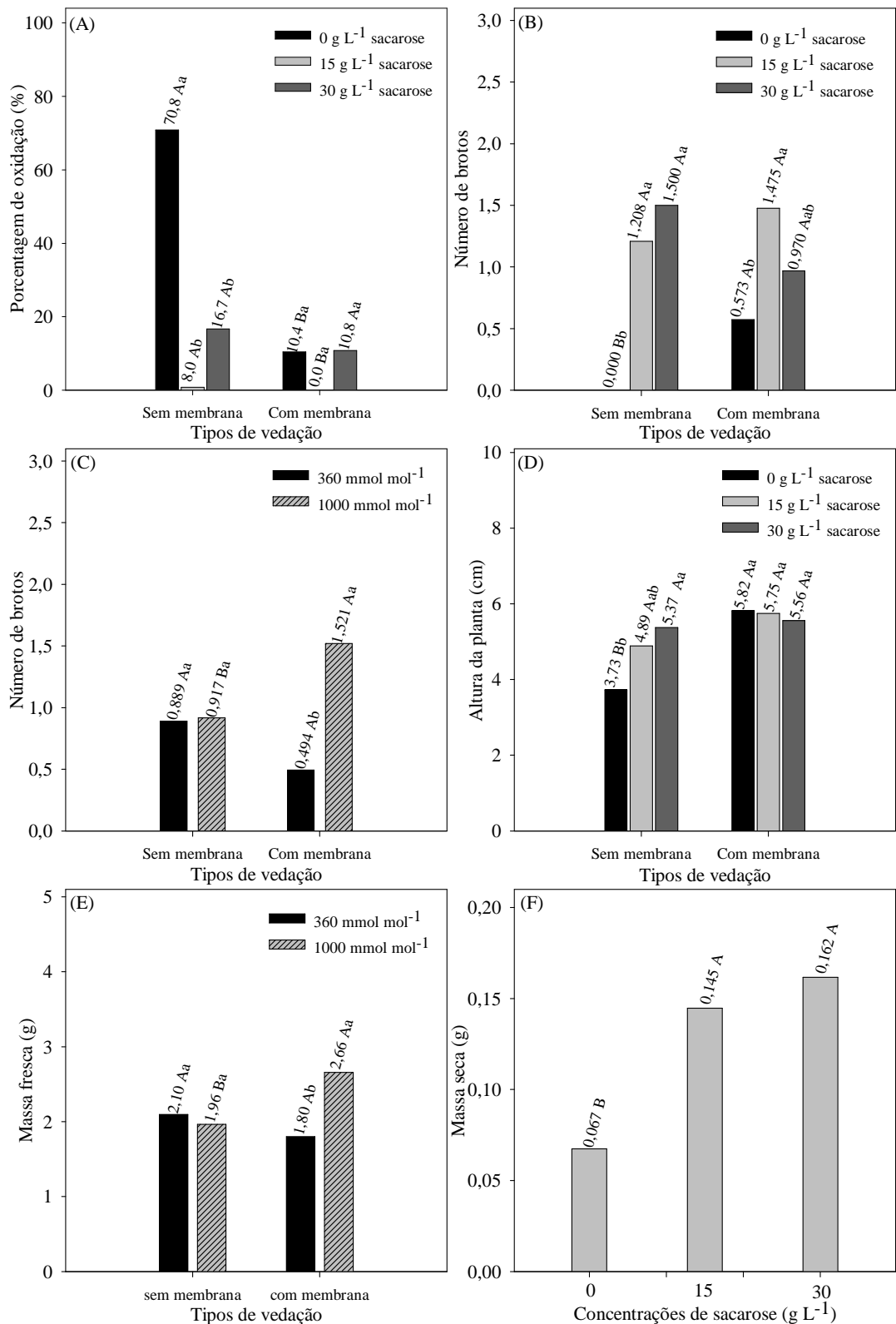
595       Para a variável porcentagem de oxidação observou-se que a utilização de  
596 membranas nas tampas dos frascos reduz a oxidação das plantas, com exceção da adição  
597 de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose ao meio de cultura, em que não houve diferença estatística entre  
598 os sistemas de vedação, tampa rígida e tampa com membranas. A ausência de sacarose  
599 no meio de cultura, e o uso de frascos com tampa sem membrana resultou em 70,8% de  
600 plantas oxidadas. No entanto, o emprego de tampas com membranas ocasionou menor  
601 porcentagem de oxidação das plantas, não apresentando diferenças significativas entre  
602 os tratamentos (Figura 1A).

603       Com base nos resultados, constata-se que para o número de brotos, houve  
604 diferença estatística apenas para o tratamento sem adição de sacarose, em que o uso de  
605 tampa rígida inibiu a produção de novos brotos. Isso pode estar associado à elevada  
606 porcentagem de oxidação constatada nas plantas submetidas a essas condições. Para as  
607 concentrações de sacarose, no sistema de vedação com tampa sem membrana, 15 e  
608 30 g L<sup>-1</sup>, o número de brotos foi superior estatisticamente aos tratamentos sem adição de  
609 sacarose. Já para o sistema de vedação tampa com membranas, houve diferença  
610 estatística apenas para 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose, em que foi superior estatisticamente quando  
611 comparado aos tratamentos sem adição de sacarose (Figura 1B). Para a atmosfera  
612 enriquecida com 360 μmol mol<sup>-1</sup> de CO<sub>2</sub> não houve diferença estatística entre os dois  
613 sistemas de vedação (tampa rígida e com membranas), já para 1000 μmol mol<sup>-1</sup> de CO<sub>2</sub>  
614 o uso de tampa com membranas (1,521) foi superior estatisticamente quando  
615 comparado à tampa rígida (0,9167). Quando comparadas as duas concentrações de CO<sub>2</sub>,  
616 não houve diferença estatística quando se utilizou tampa rígida. Diferente de quando se

617 utilizou tampa com membranas, em que  $1000 \mu\text{mol mol}^{-1}$  de  $\text{CO}_2$  (1,521) foi  
618 significativamente superior ao  $360 \mu\text{mol mol}^{-1}$  de  $\text{CO}_2$ . (0,494) (Figura 1C).

619 Para a variável altura da planta, foi possível observar que no sistema de vedação  
620 houve diferença significativa apenas para o tratamento sem adição de sacarose, em que  
621 o uso de tampa com membranas (5,82 cm) foi superior estatisticamente quando  
622 comparado a tampa rígida (3,73 cm). Para as concentrações de sacarose,  $30 \text{ g L}^{-1}$  (5,37  
623 cm) foi superior estatisticamente apenas quando comparado ao tratamento sem adição  
624 de sacarose em frascos com tampa rígida (3,73 cm). Quando utilizado tampa com  
625 membranas, não houve diferença significativa entre as concentrações de sacarose  
626 (Figura 1D).

627 Para massa fresca total da planta, quando foram comparadas as duas  
628 concentrações de  $\text{CO}_2$  (360 e  $1000 \mu\text{mol mol}^{-1}$ ), verificou-se que não houve diferença  
629 significativa quando se utilizou a tampa sem membrana. Já quando se utilizou tampa  
630 com membranas, a atmosfera enriquecida com  $1000 \mu\text{mol mol}^{-1}$  de  $\text{CO}_2$  (2,66 g) foi  
631 superior estatisticamente à de  $360 \mu\text{mol mol}^{-1}$  de  $\text{CO}_2$  (1,80 g). Não houve diferença  
632 estatística entre os dois sistemas de vedação, tampa com e sem membranas, quando foi  
633 empregada atmosfera de  $360 \mu\text{mol mol}^{-1}$  de  $\text{CO}_2$ . Já para  $1000 \mu\text{mol mol}^{-1}$  de  $\text{CO}_2$  o uso  
634 de tampa com membranas (2,66 g) foi superior estatisticamente quando comparado a  
635 tampa rígida (1,96 g) (Figura 1E). Para a massa seca total da planta, foi possível  
636 observar que as concentrações de sacarose 15 e  $30 \text{ g L}^{-1}$  (0,145 e 0,162 g,  
637 respectivamente) foram superiores estatisticamente aos tratamentos sem adição de  
638 sacarose ao meio de cultura (0,067 g) (Figura 1F).



639  
 640 **Figura 1.** Variáveis de crescimento de plantas de *Etilingera elatior* cv. Porcelana,  
 641 alongadas e enraizadas *in vitro* por 45 dias em diferentes concentrações de CO<sub>2</sub> e de  
 642 sacarose no meio de cultura, e tipos de vedação dos frascos. Percentagem de oxidação  
 643 das plantas na interação tipos de vedação x concentrações de sacarose (A); número de

644 brotos nas interações tipos de vedação x concentrações de sacarose (**B**) e concentrações  
645 de CO<sub>2</sub> x tipos de vedação (**C**); Altura das plantas na interação tipos de vedação x  
646 concentrações de sacarose (**D**); massas fresca da planta, na interação concentrações de  
647 CO<sub>2</sub> x tipos de vedação (**E**) e seca total da planta (**F**). (**A; B; D**) Médias na interação  
648 tipos de vedação x concentrações de sacarose: letras maiúsculas em sacarose (0; 15 ou  
649 30 g L<sup>-1</sup>) e minúsculas em tipos de vedação (sem ou com membrana) não diferem entre  
650 si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. (**C; E**) Médias na interação concentrações  
651 de CO<sub>2</sub> x tipos de vedação: letras maiúsculas em concentrações de CO<sub>2</sub> (360 ou 1000  
652 μmol mol<sup>-1</sup>) e minúsculas em tipos de vedação (sem ou com membrana) não diferem  
653 entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

654

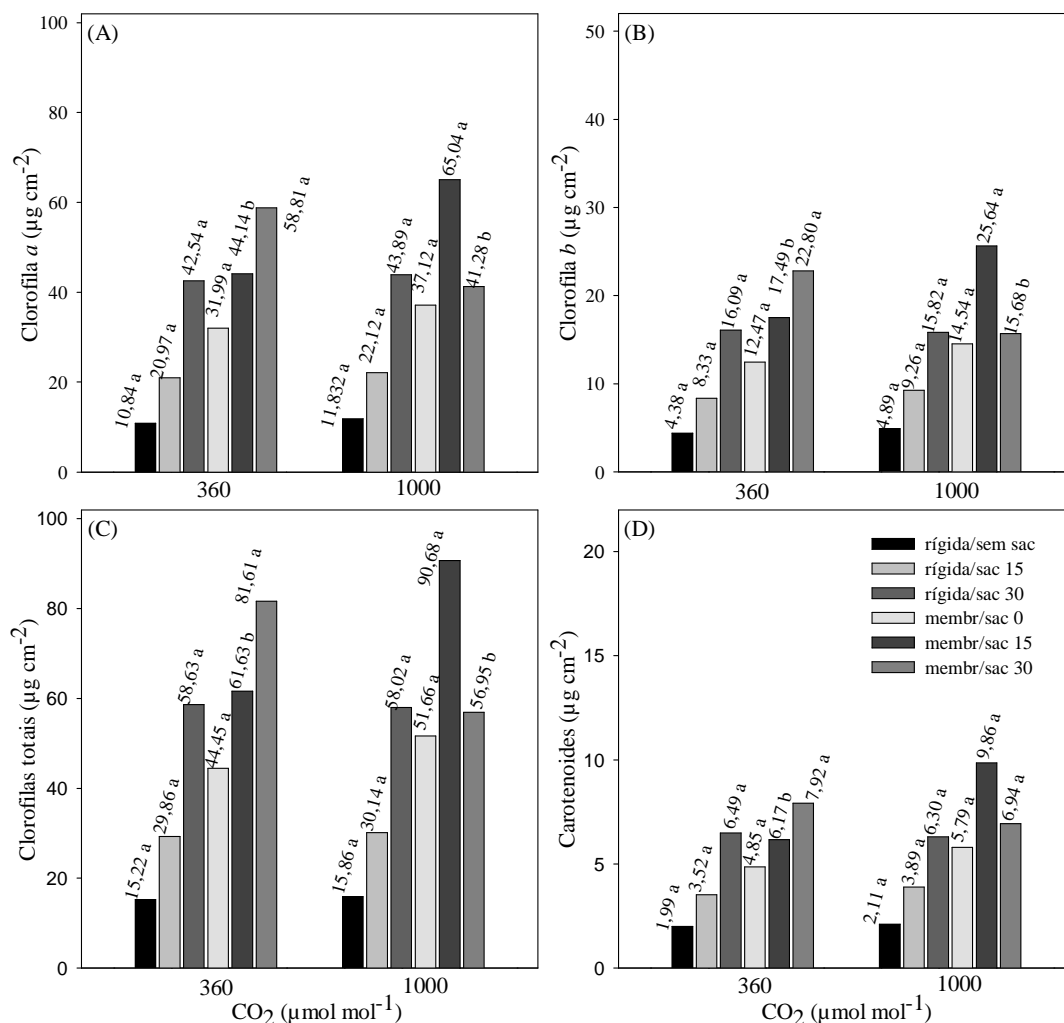
655 *Atmosfera enriquecida com CO<sub>2</sub> aumenta os pigmentos fotossintéticos, sem causar*  
656 *alterações na densidade estomática de plantas de Etilingera elatior cv. Porcelana*  
657 *durante a fase de alongamento e enraizamento in vitro*

658 Os níveis de clorofila *a* e *b*, clorofilas totais e carotenoides (pigmentos  
659 fotossintéticos) foram afetados pelas condições de crescimento do presente trabalho, no  
660 qual ocorreram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) na interação tripla da variável  
661 pigmentos fotossintéticos, entre concentrações de CO<sub>2</sub>, tipos de vedação e  
662 concentrações de sacarose.

663 Para a densidade estomática, não houve diferença significativa tanto para a  
664 porção abaxial quanto para adaxial das folhas, a 5% de probabilidade pelo teste F.  
665 Mesmo nos tratamentos submetidos à atmosfera enriquecida com CO<sub>2</sub> não houve  
666 redução da densidade estomática de *E. elatior* cv. Porcelana. Por se tratar de uma  
667 espécie anfiestomática, foram encontrados estômatos em ambas as faces da folha, no  
668 entanto, foi constatado menor número de estômatos na porção adaxial, quando  
669 comparado a porção abaxial.

670 Para os pigmentos fotossintéticos, houve diferença estatística apenas para o  
671 tratamento tampa com membranas e 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose, no qual 1000 μmol mol<sup>-1</sup> de  
672 CO<sub>2</sub> (65,04; 25,64; 90,68; 9,86 μM, para clorofila *a*, *b*, clorofilas totais e carotenoides,  
673 respectivamente) foi significativamente superior quando comparado ao mesmo  
674 tratamento na concentração 360 μmol mol<sup>-1</sup> de CO<sub>2</sub> (44,14; 17,49; 61,63; 6,17,  
675 respectivamente). O oposto foi observado no tratamento tampa com membranas e 30 g  
676 L<sup>-1</sup> de sacarose, no qual 360 μmol mol<sup>-1</sup> de CO<sub>2</sub> (58,81; 22,80; 81,61, para clorofila *a*, *b*,  
677 e clorofilas totais, respectivamente) foi significativamente superior ao 1000 μmol mol<sup>-1</sup>

678 de CO<sub>2</sub> (41,28; 15,68; 59,95, respectivamente). Já para carotenoides não houve  
 679 diferença estatística para o tratamento tampa com membranas e 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose  
 680 (Figura 2).



681

682 **Figura 2.** Pigmentos fotossintéticos em folhas de plantas de *Etlingera elatior* cv.  
 683 Porcelana alongadas e enraizadas *in vitro* aos 45 dias em diferentes concentrações de  
 684 CO<sub>2</sub> e condições de crescimento (Tampas com e sem membranas e concentrações de  
 685 sacarose). (A) clorofila a; (B) clorofila b; (C) clorofilas totais; (D) carotenoides. Médias  
 686 seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de  
 687 probabilidade.

688

689

690 *Características morfológicas, anatômicas e histoquímicas das folhas de plantas de*  
691 *Etilingera elatior* cv. *Porcelana*, *diferem entre os tratamentos*

692 O enriquecimento de CO<sub>2</sub>, o tipo de vedação e a concentração de sacarose,  
693 ocasionaram mudanças significativas nas características de crescimento das plantas de  
694 *E. elatior* (Figura 4). Quando se utilizou membranas permeáveis a gases, juntamente  
695 com o aumento da concentração interna de CO<sub>2</sub> na atmosfera interna dos frascos, houve  
696 incremento do crescimento tanto em condições fotoautotróficas quanto em  
697 fotomixotróficas.

698 Foi possível observar menor enraizamento nas plantas cultivadas sob condições  
699 fotoautotróficas com enriquecimento de CO<sub>2</sub> (360 ou 1000 μmol mol<sup>-1</sup> de CO<sub>2</sub>) e com  
700 ausência de sacarose (Figura 4C; 4D). Do contrário, em condições fotomixotróficas, sob  
701 enriquecimento de CO<sub>2</sub> e na presença de sacarose, foi possível observar plantas com  
702 maior enraizamento e com nervuras mais aparentes em suas folhas (Figura 4E-4H).  
703 Diferente do observado nas plantas cultivadas em frascos vedados, isto é, com tampa  
704 sem membranas, apesar da formação de raízes suas folhas não desenvolveram nervuras  
705 proeminentes quando comparadas aquelas mantidas em condições fotomixotróficas ou  
706 fotoautotróficas (Figura 4A; 4B).

707



708



709 **Figura 4.** Plantas de *Etilingera elatior* cv. Porcelana aos 45 dias de cultivo *in vitro*  
710 durante alongamento e enraizamento em diferentes concentrações de CO<sub>2</sub> (360 e 1000  
711 μmol mol<sup>-1</sup>) e condições de crescimento (tipos de vedação e concentrações de  
712 sacarose). **(A)** Tampa sem membrana + 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose; **(B)** Tampa sem  
713 membrana + 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose; **(C)** T4 - 360 μmol mol<sup>-1</sup> CO<sub>2</sub> + tampa com  
714 membrana + 0 g L<sup>-1</sup> sacarose; **(D)** T10 - 1000 μmol mol<sup>-1</sup> CO<sub>2</sub> + tampa com membrana  
715 + 0 g L<sup>-1</sup> sacarose; **(E)** T5 - 360 μmol mol<sup>-1</sup> CO<sub>2</sub> + tampa com membrana + 15 g L<sup>-1</sup>  
716 sacarose; **(F)** T11 - 1000 μmol mol<sup>-1</sup> CO<sub>2</sub> + tampa com membrana + 15 g L<sup>-1</sup> sacarose;  
717 **(G)** T6 - 360 μmol mol<sup>-1</sup> CO<sub>2</sub> + tampa com membrana + 30 g L<sup>-1</sup> sacarose; **(H)** T12 -  
718 1000 μmol mol<sup>-1</sup> CO<sub>2</sub> + tampa com membrana + 30 g L<sup>-1</sup> sacarose. Barras: A-H: 10  
719 mm.

720

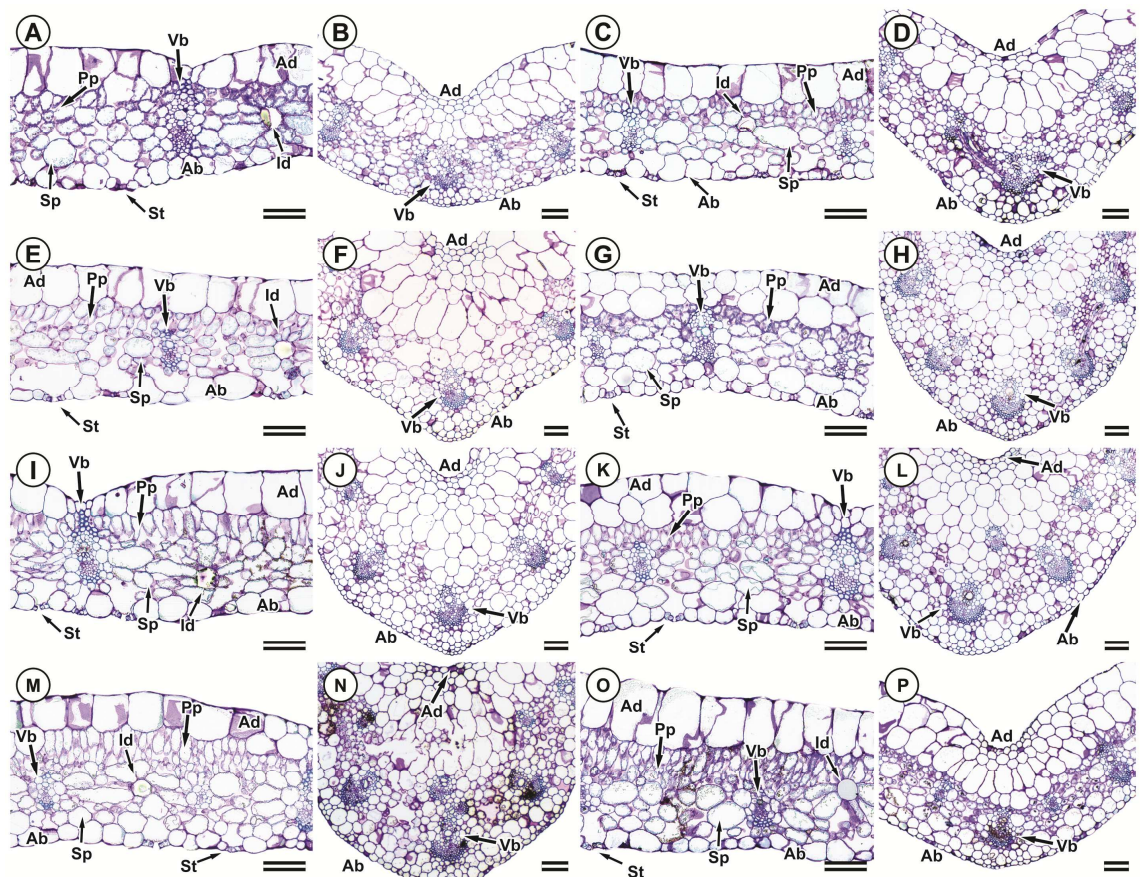
721

722 Constatou-se epidermes abaxial e adaxial, parênquimas clorofilianos paliçádico  
723 e esponjoso, estômatos, câmaras subestomáticas, sistemas vasculares (floema e xilema)  
724 e idioblastos nas folhas das plantas de *E. elatior* cv. Porcelana submetidas a todos os  
725 tratamentos (Figura 6). Entretanto, foi possível observar diferenças entre os tratamentos,  
726 demonstrando mudanças anatômicas na estrutura foliar das plantas. O enriquecimento  
727 da atmosfera com CO<sub>2</sub> e a utilização de tampas com membranas permeáveis a gases,  
728 ocasionaram diferenças no sistema vascular das folhas de *E. elatior*. Quando foram  
729 utilizadas tampas sem membranas e sem a adição de sacarose, houve reduzida  
730 sobrevivência das plantas, devido à elevada porcentagem de oxidação observada nesses  
731 tratamentos.

732 No sistema convencional de cultivo, com a adição de sacarose ao meio de  
733 cultura em frascos com tampas sem membranas (Figura 6A-D), as células do  
734 parênquima apresentaram maiores espaços intercelulares, maior desorganização dos  
735 parênquimas clorofilianos (sem diferenciação aparente entre os parênquimas paliçádico  
736 e esponjoso), reduzida nervura central e vascularização, quando comparado com as  
737 mesmas células de plantas cultivadas em frascos contendo meio de cultura com sacarose  
738 e vedados com tampas com membranas. Em frascos vedados com tampas com  
739 membranas e na ausência de sacarose ao meio de cultura, também foram detectados  
740 desorganização dos parênquimas clorofilianos, espaços intercelulares aparentes, embora  
741 com nervura central desenvolvida e elevada vascularização (Figura 6E-H). O  
742 enriquecimento de CO<sub>2</sub> (360 ou 1000 μmol mol<sup>-1</sup>) resultou na produção de folhas com

743 elevada vascularização, nervura central desenvolvida e bem proeminente, elevado grau  
 744 de organização e diferenciação dos parênquimas clorofilianos, e reduzidos espaços  
 745 intercelulares, em comparação com plantas cultivadas no sistema convencional de  
 746 propagação *in vitro* (Figura 6I-P). Com exceção de plantas cultivadas em recipientes  
 747 com meio de cultura acrescido de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, com tampas com membranas e  
 748 1000 μmol mol<sup>-1</sup> CO<sub>2</sub>, em que foi observada nervura central mais reduzida, em  
 749 comparação com as folhas de plantas cultivadas em 360 μmol mol<sup>-1</sup> CO<sub>2</sub> (Figura 6P),  
 750 sendo semelhante aos tratamentos convencionais de cultivos com tampa rígida e  
 751 presença de sacarose (Figura 6A-D).

752  
 753



754 **Figura 6.** Secções transversais da porção mediana de folhas de plantas de *Etilingera*  
 755 *elatior* cv. Porcelana durante a fase de alongamento e enraizamento aos 45 dias de  
 756 cultivo *in vitro*, em diferentes concentrações de CO<sub>2</sub> (360 e 1000 μmol mol<sup>-1</sup>) e  
 757 condições de crescimento (tipos de vedação e concentrações de sacarose) (A-B) Tampa  
 758 sem membrana + 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose; (C-D) Tampa sem membrana + 30 g L<sup>-1</sup> de  
 759 sacarose; (E-F) T4 - 360 μmol mol<sup>-1</sup> CO<sub>2</sub> + tampa com membrana + 0 g L<sup>-1</sup> sacarose;

760 **(G-H)** T10 - 1000  $\mu\text{mol mol}^{-1}$   $\text{CO}_2$  + tampa com membrana + 0 g  $\text{L}^{-1}$  sacarose; **(I-J)** T5  
761 - 360  $\mu\text{mol mol}^{-1}$   $\text{CO}_2$  + tampa com membrana + 15 g  $\text{L}^{-1}$  sacarose; **(K-L)** T11 - 1000  
762  $\mu\text{mol mol}^{-1}$   $\text{CO}_2$  + tampa com membrana + 15 g  $\text{L}^{-1}$  sacarose; **(M-N)** T6 - 360  $\mu\text{mol}$   
763  $\text{mol}^{-1}$   $\text{CO}_2$  + tampa com membrana + 30 g  $\text{L}^{-1}$  sacarose; **(O-P)** T12 - 1000  $\mu\text{mol mol}^{-1}$   
764  $\text{CO}_2$  + tampa com membrana + 30 g  $\text{L}^{-1}$  sacarose. **A, C, E, G, I, J** detalhes das lâminas  
765 foliares; **B, D, F, H, J, L** detalhe da nervura mediana. Ab face abaxial da epiderme; Ad  
766 face adaxial da epiderme; Id idioblasto; Pp parênquima paliçádico; St estômato; Sp  
767 parênquima esponjoso; Vb sistema vascular. Barras: A-P: 100  $\mu\text{m}$ .

768

769

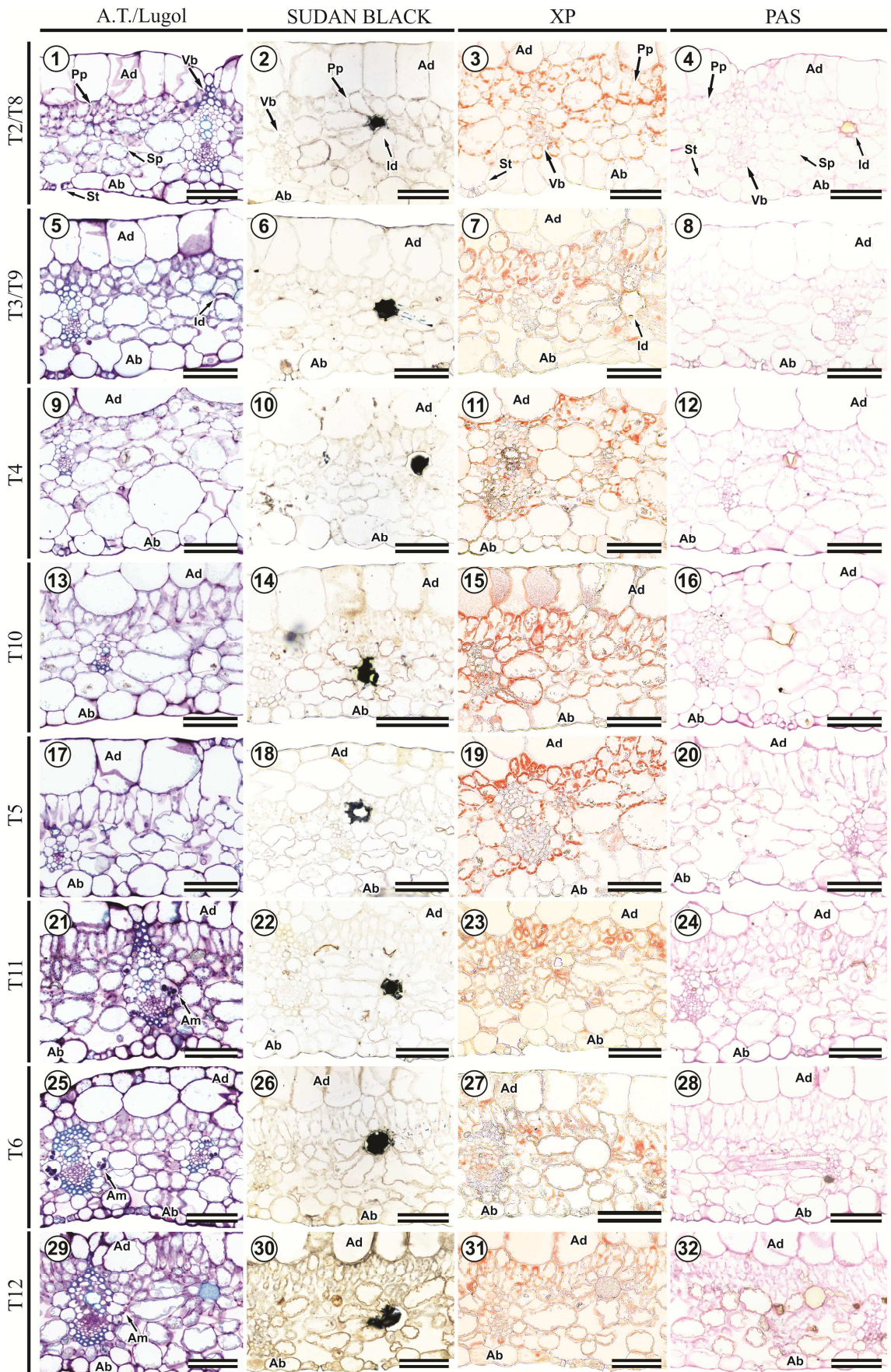
770 Testes histoquímicos indicaram a presença de compostos de reserva nas células  
771 do mesofilo das folhas de *E. elatior*. No teste de azul de toluidina e lugol (Figura 7.1;  
772 7.5; 7.9; 7.13; 7.17; 7.21; 7.25; 7.29), foram evidenciados grãos de amido no mesofilo,  
773 principalmente ao redor dos feixes vasculares, sendo possível observar apenas nos  
774 tratamentos T6, T11 e T12 (Figura 7.21; 7.25; 7.29, respectivamente).

775 Confirmou-se a presença de corpos lipídicos armazenados no interior dos  
776 idioblastos, a partir do teste de sudan Black, sendo encontrados nas folhas de todos os  
777 tratamentos (Figura 7.2; 7.6; 7.10; 7.14; 7.18; 7.22; 7.26; 7.30). Corpos protéicos foram  
778 evidenciados pela reação positiva para o teste de XP, no qual estas estruturas foram  
779 coradas de vermelho e se encontravam distribuídas no mesofilo, principalmente nas  
780 células ao redor dos feixes vasculares e no parênquima paliçádico (Figura 7.3; 7.7; 7.11;  
781 7.15; 7.19; 7.23; 7.27; 7.31). Foi possível observar reação negativa para carboidratos  
782 totais nas folhas de *E. elatior*, a partir do teste de PAS (Figura 7.4; 7.8; 7.12; 7.16; 7.20;  
783 7.24; 7.28; 7.32).

784

785





786 **Figura 7.** Estudo histoquímico de secções de folhas de plantas de *Etilingera elatior* cv.  
787 Porcelana, aos 45 dias de cultivo *in vitro*, durante alongamento e enraizamento em  
788 caixas de ventilação forçada de ar (360 e 1000  $\mu\text{mol mol}^{-1}$ ) em diferentes sistemas de  
789 vedação e concentrações de sacarose. Secções transversais da porção média de folhas  
790 submetidas ao azul de toluidina e lugol (1; 5; 9; 13; 17; 21; 25; 29), 21, 25 e 29 reação  
791 positiva para amido, evidenciada pela coloração roxa; sudan Black, reação positiva para  
792 lipídios pela coloração enegrecida dos idioblastos (2; 6; 10; 14; 18; 22; 26; 30);  
793 xylidine Ponceau, evidenciando reação positiva com corpos protéicos corados de  
794 vermelho (3; 7; 11; 15; 19; 23; 27; 31); e PAS, com reação negativa para carboidratos  
795 totais (4; 8; 12; 16; 20; 24; 28; 32). Ab: face abaxial da epiderme; Ad face adaxial da  
796 epiderme; Am amido; Id: idioblasto; Pp parênquima paliçádico; St estômato; Sp  
797 parênquima esponjoso; Vb sistema vascular. Barras: 1-32: 100  $\mu\text{m}$ .

798

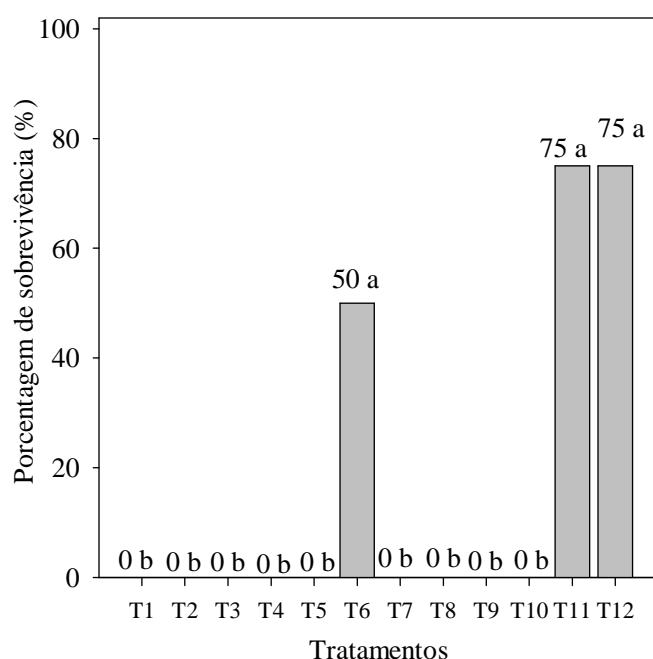
799

800 *Atmosfera enriquecida com CO<sub>2</sub> aumenta a sobrevivência de plantas de E. elatior* cv.

801 *Porcelana em condições ex vitro*

802 Para a variável porcentagem de sobrevivência das plantas à aclimatização, foi  
803 possível observar que plantas submetidas aos tratamentos T6 (360  $\mu\text{mol mol}^{-1}$  de CO<sub>2</sub> +  
804 tampa com membrana + 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose); T11 (1000  $\mu\text{mol mol}^{-1}$  de CO<sub>2</sub> + tampa  
805 com membrana + 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose); e T12 (1000  $\mu\text{mol mol}^{-1}$  de CO<sub>2</sub> + tampa com  
806 membrana + 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose) não diferiram entre si a 5% de significância,  
807 alcançando médias de 50; 75 e 75% de sobrevivência, respectivamente (Figura 3;  
808 Figura 4).

809



810

811 **Figura 3.** Porcentagem de sobrevivência à aclimatização das plantas de *Etilingera*  
 812 *elatior* cv. Porcelana, aos 45 dias de cultivo *in vitro* em diferentes concentrações de CO<sub>2</sub>  
 813 e condições de crescimento (tipos de vedação e concentração de sacarose). Médias  
 814 seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott Knott, a 5% de  
 815 probabilidade.

816

817



818 **Figura 4.** Plantas de *Etilingera elatior* cv. Porcelana provenientes de cultivo *in vitro*  
 819 durante 45 dias de alongamento e enraizamento em diferentes concentrações de CO<sub>2</sub>  
 820 (360 e 1000  $\mu\text{mol mol}^{-1}$ ) e condições de crescimento (tipos de vedação e concentrações

821 de sacarose), após 30 dias de aclimatização em casa de vegetação. **(A)** T6 - 360  $\mu\text{mol}$   
822  $\text{mol}^{-1} \text{CO}_2$  + tampa com membrana + 30  $\text{g L}^{-1}$  sacarose; **(B)** T11 - 1000  $\mu\text{mol mol}^{-1} \text{CO}_2$   
823 + tampa com membrana + 15  $\text{g L}^{-1}$  sacarose; **(C)** T12 - 1000  $\mu\text{mol mol}^{-1} \text{CO}_2$  + tampa  
824 com membrana + 30  $\text{g L}^{-1}$  sacarose. Barras: 10 mm.  
825

## 826 **DISCUSSÃO**

827

828 *A atmosfera enriquecida com CO<sub>2</sub> melhora o crescimento in vitro de plantas de E.*  
829 *elatiior cv. Porcelana, durante a fase de alongamento e enraizamento in vitro*

830         Esse trabalho descreve pela primeira vez o efeito do enriquecimento de CO<sub>2</sub>, sob  
831 ventilação forçada de ar, na propagação *in vitro* de *E. elatiior* cv. Porcelana. O emprego  
832 de concentrações de CO<sub>2</sub>, com ou sem sacarose no meio de cultura, e o tipo de vedação  
833 dos frascos (com ou sem membranas permeáveis a gases), resultou em plantas com  
834 diferenças evidentes nos parâmetros de crescimento. Quando se utilizou membranas  
835 permeáveis a gases associada ao enriquecimento de CO<sub>2</sub>, (principalmente 1000 µmol  
836 mol<sup>-1</sup> de CO<sub>2</sub>) constatou-se melhora no crescimento das plantas em condições  
837 fotoautotróficas e fotomixotróficas, principalmente quando foram propagadas em meio  
838 MS suplementado com 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose (Figura 1 e 4).

839         O ideal para a propagação *in vitro* seria produzir plantas sob as mesmas  
840 condições ambientais *ex vitro*, com a manutenção das trocas gasosas, níveis ideais de  
841 fluxo de fótons fotossinteticamente ativos e concentração adequada de CO<sub>2</sub> (Xiao et al.,  
842 2011; Pinheiro et al., 2013). Para isso são utilizadas membranas porosas a gases, pois  
843 favorecem a manutenção da concentração adequada de CO<sub>2</sub>; diminuem o acúmulo de  
844 etileno e reduzem a umidade relativa no interior dos frascos. Essas mudanças ocorrem  
845 devido a maior eficiência das trocas gasosas, que estimulam a fotossíntese,  
846 influenciando positivamente tanto o desempenho das plantas nas etapas *in vitro* quanto  
847 na aclimatização (Kozai & Kubota, 2001; Xiao et al., 2011).

848         O crescimento e desenvolvimento das plantas produzidas *in vitro* são afetados  
849 pela trocas gasosas entre o meio interno e externo dos frascos (Zobayed, 2006; Saldanha  
850 et al., 2012; Saldanha et al., 2013). O uso de membranas porosas a gases no cultivo *in*  
851 *vitro*, resulta em plantas maiores e mais vigorosas, com maior altura e acúmulo de  
852 biomassa, taxas de crescimento e fotossintética mais elevadas, estômatos normais e  
853 funcionais, folhas e raízes maiores e mais desenvolvidas, além de aumentar a absorção  
854 de nutrientes e estimular o metabolismo secundário (Ribeiro et al., 2009; Arigita et al.,  
855 2010; Kozai, 2010; Badr et al., 2011; Iarema et al., 2012; Saldanha et al., 2013;  
856 Saldanha et al., 2014).

857         Quando as plantas são produzidas sob elevadas trocas gasosas, pode-se induzir a  
858 um aumento de duas vezes da massa seca, quando comparada a produção de plantas em  
859 sistema convencional de cultivo *in vitro* (Nguyen et al., 1999). O mesmo foi observado



860 no presente trabalho, em que a massa fresca total das plantas foi superior sob  
861 concentração de  $1000 \mu\text{mol mol}^{-1}$  de  $\text{CO}_2$  com o uso de membranas permeáveis a gases.  
862 Já a massa seca total das plantas foi maior sob suplementação de 15 e  $30 \text{ g L}^{-1}$  de  
863 sacarose ao meio de cultura, independente do tipo de vedação usado. Diferente do  
864 observado por Saldanha et al. (2012), em que o uso de membranas porosas a gases  
865 aumentou o peso seco da parte aérea de *P. glomerata*. Para Mohamed e Alsdon (2010)  
866 o maior peso seco das plantas foi observado sob enriquecimento de  $\text{CO}_2$  que pode ter  
867 incrementado a maior atividade fotossintética das plantas.

868 No presente trabalho, o uso de membranas porosas a gases favoreceu o  
869 crescimento das plantas, tanto em condições fotomixotróficas quanto em  
870 fotoautotróficas sob elevadas concentrações de  $\text{CO}_2$  (Iarema et al., 2012; Saldanha et al.,  
871 2013). No entanto, o sistema fotomixotrófico, em condições de enriquecimento de  $\text{CO}_2$   
872 associado à adição de carboidrato ( $15$  ou  $30 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose), favoreceu o melhor  
873 desenvolvimento morfo-fisiológico de plantas de bastão-do-imperador.

874

875 *Atmosfera enriquecida com  $\text{CO}_2$  aumenta os pigmentos fotossintéticos, sem causar*  
876 *alterações na densidade estomática de plantas de *E. elatior* cv. Porcelana durante a*  
877 *fase de alongamento e enraizamento in vitro*

878 A variável pigmentos fotossintéticos é um bom indicador do estado funcional do  
879 aparato fotossintético das plantas (Alvarez et al., 2012). No presente trabalho, atmosfera  
880 enriquecida com  $360$  e  $1000 \mu\text{mol mol}^{-1}$  de  $\text{CO}_2$ , uso de tampas com membranas  
881 porosas e meio de cultura suplementado com  $15$  e  $30 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose promoveram  
882 elevados valores de pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*, *b*, clorofilas totais e  
883 carotenoides). O mesmo foi observado para *Persea americana*, a redução de sacarose  
884 juntamente com o enriquecimento de  $\text{CO}_2$  ( $1000 \mu\text{mol mol}^{-1}$ ), promoveram elevação  
885 dos pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*, *b*, totais e carotenoides), aumentando a taxa  
886 fotossintética das plantas produzidas (De La Viña et al., 1999). Em *P. glomerata*,  
887 também foi observado maior teor de pigmentos em atmosfera enriquecida com  $\text{CO}_2$ ,  
888 indicando que essa condição estimula o crescimento fotoautotrófico das plantas  
889 (Saldanha et al., 2013; Saldanha et al., 2014). Para *Solanum tuberosum*, o estímulo da  
890 fotossíntese em condições fotomixotróficas proporcionou aumento dos pigmentos  
891 fotossintéticos, sendo dependente do enriquecimento da atmosfera com  $\text{CO}_2$ , da redução  
892 da concentração de sacarose no meio de cultura ( $20 \text{ g L}^{-1}$ ) e da utilização de membranas

893 permeáveis a gases (Mohamed & Alsadon, 2010). Em *Coffea arabusta* também foi  
894 observado maior teor de clorofila em condições fotomixotróficas (Afreen et al., 2002).

895 Alguns autores relatam que em condições fotoautotróficas, o uso da  
896 concentração ideal de CO<sub>2</sub> associada à utilização de membranas porosas a gases, resulta  
897 em aumento da taxa fotossintética e conseqüentemente do crescimento das plantas  
898 (Kozai, 2010; Cha-Um et al., 2011). O aumento das trocas gasosas proporciona  
899 aumento na biossíntese de pigmentos das folhas produzidas *in vitro* (Ivanova & Staden,  
900 2010; Mohamed & Alsadon, 2011; Saldanha et al., 2012). Por outro lado, em frascos  
901 com trocas gasosas reduzidas ocorre decréscimo dos pigmentos fotossintéticos, sendo  
902 observadas menores perdas de umidade e acúmulo de etileno; comprovado em situação  
903 de trocas gasosas, no qual se elevam os pigmentos fotossintéticos, ocorre aumento da  
904 umidade e reduz ou inibe a concentração de etileno (Zobayed et al., 1999;  
905 Chanemougasoundharam et al., 2004; Saldanha et al., 2012). Com isso, o reduzido teor  
906 de pigmentos fotossintéticos pode comprometer o desempenho das plantas durante a  
907 aclimatização *ex vitro*.

908

909 *Características morfológicas, anatômicas e histoquímicas das folhas de plantas de*  
910 *Etilingera elatior cv. Porcelana, diferem entre os tratamentos*

911 Para bastão-do-imperador, foram observadas mudanças na anatomia foliar  
912 durante todo o processo de alongamento e enraizamento *in vitro* em diferentes  
913 concentrações de CO<sub>2</sub>, sacarose e tipos de vedação. Em condições fotomixotróficas,  
914 com enriquecimento de CO<sub>2</sub>, presença de sacarose (15 ou 30 g L<sup>-1</sup>) e frascos com  
915 tampas contendo membranas permeáveis a gases, foram produzidas plantas mais  
916 vigorosas, com maior enraizamento e folhas mais desenvolvidas e com nervuras mais  
917 aparentes. Saldanha et al. (2013), relataram que a concentração de CO<sub>2</sub>, a presença de  
918 membranas porosas e a presença de sacarose no meio de cultura, levaram importantes  
919 alterações anatômicas nas folhas de *P. glomerata*. Nas condições de trocas gasosas, são  
920 produzidas plantas vigorosas com estruturas anatômicas diferenciadas, quando  
921 comparadas àquelas obtidas no sistema convencional de propagação *in vitro* (Ribeiro et  
922 al., 2009), em que são produzidas plantas de morfologia, anatomia e fisiologia anormais  
923 (Mohamed & Alsadon, 2010).

924 A utilização de membranas porosas associada às trocas gasosas produz células e  
925 tecidos mais diferenciados e organizados (Zobayed et al., 2001a) conduz maior  
926 deposição de parede celular na superfície das folhas, sistema vascular mais

927 desenvolvido (Mills et al., 2004), parênquimas paliçádico e esponjoso mais definidos  
928 (Zobayed et al., 2001b), beneficiando a morfogênese *in vitro* das plantas, aumentando  
929 assim, a taxa de sobrevivência durante o processo de aclimatização *ex vitro*. Do  
930 contrário, na propagação *in vitro* convencional, são produzidas plantas com epiderme  
931 irregular; espaços intercelulares no mesofilo e na câmara subestomática, reduzida  
932 diferenciação do mesofilo e dos tecidos vasculares; associada à pequena deposição de  
933 cutícula e parede celular, resultando em uma estrutura mais delgada, portanto mais fácil  
934 de sofrer danos (Ribeiro et al., 2009; Alvarez et al., 2012; Saldanha et al., 2013). Dessa  
935 forma, folhas anatomicamente bem desenvolvidas, oriundas de mudas cultivadas em  
936 frascos com membranas e em meio MS acrescido de reduzida concentração de sacarose  
937 aumentarão a sobrevivência das plantas durante a aclimatização *ex vitro* (Mohamed &  
938 Alsadon, 2010), devido também a maior deposição de cera epicuticular em ambas as  
939 superfícies da folha e melhor funcionamento dos estômatos (Yoon et al., 2009).

940         Isso por que, em sistemas fotoautotrófico ou fotomixotrófico, o enriquecimento  
941 de CO<sub>2</sub> potencializa a produção em larga escala das plantas, reduzindo as perdas devido  
942 à desidratação, aumentando assim, a porcentagem de sobrevivência em condições *ex*  
943 *vitro* (Saldanha et al., 2013).

944         Assim como no presente trabalho, é comum, nas folhas de plantas da família  
945 Zingiberaceae, a presença de idioblastos, com material lipofílico no seu interior,  
946 dispostos no parênquima clorofiliano. Essas estruturas também foram observadas em  
947 *Alpinia zerumbet* (Albuquerque & Neves, 2004; Victorio et al., 2011) e em *Hedychium*  
948 *coronarium* (Martins et al., 2010), cultivadas em condições de campo.

949         O número de estômatos e o funcionamento estomático normal são características  
950 importantes para a sobrevivência das plantas no processo de aclimatização (Ribeiro et  
951 al., 2009). No presente trabalho, não houve diferença estatística para a variável  
952 densidade estomática entre os tratamentos. No entanto, em muitos trabalhos, pode-se  
953 observar diferenças quanto a densidade estomática das diferentes espécies estudadas.  
954 Por exemplo, em *S. melongena* e *S. tuberosum*, a maior densidade estomática foi  
955 constatada em frascos completamente vedados (Ribeiro et al., 2009; Mohamed &  
956 Alsadon, 2010). Já em *Brassica oleracea*, observaram-se densidade estomática 1,3  
957 maior nas folhas das plantas cultivadas em frascos com membranas porosas a gases  
958 (Zobayed et al., 2001b). Para *P. glomerata*, ocorreu redução da densidade estomática  
959 em condições de enriquecimento de CO<sub>2</sub> e membranas porosas a gases (Saldanha et al.,

960 2013). Já Saldanha et al. (2014) relatam que notavelmente a epiderme abaxial foi mais  
961 responsiva aos tratamentos de CO<sub>2</sub> (360 e 1000 μmol mol<sup>-1</sup>).

962 A propagação *in vitro* de plantas em sistema convencional, sob elevada umidade  
963 relativa e baixa concentração de CO<sub>2</sub>, pode proporcionar a elevada produção de  
964 estômatos, no entanto esses não são funcionais (Zobayed et al., 2000; Mohamed &  
965 Alsadon, 2010). No entanto, sob condições de enriquecimento de CO<sub>2</sub> o crescimento  
966 das plantas pode modificar a densidade estomática, podendo aumentar, diminuir ou  
967 permanecer inalterada, em comparação com plantas cultivadas em concentrações de  
968 CO<sub>2</sub> ambiente (Saldanha et al., 2013).

969

970 *Atmosfera enriquecida com CO<sub>2</sub> aumenta a sobrevivência de plantas de Etilingera*  
971 *elatior cv. Porcelana em condições ex vitro*

972 Plantas de bastão-do-imperador submetidas a condições *ex vitro*, foram  
973 aclimatizadas apenas em recipientes plásticos contendo substrato, sem qualquer  
974 prevenção da perda de umidade. Esse procedimento foi realizado com o objetivo de  
975 observar se as plantas que estavam submetidas aquelas condições tiveram algum ganho  
976 morfológico e fisiológico, e assim, capazes de suportar ao estresse quando passadas das  
977 condições *in vitro* para *ex vitro*. Nessas condições, apenas as plantas submetidas aos  
978 tratamentos com enriquecimento de CO<sub>2</sub> (360 ou 1000 μmol mol<sup>-1</sup>) e adição de sacarose  
979 ao meio de cultura e uso de tampas com membranas (T6, T11 e T12) sobreviveram as  
980 condições de aclimatização *ex vitro*. O uso de tampas com membranas porosas a gases  
981 tem efeito positivo durante a aclimatização das plantas *ex vitro*, aumentando a taxa de  
982 sobrevivência (Shim et al., 2003; Zobayed, 2006; Alvarez et al., 2012), devido ao  
983 estímulo da capacidade fotossintética das plantas (Kozai, 2010; Xiao et al., 2011;  
984 Alvarez et al., 2012).

985 No presente trabalho, nesses mesmos tratamentos (T6, T11 e T12) os testes  
986 histoquímicos evidenciaram grãos de amido distribuídos no mesofilo e ao redor dos  
987 feixes vasculares, resultado da fotossíntese realizada já durante as condições *in vitro* sob  
988 enriquecimento de CO<sub>2</sub>, os mesmos tratamentos que sobreviveram as condições de  
989 aclimatização *ex vitro*. Outros autores relatam a presença de amido apenas durante a  
990 aclimatização *ex vitro* de plantas que passaram pelo enriquecimento de CO<sub>2</sub> (Yoon et  
991 al., 2009). Em muitas plantas o enriquecimento de CO<sub>2</sub> está associado ao aumento da  
992 atividade fotossintética, comprovado a partir da maior quantidade de clorofila *a*, *b* e  
993 totais (Suthar et al., 2009), com isso, ocorre a formação de grãos de amido nas folhas

994 das plantas (Yoon et al., 2009), aumentando o teor de carboidratos. A suplementação  
995 exógena de sacarose aumenta a produção de reservas de amido em plantas propagadas  
996 *in vitro*, favorecendo a transferência para condições *ex vitro*, e assim, acelerando  
997 adaptações fisiológicas e o sucesso da aclimatização (Yoon et al., 2009).

998 Em *Azadirachta indica*, o uso de membranas porosas a gases possibilitou o  
999 aumento da qualidade de brotos, pois diminuiu a ocorrência de clorose e senescência  
1000 foliar, elevou o enraizamento das mudas, aumentando, assim, a taxa de sobrevivência na  
1001 aclimatização para 80% (Rodrigues et al., 2012). O mesmo foi observado no presente  
1002 trabalho, em que foram observados porcentagem de sobrevivência de plantas de bastão-  
1003 do-imperador de 50, 75 e 75% (T6, T11 e T12, respectivamente).

1004 No sistema convencional de propagação *in vitro*, pode ocorrer elevadas taxas de  
1005 mortalidade das plantas durante a fase de aclimatização. A elevada adição de sacarose  
1006 adicionada ao meio de cultura é uma das causas para que isso ocorra (Badr et al., 2011).  
1007 Por essa razão, a utilização de plantas de *E. elatior* cv. Porcelana cultivadas sob  
1008 enriquecimento de CO<sub>2</sub> (1000 µmol mol<sup>-1</sup>), utilização de membranas permeáveis a gases  
1009 e meio de cultura suplementado com 15 g L<sup>-1</sup> é ideal para fase de  
1010 alongamento/enraizamento *in vitro* das plantas, o que irá melhor o desempenho delas  
1011 durante a aclimatização *ex vitro*.

1012 Após o estabelecimento de protocolo de fotomixotrofia de *E. elatior* cv.  
1013 Porcelana espera-se melhorar o desempenho da capacidade fotossintética e o  
1014 crescimento das plantas produzidas, e a partir daí promover o aumento da sobrevivência  
1015 das plantas após a transferência das condições de *in vitro* para *ex vitro*.

1016 Este é o primeiro estudo sobre a produção de mudas de *E. elatior* cv. Porcelana  
1017 sob atmosfera enriquecida com CO<sub>2</sub>, em diferentes concentrações de sacarose e tipos de  
1018 vedação dos frascos de cultivo, sendo observadas mudanças primordiais na anatomia  
1019 das folhas das plantas produzidas em cada um desses tratamentos, buscando identificar  
1020 quais características as plantas devem apresentar para se aproximarem das mudas  
1021 produzidas sob condições naturais de campo.

1022 Os resultados do presente estudo revelam que o crescimento fotomixotrófico de  
1023 bastão-do-imperador 'Porcelana' pode ser feito sob enriquecimento de CO<sub>2</sub> (1000 µmol  
1024 mol<sup>-1</sup>), vedados com membranas porosas a gases e submetidos em meio MS acrescido  
1025 de 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose, sendo alcançadas as melhores respostas para alongamento e  
1026 enraizamento *in vitro* das plantas.

1027 Com isso, o sistema de fotomixotrofia favorecerá a produção em larga escala de  
1028 mudas de *E. elatior* cv. Porcelana, e aumentará a sobrevivência das plantas durante  
1029 aclimatização *ex vitro*.

1030

### 1031 **AGRADECIMENTOS**

1032

1033 Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível  
1034 Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos; e Fundação de Amparo à  
1035 Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro.

1036

1037 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1038

- 1039 ABDELMAGEED, A.H.A.; FARIDAH, Q.Z.; NUR AMALINA, A.; YAACOB, M.  
1040 The influence of organ and post-harvest drying period on yield and chemical  
1041 composition of the essential oils of *Etilingera elatior* (Zingiberaceae). **Journal of**  
1042 **Medicinal Plants Research**, v.5, p.3432-3439, 2011.
- 1043 ABDELWAHAB, S.I.; ZAMAN, F.Q.; MARIOD, A.A.; YAACOB, M.;  
1044 ABDELMAGEED, A.H.; KHAMIS, S. Chemical composition, antioxidant and  
1045 antibacterial properties of the essential oils of *Etilingera elatior* and *Cinnamomum*  
1046 *pubescens* Kochummen. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.90,  
1047 p.2682-2688, 2010.
- 1048 AFREEN, F.; ZOBAYED, S.M.A.; KOZAI, T. Photoautotrophic culture of *Coffea*  
1049 *arabusta* somatic embryos photosynthetic ability and growth of different stage embryos.  
1050 **Annals of Botany**, v.90, p.11-19, 2002.
- 1051 ALBUQUERQUE, E.S.B.; NEVES, L.J. Anatomia foliar de *Alpinia zerumbet* (Pers.)  
1052 Burt & Smith (Zingiberaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v.18, p.109-121, 2004.
- 1053 ALVAREZ, C.; SÁEZ, P.; SÁEZ, K.; SÁNCHEZ-OLATE, M.; RÍOS, D. Effects of  
1054 light and ventilation on physiological parameters during in vitro acclimatization of  
1055 *Gevuina avellana* mol. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.110, p.93-101, 2012.
- 1056 ARIGITA, L.; CAÑAL, M.J.; TAMÉS, R.S.; GONZÁLEZ, A. CO<sub>2</sub>-enriched  
1057 microenvironment affects sucrose and macronutrients absorption and promotes  
1058 autotrophy in the *in vitro* culture of kiwi (*Actinidia deliciosa* Chev. Liang and  
1059 Ferguson). **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v.46, p.312-322,  
1060 2010.
- 1061 BADR, A.; ANGERS, P.; DESJARDINS, Y. Metabolic profiling of photoautotrophic  
1062 and photomixotrophic potato plantlets (*Solanum tuberosum*) provides new insights into  
1063 acclimatization. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.107, p.13-24, 2011.
- 1064 CHA-UM, S.; CHANSEETIS, C.; CHINTAKOVID, W.; PICCHAKUM, A.;  
1065 SUPAIBULWATANA, K. Promoting root induction and growth of in vitro macadamia

1066 (*Macadamia tetraphylla* L. 'Keaau') plantlets using CO<sub>2</sub>-enriched photoautotrophic  
1067 conditions **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.106, p.435-444, 2011.

1068 CHAN, E.W.C.; LIM, Y.Y.; WONG, S.K. Phytochemistry and pharmacological  
1069 properties of *Etilingera elatior*: A review. **Pharmacognosy Journal**, v.3, p.6-10, 2011a.

1070 CHAN, E.W.C.; NG, V.P.; TAN, V.V.; LOW, Y.Y. Antioxidant and antibacterial  
1071 properties of *Alpinia galanga*, *Curcuma longa*, and *Etilingera elatior* (Zingiberaceae).  
1072 **Pharmacognosy Journal**, v.3, p.54-61, 2011b.

1073 CHANEMOUGASOUNDHARAM, A.; SARKAR, D.; PANDEY, S.K.; AL-BISKI, F.;  
1074 HELALI, O.; MINHAS, J.S. Culture tube closure-type affects potato plantlets growth  
1075 and chlorophyll contents. **Biologia Plantarum**, v.48, p.7-11, 2004.

1076 CRUZ, C.D. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and  
1077 quantitative genetics. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v.35, p.271-276, 2013.

1078 DE LA VIÑA, G.; PLIEGO-ALFARO, F.; DRISCOLL, S.P.; MITCHELL, V.J.;  
1079 PARRY, M.A.; LAWLOR, D.W. Effects of CO<sub>2</sub> and sugars on photosynthesis and  
1080 composition of avocado leaves grown in vitro. **Plant Physiology and Biochemistry**,  
1081 v.37, p.587-595, 1999.

1082 IAREMA, L.; DA CRUZ, A.C.F.; SALDANHA, C.W.; DIAS, L.L.C.; VIEIRA, R.F.;  
1083 DE OLIVEIRA, E.J.; OTONI, W.C. Photoautotrophic propagation of Brazilian ginseng  
1084 [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.110,  
1085 p.227-238, 2012.

1086 IVANOVA, M.; STADEN, J. Natural ventilation effectively reduces hyperhydricity in  
1087 shoot cultures of *Aloe polyphylla* Schönland ex Pillans. **Plant Growth Regulation**,  
1088 v.60, p.143-150, 2010.

1089 JAAFAR, F.M.; OSMAN, C.P.; ISMAIL, N.H.; AWANG, K. Analysis of essential oils  
1090 of leaves, stems, flowers and rhizomes of *Etilingera elatior* (Jack) R.M. **The Malaysian**  
1091 **Journal of Analytical Sciences**, v.11, p.269-273, 2007.

1092 KARIM, A.; MUNIR, S. A newly developed method for rapid propagation of an  
1093 important culinary and medicinal herb (*Etilingera elatior*). **Insight**  
1094 **Ethnopharmacology**, v.1, p.3-4, 2011.



- 1095 KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde–glutaraldehyde fixative of high osmolarity for  
1096 use in electron microscopy. **The Journal of Cell Biology**, v.27, p.127-128, 1965.
- 1097 KOZAI, T. Photoautotrophic micropropagation—environmental control for promoting  
1098 photosynthesis. **Propagation of Ornamental Plants**, v.10, p.188-204, 2010.
- 1099 KOZAI, T.; KUBOTA, C. Development a photoautotrophic micropropagation system  
1100 for woody plants. **Journal of Plant Research** v.114, p.525-537, 2001.
- 1101 LINS, S.R.O.; COELHO, R.S.B. Antracnose em inflorescências de bastão do imperador  
1102 (*Etlingera elatior*): Ocorrência e métodos de inoculação. **Summa Phytopatológica**,  
1103 v.29, p.355-358, 2003.
- 1104 MARTINS, M.B.G.; CARAVANTE, A.L.C.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.;  
1105 SOARES, M.K.M.; MOREIRA, R.R.D.; SANTOS, L.E. Caracterização anatômica e  
1106 fitoquímica de folhas e rizomas de *Hedychium coronarium* J. König (Zingiberaceae).  
1107 **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.12, p.179-187, 2010.
- 1108 MILLS, D.; YANQING, Z.; BENZONI, A. Improvement of jojoba shoot  
1109 multiplication *in vitro* by ventilation. **In Vitro Cellular & Developmental Biology -**  
1110 **Plant**, v.40, p.386-402, 2004.
- 1111 MOHAMED, M.A.H.; ALSADON, A.A. Influence of ventilation and sucrose on  
1112 growth and leaf anatomy of micropropagated potato plantlets. **Scientia Horticulturae**,  
1113 v.123, p.295-300, 2010.
- 1114 MOHAMED, M.A.H.; ALSADON, A.A. Effect of vessel type and growth regulators on  
1115 micropropagation of *Capsicum annuum*. **Biologia Plantarum**, v.55, p.370-374, 2011.
- 1116 MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with  
1117 tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.
- 1118 NGUYEN, Q.T.; KOZAI, T. Photoautotrophic micropropagation of woody species. In:  
1119 KOZAI, T.; AFREEN, F.; ZOBAYED, S.M.A. (Ed.). **Photoautotrophic (sugar-free**  
1120 **medium) micropropagation as a new micropropagation and transplant production**  
1121 **system**. Dordrecht: Springer, 2005. p.123-146.

- 1122 NGUYEN, Q.T.; KOZAI, T.; NIU, G.; NGUYEN, U.V. Photosynthetic characteristics  
1123 of coffee (*Coffea arabusta*) plantlets *in vitro* in response to different CO<sub>2</sub> concentrations  
1124 and light intensities. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.55, p.133-139, 1999.
- 1125 O'BRIEN, T.P.; MCCULLY, M.E. **The study of plant structure principles and select**  
1126 **methods**. Melbourne: Termarcarphi Pty Ltd, 1981.
- 1127 PINHEIRO, M.V.M.; MARTINS, F.B.; XAVIER, A.; OTONI, W.C. Trocas gasosas  
1128 influenciam na morfogênese *in vitro* de duas cultivares de oliveira (*Olea europaea* L.).  
1129 **Revista Árvore**, v.37, p.19-29, 2013.
- 1130 RESCAROLLI, C.L.S.; ZAFFARI, G.R. Produção de mudas de *Etilingera elatior* (Jack)  
1131 R.M. Sm. através da cultura de tecidos vegetais *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas**  
1132 **Medicinais**, v.11, p.190-195, 2009.
- 1133 RIBEIRO, A.P.O.; PICOLI, E.A.T.; LANI, E.R.G.; VENDRAME, W.A.; OTONI,  
1134 W.C. The influence of flask sealing on *in vitro* morphogenesis of eggplant (*Solanum*  
1135 *melongena* L.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v.45, p.421-428,  
1136 2009.
- 1137 RIBEIRO, T.R.; ALMEIDA, E.F.A.; FRAZÃO, J.E.M.; CARVALHO, J.G. Bastão-do-  
1138 imperador. In: PAIVA, P.D.O.; ALMEIDA, E.F. (Ed.). **Produção de flores de corte**.  
1139 Lavras: UFLA, 2012. p.90-103.
- 1140 RODRIGUES, M.; COSTA, T.H.F.; FESTUCCI-BUSELLI, R.A.; SILVA, L.C.;  
1141 OTONI, W.C. Effects of flask sealing and growth regulators on *in vitro* propagation of  
1142 neem (*Azadirachta indica* A. Juss.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-**  
1143 **Plant**, v.48, p.67-72, 2012.
- 1144 SALDANHA, C.W.; OTONI, C.G.; DE AZEVEDO, J.L.F.; DIAS, L.L.C.; DO RÊGO,  
1145 M.M.; OTONI, W.C. A low-cost alternative membrane system that promotes growth in  
1146 nodal cultures of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Plant Cell,**  
1147 **Tissue and Organ Culture**, v.110, p.413-422, 2012.
- 1148 SALDANHA, C.W.; OTONI, C.G.; NOTINI, M.M.; KUKI, K.N.; CRUZ, A.C.F.;  
1149 RUBIO NETO, A.; DIAS, L.L.C.; OTONI, W.C. A CO<sub>2</sub>-enriched atmosphere improves  
1150 *in vitro* growth of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **In Vitro**  
1151 **Cellular & Developmental Biology - Plant**, v.49, p.433-444, 2013.

1152 SALDANHA, C.W.; OTONI, C.G.; ROCHA, D.I.; CAVATTE, P.C.; DETMANN,  
1153 K.D.S.C.; TANAKA, F.A.O.; DIAS, L.L.C.; DAMATTA, F.M.; OTONI, W.C. CO<sub>2</sub>-  
1154 enriched atmosphere and supporting material impact the growth, morphophysiology and  
1155 ultrastructure of *in vitro* Brazilian-ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]  
1156 plantlets. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (In Press)**, 2014.

1157 SANTOS, E.M.; AZEVEDO, B.M.; MARINHO, A.B.; CARVALHO, A.C.P.P.;  
1158 SARAIVA, K.R. Acclimatização de mudas micropropagadas de Bastão do Imperador em  
1159 diferentes volumes de recipientes. **Revista Ceres**, v.60, p.134-137, 2013.

1160 SANTOS, R.P.; CRUZ, A.C.F.D.; IAREMA, L.; KUKI, K.N.; OTONI, W.C. Protocolo  
1161 para extração de pigmentos foliares em porta-enxertos de videira micropropagados.  
1162 **Revista Ceres**, v.55, p.356-364, 2008.

1163 SEGATTO, F.B.; BISOGNIN, D.A.; BENEDETTI, M.; COSTA, L.C.;  
1164 RAMPELOTTO, M.V.; NICOLOSO, F.T. Técnica para o estudo da anatomia da  
1165 epiderme foliar de batata. **Ciência Rural**, v.34, p.1597-1601, 2004.

1166 SHIM, S.-W.; HAHN, E.-J.; PAEK, K.-Y. *In vitro* and *ex vitro* growth of grapevine  
1167 rootstock '5BB' as influenced by number of air exchanges and the presence or absence  
1168 of sucrose in culture media **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.75, p.57-62,  
1169 2003.

1170 SUTHAR, R.K.; RATHORE, P.; PUROHIT, S.D. *In vitro* growth and shoot  
1171 multiplication in *Terminalia bellerica* Roxb under controlled carbon dioxide  
1172 environment. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.47, p.204-209, 2009.

1173 VICTORIO, C.P.; ARRUDA, R.C.O.; RIEHL, C.A.S.; LAGE, C.L.S. Leaf volatiles and  
1174 secretory cells of *Alpinia zerumbet* (Pers.) Burtt et Smith (Zingiberaceae). **Natural**  
1175 **Product Research**, v.25, p.939-948, 2011.

1176 WELLBURN, A.R. The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total  
1177 carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution.  
1178 **Journal of Plant Physiology**, v.144, p.307-313, 1994.

1179 XIAO, Y.; NIU, G.; KOZAI, T. Development and application of photoautotrophic  
1180 micropropagation plant system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.105, p.149-  
1181 158, 2011.

1182 YOON, Y.-J.; MOBIN, M.; HAHN, E.-J.; PAEK, K.-Y. Impact of in vitro CO<sub>2</sub>  
1183 enrichment and sugar deprivation on acclimatory responses of *Phalaenopsis* plantlets to  
1184 *ex vitro* conditions. **Environmental and Experimental Botany**, v.65, p.183-188, 2009.

1185 YUNUS, M.F.; AZIZ, M.A.; KADIR, M.A.; RASHID, A.A. In vitro propagation of  
1186 *Etilingera elatior* (Jack) (torch ginger). **Scientia Horticulturae**, v.135, p.145-150, 2012.

1187 ZOBAYED, S. Aeration in plant tissue culture. In: DUTTA GUPTA, S.; IBARAKI, Y.  
1188 (Ed.). **Plant tissue culture engineering**. Dordrecht: Springer, 2006. p.313-327.

1189 ZOBAYED, S.M.A.; AFREEN-ZOBAYED, F.; KUBOTA, C.; KOZAI, T. Mass  
1190 propagation of *Eucalyptus camaldulensis* in a scaled-up vessel under *in vitro*  
1191 photoautotrophic condition. **Annals of Botany**, v.85, p.587-592, 2000.

1192 ZOBAYED, S.M.A.; AFREEN, F.; KOZAI, T. Physiology of *Eucalyptus* plantlets  
1193 grown photoautotrophically in a scaled-up vessel. **In Vitro Cellular & Developmental**  
1194 **Biology - Plant**, v.37, p.807-813, 2001a.

1195 ZOBAYED, S.M.A.; ARMSTRONG, J.; ARMSTRONG, W. Evaluation of a closed  
1196 system, diffusive and humidity-induced convective throughflow ventilation on the  
1197 growth and physiology of cauliflower *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**,  
1198 v.59, p.113-123, 1999.

1199 ZOBAYED, S.M.A.; ARMSTRONG, J.; ARMSTRONG, W. Leaf anatomy of in vitro  
1200 tobacco and cauliflower plantlets as affected by different types of ventilation. **Plant**  
1201 **Science**, v.161, p.537-548, 2001b.

1202

1203

## CAPÍTULO II

1204 **Embriogênese somática de antúrio [*Anthurium andraeanum* (Linden ex André) cv.**  
1205 **Eidibel] (Araceae): caracterização histoquímica e estrutural**

1206

1207 **Resumo** - A caracterização das alterações cito-histológicas ocorrentes em explantes  
1208 cultivados *in vitro* tem permitido o melhor entendimento e elucidação da aquisição de  
1209 competência e indução de eventos morfogênicos *in vitro*. Todavia, para *Anthurium*  
1210 (antúrio) essa informação ainda é inexistente na literatura. Desta forma, objetivou-se a  
1211 caracterização estrutural e histoquímica da origem e padrão de divisão celular durante a  
1212 indução da embriogênese somática indireta em antúrio. Como explantes, utilizaram-se  
1213 segmentos nodais cultivados em meio Pierik, com 10  $\mu\text{M}$  de ANA, 100  $\text{mg L}^{-1}$  de mio-  
1214 inositol, 2% de sacarose e solidificado com 6,5  $\text{g L}^{-1}$  de ágar Merck. As culturas foram  
1215 mantidas em sala de crescimento à temperatura de  $25 \pm 2$  °C, por 90 dias no escuro. A  
1216 embriogênese somática ocorreu a partir de células do meristema axilar. Aos 15 dias de  
1217 cultivo, observaram-se início da divisão celular. Aos 30 dias observaram-se divisões  
1218 celulares no sentido periclinal da protoderme e periclinais e anticlinais do meristema  
1219 axilar. A partir dos 40 dias também foi possível observar divisões celulares periclinais e  
1220 anticlinais no meristema axilar, e formação do procâmbio nos calos embriogênicos. Aos  
1221 55 dias foi visualizada a formação de embriões somáticos, com protoderme bem  
1222 delimitada e calos embriogênicos com presença de procâmbio. Aos 90 dias, foram  
1223 evidenciados embriões somáticos com estrutura completamente definida (protoderme e  
1224 procâmbio). Os testes histoquímicos indicaram presença de grãos de amido  
1225 (amiloplastos) no meristema axilar apenas quando iniciaram as divisões celulares no  
1226 meristema axilar. Nos calos embriogênicos observaram-se proteínas e grãos de amido.  
1227 Esses resultados revelaram a origem e as mudanças que ocorrem durante as diferentes  
1228 etapas da indução de embriogênese somática em antúrio.

1229

1230 **Palavras-chave:** Morfogênese, anatomia vegetal, histoquímica, ultraestrutura,  
1231 mobilização de reservas

1232

1233 **Somatic embryogenesis of anthurium [*Anthurium andraeanum* (Linden ex André)**  
1234 **cv. Eidibel] (Araceae): histochemical and structural characterization**

1235

1236 **Abstract** – Characterization of cytohistological changes occurring in explants cultured  
1237 *in vitro* has been elucidated the acquisition of competence and the induction of  
1238 morphogenic events *in vitro*. However, for anthurium this information is still lacking in  
1239 the literature. Therefore, it was aimed the structural and histochemical characterization  
1240 of the origin and pattern of cell division during induction of indirect somatic  
1241 embryogenesis in anthurium. Nodal segments were used as explants and cultured on  
1242 Pierik medium with 10  $\mu\text{M}$  NAA, 100  $\text{mg L}^{-1}$  myo-inositol, 2% of sucrose and  
1243 solidified with 6.5  $\text{g L}^{-1}$  agar Merck<sup>TM</sup>. Cultures were maintained in growth room at 25  
1244  $\pm 2$  °C for 90 days in the dark. Somatic embryogenesis occurred from cells of the  
1245 axillary meristem. After 15 days of culture, was observed the beginning of cell division.  
1246 At 30 days, were observed cell divisions in the periclinal direction in protoderm and in  
1247 periclinal and anticlinal direction in axillary meristem. From 40 days, was also observed  
1248 periclinal and anticlinal cell divisions in axillary meristem, and procambium formation  
1249 in embryogenic callus. At 55 days, the formation of somatic embryos with well-defined  
1250 protoderm and embryogenic callus with the presence of procambium were observed. At  
1251 90 days, somatic embryos with completely defined structure (protoderm and  
1252 procambium) were detected. The histochemical tests indicated the presence of starch  
1253 grains (amyloplasts) in the axillary meristem only when cell divisions started in there.  
1254 In embryogenic callus there were proteins and starch grains. These results show the  
1255 origin and the changes that occur during different stages of somatic embryogenesis  
1256 induction in anthurium.

1257

1258 **Keywords:** Morphogenesis, plant anatomy, histochemistry, ultrastructure, reserve  
1259 mobilization

1260

## 1261 INTRODUÇÃO

1262

1263 O gênero *Anthurium* Schott. é formado por espécies monocotiledôneas e  
1264 pertencentes à família Araceae. As plantas são herbáceas tropicais, epífitas ou  
1265 hemiepífitas e nativas de regiões quentes da América Tropical, destacando-se pela  
1266 beleza de suas folhagens (Castro et al., 2004; Tombolato et al., 2004; Nhut et al., 2006;  
1267 Liendo & Mogollón, 2009; Maira et al., 2010). A maioria das 600 espécies do gênero  
1268 *Anthurium* é ornamental e, dentre essas, cerca de 130 são encontradas no Brasil (Castro  
1269 et al., 2004; Tombolato et al., 2004; Pinheiro et al., 2014). As principais espécies  
1270 cultivadas pelo elevado valor das hastes florais são o *A. andraeanum* e o *A.*  
1271 *scherzerianum* (Martin et al., 2003), sendo importante fonte de renda em diversos  
1272 países.

1273 O *A. andraeanum* sobrepuja as demais espécies do seu gênero pela preferência  
1274 do público devido ao tamanho e colorido das inflorescências e pela durabilidade pós-  
1275 colheita (em média de 20 a 30 dias, podendo alcançar 40 dias), tornando-se uma das  
1276 espécies desse gênero mais cultivadas como flor de corte e plantas de vaso (Castro et  
1277 al., 2004; Junqueira & Peetz, 2008; Assis et al., 2011).

1278 O *A. andraeanum* cv. Eidibel destaca-se por ser uma planta vigorosa, de porte  
1279 médio, crescimento rápido, com espata cordiforme de tamanho médio, com textura  
1280 grossa e boa enervação, de coloração vermelho forte e espádice branca (Tombolato et  
1281 al., 2004). Essas características possibilitaram que a cultivar Eidibel se tornasse a mais  
1282 cultivada em todo o Brasil (Tombolato et al., 2004; Junqueira & Peetz, 2008).

1283 Grande parte das mudas de antúrio disponíveis no mercado é produzida por  
1284 técnicas de cultura de tecidos (Maira et al., 2010). O antúrio tem sido propagado,  
1285 principalmente por organogênese indireta a partir de segmentos foliares (Pierik et al.,  
1286 1974; Pierik, 1975; Tombolato & Quirino, 1996; Nhut et al., 2006; Atak & Çelik, 2009;  
1287 Liendo & Mogollón, 2009). A embriogênese somática de *Anthurium* foi descrita a partir  
1288 da década de 90, em explantes de folha (Kuehnle et al., 1992; Weijie et al., 2006;  
1289 Duquenne et al., 2007; Bautista et al., 2008; Beyramizade et al., 2008; Pinheiro et al.,  
1290 2014), pecíolo, raiz, segmento nodal e internodal (Fitch et al., 2011; Pinheiro et al.,  
1291 2014). O segmento nodal é o explante indicado para a indução de embriogênese  
1292 somática em *A. andraeanum* cv. Eidibel (Pinheiro et al., 2014).

1293 A embriogênese somática é uma técnica por meio da qual uma única célula  
1294 vegetal ou grupo de células de tecidos dá origem ao embrião somático, uma estrutura

1295 bipolar organizada, sem conexões com o tecido materno, sendo morfológicamente  
1296 semelhante ao embrião zigótico (Gaj, 2004; Ma et al., 2012; Alcantara et al., 2014).  
1297 Além de ser uma ferramenta bastante útil em sistemas de propagação *in vitro*, a  
1298 embriogênese somática apresenta grandes vantagens para o desenvolvimento de  
1299 diferentes pesquisas em plantas (Ninković et al., 2010), como: produção de sementes  
1300 sintéticas; conservação de germoplasma por criopreservação; manipulação genética,  
1301 pelo desenvolvimento de plantas transgênicas, entre outras (Quiroz-Figueroa et al.,  
1302 2006; Bakhshaie et al., 2010; Capelo et al., 2010; Khan et al., 2010; Ming-Hua & Sen-  
1303 Rong, 2010; Parimalan et al., 2010; Sen-Rong & Ming-Hua, 2012). A produção de  
1304 plantas pela técnica da embriogênese somática é aplicada com sucesso na regeneração  
1305 de muitas espécies (Yang et al., 2010), devido ao eficiente sistema de produção de  
1306 plantas em larga escala (Pinto et al., 2011; Rocha et al., 2012). Além disso, a  
1307 embriogênese somática é um sistema ideal para estudo das características morfológicas,  
1308 fisiológicas, moleculares e bioquímicas envolvidas durante a diferenciação celular  
1309 (Zakizadeh et al., 2010; You et al., 2011; Rocha et al., 2012).

1310 A descrição das alterações celulares que ocorrem durante a embriogênese  
1311 somática pode levar a conhecimentos relevantes, gerando importante base para os  
1312 estudos citados anteriormente. Existe a necessidade de confirmar a morfologia das  
1313 células a fim de distinguir as células competentes daquelas que falharam durante a  
1314 resposta embriogênica (Jalil et al., 2008). Estudos anatômicos e ultraestruturais têm  
1315 contribuído para a compreensão dos mecanismos básicos envolvidos na aquisição de  
1316 competência embriogênica e no progresso das fases específicas da embriogênese  
1317 somática (Jalil et al., 2008; Maciel et al., 2010; Rocha et al., 2012). Já os testes  
1318 histoquímicos têm permitido observar a mobilização das reservas durante a  
1319 embriogênese somática (Rocha et al., 2012).

1320 Estudos histológicos têm sido utilizados para descrever a transição de células  
1321 somáticas em embriogênicas de muitas espécies, como *Camellia japonica* (Barciela &  
1322 Vieitez, 1993), *Carica papaya* (Fernando et al., 2001), *Glycine Max* (Fernando et al.,  
1323 2002), *Vitis vinifera* (Jayasankar et al., 2003), *Cocos nucifera* (Sáenz et al., 2006),  
1324 *Phoenix dactylifera* (Sané et al., 2006), *Capsicum chinense* (Santana-Buzzy et al.,  
1325 2009), *Acrocomia aculeata* (Moura et al., 2008; Moura et al., 2010), *Musa* spp. (Jalil et  
1326 al., 2008; Xu et al., 2011), *Passiflora cincinnata* (Rocha et al., 2012), entre outras.

1327 As características estruturais da indução de embriogênese somática de *A.*  
1328 *andraeanum* e suas características ainda são escassas, especialmente as que se referem a



1329 aspectos anatômicos, histoquímicos e ultraestruturais. Esses conhecimentos fornecerão  
1330 informações relevantes do processo de diferenciação celular e formação dos embriões  
1331 somáticos de *Anthurium*

1332 Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliara origem e o padrão de  
1333 divisão celular durante a indução da embriogênese somática indireta a partir de  
1334 segmentos nodais de *A. andraeanum* cv. Eidibel, para determinar as alterações  
1335 estruturais e o acúmulo de reservas envolvidos durante a ontogênese dos calos  
1336 embriogênicos.

1337

1338 **MATERIAL E MÉTODOS**

1339

1340 *Material vegetal e condições de cultivo*

1341 Como material vegetal, utilizaram-se segmentos nodais de plantas de *A.*  
1342 *andraeanum* cv. Eidibel previamente estabelecidas *in vitro* a partir da organogênese  
1343 indireta de folhas tenras e jovens, seguindo a metodologia proposta por Tombolato et al.  
1344 (1998), sendo cedidas pelo IAC (Instituto Agrônomo), em Campinas.

1345 Após o estabelecimento *in vitro* da cultura, as plantas foram subcultivadas a cada  
1346 30 dias, em meio contendo macro, micronutrientes e vitaminas Pierik (Pierik, 1976),  
1347 acrescido de 4,44  $\mu\text{M}$  de 6-benziladenina (BA), 0,54  $\mu\text{M}$  de ácido  $\alpha$ -naftalenoacético  
1348 (ANA), 2% de sacarose, 100  $\text{mg L}^{-1}$  de mio-inositol e solidificado com 6,5  $\text{g L}^{-1}$  de ágar  
1349 Merck<sup>®</sup> (Darmstadt, Alemanha). O pH foi ajustado para 5,8, anteriormente à  
1350 autoclavagem a 121 °C e 1,5 atm por 15 minutos. O material vegetal foi mantido em  
1351 sala de crescimento, com temperatura de  $25 \pm 2^\circ \text{C}$  e irradiância de  $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

1352

1353 *Indução de embriogênese somática*

1354 Seguindo a metodologia proposta por Pinheiro et al. (2014) para a indução de  
1355 embriogênese somática em *A. andraeanum* cv. Eidibel, segmentos nodais com  
1356 aproximadamente 1,0 cm de comprimento contendo uma gema (meristema axilar)  
1357 (Figura 1A), foram inoculados, sob condições assépticas, em placas de Petri de 90 x 15  
1358 mm (J. Prolab, Curitiba, Brazil) contendo 25 mL de meio Pierik acrescido de 10  $\mu\text{M}$  de  
1359 ANA, 2% de sacarose, 100  $\text{mg L}^{-1}$  de mio-inositol e solidificado com 6,5  $\text{g L}^{-1}$  de ágar  
1360 Merck<sup>®</sup> (Darmstadt, Alemanha) e o pH ajustado para 5,8, e autoclavado a 121 °C e 1,5  
1361 atm por 15 minutos. Em cada placa de Petri foram inoculados nove segmentos nodais  
1362 dispostos horizontalmente na superfície do meio. As culturas foram mantidas no escuro  
1363 em sala de crescimento, à temperatura de  $25 \pm 2^\circ \text{C}$ , por 90 dias.

1364 Os registros fotográficos de segmentos nodais e calos embriogênicos foram  
1365 obtidos em microscópio estereoscópio (modelo Olympus SZX) com sistema de captura  
1366 de imagens acoplado (modelo Olympus E-330).

1367

1368 *Preparo das amostras para análises histológicas*

1369 Para os estudos anatômicos e ultraestruturais da embriogênese somática em *A.*  
1370 *andraeanum*, explantes de segmentos nodais foram coletados a cada cinco dias após a  
1371 inoculação em meio de indução da embriogênese somática. As amostras foram fixadas

1372 em solução de Karnovsky modificado (glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 2,5% em  
1373 tampão cacodilato 0,05 M, pH 7,2) (Karnovsky, 1965).

1374

#### 1375 *Microscopia de luz*

1376 Para os estudos anatômicos e histoquímicos amostras fixadas aos 0, 5, 10, 15,  
1377 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 55 e 90 dias (três amostras por data) foram desidratadas em  
1378 série etílica crescente e incluídas em metacrilato (Historesin, Leica Instruments,  
1379 Heidelberg, Alemanha). Para montagem das lâminas, cortes longitudinais de 5 µm  
1380 foram obtidos em micrótomo rotativo de avanço automático (RM2255, Leica  
1381 Microsystems Inc., Deerfield, EUA). Para a caracterização estrutural, as amostras foram  
1382 mantidas por 10 minutos e coradas com azul de toluidina pH 4,4 (O'brien & Mccully,  
1383 1981). Para a caracterização histoquímica, os cortes longitudinais das amostras fixadas  
1384 foram submetidos ao sudan black B, para evidenciar a presença de lipídios; ao ácido  
1385 periódico/reagente de Schiff (PAS), para caracterizar a presença de amido, mucilagens e  
1386 polissacarídeos (Feder & O'brien, 1968); lugol, para evidenciar amido; xylydine  
1387 Ponceau (XP), para detecção de proteínas totais (Vidal, 1977); e vermelho de rutênio  
1388 para comprovar a presença de substâncias pécticas (Rawlins & Takahashi, 1952). A  
1389 captura de imagens foi realizada utilizando fotomicroscópio (AX70TRF, Olympus  
1390 Optical, Tóquio, Japão) equipado com o sistema U-Photo.

1391

#### 1392 *Microscopia eletrônica de varredura*

1393 As amostras, fixadas aos 0, 15, 30,55 e 90 dias (três amostras por data) após  
1394 indução da embriogênese somática, foram desidratadas em série de concentração  
1395 crescente de acetona. Os fragmentos foram secos ao ponto crítico, utilizando-se CO<sub>2</sub>  
1396 (CPD 030, Bal-Tec, Balzers, Alemanha) e, posteriormente, metalizadas com ouro (FDU  
1397 010 Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein). As observações e a documentação fotográfica  
1398 foram conduzidas utilizando o microscópio eletrônico de varredura (Leo 1430 VP,  
1399 Zeiss, Cambridge, Reino Unido), e todas as imagens foram processadas digitalmente.

1400

#### 1401 *Microscopia eletrônica de transmissão*

1402 Para análise ultraestrutural, três amostras de calos embriogênicos, fixadas aos 90  
1403 dias após indução da embriogênese somática, foram pós-fixadas com tetróxido de ósmio  
1404 1% em tampão fosfato 0,05 M, desidratadas em série de concentração crescente de  
1405 acetona, infiltradas e polimerizadas em resina epóxi (Spurr, 1969). Secções ultrafinas de

1406 70 nm de espessura foram obtidas em ultramicrotomo (Leica UC6, Leica  
1407 MicrosystemsInc., USA) e contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo  
1408 (Reynolds, 1963). As observações e a documentação fotográfica foram conduzidas em  
1409 microscópio eletrônico de transmissão (EM900, Zeiss, Germany) em 50 kV, e as  
1410 amostras processadas digitalmente.  
1411

1412 **RESULTADOS**

1413

1414 *Alterações morfohistológicas dos segmentos nodais durante a indução de embriogênese*  
1415 *somática*

1416 A embriogênese somática em *A. andraeanum* ocorreu no meristema axilar,  
1417 permanecendo intacta a epiderme dos segmentos nodais. Foi possível observar que a  
1418 indução da embriogênese somática é assincrônica, pois observou-se o início de  
1419 diferenciação celular do meristema axilar nos diferentes tempos de cultivo.

1420 O segmento nodal possui uma bainha que reveste o meristema axilar (Figura 1A;  
1421 1B). Em secção longitudinal, no tempo zero foi possível observar que o segmento nodal  
1422 possui meristema axilar e sistema vascular (Figura 1C). Sendo o mesmo observado aos  
1423 5 dias de cultivo (dados não mostrados).

1424 Aos 15 dias, em meio de indução de embriogênese somática, o meristema axilar  
1425 apresentou intumescimento (Figura 1D). Nesse estágio, foi observado início da divisão  
1426 celular (Figura 1E). O mesmo foi observado aos 10 e 20 dias (dados não mostrados).

1427 Aos 30 dias, observaram-se divisões celulares no sentido periclinal da  
1428 protoderme e periclinais e anticlinais do meristema axilar, caracterizando o início da  
1429 formação das protuberâncias ou massas embriogênicas (Figura 1F). Essas características  
1430 também foram observadas aos 25 e 35 dias (dados não mostrados).

1431 A partir dos 30 dias de cultivo, grupos de células com citoplasma denso, núcleos  
1432 grandes e nucléolos proeminentes, características de células embriogênicas foram  
1433 observadas, tanto em células em divisão quanto em calos embriogênicos.

1434 Aos 40-45 dias também foi possível observar divisões celulares periclinais e  
1435 anticlinais no meristema axilar. No entanto, com a formação inicial de procâmbio no  
1436 interior da massa embriogênica, proveniente das células em diferenciação e ráfides, que  
1437 são inerentes à espécie (Figura 1G). Nessa etapa, os calos embriogênicos tornaram-se  
1438 visíveis, após rompimento da epiderme do segmento nodal.

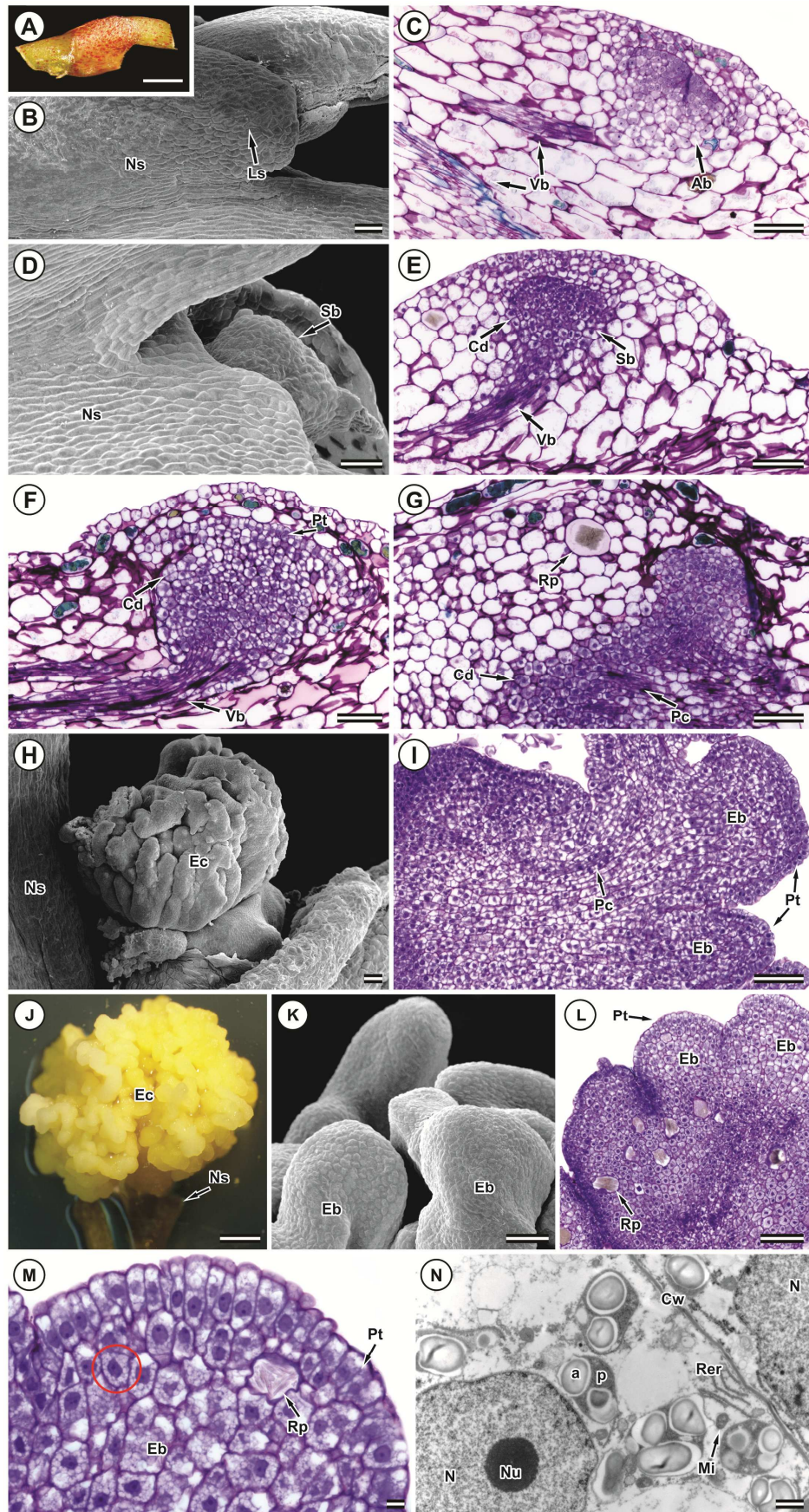
1439 Aos 50-55 dias foi possível observar a formação de calos embriogênicos  
1440 friáveis, a partir da diferenciação das células meristemáticas (Figura 1H). Foi  
1441 visualizada a formação de embriões somáticos, com protoderme bem delimitada e calos  
1442 embriogênicos com presença de procâmbio (Figura 1I).

1443 Aos 90 dias de indução de embriogênese somática, ocorreram novas divisões  
1444 celulares e aumento do tamanho dos calos embriogênicos de coloração amarela (Figura  
1445 1J), sendo evidenciados embriões somáticos (Figura 1K), com delimitação da

1446 protoderme e presença de ráfides, inerente à espécie (Figura 1L), além de citoplasma  
1447 denso, núcleos volumosos, nucléolo evidentes (Figura 1M), acúmulo de grãos de amido  
1448 nos plastídios (amiloplastos), retículo endoplasmático rugoso, parede celular e  
1449 mitocôndrias (Figura 1N).

1450

1451



1452 **Figura 1.** Indução de culturas embriogênicas em segmentos nodais de *Anthurium*  
 1453 *andraeanum* cv. Eidibel. caracterizada mediante microscopia de luz e eletrônica de

1454 varredura e de transmissão. **(A, B)** Segmento nodal antes do cultivo *in vitro* em meio  
1455 Pierik com 10  $\mu\text{M}$  de ANA [0 dias de cultivo *in vitro*]; **(C)** Explante inicial, segmento  
1456 nodal, evidenciando a presença de meristema axilar e tecido vascular [0 dias]; **(D)**  
1457 Segmento nodal com intumescimento do meristema axilar [15 dias]; **(E)** Intumescimento  
1458 do meristema axilar, evidenciando início das divisões celulares, com presença de tecido  
1459 vascular [15 dias]; **(F)** Divisões periclinais na formação da protoderme e divisões  
1460 celulares periclinais e anticlinais do meristema axilar, com tecido vascular evidente [30  
1461 dias]; **(G)** Aumento das divisões celulares e início da formação de procâmbio dos calos  
1462 embriogênicos [40 dias]; **(H)** Segmento nodal com formação de calos embriogênicos a  
1463 partir do meristema axilar [55 dias]; **(I)** Embriões globulares com protoderme bem  
1464 delimitada e procâmbio evidente [55 dias]; **(J)** Segmento nodal formando calos  
1465 embriogênico em meio Pierik com 10  $\mu\text{M}$  de ANA [90 dias]; **(K)** Zona embriogênica  
1466 [90 dias]; **(L)** Embriões globulares evidenciando protoderme e presença de ráfides [90  
1467 dias]; **(M)** Embrião globular com protoderme, núcleos maiores e nucléolos  
1468 proeminentes (círculo), citoplasma denso [90 dias]; **(N)** Embrião compreendendo  
1469 células com núcleo e nucléolo, citoplasma denso contendo mitocôndrias, retículo  
1470 endoplasmático, parede celular, plastídio e grãos de amido [90 dias]. a: amido; Ab:  
1471 meristema axilar; Cd: divisões celulares; Cw: parede celular; Eb: calo embriogênico;  
1472 Lm: bainha; Mi: mitocôndria; Ns: segmento nodal; Sb: gema intumescida; p: plastídio;  
1473 Pc: procâmbio; Pt: protoderme; Rer: retículo endoplasmático rugoso; Rp: ráfide; N:  
1474 núcleo; Nu: nucléolo; Vb sistema vascular. Barras: A; J: 1000  $\mu\text{m}$ ; B-I: 100  $\mu\text{m}$ ; K; L:  
1475 100  $\mu\text{m}$ ; M: 10  $\mu\text{m}$ ; N: 1  $\mu\text{m}$ .

1476

1477

#### 1478 *Caracterização histoquímica da indução de embriogênese somática*

1479 Testes histoquímicos indicaram a presença de compostos de reserva nas células  
1480 do segmento nodal, nas células em diferenciação do meristema axilar e em calos  
1481 embriogênicos. Em todo o período analisado não houve intensificação dos reagentes  
1482 sudan black B, para corpos lipídicos (Figura 2F-J), e vermelho de rutênio, para pectatos  
1483 (Figura 3A-E), tanto no meristema axilar quanto nos calos embriogênicos.

1484 No tempo zero, antes da inoculação do explante em meio de indução de  
1485 embriogênese somática, foi possível identificar a presença de grãos de amido nas  
1486 células do tecido parenquimático do segmento nodal. No entanto, não foram observados  
1487 grãos de amido nas células do meristema axilar, confirmados pela reação negativa pelos



1488 testes de lugol e PAS (Figura 2A; 3F, respectivamente). Não foi evidenciada a presença  
1489 de proteínas totais pela reação negativa ao XP (Figura 2K).

1490 O surgimento de grãos de amido no meristema axilar em divisão foi gradual,  
1491 aumentando em quantidade e em tamanho durante todo o processo. Aos 15 dias em  
1492 meio de indução de embriogênese somática foram identificadas células do tecido  
1493 parenquimático com presença de grãos de amido e células em divisão do meristema  
1494 axilar com pequenos grãos de amido, evidenciados pelo teste de lugol e com PAS,  
1495 confirmando a reação positiva (Figura 2B; 3G, respectivamente), e ausência de  
1496 proteínas totais (Figura 2L).

1497 Aos 30 dias, também foi possível observar a presença de grãos de amido nas  
1498 células do tecido parenquimático do segmento nodal e pequenos grãos de amido no  
1499 meristema axilar em divisão celular, evidenciado pela reação positiva do lugol e PAS  
1500 (Figura 2C; 3H, respectivamente). Não foi detectada a presença proteínas totais (Figura  
1501 2M).

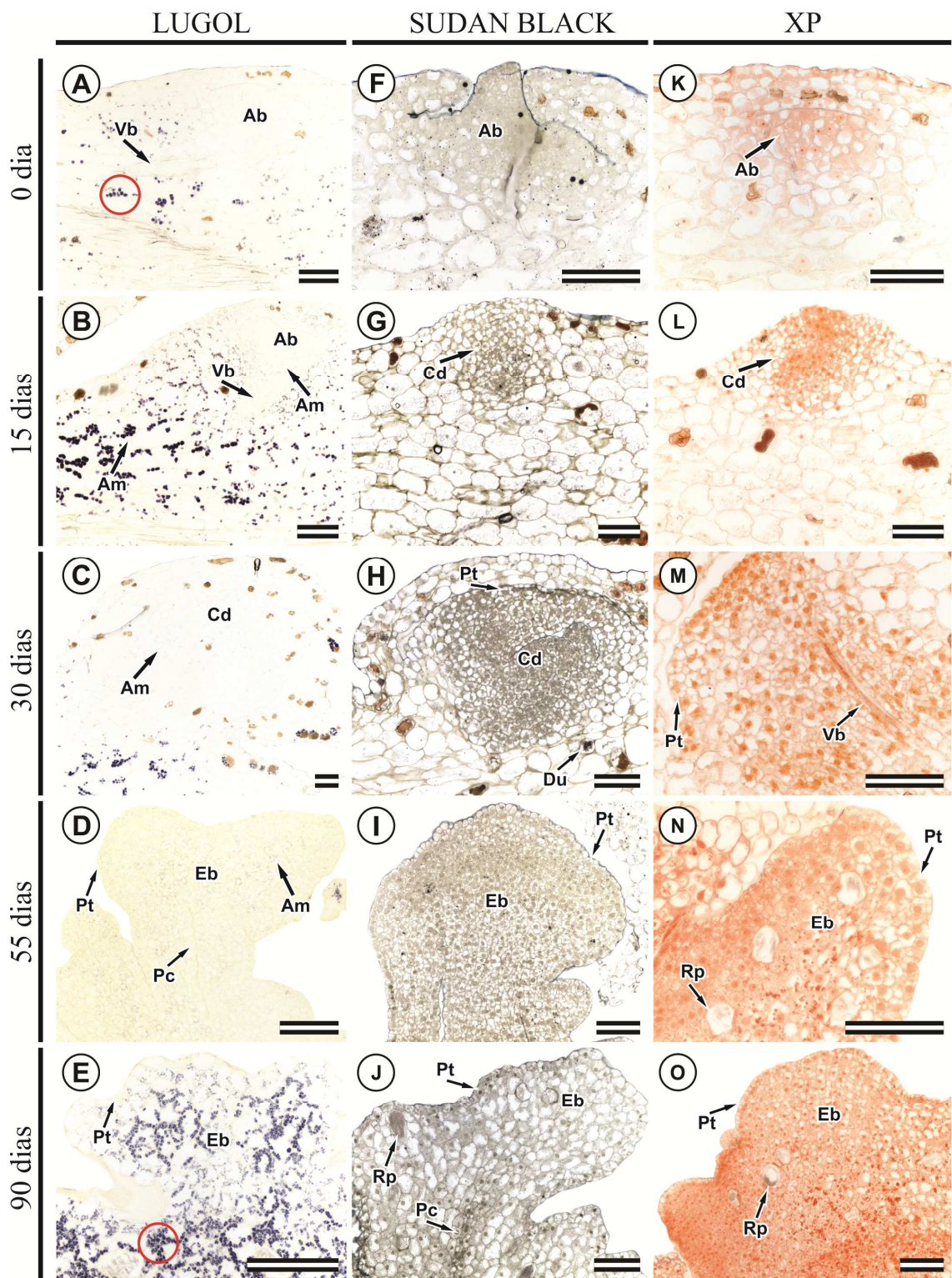
1502 Aos 55 dias, foi observada a presença de pequenos grãos de amido em elevada  
1503 quantidade, nas células dos calos embriogênicos, confirmada pelos testes de lugol e PAS  
1504 (Figura 2D; 3I, respectivamente). Constatou-se também reação positiva para proteínas  
1505 totais nas células embriogênicas, em que as pequenas inclusões foram coradas com XP  
1506 (Figura 2N).

1507 Aos 90 dias, foram identificados grãos de amido de maior tamanho e em elevada  
1508 quantidade nas células dos calos embriogênicos, quando comparados com os demais  
1509 períodos de cultivo *in vitro* (Figura 2E; 3J, respectivamente). Neste período, proteínas  
1510 totais foram evidenciadas na porção mais interna do calo embriogênico, quando corados  
1511 com XP (Figura 2O).

1512 Nos calos embriogênicos, foram observados, como materiais de reserva grãos de  
1513 amido e proteínas totais, porém não foram identificados corpos lipídicos. A quantidade  
1514 de grãos de amido foi aumentando gradativamente durante a indução de embriogênese  
1515 somática, sendo iniciada durante as divisões celulares que ocorreram no meristema  
1516 axilar no 15<sup>o</sup> dia. As proteínas totais foram identificadas apenas na fase de calo  
1517 embriogênico, sendo gradativamente intensificadas aos 55 e 90 dias.

1518

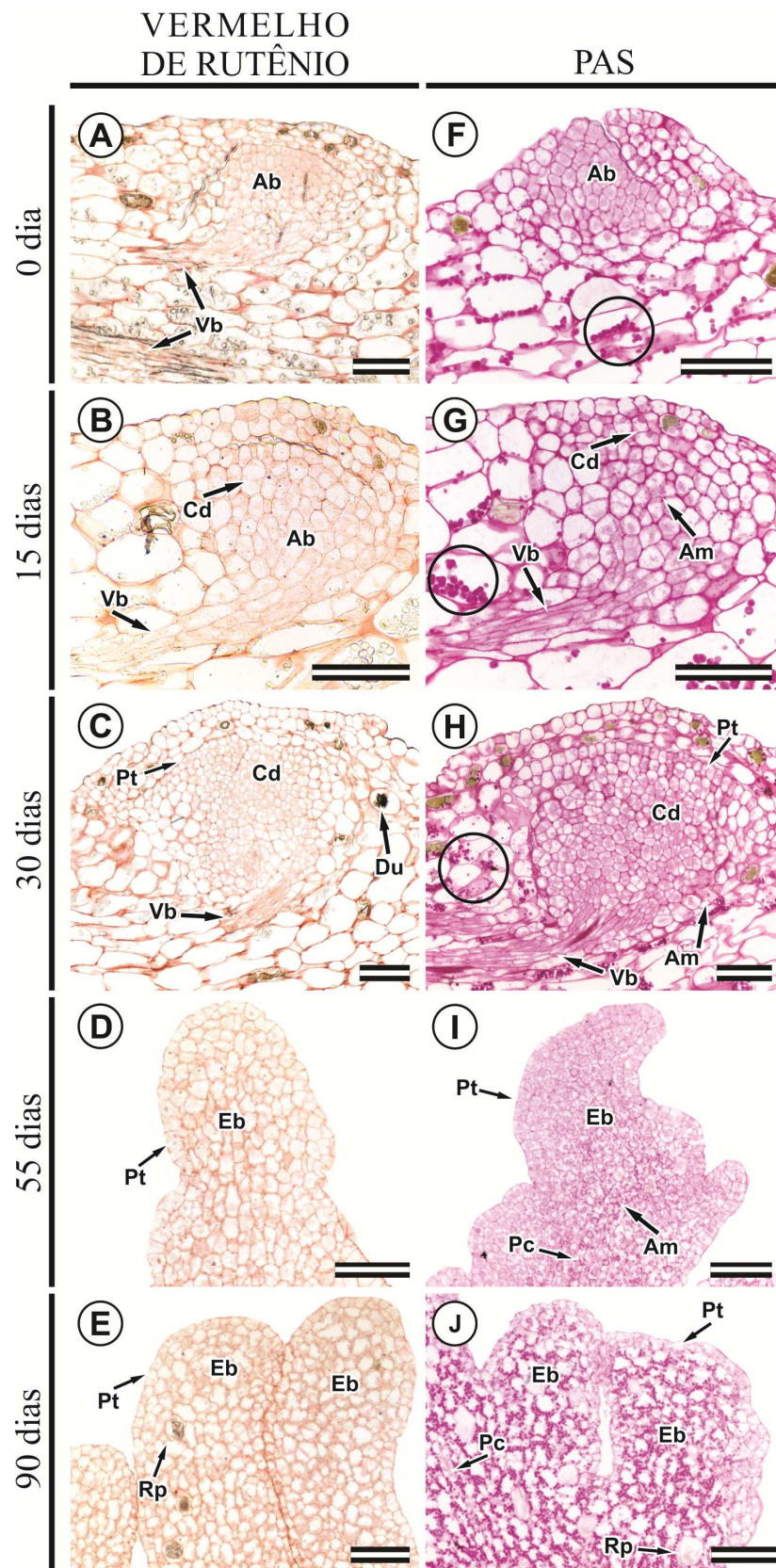
1519



1520 **Figura 2.** Estudo histoquímico durante a indução de culturas embriogênicas em  
1521 segmentos nodais de *Anthurium andraeanum* cv. Eidibel, analisados nos tempos 0 (**A**;  
1522 **F**; **K**), 15 (**B**; **G**; **L**), 30 (**C**; **H**; **M**), 55 (**D**; **I**; **N**) e 90 dias (**E**; **J**; **O**). Seções  
1523 longitudinais submetidas ao lugol (**A**; **B**; **C**; **D**; **E**), sudan black B, (**F**; **G**; **H**; **I**; **J**) e  
1524 xylidine Ponceau - XP (**K**; **L**; **M**; **N**; **O**). (**A**) Reação positiva para células do tecido  
1525 parenquimático do segmento nodal (circulo) e negativa para amido no meristema axilar;

1526 **(B-C)** Reação positiva para amido no meristema axilar; **(D-E)** Reação positiva para  
1527 amido nos calos embriogênicos; **(K; L; M)** Reação negativa para proteínas totais; **(N;**  
1528 **O)** Reação positiva para proteínas totais corados de vermelho. Ab: meristema axilar;  
1529 Am: grãos de amido; Eb: calo embriogênico; Cd: divisões celulares; Du: drusa; Pc:  
1530 procâmbio; Pt: protoderme; Rp: ráfide; Vb sistema vascular. Barras 100 µm.  
1531  
1532





1533 **Figura 3.** Estudo histoquímico durante a indução de culturas embriogênicas em  
 1534 segmentos nodais de *Anthurium andraeanum* cv. Eidibel, analisados nos tempos 0 (**A;**  
 1535 **F**), 15 (**B; G**), 30 (**C; H**), 55 (**D; I**) e 90 dias (**E; J**). Secções longitudinais submetidas

1536 ao vermelho de rutênio, com reação negativa para pectinas (**A. B. C. D. E**) e ao ácido  
1537 periódico/reagente de Schiff - PAS (**F, G, H, I. J**). (**F**) Reação positiva para grãos de  
1538 amido nas células do tecido parenquimático (círculo) e negativa no meristema axilar;  
1539 (**G-H**) Reação positiva para grãos de amido nas células do tecido parenquimático  
1540 (círculo) e no meristema axilar, corados ao teste com PAS; (**I-J**) reação positiva para  
1541 amido nos calos embriogênicos, corados ao teste com PAS. Ab: gema axilar; Am: grãos  
1542 de amido; Eb: calo embriogênico; Cd: divisões celulares; Du: drusa; Pc: procâmbio; Pt:  
1543 protoderme; Rp: ráfide; Vb sistema vascular. Barras 100 µm.  
1544

1545 **DISCUSSÃO**

1546

1547 *Alterações estruturais da indução da embriogênese somática*

1548 Em *A. andraeanum* cv. Eidibel, a utilização do meio Pierik com 10 µM de ANA  
1549 promoveu a indução de embriogênese somática em segmentos nodais (Pinheiro et al.,  
1550 2014) com a possibilidade de maturação dos embriões somáticos (Pinheiro et al., 2013).  
1551 No entanto, até o momento, a análise ontogênica da indução de embriogênese somática  
1552 ainda não havia sido descrita, especialmente no que se refere a aspectos estruturais e  
1553 ultraestruturais.

1554 No presente trabalho foi observado que a indução de embriogênese somática em  
1555 *A. andraeanum* é assincrônica, pois em todos os tempos de cultivo foi possível observar  
1556 o início de diferenciação do meristema axilar para a formação de calos embriogênicos.  
1557 O mesmo foi observado durante o estudo ontogênico da embriogênese somática de  
1558 *Euterpe oleracea*, a partir de embriões zigóticos, sendo observado a diferenciação de  
1559 embriões somáticos em diferentes estágios de maturação, além da formação de  
1560 embriogênese somática secundária (Scherwinski-Pereira et al., 2012). Demonstrando  
1561 que as células podem adquirir competência em diferentes tempos de exposição dos  
1562 tecidos ao meio de cultura acrescido de reguladores de crescimento, adquirindo  
1563 atividade meristemática. Quando as células adquirem essa atividade, são chamados de  
1564 células competentes (Rocha et al., 2012).

1565 A análise ontogênica indicou que o potencial embriogênico do segmento nodal  
1566 ocorreu no meristema axilar do segmento nodal, quando esse sofreu divisões celulares.  
1567 Com a sequência de eventos foi possível observar a formação de calos embriogênicos  
1568 provenientes do meristema axilar. Essa formação tornou-se visível a partir dos 40 dias  
1569 de cultivo, quando ocorreu rompimento da epiderme do explante inicial. Em embriões  
1570 zigóticos de *Trifolium nigrescens*, a proliferação extensiva de células ocorreu dentro do  
1571 explante inicial, resultando em intumescimento na periferia, seguido de ruptura da  
1572 epiderme e proliferação dos calos embriogênicos para a região externa do explante  
1573 (Konieczny et al., 2012).

1574 A embriogênese somática é um processo no qual uma única célula vegetal ou um  
1575 grupo de células dá origem ao embrião somático (Konieczny et al., 2012). Assim como  
1576 no presente trabalho, em *E. oleracea* foi observada a formação multicelular, com células  
1577 dispostas, evoluindo para calos embriogênicos e posterior formação de embriões  
1578 somáticos (Scherwinski-Pereira et al., 2012). Isso ocorreu devido à diferenciação das

1579 células dos calos embriogênicos e a sua rediferenciação em grupos de células, indicando  
1580 padrão multicelular na origem dos embriões somáticos (Rocha et al., 2012).

1581

### 1582 *Mobilização de reservas da embriogênese somática*

1583 A natureza dos compostos de reservas é basicamente carboidratos, lipídios e  
1584 proteínas, sendo espécie específica. Como fontes iniciais, em dicotiledôneas são  
1585 encontrados principalmente lipídios e proteínas, já em monocotiledôneas, carboidratos e  
1586 proteínas (Bewley & Black, 1994; Rocha et al., 2012). O que corrobora com os  
1587 resultados no presente trabalho, nos calos embriogênicos foram encontrados  
1588 amiloplastos e proteínas, características de monocotiledôneas.

1589 O amido no interior celular tem a capacidade de fornecer energia para as células  
1590 em divisão e posterior formação de calos embriogênicos (Barciela & Vieitez, 1993). No  
1591 presente estudo, foram constatados amiloplastos com grãos de amido maiores nas  
1592 células do tecido parenquimático próximas ao meristema axilar, e à medida que  
1593 ocorreram divisões celulares, foram observados pequenos grãos de amido no interior  
1594 das células em divisão. Barciela e Vieitez (1993) relataram também que em células  
1595 embriogênicas ocorre acúmulo de amido, no entanto, em grãos menores, quando  
1596 comparado aos grãos de amido presentes no parênquima, comprovados pela intensidade  
1597 de reação do PAS. Em *E. oleracea* também foi observada a presença de grãos de amido  
1598 em células sem características embriogênicas localizadas próximas àquelas regiões onde  
1599 ocorriam divisões celulares (Scherwinski-Pereira et al., 2012). Em *A. aculeata*, o  
1600 armazenamento de grãos de amido também ocorreu principalmente nas células internas  
1601 do explante, próximas das regiões de intensa divisão celular (Moura et al., 2008). Os  
1602 calos embriogênicos possuíam amiloplastos, no entanto, não eram abundantes nem  
1603 distribuídos uniformemente por todas as células embriogênicas (Moura et al., 2010),  
1604 diferentemente do presente trabalho, no qual foram observados amiloplastos em grande  
1605 quantidade distribuídos por todas as células dos calos embriogênicos. O armazenamento  
1606 de amido em células embriogênicas ou em células adjacentes é um fenômeno que  
1607 normalmente indica a aquisição de competência à embriogênese somática (Moura et al.,  
1608 2008).

1609 Em *A. andraeanum* foi possível identificar a presença de proteínas totais apenas  
1610 nos calos embriogênicos, e ausência dessas estruturas durante as divisões celulares do  
1611 meristema axilar. A proporção de células com níveis significativos de proteínas  
1612 citoplasmática e nuclear pode ser aumentada durante a formação de células

1613 embriogênicas (Barciela & Vieitez, 1993). Em calos embriogênicos de *Musa*  
1614 *acuminata*, também foram observados, como reservas, grãos de amido e proteínas (Jalil  
1615 et al., 2008). Em *Elaeis guineensis*, corpos proteicos foram acumulados mais  
1616 precocemente e em quantidade reduzida durante o desenvolvimento do embrião  
1617 somático, quando comparado ao embrião zigótico (Morcillo et al., 1998).

1618 Sané et al. (2006) demonstraram que o acúmulo de grãos de amido e de  
1619 proteínas foi reduzindo nas fases mais tardias da embriogênese. O mesmo foi observado  
1620 em *P. cincinnata*, no qual os corpos proteicos foram rapidamente consumidos durante o  
1621 processo embriogênico (Rocha et al., 2012). No presente trabalho, durante a indução da  
1622 embriogênese somática, foram observados proteínas totais apenas em fase de calos  
1623 embriogênicos. Provavelmente também poderia ocorrer consumo durante as etapas  
1624 seguintes de maturação e germinação dos embriões somáticos.

1625 Os testes com sudan black B e vermelho de rutênio foram utilizados para  
1626 identificar corpos lipídicos e pectinas secretadas, respectivamente, durante a indução de  
1627 embriogênese somática de *A. andraeanum*. No entanto, não foram observados corpos  
1628 lipídicos nem pectinas nas células em divisão ou mesmo em calos embriogênicos de *A.*  
1629 *andraeanum*. Observou-se a reação com vermelho de rutênio apenas associada ao tecido  
1630 parenquimático dos segmentos nodais. Diferente do observado em *Musa* spp., no qual  
1631 foram observados pectinas secretadas na mucilagem, cobrindo os calos embriogênicos  
1632 bem como os embriões somáticos (Xu et al., 2011).

1633 As análises realizadas revelaram a origem e as mudanças que ocorrem durante as  
1634 diferentes etapas da indução de embriogênese somática em *A. andraeanum*, ampliando a  
1635 compreensão desse processo. Estes resultados fornecem contribuições importantes para  
1636 futuros estudos, como a identificação de genes marcadores da embriogênese somática,  
1637 indicando quais os tipos celulares que adquirem competência embriogênica em resposta  
1638 às condições de cultivo e quais os genes são expressos durante a embriogênese  
1639 somática.

1640

## 1641 **AGRADECIMENTOS**

1642

1643 Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível  
1644 Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos; e Fundação de Amparo à  
1645 Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro.



1646           Ao Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica na Pesquisa  
1647 Agropecuária (ESALQ/USP) e ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da  
1648 Universidade Federal de Viçosa (NMM/UFV), pelo auxílio no preparo das amostras e  
1649 uso dos microscópios.

1650

1651 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1652

1653 ALCANTARA, G.B.; DIBAX, R.; OLIVEIRA, R.A.; BESPALHOK FILHO, J.C.;  
1654 DAROS, E. Plant regeneration and histological study of the somatic embryogenesis of  
1655 sugarcane (*Saccharum* spp.) cultivars RB855156 and RB72454. **Acta Scientiarum.**  
1656 **Agronomy**, v.36, p.63-72, 2014.

1657 ASSIS, A.M.D.; UNEMOTO, L.K.; FARIA, R.T.D.; DESTRO, D.; TAKAHASHI,  
1658 L.S.A.; ROBERTO, S.R.; PRUDÊNCIO, S.H.; TOMBOLATO, A.F.C. Adaptation of  
1659 anthurium cultivars as cut flowers in a subtropical area. **Pesquisa Agropecuária**  
1660 **Brasileira**, v.46, p.161-166, 2011.

1661 ATAK, Ç.; ÇELIK, Ö. Micropropagation of *Anthurium andraeanum* from leaf explants.  
1662 **Pakistan Journal of Botany**, v.41, p.1155-1161, 2009.

1663 BAKHSHAIE, M.; BABALAR, M.; MIRMASOUMI, M.; KHALIGHI, A. Somatic  
1664 embryogenesis and plant regeneration of *Lilium ledebourii* (Baker) Boiss., an  
1665 endangered species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.102, p.229-235, 2010.

1666 BARCIELA, J.; VIEITEZ, A.M. Anatomical sequence and morphometric analysis  
1667 during somatic embryogenesis on cultured cotyledon explants of *Camellia japonica* L.  
1668 **Annals of Botany**, v.71, p.395-404, 1993.

1669 BAUTISTA, N.D.R.; PEÑALVER, D.A.; RODRÍGUEZ, R.B.; CHIU, W.C.; LÓPEZ,  
1670 R.C.; TERRY, F.J.; PERALTA, M.P.; MARTÍNEZ, O.G. Embriogénesis somática en  
1671 (*Anthurium andraeanum* Lind.) variedad 'Lambada'. **Revista de Sociedad, Cultura y**  
1672 **Desarrollo Sustentable**, v.4, p.135-149, 2008.

1673 BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination.**  
1674 London: Springe, 1994. 445p.

1675 BEYRAMIZADE, E.; AZADI, P.; MII, M. Optimization of factors affecting  
1676 organogenesis and somatic embryogenesis of *Anthurium andreanum* Lind. 'Tera'.  
1677 **Propagation of Ornamental Plants**, v.8, p.198-203, 2008.

1678 CAPELO, A.M.; SILVA, S.; BRITO, G.; SANTOS, C. Somatic embryogenesis  
1679 induction in leaves and petioles of a mature wild olive. **Plant Cell, Tissue and Organ**  
1680 **Culture**, v.103, p.237-242, 2010.

- 1681 CASTRO, A.C.; RESENDE, L.V.; GUIMARÃES, W.N.R.; LOGES, V. Uso de  
1682 técnicas moleculares em estudo de diversidade genética em antúrio. **Revista Brasileira**  
1683 **de Horticultura Ornamental**, v.10, p.6-9, 2004.
- 1684 DUQUENNE, B.; EECKHAUT, T.; WERBROUCK, S.; HUYLENBROECK, J. Effect  
1685 of enzyme concentrations on protoplast isolation and protoplast culture of  
1686 *Spathiphyllum* and *Anthurium*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.91, p.165-  
1687 173, 2007.
- 1688 FEDER, N.; O'BRIEN, T.P. Plant microtechnique: some principles and new methods.  
1689 **American Journal of Botany**, v.55, p.123-142, 1968.
- 1690 FERNANDO, J.A.; MELO, M.; SOARES, M.K.M.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.  
1691 Anatomy of somatic embryogenesis in *Carica papaya* L. **Brazilian Archives of**  
1692 **Biology and Technology**, v.44, p.247-255, 2001.
- 1693 FERNANDO, J.A.; VIEIRA, M.L.C.; GERALDI, I.O.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.  
1694 Anatomical study of somatic embryogenesis in *Glycine max* (L.) Merril. **Brazilian**  
1695 **Archives of Biology and Technology**, v.45, p.277-286, 2002.
- 1696 FITCH, M.M.M.; LEONG, T.C.W.; HE, X.; MCCAFFERTY, H.R.K.; ZHU, Y.J.;  
1697 MOORE, P.H.; GONSALVES, D.; ALDWINCKLE, H.S.; ATKINSON, H.J. Improved  
1698 transformation of anthurium. **HortScience**, v.46, p.358-364, 2011.
- 1699 GAJ, M.D. Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration  
1700 with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh **Plant Growth**  
1701 **Regulation**, v.43, p.27-47, 2004.
- 1702 JALIL, M.; CHEE, W.W.; OTHMAN, R.Y.; KHALID, N. Morphohistological  
1703 examination on somatic embryogenesis of *Musa acuminata* cv. Mas (AA). **Scientia**  
1704 **Horticulturae**, v.117, p.335-340, 2008.
- 1705 JAYASANKAR, S.; BONDADA, B.R.; LI, Z.; GRAY, D.J. Comparative anatomy and  
1706 morphology of *Vitis vinifera* (Vitaceae) somatic embryos from solid- and liquid-culture-  
1707 derived proembryogenic masses. **American Journal of Botany**, v.90, p.973-979, 2003.
- 1708 JUNQUEIRA, A.H.; PEETZ, M.D.S. Cultivares de Anthurium en el mercado brasileño.  
1709 **Horticultura Internacional**, v.66, p.38-41, 2008.

1710 KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde–glutaraldehyde fixative of high osmolarity for  
1711 use in electron microscopy. **The Journal of Cell Biology**, v.27, p.127-128, 1965.

1712 KHAN, T.; REDDY, V.S.; LEELAVATHI, S. High-frequency regeneration via somatic  
1713 embryogenesis of an elite recalcitrant cotton genotype (*Gossypium hirsutum* L.) and  
1714 efficient *Agrobacterium*-mediated transformation. **Plant Cell, Tissue and Organ**  
1715 **Culture** v.101, p.323-330, 2010.

1716 KONIECZNY, R.; SLIWINSKA, E.; PILARSKA, M.; TULEJA, M.  
1717 Morphohistological and flow cytometric analyses of somatic embryogenesis in  
1718 *Trifolium nigrescens* Viv. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.109, p.131-141,  
1719 2012.

1720 KUEHNLE, A.R.; CHEN, F.-C.; SUGIL, N. Somatic embryogenesis and plant  
1721 regeneration in *Anthurium andraeanum* hybrids. **Plant Cell Reports**, v.11, p.438-442,  
1722 1992.

1723 LIENDO, M.; MOGOLLÓN, N. Multiplicación clonal *in vitro* del anturio (*Anthurium*  
1724 *andraeanum* Lind. cv. Nicoya). **Bioagro**, v.21, p.179-182, 2009.

1725 MA, J.; HE, Y.; WU, C.; LIU, H.; HU, Z.; SUN, G. Cloning and molecular  
1726 characterization of a SERK gene transcriptionally induced during somatic  
1727 embryogenesis in *Ananas comosus* cv. Shenwan. **Plant Molecular Biology Reporter**,  
1728 v.30, p.195-203, 2012.

1729 MACIEL, S.A.; FERMINO JUNIOR, P.C.P.; SILVA, R.A.; SCHERWINSKI-  
1730 PEREIRA, J.E. Morpho-anatomical characterization of embryogenic calluses from  
1731 immature zygotic embryo of peach palm during somatic embryogenesis. **Acta**  
1732 **Scientiarum. Agronomy**, v.32, p.263-267, 2010.

1733 MAIRA, O.; ALEXANDER, M.; VARGAS, T.E. Micropropagation and organogenesis  
1734 of *Anthurium andreanum* Lind cv Rubrun. In: JAIN, S.M.; OCHATT, S.J. (Ed.).  
1735 **Protocols for in vitro propagation of ornamental plants, methods in molecular**  
1736 **biology**. Totowa, New Jersey: Humana Press Edition, 2010. p.3-14.

1737 MARTIN, K.; JOSEPH, D.; MADASSER, J.; PHILIP, V. Direct shoot regeneration  
1738 from lamina explants of two commercial cut flower cultivars of *Anthurium andraeanum*  
1739 Hort. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v.39, p.500-504, 2003.

- 1740 MING-HUA, Y.; SEN-RONG, H. A simple cryopreservation protocol of *Dioscorea*  
1741 *bulbifera* L. embryogenic calli by encapsulation-vitrification. **Plant Cell, Tissue and**  
1742 **Organ Culture**, v.101, p.349-358, 2010.
- 1743 MORCILLO, F.; ABERLENC-BERTOSSI, F.; HAMON, S.; DUVAL, Y.  
1744 Accumulation of storage protein and 7S globulins during zygotic and somatic embryo  
1745 development in *Elaeis guineensis*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.36, p.509-  
1746 514, 1998.
- 1747 MOURA, E.F.; VENTRELLA, M.C.; MOTOIKE, S.Y. Anatomy, histochemistry and  
1748 ultrastructure of seed and somatic embryo of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae). **Scientia**  
1749 **Agricola**, v.67, p.399-407, 2010.
- 1750 MOURA, E.F.; VENTRELLA, M.C.; MOTOIKE, S.Y.; DE SÁ JÚNIOR, A.Q.;  
1751 CARVALHO, M.; MANFIO, C.E. Histological study of somatic embryogenesis  
1752 induction on zygotic embryos of macaw palm (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex  
1753 Martius). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.95, p.175-184, 2008.
- 1754 NHUT, D.T.; NGUYEN, D.; VY, N.N.H.; KHUE, C.D.; KHIEM, D.V.; VINH, D.N.  
1755 Impact of *Anthurium* spp. genotype on callus induction derived from leaf explants, and  
1756 shoot and root regeneration capacity from callus. **Journal of Applied Horticulture**,  
1757 v.8, p.135-137, 2006.
- 1758 NINKOVIĆ, S.; DJORDJEVIĆ, T.; VINTERHALTER, B.; UZELAC, B.; CINGEL,  
1759 A.; SAVIĆ, J.; RADOVIĆ, S. Embryogenic responses of *Beta vulgaris* L. callus  
1760 induced from transgenic hairy roots. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** v.103,  
1761 p.81-91, 2010.
- 1762 O'BRIEN, T.P.; MCCULLY, M.E. **The study of plant structure principles and select**  
1763 **methods**. Melbourne: Termarcarphi Pty Ltd, 1981.
- 1764 PARIMALAN, R.; VENUGOPALAN, A.; GIRIDHAR, P.; RAVISHANKAR, G.A.  
1765 Somatic embryogenesis and *Agrobacterium*-mediated transformation in *Bixa orellana*  
1766 L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.105, p.317-328, 2010.
- 1767 PIERIK, R.L.M. Callus multiplication of *Anthurium andraeanum* Lindl. in liquid  
1768 media. **Netherlands Journal of Agricultural Science**, v.23, p.299-302, 1975.

- 1769 PIERIK, R.L.M. *Anthurium andraeanum* plantlets produced from callus tissues  
1770 cultivated *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, v.37, p.80-82, 1976.
- 1771 PIERIK, R.L.M.; STEEGMANS, H.H.M.; VAN DER MEYS, J.A.J. Plantlet formation  
1772 on callus tissues of *Anthurium andraeanum* Lind. **Scientia Horticulturae**, v.2, p.193-  
1773 198, 1974.
- 1774 PINHEIRO, M.V.M.; MARTINS, F.B.; CRUZ, A.C.F.; CARVALHO, A.C.P.P.;  
1775 OLIVEIRA, E.J.; OTONI, W.C. Somatic embryogenesis in anthurium (*Anthurium*  
1776 *andraeanum* cv. Eidibel) as affected by different explants. **Acta Scientiarum.**  
1777 **Agronomy**, v.36, p.87-98, 2014.
- 1778 PINHEIRO, M.V.M.; MARTINS, F.B.; CRUZ, A.C.F.; CARVALHO, A.C.P.P.;  
1779 VENTRELLA, M.C.; OTONI, W.C. Maturation of *Anthurium andraeanum* cv. Eidibel  
1780 somatic embryos from explants of nodal segments. **In Vitro Cellular and**  
1781 **Developmental Biology - Plant**, v.49, p.304-312, 2013.
- 1782 PINTO, D.L.P.; ALMEIDA, A.M.R.; RÊGO, M.M.; SILVA, M.L.; OLIVEIRA, E.J.;  
1783 OTONI, W.C. Somatic embryogenesis from mature zygotic embryos of commercial  
1784 passionfruit (*Passiflora edulis* Sims) genotypes. **Plant Cell, Tissue and Organ**  
1785 **Culture**, v.107, p.521-530, 2011.
- 1786 QUIROZ-FIGUEROA, F.R.; ROJAS-HERRERA, R.; GALAZ-AVALOS, R.M.;  
1787 LOYOLA-VARGAS, V.M. Embryo production through somatic embryogenesis can be  
1788 used to study cell differentiation in plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**,  
1789 v.86, p.285-301, 2006.
- 1790 RAWLINS, T.E.; TAKAHASHI, W.N. **Technics of plant histochemistry and**  
1791 **virology**. Millbrae: The National Press, 1952. 125p.
- 1792 REYNOLDS, E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in  
1793 electronmicroscopy. **Journal of Cell Biology**, v.17, p.208-212, 1963.
- 1794 ROCHA, D.I.; VIEIRA, L.M.; TANAKA, F.A.O.; SILVA, L.C.; OTONI, W.C.  
1795 Somatic embryogenesis of a wild passion fruit species *Passiflora cincinnata* Masters:  
1796 histocytological and histochemical evidences. **Protoplasma**, v.249, p.747-758, 2012.

- 1797 SÁENZ, L.; AZPEITIA, A.; CHUC-ARMENDARIZ, B.; CHAN, J.L.; VERDEIL, J.L.;  
1798 HOCHER, V.; OROPEZA, C. Morphological and histological changes during somatic  
1799 embryo formation from coconut plumule explants. **In Vitro Cellular & Developmental**  
1800 **Biology - Plant**, v.42, p.19-25, 2006.
- 1801 SANÉ, D.; ABERLENC-BERTOSSI, F.; GASSAMA-DIA, Y.K.; SAGNA, M.;  
1802 TROUSLOT, M.F.; DUVAL, Y.; BORGEL, A. Histocytological analysis of  
1803 callogenesis and somatic embryogenesis from cell suspensions of date palm (*Phoenix*  
1804 *dactylifera*). **Annals of Botany**, v.98, p.301-308, 2006.
- 1805 SANTANA-BUZZY, N.; LÓPEZ-PUC, G.; CANTO-FLICK, A.; BARREDO-POOL,  
1806 F.; BALAM-UC, E.; AVILÉS-VINÑAS, S.; SOLÍS-MARROQUÍN, D.; LECONA-  
1807 GUZMÁN, C.; BELLO-BELLO, J.J.; GÓMEZ-UC, E.; MIJANGOS-CORTÉS, J.O.  
1808 Ontogenesis of the somatic embryogenesis of habanero pepper (*Capsicum chinense*  
1809 Jacq.). **HortScience**, v.44, p.113-118, 2009.
- 1810 SCHERWINSKI-PEREIRA, J.; DA SILVA GUEDES, R.; DA SILVA, R.; FERMINO,  
1811 P.; LUIS, Z.; DE OLIVEIRA FREITAS, E. Somatic embryogenesis and plant  
1812 regeneration in açai palm (*Euterpe oleracea*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**,  
1813 v.109, p.501-508, 2012.
- 1814 SEN-RONG, H.; MING-HUA, Y. A simple and efficient protocol for cryopreservation  
1815 of embryogenic calli of the medicinal plant *Anemarrhena asphodeloides* Bunge by  
1816 vitrification. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, p.1-10, 2012.
- 1817 SPURR, A.R. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy.  
1818 **Journal of Ultrastructural Research**, v.26, p.31-43, 1969.
- 1819 TOMBOLATO, A.F.C.; QUIRINO, E.A. Multiplicação in vitro de novas seleções de  
1820 *Anthurium andraeanum* Lindl. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v.2,  
1821 p.37-46, 1996.
- 1822 TOMBOLATO, A.F.C.; QUIRINO, E.A.; COSTA, A.M.M. Antúrio (*Anthurium*  
1823 *andraeanum* Lindl.). In: TOMBOLATO, A.F.C.C., A. M. M (Ed.). **Micropropagação**  
1824 **de plantas ornamentais**. Campinas: Instituto Agrônômico, 1998. p.18-21.

1825 TOMBOLATO, A.F.C.; UZZO, R.P.; CASTRO, A.C.R.; SAKAI, M.; SAES, L.A.  
1826 Recursos genéticos e melhoramento do antúrio (*Anthurium andraeanum* Linden) no  
1827 IAC–APTA. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v.10, p.1-5, 2004.

1828 VIDAL, B.C. Acid glycosaminoglycans and endochondral ossification  
1829 microspectrophotometric evaluation and macromolecular orientation. **Cell and**  
1830 **Molecular Biology**, v.22, p.45-64, 1977.

1831 WEIJIE, X.; BIN, X.; GUANGDONG, W.; WEIMING, G.; FANGDE, W.; JIANPING,  
1832 J. Somatic embryogenesis and plant regeneration of *Anthurium andraeanum*. **Acta**  
1833 **Horticulturae Sinica**, v.33, p.1281-1286, 2006.

1834 XU, C.; ZHAO, L.; PAN, X.; SAMAJ, J. Developmental localization and  
1835 methylesterification of pectin epitopes during somatic embryogenesis of banana (*Musa*  
1836 spp. AAA). **PLoS One**, v.6, p.e22992, 2011.

1837 YANG, J.L.; SEONG, E.S.; KIM, M.J.; GHIMIRE, B.K.; KANG, W.H.; YU, C.Y.; LI,  
1838 C.H. Direct somatic embryogenesis from pericycle cells of broccoli (*Brassica oleracea*  
1839 L. var. italica) root explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.100, p.49-58,  
1840 2010.

1841 YOU, C.; FAN, T.; GONG, X.; BIAN, F.; LIANG, L.; QU, F. A high-frequency cyclic  
1842 secondary somatic embryogenesis system for *Cyclamen persicum* Mill. **Plant Cell,**  
1843 **Tissue and Organ Culture**, v.107, p.233-242, 2011.

1844 ZAKIZADEH, H.; STUMMANN, B.M.; LÜTKEN, H.; MÜLLER, R. Isolation and  
1845 characterization of four somatic embryogenesis receptor-like kinase (*RhSERK*) genes  
1846 from miniature potted rose (*Rosa hybrida* cv. Linda). **Plant Cell, Tissue and Organ**  
1847 **Culture**, v.101, p.331-338, 2010.

1848



### CAPÍTULO III

1849  
1850  
1851  
1852  
1853  
1854

**Clonagem, caracterização molecular e análise da expressão do gene *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE (SERK)* na embriogênese somática em antúrio [*Anthurium andraeanum* (Linden ex André) cv. Eidibel] (Araceae)**

1855 **Resumo** - Os genes *SERK* (*SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE*  
1856 *KINASE*), podem estar envolvidos em vários processos de desenvolvimento das plantas.  
1857 O monitoramento da expressão de genes *SERK* pode fornecer informações sobre a  
1858 aquisição de competência dos tecidos ou informações sobre o estágio de  
1859 desenvolvimento embriogênico. Dessa forma, o objetivo inicial desse estudo foi isolar e  
1860 caracterizar transcritos de *SERK* expressos durante a embriogênese somática a partir de  
1861 segmentos nodais e avaliar o padrão de expressão durante as fases de indução e  
1862 maturação de calos embriogênicos de *Anthurium andraeanum* cv. Eidibel. Para isso,  
1863 calos embriogênicos aos 55 dias em meio de indução, foram utilizados para extração do  
1864 RNA total. O cDNA fita simples foi sintetizado e utilizado como molde para  
1865 amplificação da sequência codante, utilizando-se seis combinações de primers  
1866 degenerados. Os fragmentos amplificados de tamanhos esperados foram purificados de  
1867 gel, ligados em vetor e inseridos em células ultracompetentes. A sequência deduzida, de  
1868 aminoácidos de uma ORF contendo 382 aminoácidos, foi comparada com proteínas  
1869 *SERK* de outras espécies depositadas no banco de dados NCBI, incluindo uma  
1870 sequência parcial de *A. andraeanum*, sendo observada elevada similaridade. Sendo  
1871 demonstrada também pela análise filogenética. A análise em secções longitudinais dos  
1872 cortes de segmentos nodais de antúrio hibridizados *in situ*, com sonda antisense  
1873 (positivo), demonstrou que o sinal da expressão de *SERK* aumenta gradativamente,  
1874 tendo sinal fraco nas células do meristema axilar e forte em células de calos  
1875 embriogênicos. Já aos 65 dias de maturação, não houve sinal da expressão de *SERK*.  
1876 Dessa forma, sugere-se que a expressão do gene *SERK* está associada com a indução de  
1877 embriogênese somática, sugerindo que esse mecanismo seja conservado. Os resultados  
1878 sugerem que essas sequências podem ser utilizadas para monitorar a transição de células  
1879 competentes em células e tecidos embriogênicos de *A. andraeanum*.

1880

1881 **Palavras-chave:** Expressão gênica, filogenia, hibridização *in situ*.

1882 **Cloning, molecular characterization and analysis of gene *SOMATIC***  
1883 ***EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE (SERK)* expression in somatic**  
1884 **embryogenesis of anthurium [*Anthurium andraeanum* (Linden ex André) cv.**  
1885 **Eidibel] (Araceae)**

1886

1887 **Abstract** - The *SERK* (*SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE*)  
1888 genes could be involved in various processes of plant development. The monitoring of  
1889 expression of *SERK* can provide information about the acquisition of competence of  
1890 tissues or the stage of embryonic development. Therefore, the aim of this study was to  
1891 isolate and characterize transcripts of *SERK* expressed during somatic embryogenesis  
1892 from nodal segment and evaluate the expression pattern during induction and  
1893 maturation of embryogenic callus of *Anthurium andraeanum* cv. Eidibel. For this,  
1894 embryogenic callus 55 days on induction medium, were used for extraction of total  
1895 RNA. The single-stranded cDNA was synthesized and used as template for the  
1896 amplification of the coding sequence, using six combinations of degenerate primers.  
1897 The amplified fragments of expected size were gel purified, linked in the vector and  
1898 inserted into ultra-competent cells. The deduced sequence, of an open reading frame  
1899 with 382 amino acids, was compared with *SERK* proteins of other species deposited in  
1900 the NCBI database, including a partial sequence of *A. andraeanum*, showing high  
1901 similarity, which was also shown by phylogenetic analysis. The analysis on longitudinal  
1902 sections of nodal segments of anthurium *in situ* hybridized with antisense probe  
1903 (positive control), shown that the expression of *SERK* signal increases gradually with  
1904 weak signal in axillary meristem cells and strong signal in cells of embryogenic callus.  
1905 After 65 days of maturation, there was no sign of the expression of *SERK*. Thus, it is  
1906 suggested that the expression of the *SERK* gene is related with the induction of somatic  
1907 embryogenesis, suggesting that this mechanism is conserved. These results suggest that  
1908 these sequences can be used to monitor the competent cells transition to embryogenic  
1909 tissues and cells of *A. andraeanum*.

1910

1911 **Keywords:** Gene expression, phylogeny, *in situ* hybridization.

1912

## 1913 INTRODUÇÃO

1914

1915 Plantas do gênero *Anthurium* Schott. são monocotiledôneas, herbáceas tropicais,  
1916 epífitas ou hemiepífitas e nativas de regiões quentes da América Tropical (Castro et al.,  
1917 2004; Tombolato et al., 2004; Nhut et al., 2006; Liendo & Mogollón, 2009; Maira et al.,  
1918 2010). A maioria das espécies desse gênero é ornamental, e cerca de 130 espécies são  
1919 encontradas no Brasil (Castro et al., 2004; Tombolato et al., 2004). Dentre estas  
1920 destaca-se o *Anthurium andraeanum* Linden, pois possui grande aceitação do público  
1921 consumidor devido ao tamanho, coloração e longa durabilidade pós-colheita das  
1922 inflorescências, tornando-se uma das espécies mais cultivadas no Brasil (Castro et al.,  
1923 2004).

1924 Dentre as principais cultivares de *A. andraeanum*, destaca-se a ‘Eidibel’, sendo  
1925 plantas produtivas, de crescimento rápido, com inflorescências de coloração vermelho  
1926 forte e espádice branca, fatores esses que possibilitaram tornar esta cultivar como a mais  
1927 cultivada em todo o Brasil (Tombolato et al., 2004; Junqueira & Peetz, 2008).

1928 Atualmente, as mudas dos antúrios disponíveis no mercado são produzidos por  
1929 técnicas de cultura de tecidos (Maira et al., 2010) e a partir da década de 90, vem se  
1930 utilizando, como forma de propagação *in vitro*, a embriogênese somática. Para isso, tem  
1931 sido utilizados como explantes, folhas, pecíolos, raízes, segmentos nodais e internodais  
1932 (Kuehnle et al., 1992; Hamidah et al., 1997; Weijie et al., 2006; Duquenne et al., 2007;  
1933 Bautista et al., 2008; Beyramizade et al., 2008; Fitch et al., 2011), dependendo do  
1934 genótipo. O segmento nodal é o explante indicado para a indução de embriogênese  
1935 somática em *A. andraeanum* cv. Eidibel (Pinheiro et al., 2014).

1936 A embriogênese somática oferece grandes vantagens para o desenvolvimento de  
1937 diferentes pesquisas em plantas (Ninković et al., 2010), sendo aplicada também com  
1938 sucesso em sistemas de regeneração de diversas espécies (Yang et al., 2010).  
1939 Comparativamente às demais técnicas de cultura de tecidos, a embriogênese somática  
1940 permite a produção em larga escala de plantas, possibilitando reduzir significativamente  
1941 o custo por unidade de muda produzida. Além disso, a embriogênese somática é um  
1942 sistema ideal para estudo de eventos morfológicos, fisiológicos, bioquímicos e  
1943 moleculares que ocorrem durante o processo de embriogênese em plantas superiores  
1944 (Zakizadeh et al., 2010; You et al., 2011).

1945 A embriogênese somática é um sistema de propagação *in vitro* de plantas, que  
1946 requer sinalização hormonal para induzir a formação de embrião somático, com

1947 estrutura bipolar organizada, capaz de formar uma planta completa, sem fusão de  
1948 gametas (Yang et al., 2010; Ma et al., 2012). Durante a embriogênese somática ocorrem  
1949 alterações morfológicas e bioquímicas em resposta às alterações nos padrões de  
1950 expressão gênica (Santos et al., 2005). No entanto, a base molecular dos mecanismos  
1951 genéticos que regula a propriedade de competência à embriogênese em células vegetais  
1952 ainda não está totalmente elucidada (Santa-Catarina et al., 2004; Pérez-Núñez et al.,  
1953 2009; Ma et al., 2012).

1954 A partir da utilização de marcadores moleculares e da localização de células  
1955 competentes, foi possível complementar os métodos tradicionais de identificação de  
1956 células envolvidas na formação de embriões somáticos (Schmidt et al., 1997).

1957 Nos últimos anos, os estudos moleculares e genéticos, focados no  
1958 desenvolvimento das plantas, resultaram na identificação de vários grupos de genes  
1959 especificamente expressos durante a embriogênese (Ito et al., 2005; Pérez-Núñez et al.,  
1960 2009). Entre os genes expressos na embriogênese zigótica e somática destacam-se os da  
1961 família *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE (SERK)* (Schmidt et  
1962 al., 1997; Hecht et al., 2001). Esses genes podem fornecer informações importantes  
1963 sobre a competência dos tecidos ou mesmo sobre o estágio de desenvolvimento mais  
1964 adequado para o cultivo *in vitro* (Santa-Catarina et al., 2004).

1965 Os genes da família *SERK* têm, como produto, proteínas do tipo RLK (*Receptor-*  
1966 *Like Protein Kinase*) com domínio de LRR (*Leucine-Rich Repeat*) (Li, 2010; Nolan et  
1967 al., 2011). Essa subfamília de proteínas quinase, LRR-RLKs, é caracterizada por um  
1968 domínio extracelular com pelo menos cinco motivos LRR, um domínio transmembrana  
1969 e um domínio de proteína-quinase intracelular, que desempenha importante papel no  
1970 controle de um amplo processo do desenvolvimento em plantas (Cock et al., 2002; Ma  
1971 et al., 2012).

1972 A família multigênica *SERK* foi definida com a presença de 11 éxons e a  
1973 tendência de que cada éxon codifica um domínio de proteína específica (Nolan et al.,  
1974 2011). A sequência de aminoácidos de *SERK* compõe uma ordem particular de  
1975 domínios do N ao C terminal, sendo peptídeo sinal (SP), zíper de leucina (ZIP), cinco  
1976 motivos repetitivos de leucina (*Leucine Rich Repeats – LRRs*), um domínio rico em  
1977 prolina (SPP), um domínio transmembrana e um domínio quinase intracelular seguido  
1978 da porção C-terminal (Nolan et al., 2011).

1979 O primeiro homólogo de *SERK* foi isolado em culturas embriogênicas de  
1980 *Daucus carota (DcSERK)*, sendo caracterizado como um gene marcador de células com

1981 características embriogênicas (Schmidt et al., 1997). Em seguida, vários genes da  
1982 família *SERK* foram isolados em outras espécies, como *AtSERK1* a *AtSERK5* de  
1983 *Arabidopsis thaliana* (Hecht et al., 2001), *ZmSERK1* a *ZmSERK3* de *Zea mays* (Baudino  
1984 et al., 2001; Zhang et al., 2011), *MtSERK1* a *MtSERK6* e *MtSERKLL1* a *MtSERKLL3* de  
1985 *Medicago truncatula* (Nolan et al., 2003; Nolan et al., 2009; Nolan et al., 2011),  
1986 *HaSERK* de *Helianthus annuus* (Thomas et al., 2004), *TcSERK* de *Theobroma cacao*  
1987 (Santos et al., 2005), *CitSERK1* de *Citrus unshiu* (Shimada et al., 2005) *OsSERK1*,  
1988 *OsSERK2* e *OsBISERK1* de *Oryza sativa* (Hu et al., 2005; Ito et al., 2005; Song et al.,  
1989 2008; Park et al., 2011), *StSERK1* de *Solanum tuberosum* (Sharma et al., 2008),  
1990 *TaSERK1* a *TaSERK3* de *Triticum aestivum* (Singla et al., 2008) *VvSERK1* a *VvSERK3*  
1991 de *Vitis vinifera* (Schellenbaum et al., 2008; Maillot et al., 2009), *CnSERK* de *Cocos*  
1992 *nucifera* (Pérez-Núñez et al., 2009), *MaSERK1* de *Musa acuminata* (Huang et al.,  
1993 2010), *RhSERK1* a *RhSERK4* de *Rosa hybrida* (Zakizadeh et al., 2010), *CpSERK1* e  
1994 *CpSERK2* de *Cyclamen persicum* (Savona et al. 2012)(Savona et al., 2012), *AcSERK1*  
1995 de *Ananas comosus* (Ma et al., 2012), *AaSERK1* de *Araucaria angustifolia* (Steiner et  
1996 al., 2012), e *PiSERK3* de *Prunus incisa* (Ben Mahmoud et al., 2013).

1997 No presente estudo, foi isolado e caracterizada a expressão de um homólogo de  
1998 *SERK* durante a indução e maturação de calos embriogênicos de *A. andraeanum* cv.  
1999 Eidibel. O relacionamento filogenético com membros de outras espécies sugere que  
2000 AanSERK seja um possível ortólogo desse gene relacionado com a embriogênese  
2001 somática, podendo também estar envolvido em diferentes funções ao longo do  
2002 desenvolvimento da planta.

2003

2004 **MATERIAL E MÉTODOS**

2005

2006 **Material vegetal e condições de cultivo**

2007 Utilizaram-se, como material vegetal, plantas de *A. andraeanum* cv. Eidibel  
2008 previamente estabelecidas *in vitro* por organogênese indireta a partir de folhas jovens,  
2009 seguindo a metodologia proposta por Tombolato et al. (1998), sendo as culturas cedidas  
2010 pelo Instituto Agronômico, em Campinas (IAC).

2011 As culturas foram subcultivadas a cada 30 dias (Figura 2A), em meio contendo  
2012 macro, micronutrientes e vitaminas Pierik (Pierik, 1976), acrescido de 4,44  $\mu\text{M}$  de 6-  
2013 benziladenina (BA), 0,54  $\mu\text{M}$  de ácido naftalenoacético (ANA), 2% de sacarose, 100  
2014  $\text{mg L}^{-1}$  de mio-inositol e solidificado com 6,5  $\text{g L}^{-1}$  de ágar Merck® (Darmstadt,  
2015 Alemanha). O pH foi ajustado para 5,8, anteriormente à autoclavagem a 121 °C e 1,5  
2016 atm por 15 minutos. O material vegetal foi mantido em sala de crescimento, com  
2017 temperatura de  $25 \pm 2$  °C, irradiância luminosa de  $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

2018

2019 *Indução de embriogênese somática*

2020 Seguindo a metodologia proposta por Pinheiro et al. (2014) para a indução de  
2021 embriogênese somática em *A. andraeanum* cv. Eidibel, os explantes, segmentos nodais  
2022 com aproximadamente 1,0 cm de comprimento contendo uma gema (meristema axilar)  
2023 (Figura 2B), foram inoculados, sob condições assépticas, em placas de Petri 90 x 15 mm  
2024 (J. Prolab, Curitiba, Brasil) contendo 25 mL de meio Pierik acrescido de 10  $\mu\text{M}$  de  
2025 ANA, 2% de sacarose, 100  $\text{mg L}^{-1}$  de mio-inositol e solidificado com 6,5  $\text{g L}^{-1}$  de ágar  
2026 Merck® (Darmstadt, Alemanha) e o pH ajustado para 5,8, e autoclavado a 121 °C e 1,5  
2027 atm por 15 minutos. Em cada placa de Petri foram inoculados, horizontalmente, nove  
2028 segmentos nodais, sendo mantidos por 90 dias para a indução de calos embriogênicos  
2029 (Figura 2C). As culturas foram mantidas em sala de crescimento, no escuro, com  
2030 temperatura de  $25 \pm 2$  °C.

2031 Os registros fotográficos de segmentos nodais e calos embriogênicos foram  
2032 obtidos em microscópio estereoscópio (modelo Olympus SZX) com sistema de captura  
2033 de imagens acoplado (modelo Olympus E-330).

2034

2035 *Maturação de embriões somáticos*

2036 Seguindo a metodologia de Pinheiro et al. (2013) para a maturação dos embriões  
2037 somáticos de *A. andraeanum*, após a indução de embriogênese somática cerca de 90 mg

2038 de calos embriogênicos foram transferidos, sob condições assépticas, para Erlenmeyers  
2039 (125 mL), contendo 25 mL de meio líquido Pierik acrescido de 0,47  $\mu\text{M}$  de 6-furfuril-  
2040 aminopurina (cinetina), 2% de sacarose, 100  $\text{mg L}^{-1}$  de mio-inositol e solidificado com  
2041 6,5  $\text{g L}^{-1}$  de ágar Merck<sup>®</sup> (Darmstadt, Alemanha). O pH foi ajustado para 5,8, e  
2042 autoclavado a 121 °C e 1,5 atm por 15 minutos. As culturas foram mantidas por 65 dias  
2043 em mesa agitadora (100 rpm), no escuro, em sala de crescimento, com temperatura de  
2044  $25\pm 2$  °C.

2045

### 2046 **Microscopia de luz**

2047 Para os estudos anatômicos, as amostras fixadas aos 0, 15, 25, 30, 35, 40, 50, 90  
2048 dias em meio de indução de embriogênese somática, foram desidratadas em série etífica  
2049 crescente e incluídas em metacrilato (Historesin, Leica Instruments, Heidelberg,  
2050 Alemanha). Para montagem das lâminas, cortes longitudinais de 5  $\mu\text{m}$  foram obtidos em  
2051 micrótomo rotativo de avanço automático (RM2255, Leica Microsystems Inc.,  
2052 Deerfield, EUA). Para a caracterização estrutural, as amostras foram mantidas por 10  
2053 minutos e coradas com azul de toluidina pH 4,4 (O'Brien & McCully, 1981). A captura  
2054 de imagens foi realizada utilizando fotomicroscópio (AX70TRF, Olympus Optical,  
2055 Tóquio, Japão) equipado com o sistema de câmera U-Photo. Os demais registros  
2056 fotográficos foram obtidos em microscópio estereoscópio (modelo Olympus SZX) com  
2057 sistema de captura de imagens acoplado (modelo Olympus E-330).

2058

### 2059 **Clonagem e caracterização do gene *SERK* de *A. andraeanum***

2060

#### 2061 *Extração, quantificação e verificação da integridade do RNA total*

2062 O RNA total foi extraído a partir de calos embriogênicos, com 55 dias em meio  
2063 de indução de embriogênese, utilizando Tris-Reagente<sup>®</sup>. Cada amostra, com 500 mg de  
2064 material, foi macerada em nitrogênio líquido, com o auxílio de gral e pistilo (livre de  
2065 RNase) e imediatamente colocadas em tubos Eppendorf<sup>®</sup> de 1,5 mL contendo 500  $\mu\text{L}$   
2066 de Tris-Reagent. Em seguida foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  da mistura de clorofórmio e  
2067 álcool isoamílico (24:1, v/v). A amostra foi homogeneizada, seguindo-se de incubação  
2068 em gelo por cinco minutos e centrifugação a 12.000 rpm por 20 minutos a 4 °C. Após  
2069 centrifugação, o sobrenadante foi recolhido para um novo tubo Eppendorf<sup>®</sup>,  
2070 adicionando o mesmo volume de isopropanol à amostra, para a precipitação do RNA.  
2071 Após uma hora de incubação a 4 °C, a amostra foi lavada em 1 mL de etanol 70% (livre

2072 de RNase) e centrifugada por 15 minutos a 12.000 rpm e 4 °C; o sobrenadante foi  
2073 descartado e os tubos foram mantidos em capela de fluxo laminar, para a evaporação do  
2074 excesso de etanol 70% e secagem do sedimento. Em seguida, o sedimento foi  
2075 ressuspendido em 300 µL de água com dietil pirocarbonato (DEPC, Sigma) e mantido  
2076 em geladeira a 4 °C.

2077 A quantificação do RNA foi realizada em NanoDrop ND-1000 (NanoDrop  
2078 Technologies TM) com absorvância de 260 nm; e a integridade das amostras verificada  
2079 por eletroforese em gel de agarose a 1,2% (livre de RNase).

2080

#### 2081 *Síntese de cDNA fita simples (Superscript II – Invitrogen™)*

2082 Para a síntese de cDNA fita simples, 3 µg de RNA total e 1 µL de oligo(dT), 1  
2083 µL de dNTP e 10 µL de água DEPC, em volume total de 12 µL, foram incubados a  
2084 65 °C por cinco minutos, em seguida, mantidos em gelo por dois minutos.  
2085 Posteriormente, foram adicionados 4 µL do tampão de síntese de primeira fita de DNA,  
2086 2 µL de mistura de dNTPs (10 mM, cada) e 1 µL (200U) da enzima transcriptase  
2087 reversa (SuperScript™ *Reverse transcriptase*, Invitrogen™), conforme recomendações  
2088 do fabricante. A reação ocorreu em ciclo de 42 °C durante 50 minutos, em seguida, por  
2089 15 minutos a 70 °C para a inativação da enzima no termociclador (Biocycler MJ25). O  
2090 cDNA foi armazenado a -20 °C até o momento do uso.

2091

#### 2092 *Amplificação, purificação e clonagem da sequência codificadora de SERK*

2093 O cDNA sintetizado a partir de RNA total de calos embriogênicos, foi utilizado  
2094 como molde para a amplificação das sequências codificadoras de *SERK* expresso  
2095 durante a embriogênese somática em *A. andraeanum*. Para amplificação, foram  
2096 utilizadas combinações de iniciadores degenerados desenhados por Baudino et al.  
2097 (2001) nas seguintes combinações: S5/S1; S5/S2; S4/S1; S4/S2; S3/S1 e S3/S2 (Tabela  
2098 1; Figura 1).

2099

2100

2101

2102

2103



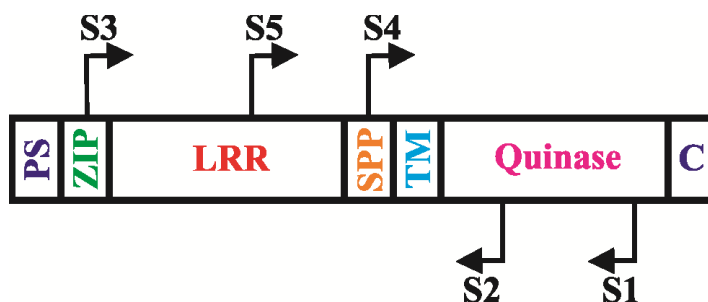
2104 **Tabela 1.** Iniciadores degenerados utilizados para amplificação do gene *SERK* em  
 2105 cDNA de *A. andraeanum*, a partir de calos embriogênicos com 50 dias em meio de  
 2106 indução da embriogênese somática, e a localização na proteína (Baudino et al., 2001).

Iniciadores	Sequência	Domínio estrutural
S1	5'TGTHACRTGGGTRTCCTTGTARTCCAT3'	Domínio quinase (exon VII)
S2	5'CGRTGMACWGCCATRCTIATCAT3'	Domínio quinase (exon III)
S3	5'GTGAAYCCTTGCACATGGTTYCATGT3'	Zipper de leucina
S4	5'CCMTGYCCIGGATCTCCCCITTT3'	SSP
S5	5'ATGCACTSACYAATATYACWACYCTTCAAG3'	LRR

2107 W = A ou T; R = A ou G; M = A ou C; Y = C ou T; H = A ou C ou T; S = C ou G. S1 e  
 2108 S2 (iniciadores reversos); S3, S4 e S5 (Iniciadores diretos). LRR = Repetições ricas em  
 2109 leucina; SPP = Região rica em prolina.

2110

2111



2112

2113 **Figura 1.** Estrutura geral de genes *SERK* e posição dos indicadores degenerados  
 2114 utilizados na amplificação. PS = Peptídeo sinal; ZIP = Zíper de leucina; LRR =  
 2115 Repetições ricas em leucina; SPP = Região rica em prolina; TM = domínio  
 2116 transmembrana; C = Região C terminal. Modificado de Baudino et al. (2001).

2117

2118 A reação de PCR ocorreu em volume final de 25  $\mu$ L, contendo 2,0  $\mu$ L de cDNA  
 2119 concentrado, 2,5  $\mu$ L de tampão 10x, 0,5  $\mu$ L de dNTPs (10 mM), 0,75  $\mu$ L de  $MgCl_2$  (50  
 2120 mM), 1  $\mu$ L de primer direto, 1  $\mu$ L de primer reverso, 0,2  $\mu$ L de Platinum<sup>®</sup> Taq DNA  
 2121 polimerase (Invitrogen<sup>TM</sup>) e 17,05  $\mu$ L de água milli-Q. Foi utilizado o seguinte  
 2122 programa de amplificação: desnaturação a 95 °C por cinco minutos, seguido de 35  
 2123 ciclos a 95 °C (1 minuto), 50 °C (1 minuto), 72 °C (1 minuto), e uma extensão final a  
 2124 72 °C por cinco minutos. Os produtos da amplificação foram analisados por eletroforese  
 2125 em gel de agarose 1,0%.

2126 Os fragmentos amplificados foram purificados a partir do gel de agarose  
2127 utilizando o Kit Wizard<sup>®</sup> SV Gel e PCR clean up (Promega<sup>®</sup>, USA), de acordo com as  
2128 instruções do fabricante.

2129 Após quantificação, os fragmentos foram ligados no vetor pGEM<sup>®</sup>-T Easy  
2130 Vector Systems (Promega<sup>®</sup>, USA), na proporção de 3:1 de inserto:vetor, com a enzima  
2131 T4 DNA ligase (Promega<sup>®</sup>, USA), de acordo com as instruções do fabricante. A  
2132 transformação em *Escherichia coli* (células ultracompetentes DH5 $\alpha$ ), por choque  
2133 térmico, foi realizada utilizando 2  $\mu$ L da ligação (inserto) e 40  $\mu$ L de células  
2134 ultracompetentes ( $1 \times 10^8$ ). Após incubação a 37 °C por 1 hora, as células foram  
2135 plaqueadas em meio seletivo LB (Sambrook & Russel, 2001) sólido contendo 100  $\mu$ g  
2136 mL<sup>-1</sup> de ampicilina, 20  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> de 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -d-galactopiranosídeo  
2137 (X-Gal) (Promega<sup>®</sup>, USA), 0,1 mM de isopropil-beta-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG)  
2138 (Promega<sup>®</sup>, USA) e, posteriormente, incubadas a 37 °C por aproximadamente 14 horas.  
2139 Para a confirmação da presença do inserto no vetor, o DNA plasmidial das colônias  
2140 brancas foi clivado (digerido) com a enzima de restrição *EcoRI* e os fragmentos foram  
2141 separados por eletroforese em gel de agarose 1,0%, e posterior análise.

2142

#### 2143 *Sequenciamento dos clones e análise das sequências*

2144 Os clones confirmados pela análise de restrição foram sequenciados pela  
2145 empresa Macrogen, na Coreia do Sul, nos sentidos senso e anti-senso com os  
2146 iniciadores universais M13 e SP6, respectivamente.

2147 Os cromatogramas obtidos foram processados e a montagem dos *consensus*  
2148 executada no programa CodonCode<sup>™</sup> Aligner-Software (LI-COR, Inc., Lincoln, USA).

2149 As sequências *consensus* obtidas foram comparadas com sequências já  
2150 depositadas no banco de dados do NCBI utilizando-se do programa BLASTn (Altschul  
2151 et al., 1997). O programa ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>) foi  
2152 utilizado para identificar a fase de leitura e tradução das proteínas. As sequências de  
2153 nucleotídeos e aminoácidos foram alinhadas com sequências homólogas de proteínas  
2154 SERK disponíveis no banco de dados do NCBI com maior identidade às sequências de  
2155 *A. andraeanum*, para análise dos domínios conservados.

2156

#### 2157 *Análise filogenética*

2158 O relacionamento filogenético da sequência de SERK de *A. andraeanum* com as  
2159 de outras espécies foi inferido mediante a construção de árvores filogenéticas. As

2160 sequências obtidas foram alinhadas com sequências de eudicotiledôneas,  
2161 monocotiledôneas e gimnospermas, disponíveis no GenBank  
2162 (<http://www.ncbi.nih.nlm.gov>).

2163 Alinhamentos múltiplos das sequências foram obtidos utilizando-se o programa  
2164 MUSCLE (Edgar, 2004) implementado no MEGA versão 5.0 (Tamura et al., 2011)  
2165 disponível em <http://www.megasoftware.net/mega5>. Árvores filogenéticas foram  
2166 obtidas utilizando o método de distância Neighbor-Joining (NJ) (Saitou & Nei, 1987)  
2167 com o modelo de substituição JTT (Jones et al., 1992) e distribuição Gamma. A  
2168 confiabilidade de cada ramo da árvore foi estimada via teste Bootstrap (Felsenstein,  
2169 1985) com 1.000 repetições.

2170

### 2171 **Análise da expressão espacial do gene *SERK* durante a embriogênese somática de** 2172 ***A. andraeanum* por hibridização *in situ***

2173

#### 2174 *Coleta e preparo dos tecidos*

2175 Foram coletados segmentos nodais com 0, 15, 25, 30, 35, 40, 50, 90 dias em  
2176 meio de indução de embriogênese somática, e calos embriogênicos com 65 dias em  
2177 meio de maturação dos embriões somáticos. Os explantes foram coletados em  
2178 condições livres da ação de RNAses e imersos imediatamente em solução fixadora  
2179 (paraformaldeído 4% e glutaraldeído 0,25%, em tampão fosfato de sódio 0,01 M, pH  
2180 7,2). As amostras foram submetidas a vácuo por 1 hora, à temperatura ambiente. Em  
2181 seguida a solução fixadora foi renovada e as amostras foram mantidas a 4 °C durante a  
2182 noite.

2183 No dia seguinte, as amostras foram lavadas em tampão fosfato de sódio 0,01 M,  
2184 pH 7,2 e desidratadas em série etílica (30, 50, 70, 80, 85, 90, 95 e 100%), por 1 hora  
2185 cada. As amostras foram infiltradas em parafina histológica (Dinâmica, Brasil), sendo  
2186 desidratadas em séries crescentes de etanol:xilol nas proporções 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3,  
2187 v/v e xilol puro (duas trocas), sendo que cada etapa teve a duração de, pelo menos, 12  
2188 horas. Durante a etapa de xilol puro, as amostras foram mantidas em estufa a 65 °C,  
2189 sendo acrescentado parafina. A cada troca foi descartado 30% da solução dos frascos e  
2190 acrescentado parafina, até a substituição completa de xilol por parafina pura. As  
2191 amostras foram colocadas em formas de papel e, após a completa polimerização, foram  
2192 fixadas em blocos de madeira e estocadas a 4 °C.

2193 Secções de 10 µm foram obtidas em micrótomo rotativo de avanço manual Leica  
2194 RM2255 (Alemanha) e colocadas em banho-maria contendo água tratada com DEPC,  
2195 aquecida a 42 °C para distender as secções, sendo depois acondicionadas em lâminas  
2196 Fisherbrand® (Fisher Scientific), livres de RNAses. Depois desse processo, as lâminas  
2197 foram secas a temperatura ambiente e armazenadas a 4 °C, até o momento do uso.

2198 Antes da hibridização, a parafina foi removida das lâminas em xilol 100% (duas  
2199 trocas de cinco minutos, cada), xilol:etanol (1:1, v/v) por cinco minutos e etanol 100%  
2200 (10 minutos). As lâminas foram secas à temperatura ambiente.

2201

#### 2202 *Síntese da sonda senso e anti-senso marcadas com digoxigenina*

2203 Para a síntese da sonda, foi utilizado como molde um fragmento de 626 bp,  
2204 referente ao clone Aan3 (Tabela 2). O fragmento foi amplificado a partir de 10 ng do  
2205 DNA plasmidial utilizando os iniciadores T7 e SP6, nas mesmas condições de  
2206 amplificação já mencionada anteriormente. Os produtos amplificados foram purificados  
2207 com fenol/clorofórmio (1:1), seguido de clorofórmio puro para remoção do fenol. A  
2208 precipitação do DNA foi feita com acetato de sódio 3 M (1/10 volumes) e dois volumes  
2209 de etanol absoluto. Os produtos foram quantificados em gel de agarose 1,0% com  
2210 auxílio do marcador de peso molecular *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen®). Após  
2211 análise da orientação do inserto na sequência, o clone escolhido para a síntese da sonda  
2212 foi estocado em glicerol 20% a -80 °C. Para a síntese da sonda, foi utilizado 1 µg do  
2213 produto purificado. A sonda de RNA, senso e anti-senso, foi sintetizada por transcrição  
2214 *in vitro*, utilizando o *DIG RNA Labeling kit (SP6/T7)* (Roche®), de acordo com as  
2215 instruções do fabricante. A concentração da sonda foi verificada por eletroforese em gel  
2216 de agarose 1,2%, utilizando 100 e 200 ng do controle positivo de RNA marcado do  
2217 mesmo *kit*, e a marcação confirmada por dotblot.

2218

#### 2219 *Reação de hibridização*

2220 Para a reação de hibridização, 60 ng de tRNA de levedura (Invitrogen®) e 60 ng  
2221 de sonda foram desnaturados a 80 °C por cinco minutos e adicionados a 100 µL de  
2222 tampão de hibridização (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, NaCl 300 mM, formamida 50%,  
2223 EDTA 1 mM pH 8.0; solução de Denhardt 1X). Para a hibridização, 120 µL do mix de  
2224 hibridização foram colocados sobre cada lâmina e cobertas com Parafilm®. As lâminas  
2225 foram incubadas em câmara úmida, a 42 °C, no escuro, por período de  
2226 aproximadamente 16 horas.

2227

2228 *Reação de pós-hibridização e detecção imunológica*

2229 Após a hibridização, as lâminas foram lavadas em SSC 4x, 2x, 1x e 0,5x 5x (a  
2230 partir de solução SSC 20X = NaCl 3M, Na<sub>3</sub>-citrato 0,3M, pH 7,2), cada solução por 20  
2231 minutos. Em seguida, foram mantidas por cinco minutos em tampão de detecção 1 (0,1  
2232 M de Tris HCl - pH 7,5; 0,15 M de NaCl) e incubadas por 30 minutos em tampão  
2233 bloqueadora 2 (tampão de detecção 1 acrescido de 1% de BSA). As secções foram  
2234 novamente lavadas em tampão de detecção 1 por cinco minutos e incubadas durante  
2235 uma hora com anticorpo *Anti-Digoxigenina-AP, Fab Fragments* (Roche®) diluído  
2236 1:1.000 em tampão de detecção 1. Após a sequência de duas lavagens, de 15 minutos  
2237 cada, em tampão de detecção 1 e uma lavagem de cinco minutos em tampão de detecção  
2238 3 (0,1 M de Tris-HCl pH 7,5; 0,1 M de NaCl; 0,05 M de MgCl<sub>2</sub>, com pH final ajustado  
2239 para 9,5), as secções foram incubadas em solução de coloração contendo 4,5 µL de  
2240 BCIP (5-bromo-  
2241 4-cloro-3-indolil-fosfato) (Promega®, USA) (0,05 g mL<sup>-1</sup>) e 4,5 µL de NBT  
2242 (nitrobluetetrazólio) (Promega®, USA) (0,05 g mL<sup>-1</sup>) em 1 mL de tampão 3 por  
2243 aproximadamente 40 minutos, no escuro.

2244 Para cessar a reação, as secções foram incubadas no tampão de detecção 4 (0,01  
2245 M de Tris HCl - pH 8,0; 1 mM EDTA) por dez minutos, em seguida foram lavadas duas  
2246 vezes em água bidestilada. As lâminas foram montadas em água milli-Q.

2247 As análises e captura de imagens foram realizadas em microscópio de luz  
2248 modelo AX70 TRF, Olympus Optical) com sistema U-Photo, acoplado à câmera  
2249 fotográfica digital (modelo Spot Insightcolour 3.2.0, Diagnostic Instruments Inc.) e  
2250 microcomputador com o programa de captura de imagens Spot Basic 4.8.

2251

2252 **RESULTADOS**

2253

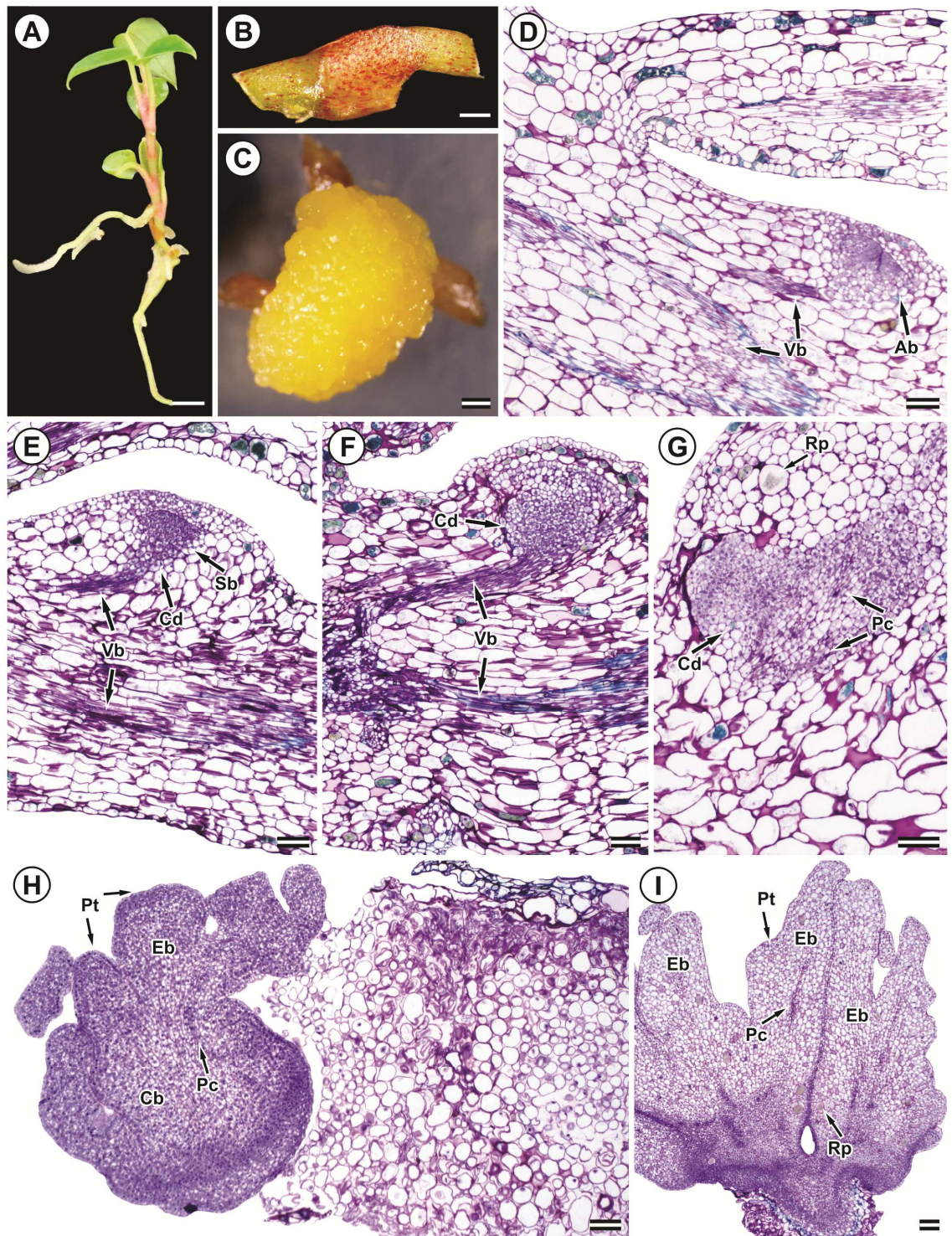
2254 **Alterações estruturais dos segmentos nodais durante a indução da embriogênese**  
2255 **somática em *A. andraeanum***

2256 A embriogênese somática em *A. andraeanum* ocorreu no meristema axilar, sem  
2257 qualquer divisão aparente da epiderme ou das células do parênquima de preenchimento  
2258 dos segmentos nodais.

2259 Em secções longitudinais, foi possível observar segmentos nodais com  
2260 meristema axilar e sistema vascular (Figura 2D). Aos 15 dias em meio de indução, o  
2261 meristema axilar apresentou intumescimento, com início de diferenciação das células da  
2262 protoderme da região meristemática (Figura 2E). Aos 25 dias, foram observadas início  
2263 das divisões da protoderme do calo embriogênico e no meristema axilar, tendo o início  
2264 da formação dos calos embriogênicos (Figura 2F). Aos 35 dias, observaram-se início de  
2265 formação procambial no calo embriogênico (Figura 2G). Aos 55 dias, foi evidenciada a  
2266 presença de calo embriogênico sem conexão com o tecido de origem, com presença de  
2267 embrião somático, protoderme e procâmbio (Figura 2H). Aos 90 dias de indução de  
2268 embriogênese somática, pode-se observar aumento do tamanho do calo embriogênico,  
2269 devido as novas divisões celulares, evidenciando embriões com delimitação de  
2270 protoderme, procâmbio, e a presença de ráfides, inerente à espécie (Figura 2I).

2271





2272 **Figura 2.** Indução de culturas embriogênicas em segmentos nodais de *Anthurium*  
 2273 *andraeanum* cv. Eidibel. (A) Planta subcultivada a cada 30 dias; (B) Explante inicial:  
 2274 segmento nodal em tempo zero (controle); (C) Explante final: calos embriogênicos aos  
 2275 90 dias de cultivo em meio de indução; (D) Segmento nodal em tempo zero; Segmento  
 2276 nodal aos 15 (E), 25 (F) e 35 (G) dias de cultivo com intumescimento das gemas e  
 2277 células com intensa divisão na região meristemática; (H) Aos 55 dias, calos

2278 embriogênicos formados, evidenciando embriões globulares com delimitação da  
2279 protoderme; (I) Embrião somático aos 90 dias de cultivo com formação da protoderme,  
2280 evidenciando procâmbio e protoderme. Ab: meristema axilar; Cb: calo embriogênico.  
2281 Cd: divisões celulares; Eb: embrião somático; Pc: procâmbio; Pt: protoderme; Rp:  
2282 ráfide; Sb: gema intumescida; Vb: sistema vascular. Barras: A-C: 500  $\mu$ M; D-I: 100  
2283  $\mu$ M.

2284

### 2285 **Clonagem da provável sequência codificadora de *SERK* em *A. andraeanum***

2286 Todas as combinações de iniciadores degenerados utilizados para a amplificação  
2287 do cDNA de *SERK* em *A. andraeanum* (Tabela 1) geraram fragmentos com tamanho  
2288 esperado no gel (Tabela 2). Esses fragmentos foram clonados, sendo identificados sete  
2289 clones positivos das combinações S5/S1; S5/S2; S4/S1; S4/S2; S3/S1 e S3/S2, através  
2290 da análise de restrição. Os clones foram numerados de 1 a 7. A combinação S3/S1 do  
2291 clone Aan6, gerou a maior sequência, com cerca de, aproximadamente, 1.239 bp. Já a  
2292 combinação S5/S2, do clone Aan3, gerou sequência de, aproximadamente, 626 pb  
2293 (Tabela 2).

2294

2295 **Tabela 2.** Tamanho dos fragmentos dos clones positivos do cDNA de *Anthurium*  
2296 *andraeanum* obtidos por PCR de acordo com a combinação de iniciadores.

Combinação dos iniciadores	Tamanho (kb)
S3/S1	1,2
S3/S2	0,9
S5/S1	0,9
S5/S2	0,6
S4/S1	0,7
S4/S2	0,4

2297

### 2298 **Análise dos homólogos de *SERK* por meio das sequências de nucleotídeos**

2299 Na comparação das sequências nucleotídicas dos clones com aquelas  
2300 depositadas no banco de dados do NCBI, constatou-se elevada identidade com os  
2301 homólogos de *SERK*. As sequências dos nucleotídeos dos sete clones foram alinhadas, e  
2302 para analisar a proximidades desses clones, foi construído cladograma (dados não  
2303 mostrados). Após análise, não foram encontradas diferenças no agrupamento dos  
2304 clones. Dessa forma, foi selecionado o maior clone obtido (Aan6) da combinação



2305 S3/S1, com, aproximadamente, 1.239 pb, que apresentou elevada identidade com SERK  
 2306 e SERK1 (82 a 84%), quando comparado com diferentes espécies, como: SERK de  
 2307 *Cocos nucifera* (84%), SERK1 *Malus hupehensis* (83%), SERK1 de *Rosa canina*  
 2308 (83%), SERK de *Dimocarpus longan* (83%) e SERK de *Theobroma cacao* (82%)  
 2309 (Tabela 4).

2310

2311 **Tabela 4.** Comparação da sequência nucleotídica do clone Aan6 (AanSERK) de  
 2312 *Anthurium andraeanum*, obtida a partir de cDNA amplificado com a combinação S3/S1  
 2313 (1.239 pb), com as sequências de outras espécies depositadas no banco de dados do  
 2314 NCBI.

Acesso	Descrição	Cobertura (%)	E-valor	Identidade máxima (%)
AY791293.2	<i>Cocos nucifera</i> (SERK)	99	0,0	84
JQ231272.1	<i>Malus hupehensis</i> (SERK1)	100	0,0	83
HM802242.1	<i>Rosa canina</i> (SERK1)	100	0,0	83
FJ013227.3	<i>Dimocarpus longan</i> (SERK)	99	0,0	83
AY570507.1	<i>Theobroma cacao</i> (SERK)	100	0,0	82

2315

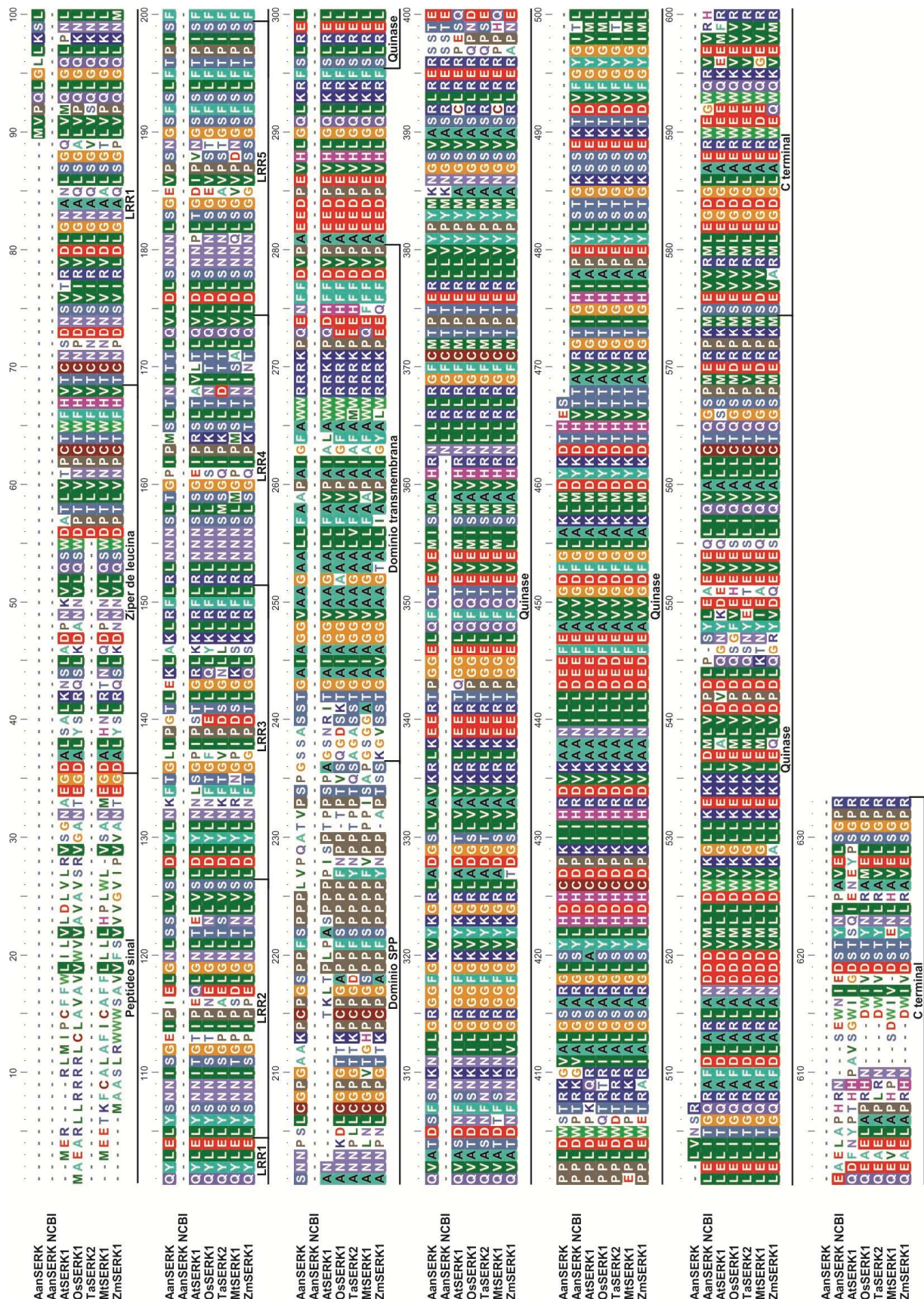
2316 **Análise da sequência de aminoácidos da proteína SERK de *A. andraeanum***

2317 As sequências dos clones de *A. andraeanum* foram analisadas pelo programa  
 2318 ORF Finder (NCBI). Depois disso, foi construído um cladograma apenas com as  
 2319 sequências de *A. andraeanum*, em que foi demonstrada elevada similaridade entre as  
 2320 sequências de aminoácidos desses clones. Dessa forma, foi selecionado apenas um  
 2321 clone, o Aan6, com 1.239 pb, e possui *Open Read Frame* (ORF) de 382 aminoácidos.

2322 Com o múltiplo alinhamento das sequências deduzidas de aminoácidos  
 2323 verificou-se que o clone Aan6 (AanSERK) apresenta domínios estruturais  
 2324 característicos de proteínas SERK de outras espécies, que inclui parte do domínio  
 2325 extracelular contendo parte do padrão repetitivo de leucina (LRR1) até LRR5, a região  
 2326 rica em prolina, o domínio transmembranar e parte do domínio quinase (Figura 3).

2327 A sequência do clone Aan6 (AanSERK) foi alinhada com a sequência parcial de  
 2328 *A. andraeanum* (AanSERK NCBI), com aproximadamente 1.003 pb, depositada no  
 2329 banco de dados da NCBI, no qual inicia-se em parte da região quinase e finaliza na  
 2330 extremidade C terminal (Figura 3). Ainda assim, para maiores informações sobre essas

2331 regiões, faz-se necessário experimentos futuros de RACE 3' e 5', que dará extensão do  
2332 clone a partir de iniciadores internos específicos.  
2333  
2334



2335 **Figura 3.** Comparação das seqüências de aminoácidos deduzidas do clone Aa6  
 2336 (AaNSERK) de *A. andraeanum* com homólogos de SERK disponíveis no banco de

2337 dados. As sequências deduzidas de aminoácidos de proteínas SERK de *Anthurium*  
2338 *andraeanum* parcial (AanSERK NCBI); *Arabidopsis thaliana* (AtSERK1), *Oryza sativa*  
2339 (OsSERK1), *Triticum aestivum* (TaSERK1), *Medicago truncatula* (MtSERK1) e *Zea*  
2340 *mays* (ZmSERK1) foram alinhadas e os domínios estruturais foram indicados por  
2341 retângulos abaixo do alinhamento. LRR1-LRR5: domínios contendo os motivos  
2342 repetitivos de leucina; SPP: região rica em prolina; C-terminal: domínio carboxi-  
2343 terminal. “Gaps” incluídos para otimização do alinhamento são indicados por “-”.

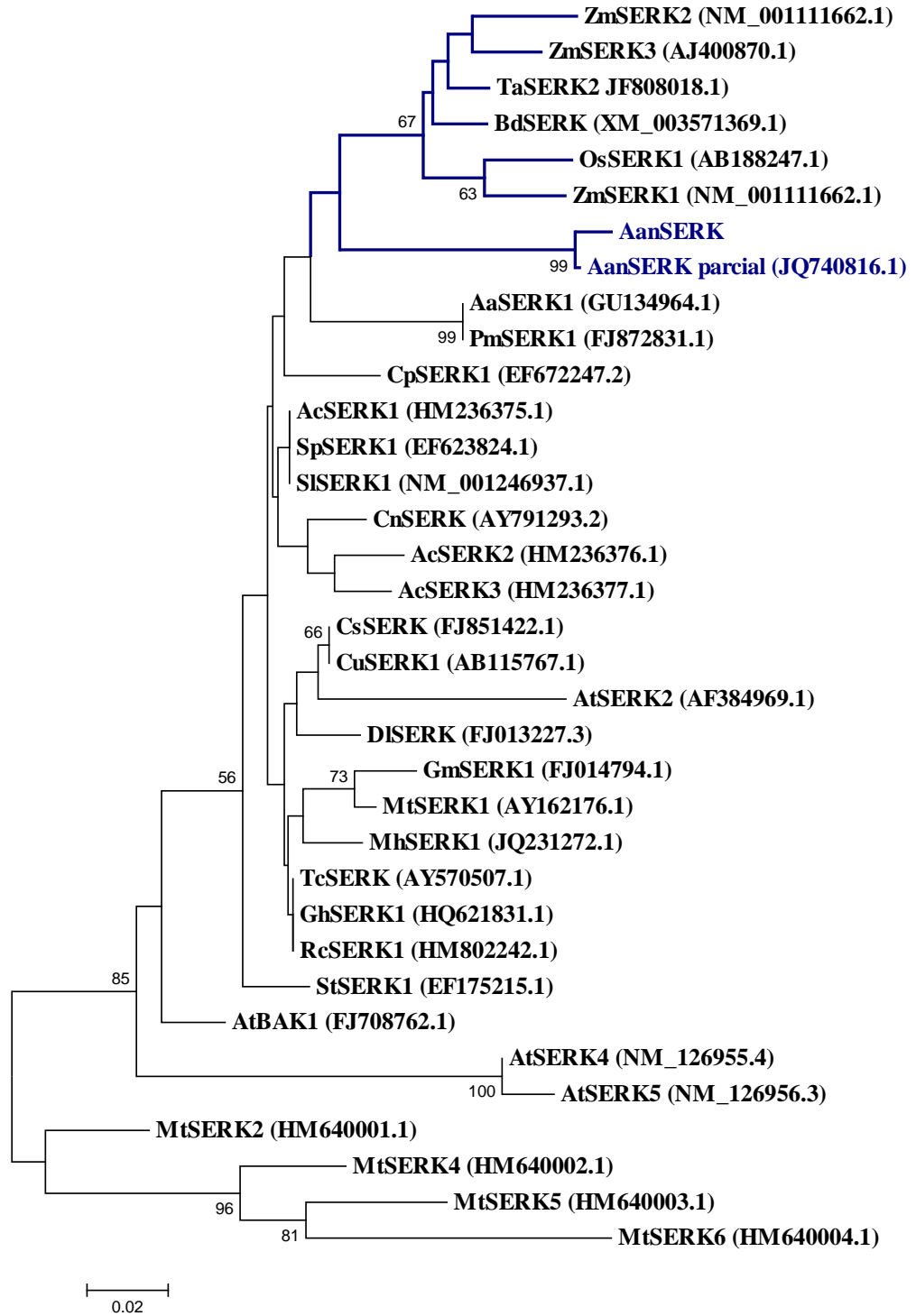
2344

### 2345 **Análise filogenética**

2346 Realizou-se comparação filogenética da sequência proteica de *A. andraeanum*  
2347 (AanSERK) com seus homólogos de SERK em outras espécies vegetais, com o intuito  
2348 de investigar a relação entre essas proteínas. A árvore filogenética foi construída  
2349 considerando a sequência deduzida de aminoácidos do clone Aan6 (AanSERK),  
2350 incluindo os motivos LRR ao domínio quinase.

2351 Foi observada a formação grupos bem sustentados pelo teste de Bootstrap  
2352 (Figura 4). O clone Aan6 (AanSERK) se agrupou em um clado próximo aos diferentes  
2353 membros de SERK de monocotiledôneas, como *Zea mays* (ZmSERK1, ZmSERK2 e  
2354 ZmSERK3), *Triticum aestivum* (TaSERK2), *Brachypodium distachium* (BdSERK) e  
2355 *Oryza sativa* (OsSERK1). As sequências de *A. andraeanum* (AanSERK e AanSERK  
2356 NCBI) agruparam-se no mesmo clado, sustentado com valor Bootstrap de 99%, de  
2357 acordo com a análise comparativa de sequências (Figura 4).

2358



2359

2360 **Figura 4.** Inferência das relações filogenéticas entre homólogos da proteína SERK com  
 2361 base nas sequências parciais de aminoácidos deduzidas. Os diferentes homólogos foram  
 2362 alinhados e foi gerada uma matriz de distância para construção do cladograma por  
 2363 *neighbor-joining*. A barra indica 2% de substituições não-sinônimas. Os números  
 2364 indicam valores de *Bootstrap*, em porcentagem (1.000 repetições), sendo apresentados  
 2365 apenas valores acima de 50%. O clone de *Anthurium andraeanum* é destacado em azul,



2366 Aan6 - AanSERK, juntamente com a sequência parcial da mesma espécie (AanSERK  
2367 NCBI), depositada no banco de dados do NCBI. Os ramos em azul indicam as  
2368 sequências de plantas monocotiledôneas de clado próximo, com a sequência de  
2369 AanSERK. As letras e números entre parênteses indicam o código de acesso no banco  
2370 de dados do NCBI. ZmSERK1, ZmSERK2 e ZmSERK3 (*Zea mays*); TaSERK2  
2371 (*Triticum aestivum*), BdSERK (*Brachypodium distachyon*), OsSERK1 (*Oryza sativa*);  
2372 AanSERK NCBI (*Anthurium andraeanum*); AaSERK1 (*Araucaria angustifolia*)  
2373 PmSERK1 (*Pinus massoniana*); CpSERK1 (*Cyclamen persicum*); AcSERK1,  
2374 AcSERK2 e AcSERK3 (*Ananas comosus*); SpSERK1 (*Solanum peruvianum*);  
2375 SlSERK1 (*Solanum lycopersicum*); CnSERK (*Cocos nucifera*); CsSERK (*Citrus*  
2376 *sinensis*); CuSERK1 (*Citrus unshiu*); AtBAK1, AtSERK2, AtSERK4 e AtSERK5  
2377 (*Arabidopsis thaliana*); DiSERK (*Dimocarpus longan*); GmSERK1 (*Glycine max*),  
2378 MtSERK1, MtSERK2, MtSERK4, MtSERK5 e MtSERK6 (*Medicago truncatula*);  
2379 MhSERK1 (*Malus hupehensis*); TcSERK (*Theobroma cacao*); GhSERK1 (*Gossypium*  
2380 *hirsutum*); RcSERK1 (*Rosa canina*); StSERK1 (*Solanum tuberosum*).

2381

### 2382 **Caracterização do padrão de expressão de *SERK* por hibridização *in situ***

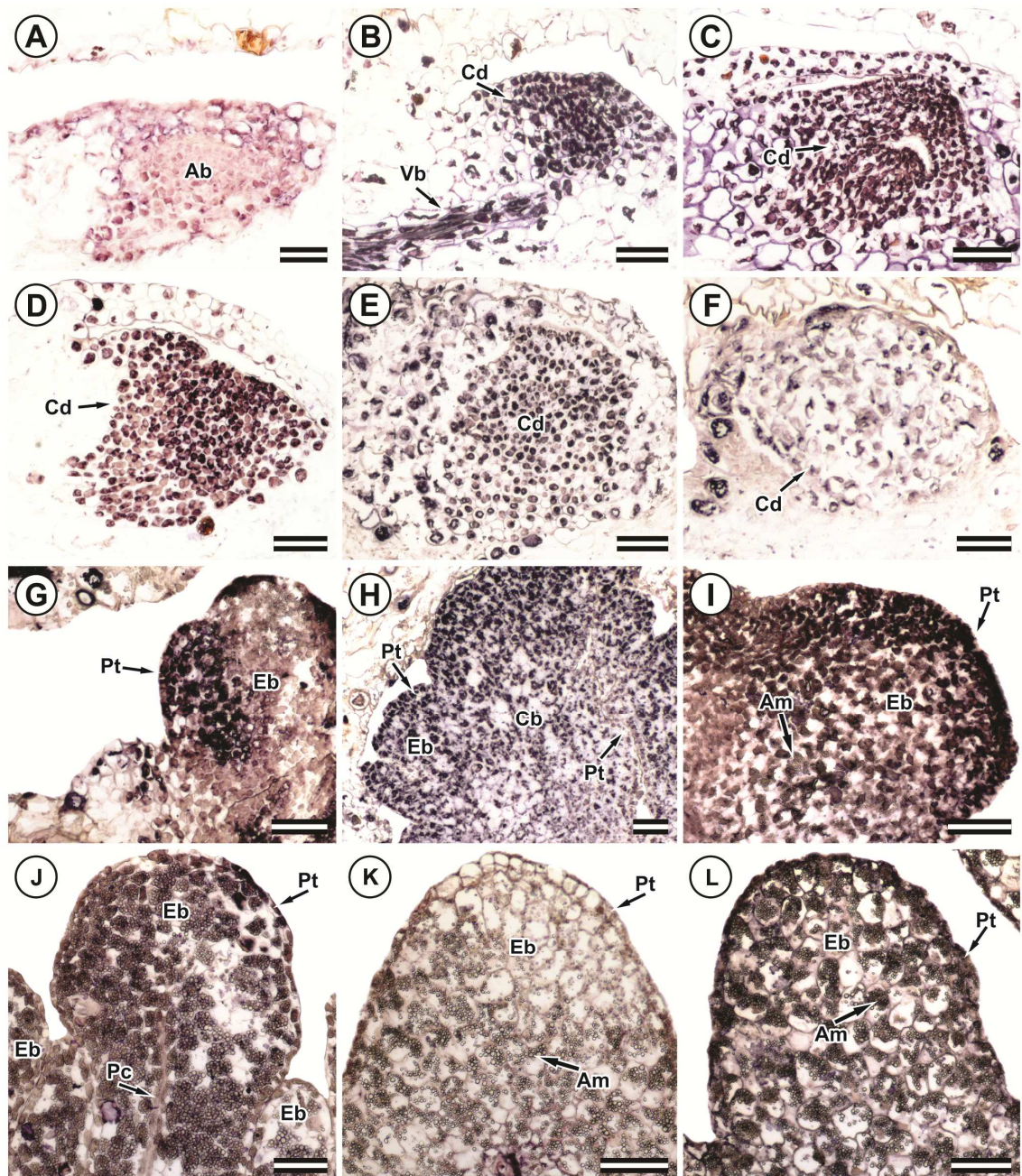
2383 Com a finalidade de determinar o padrão de expressão dos transcritos de *SERK*,  
2384 realizou-se a hibridização *in situ* durante a indução e maturação de embriões somáticos  
2385 em *A. andraeanum*

2386 Com a análise em secções longitudinais dos cortes hibridizados com sonda  
2387 antisenso (positivo), demonstrou sinal fraco da expressão de *SERK* no meristema axilar  
2388 (Figura 5A) dos segmentos nodais em tempo zero. Aos 15 dias, foi possível observar  
2389 que as células em divisão foram fortemente marcadas, juntamente com as células da  
2390 protoderme e o sistema vascular (Figura 5B). Aos 25, 30 e 35 dias observou-se sinal  
2391 forte da expressão de *SERK* na protoderme e nas células em divisão do meristema axilar  
2392 (Figura 5C, 5D e 5E, respectivamente). Não foi observado nenhum sinal positivo nos  
2393 tecidos meristemáticos em divisão, quando hibridizados com a sonda senso (controle  
2394 negativo), apenas acúmulo de compostos fenólicos no tecido parenquimático do  
2395 segmento nodal (Figura 5F). Aos 40 dias de cultivo, observou-se sinal forte para a  
2396 expressão do gene *SERK*, nas células embriogênicas em constante divisão (Figura 5G).  
2397 Aos 55 dias, foi possível observar embriões somáticos em estágio globular com forte  
2398 reação positiva quando hibridizado com a sonda antisenso (Figura 5H). Aos 90 dias, foi  
2399 possível observar embriões somáticos com forte marcação na protoderme e nas células

2400 em divisão, principalmente ao redor do núcleo e nucléolo (Figura 5I). Quando testada a  
2401 sonda senso, foi possível observar a ausência da coloração característica da hibridização  
2402 (Figura 5J).

2403 Aos 65 dias em meio de maturação, foi possível observar a ausência de sinal da  
2404 hibridização, tanto na sonda antisense (Figura 5K), quanto na senso (Figura 5L).

2405



2406 **Figura 5.** Localização dos transcritos do gene *SERK* por hibridização *in situ* durante a  
2407 ontogenia da indução de embriogênese somática e maturação dos embriões maduros de  
2408 *Anthurium andraeanum* cv. Eidibel, a partir de segmento nodais. (A) Meristema axilar  
2409 do segmento nodal em tempo zero (controle), hibridizado com sonda antisense (controle

2410 positivo); Segmento nodal aos 15 (B), 25 (C), 30 (D), 35 (E) dias de cultivo com  
2411 intumescimento das gemas e divisões celulares na região meristemática; (F) Segmento  
2412 nodal aos 35 dias, hibridizado com sonda senso (controle negativo); (G) Aos 40 dias de  
2413 cultivo, segmento nodal evidenciando calos embriogênicos e protoderme; (H) Aos 55  
2414 dias, calos embriogênicos formados, evidenciando embriões somáticos com delimitação  
2415 da protoderme; (I) Embrião somático aos 90 dias de cultivo com formação da  
2416 protoderme, evidenciando amiloplastos; (J) Embriões somáticos aos 90 dias, com  
2417 presença de protoderme, procâmbio e amiloplastos, hibridizado com sonda senso;  
2418 Embrião maduro aos 65 dias de cultivo em meio de maturação, contendo protoderme e  
2419 amiloplasto, hibridizado com sonda antisense (K) e senso (L). Sondas antisense (A-E;  
2420 G-I; K - SP6) e senso (F; J; L - T7). Ab: meristema axilar; Am: amiloplasto; Cb: Calo  
2421 embriogênico; Cd: divisões celulares; Eb: Embrião somático; Pc: procâmbio; Pt:  
2422 protoderme; Vb sistema vascular. Barras: 100µm.  
2423



2424 **DISCUSSÃO**

2425

2426 **Alterações estruturais dos segmentos nodais durante a indução da embriogênese**  
2427 **somática em *A. andraeanum***

2428 Em *A. andraeanum* cv. Eidbel, quando utilizado meio de indução (Pierik com a  
2429 adição de 10 µM de ANA), foi observada a indução de embriogênese somática a partir  
2430 dos segmentos nodais (Pinheiro et al., 2014). No entanto, o presente estudo descreve  
2431 pela primeira vez as alterações estruturais com modificações moleculares que ocorrem  
2432 durante a embriogênese somática nessa espécie.

2433 Uma das maneiras para investigar a progressão das fases específicas na  
2434 embriogênese somática são os estudos histológicos (Jalil et al., 2008). No presente  
2435 trabalho, a análise anatômica revelou a origem celular e o desenvolvimento da  
2436 embriogênese somática a partir de segmentos nodais. Nesse sistema foi demonstrado  
2437 que os calos embriogênicos de *A. andraeanum* são de padrão multicelular, assim como  
2438 observado em *Acrocomia aculeata* (Moura et al., 2008) *Euterpe oleracea* (Scherwinski-  
2439 Pereira et al., 2012) e *Passiflora cincinnata* (Rocha et al., 2012). Isso devido à  
2440 diferenciação das células dos calos embriogênicos e a sua rediferenciação em grupos de  
2441 células, indicando padrão multicelular na origem dos embriões somáticos (Rocha et al.,  
2442 2012).

2443 O potencial embriogênico dos explantes ocorreu predominantemente no  
2444 meristema axilar dos segmentos nodais de *A. andraeanum*. Os calos embriogênicos  
2445 tornaram-se visíveis a partir dos 40 dias de cultivo em meio de indução.

2446 A partir dos 30 dias de cultivo foram observadas tanto em células em divisão  
2447 quanto em calos embriogênicos, grupos de células com núcleo grande, nucléolo  
2448 proeminente, citoplasma denso, paredes celulares delgadas e presença de amido,  
2449 características encontradas normalmente em células embriogênicas. Durante a indução  
2450 de embriogênese somática, o tempo de exposição dos tecidos causa modificações  
2451 celulares, e algumas células adquirem atividade meristemática (Fehér et al., 2003).  
2452 Quando as células adquirem habilidade no desenvolvimento de embriões somáticos são  
2453 chamadas de células competentes (Rocha et al., 2012). Essas modificações celulares  
2454 também são observadas em regiões do embrião zigótico, o que caracteriza células com  
2455 competência embriogênica (Scherwinski-Pereira et al., 2012).

2456 Existe a necessidade de confirmar a morfologia das células para distinguir as  
2457 células que são embriogênicas daquelas que falharam durante a resposta embriogênica

2458 (Jalil et al., 2008). Nesse contexto, informações sobre células competentes são  
2459 importantes para estudos sobre a regulação gênica durante a indução de embriogênese  
2460 somática em plantas.

2461

### 2462 **Expressão do gene *SERK* na embriogênese somática de *A. andraeanum***

2463 Foi realizada a análise molecular para obter melhor compreensão dos eventos-  
2464 chave que ocorrem durante a indução da embriogênese somática em segmentos nodais  
2465 de *A. andraeanum*. Não existem relatos na literatura de genes relacionados com a  
2466 embriogênese somática nessa espécie. Apesar disso, parte da região 3' do gene *SERK*  
2467 em *A. andraeanum* foi depositada no banco de dados NCBI.

2468 Comparando o gene *SERK* de *A. andraeanum* (AanSERK) com seus homólogos  
2469 em outras espécies de plantas, depositadas no banco de dados NCBI, foi possível  
2470 observar que houve elevada similaridade desses genes, sugerindo que eles podem  
2471 desempenhar funções semelhantes. No presente estudo foi analisada a expressão do  
2472 gene *SERK* na indução e maturação de embriões somáticos de *A. andraeanum* e a sua  
2473 função como marcador de embriogênese somática durante o cultivo *in vitro*

2474 Embora a expressão de *SERK* esteja extremamente relacionada com a indução de  
2475 embriogênese, este gene pode desempenhar importante papel no amplo  
2476 desenvolvimento das plantas (Ben Mahmoud et al., 2013). Ou seja, a expressão dos  
2477 homólogos de *SERK* pode ocorrer em outros tecidos, tais como: em calos não  
2478 embriogênicos (Baudino et al., 2001; Zakizadeh et al., 2010); em tecidos reprodutivos  
2479 (Baudino et al., 2001); na organogênese *in vitro* da parte aérea (Thomas et al., 2004); na  
2480 rizogênese *in vitro*, em meristemas primários, incluindo procâmbio (Nolan et al., 2009;  
2481 Savona et al., 2012; Wang et al., 2011); em primórdios caulinares e radiculares (Ito et  
2482 al., 2005; Savona et al., 2012); e em órgãos vegetais, como folhas, caule, cálice (Ito et  
2483 al., 2005; Ma et al., 2012) e raízes (Ito et al., 2005). No presente trabalho, foi possível  
2484 observar a presença de transcritos de *SERK* no meristema axilar do segmento nodal  
2485 (tempo zero).

2486 Os homólogos de *SERK* podem ser expressos também durante o  
2487 desenvolvimento de plantas, na indução de resistência às doenças e aos patógenos  
2488 (Santos et al., 2009; Huang et al., 2010; Yang et al., 2011). Isso ocorre por que os  
2489 homólogos de *SERK* são capazes de mediar parcialmente a transdução de sinais de  
2490 defesa (Hu et al., 2005; Song et al., 2008).

2491 Os homólogos de *SERK* estão envolvidos não só no crescimento e  
2492 desenvolvimento das plantas, mas também na sinalização de reguladores de crescimento  
2493 e dos estádios de desenvolvimento do embrião durante a embriogênese (Santos et al.,  
2494 2009; Zhang et al., 2011). Esses genes também atuam no mecanismo geral de percepção  
2495 de estresse biótico e abiótico, provavelmente a uma resposta de estresse à dessecação e  
2496 a outros fatores que podem estimular a embriogênese somática, quando se utiliza a  
2497 auxina como molécula de sinalização (Santos et al., 2009). Esses genes são induzidos  
2498 também por outras moléculas do estresse de sinalização, como ácido jasmônico,  
2499 benzotiadiazole, o ácido abscísico (Hu et al., 2005), além das auxinas (Nolan et al.,  
2500 2003).

2501 Estes dados sugerem que a expressão dos homólogos de *SERK* pode estar  
2502 associada como marcador de pluripotência, pois possui amplo papel no crescimento e  
2503 desenvolvimento de plantas, não sendo específico para a embriogênese somática (Nolan  
2504 et al., 2003; Zakizadeh et al., 2010; Savona et al., 2012). Apesar disso, a expressão dos  
2505 genes da família *SERK* está normalmente associada com a indução de embriogênese  
2506 somática, podendo ser utilizado como potencial gene marcador para monitorar a  
2507 transição das células de tecidos de calos para células competentes e embriogênicas  
2508 (Pérez-Núñez et al., 2009; Zakizadeh et al., 2010; Ma et al., 2012).

2509 No presente estudo, a partir da hibridização *in situ*, foi possível observar a  
2510 presença de transcritos de *SERK* no meristema axilar sem início de divisões celulares  
2511 (tempo zero), nos tecidos em divisões celulares, nos calos embriogênicos, e nos  
2512 sistemas vasculares, durante a indução da embriogênese somática de *A. andraeanum*. No  
2513 entanto, aos 65 dias de maturação, não houve sinal nos embriões somáticos em estágio  
2514 mais avançado. Este fato demonstra que a expressão do gene *SERK* em *A. andraeanum*  
2515 está relacionada apenas na fase de indução da embriogênese somática, cessando na  
2516 etapa de maturação dos embriões somáticos.

2517 A expressão de *SERK* em *A. andraeanum* foi diferente da observada por outros  
2518 autores, em que a marcação característica de *SERK* regrediu nos estádios mais tardios.  
2519 Por exemplo, em *Citrus sinensis* foi observado a marcação característica de *SERK*,  
2520 apesar de moderada nos embriões durante as fases de cordiforme para torpedo e mais  
2521 fraca em embriões globulares (Ge et al., 2010). Em *Daucus carota* a expressão do gene  
2522 *DcSERK* ocorreu até o estágio globular, mas nenhuma expressão foi constatada em  
2523 culturas não embriogênicas (Schmidt et al., 1997; Shiu & Bleecker, 2001). Em  
2524 *Arabidopsis thaliana*, a expressão do gene *AtSERK1* ocorreu em embriões globulares, e

2525 diminuiu rapidamente após a transição para o estágio de cordiforme (Tucker et al.,  
2526 2003), não sendo expresso no procâmbio (Kwaaitaal & De Vries, 2007). Em *Dactylis*  
2527 *glomerata*, utilizando a técnica de hibridização *in situ*, foi possível observar a expressão  
2528 do gene *SERK* durante o desenvolvimento embrionário até o estágio globular dos  
2529 embriões somáticos (Somleva et al., 2000). No entanto, foi identificado também em  
2530 fases posteriores do embrião, como no meristema apical, escutelo, coleóptilo e  
2531 coleorriza (Somleva et al., 2000).

2532 O gene *TcSERK*, em *Theobroma cacao*, foi expresso durante a indução de  
2533 embriogênese somática e em embriões maduros tanto zigóticos quanto somáticos, tendo  
2534 importante papel durante os estádios mais tardios da embriogênese somática (Santos et  
2535 al., 2005). O mesmo foi observado em *Solanum tuberosum*, no qual o gene *StSERK* foi  
2536 expresso durante a fase de indução de embriogênese somática e durante os demais  
2537 estádios de desenvolvimento do embrião (Sharma et al., 2008). Em *Vitis vinifera*, o  
2538 envolvimento dos genes *VvSERK1* e *VvSERK3* ocorre nos explantes desde o início da  
2539 indução de calos embriogênicos (Schellenbaum et al., 2008). Em *Araucaria*  
2540 *angustifolia*, o gene *AaSERK1* demonstrou similaridade com o seu homólogo *SERK1*  
2541 em angiospermas, sendo este envolvido na formação inicial de embriões somáticos e  
2542 zigóticos (Steiner et al., 2012).

2543 Os trabalhos citados anteriormente, relataram sinal da expressão de *SERK* na  
2544 indução de embriogênese somática e durante os demais estádios de desenvolvimento do  
2545 embrião somático. Diferente do observado no presente trabalho, que o sinal da  
2546 expressão do gene *SERK* em *A. andraeanum* cessou durante a etapa de maturação dos  
2547 embriões somáticos. De acordo com a condição fisiológica submetida, o gene *SERK*  
2548 pode ser expresso de maneira diferenciada em diferentes espécies de eudicotiledôneas,  
2549 monocotiledôneas e gimnospermas (Steiner et al., 2012).

2550

### 2551 **Comparação entre AanSERK-like e SERK de outras espécies**

2552

2553 A partir da análise da sequência do clone Aan6 de *A. andraeanum* (AanSERK)  
2554 foi possível observar que se trata de um possível ortólogo do gene *SERK*, expresso  
2555 durante a indução da embriogênese somática nessa espécie, sendo confirmado devido a  
2556 elevada similaridade com a sequência previamente depositada no banco de dados NCBI  
2557 de *A. andraeanum* (AanSERK NCBI).

2558           Outros autores também relatam a associação do gene *SERK* como marcador de  
2559 embriogênese somática em outras espécies de eudicotiledôneas, como *Daucus carota*  
2560 (Schmidt et al., 1997), *Arabidopsis thaliana* (Hecht et al., 2001), *Medicago truncatula*  
2561 (Nolan et al., 2003; Nolan et al., 2009), *Solanum tuberosum* (Sharma et al., 2008), *Rosa*  
2562 *hybrida* (Zakizadeh et al., 2010) e *Cyclamen persicum* (Savona et al., 2012); em  
2563 monocotiledôneas, como *Zea mays* (Baudino et al., 2001; Zhang et al., 2011);  
2564 *Helianthus annuus* (Thomas et al., 2004), *Dactylis glomerata* (Somleva et al., 2000),  
2565 *Triticum aestivum* (Singla et al., 2008), *Oryza sativa* (Song et al., 2008), *Cocos nucifera*  
2566 (Pérez-Núñez et al., 2009), *Ananas comosus* (Ma et al., 2012); e em gimnosperma,  
2567 como *Araucaria angustifolia* (Steiner et al., 2012).

2568           Foi possível observar elevada similaridade da sequência parcial de *SERK* de *A.*  
2569 *andraeanum* com domínio de outras proteínas *SERK*. Isso devido à similaridade entre a  
2570 região rica em prolina (SPP), os domínios ricos em leucina (LRR), domínios  
2571 transmembrana e quinase.

2572           As LRR-RLKs estão relacionadas à percepção de sinais químicos do ambiente,  
2573 por possuírem dois domínios: o domínio transmembrana de ancoragem de proteína na  
2574 membrana plasmática e o domínio quinase-citoplasma, capazes de realizar a transdução  
2575 de sinais extracelulares para o meio intracelular, processo esse realizado pela  
2576 fosforilação da proteína (Shah, 2002; Li, 2010). A posição das RLKs, na membrana  
2577 plasmática, torna essas proteínas fundamentais para a sinalização de uma percepção  
2578 externa à célula, além da condução do sinal para o interior, elicitando uma resposta  
2579 (Nolan et al., 2011). Com isso, os genes da família *SERK* atuam como correceptores em  
2580 várias vias de sinalização, por meio de interações físicas distintas com ligantes de RLKs  
2581 (Li, 2010). Estudos recentes ressaltam ainda que alguns membros de LRR-RLKs têm  
2582 papel duplo ou múltiplo, é o caso da família *SERK* (Li, 2010). Com isso, a identificação  
2583 de outros genes da família *SERK*, que interagem com RLKs, poderá ajudar a revelar  
2584 funções adicionais desses genes (Li, 2010).

2585           Na construção da árvore filogenética, foi possível observar a separação das  
2586 espécies de monocotiledôneas, eudicotiledôneas e gimnospermas. O clone Aan6 de *A.*  
2587 *andraeanum* (AanSERK) agrupou-se junto a sequência já depositada da mesma espécie  
2588 (AanSERK NCBI), com 99% de Bootstrap, estando também próxima de outras  
2589 monocotiledôneas (gramíneas). Steiner et al. (2012) também relataram que houve  
2590 separação entre as monocotiledôneas, eudicotiledôneas e gimnospermas em três grupos  
2591 diferentes.

2592 Os resultados obtidos corroboram com os já relatados por outros autores, no qual  
2593 o processo de embriogênese somática inicia-se pela adição de reguladores de  
2594 crescimento, como as auxinas, conhecidos como moléculas de sinalização do estresse,  
2595 capazes de estimular a indução de embriogênese a partir de células somáticas (Nolan et  
2596 al., 2003; Santos et al., 2009), funcionando como moléculas de sinalização da indução  
2597 de embriogênese somática.

2598 Com base nos resultados, sugere-se que a sequência *AanSERK* esteja associada  
2599 com a indução de embriogênese somática, podendo ser utilizada para monitorar a  
2600 transição de células competentes em células e tecidos embriogênicos.

2601

## 2602 **AGRADECIMENTOS**

2603

2604 Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível  
2605 Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos; e Fundação de Amparo à  
2606 Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro.

2607

2608 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

2609

2610 ALTSCHUL, S.; MADDEN, T.; SCHAFFER, A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER,  
2611 W.; LIPMAN, D. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein  
2612 database search programs. **Nucleic Acids Research**, v.25, p.3389-3402, 1997.

2613 BAUDINO, S.; HANSEN, S.; BRETTSCHEIDER, R.; HECHT, V.F.G.;  
2614 DRESSELHAUS, T.; LÖRZ, H.; DUMAS, C.; ROGOWSKY, P.M. Molecular  
2615 characterisation of two novel maize LRR receptor-like kinases, which belong to the  
2616 *SERK* gene family. **Planta**, v.213, p.1-10, 2001.

2617 BAUTISTA, N.D.R.; PEÑALVER, D.A.; RODRÍGUEZ, R.B.; CHIU, W.C.; LÓPEZ,  
2618 R.C.; TERRY, F.J.; PERALTA, M.P.; MARTÍNEZ, O.G. Embriogénesis somática en  
2619 (*Anthurium andraeanum* Lind.) variedad 'Lambada'. **Revista de Sociedad, Cultura y**  
2620 **Desarrollo Sustentable**, v.4, p.135-149, 2008.

2621 BEN MAHMOUD, K.; DELPORTE, F.; MUHOVSKI, Y.; ELLOUMI, N.; JEMMALI,  
2622 A.; DRUART, P. Expression of *PiABP19*, *Picdc2* and *PiSERK3* during induction of  
2623 somatic embryogenesis in leaflets of *Prunus incisa* (Thunb.). **Molecular Biology**  
2624 **Reports**, v.40, p.1569-1577, 2013.

2625 BEYRAMIZADE, E.; AZADI, P.; MII, M. Optimization of factors affecting  
2626 organogenesis and somatic embryogenesis of *Anthurium andreanum* Lind. 'Tera'.  
2627 **Propagation of Ornamental Plants**, v.8, p.198-203, 2008.

2628 CASTRO, A.C.; RESENDE, L.V.; GUIMARÃES, W.N.R.; LOGES, V. Uso de  
2629 técnicas moleculares em estudo de diversidade genética em antúrio. **Revista Brasileira**  
2630 **de Horticultura Ornamental**, v.10, p.6-9, 2004.

2631 COCK, J.M.; VANOOSTHUYSE, V.; GAUDE, T. Receptor kinase signalling in plants  
2632 and animals: distinct molecular systems with mechanistic similarities. **Current**  
2633 **Opinion in Cell Biology**, v.14, p.230-236, 2002.

2634 DUQUENNE, B.; EECKHAUT, T.; WERBROUCK, S.; HUYLENBROECK, J. Effect  
2635 of enzyme concentrations on protoplast isolation and protoplast culture of  
2636 *Spathiphyllum* and *Anthurium*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.91, p.165-  
2637 173, 2007.

2638 EDGAR, R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high  
2639 throughput. **Nucleic Acids Research**, v.32, p.1792-1797, 2004.

2640 FEHÉR, A.; PASTERNAK, T.P.; DUDITS, D. Transition of somatic cells to an  
2641 embryogenic state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.74, p.201-228, 2003.

2642 FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap.  
2643 **Evolution**, v.39, p.783-791, 1985.

2644 FITCH, M.M.M.; LEONG, T.C.W.; HE, X.; MCCAFFERTY, H.R.K.; ZHU, Y.J.;  
2645 MOORE, P.H.; GONSALVES, D.; ALDWINCKLE, H.S.; ATKINSON, H.J. Improved  
2646 transformation of anthurium. **HortScience**, v.46, p.358-364, 2011.

2647 GE, X.-X.; FAN, G.-E.; CHAI, L.-J.; GUO, W.-W. Cloning, molecular characterization  
2648 and expression analysis of a *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE*  
2649 gene (*CitSERKI-like*) in Valencia sweet orange. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.32,  
2650 p.1197-1207, 2010.

2651 HAMIDAH, M.; KARIM, A.G.A.; DEBERGH, P. Somatic embryogenesis and plant  
2652 regeneration in *Anthurium scherzerianum*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**,  
2653 v.48, p.189-193, 1997.

2654 HECHT, V.; VIELLE-CALZADA, J.P.; HARTOG, M.V.; SCHMIDT, E.D.L.;  
2655 BOUTILIER, K.; GROSSNIKLAUS, U.; DE VRIES, S.C. The Arabidopsis *Somatic*  
2656 *Embryogenesis Receptor Kinase 1* gene is expressed in developing ovules and embryos  
2657 and enhances embryogenic competence in culture. **Plant Physiology**, v.127, p.803-816,  
2658 2001.

2659 HU, H.; XIONG, L.; YANG, Y. Rice *SERKI* gene positively regulates somatic  
2660 embryogenesis of cultured cell and host defense response against fungal infection.  
2661 **Planta**, v.222, p.107-117, 2005.

2662 HUANG, X.; LU, X.-Y.; ZHAO, J.-T.; CHEN, J.-K.; DAI, X.-M.; XIAO, W.; CHEN,  
2663 Y.-P.; CHEN, Y.-F.; HUANG, X.-L. *MaSERKI* gene expression associated with  
2664 somatic embryogenic competence and disease resistance response in banana (*Musa*  
2665 spp.). **Plant Molecular Biology Reporter**, v.28, p.309-316, 2010.



- 2666 ITO, Y.; TAKAYA, K.; KURATA, N. Expression of SERK family receptor-like protein  
2667 kinase genes in rice. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and**  
2668 **Expression**, v.1730, p.253-258, 2005.
- 2669 JALIL, M.; CHEE, W.W.; OTHMAN, R.Y.; KHALID, N. Morphohistological  
2670 examination on somatic embryogenesis of *Musa acuminata* cv. Mas (AA). **Scientia**  
2671 **Horticulturae**, v.117, p.335-340, 2008.
- 2672 JONES, D.T.; TAYLOR, W.R.; THORNTON, J.M. The rapid generation of mutation  
2673 data matrices from protein sequences. **Computer Applications in the Biosciences**, v.8,  
2674 p.275-282, 1992.
- 2675 JUNQUEIRA, A.H.; PEETZ, M.D.S. Cultivares de Anthurium en el mercado brasileño.  
2676 **Horticultura Internacional**, v.66, p.38-41, 2008.
- 2677 KUEHNLE, A.R.; CHEN, F.-C.; SUGIL, N. Somatic embryogenesis and plant  
2678 regeneration in *Anthurium andraeanum* hybrids. **Plant Cell Reports**, v.11, p.438-442,  
2679 1992.
- 2680 KWAAITAAL, M.A.C.J.; DE VRIES, S.C. The *SERK1* gene is expressed in  
2681 procambium and immature vascular cells. **Journal of Experimental Botany**, v.58,  
2682 p.2887-2896, 2007.
- 2683 LI, J. Multi-tasking of somatic embryogenesis receptor-like protein kinases. **Current**  
2684 **Opinion in Plant Biology**, v.13, p.509-514, 2010.
- 2685 LIENDO, M.; MOGOLLÓN, N. Multiplicación clonal *in vitro* del anturio (*Anthurium*  
2686 *andraeanum* Lind. cv. Nicoya). **Bioagro**, v.21, p.179-182, 2009.
- 2687 MA, J.; HE, Y.; WU, C.; LIU, H.; HU, Z.; SUN, G. Cloning and molecular  
2688 characterization of a SERK gene transcriptionally induced during somatic  
2689 embryogenesis in *Ananas comosus* cv. Shenwan. **Plant Molecular Biology Reporter**,  
2690 v.30, p.195-203, 2012.
- 2691 MAILLOT, P.; LEBEL, S.; SCHELLENBAUM, P.; JACQUES, A.; WALTER, B.  
2692 Differential regulation of *SERK*, *LEC1-Like* and *Pathogenesis-Related* genes during  
2693 indirect secondary somatic embryogenesis in grapevine. **Plant Physiology and**  
2694 **Biochemistry**, v.47, p.743-752, 2009.

- 2695 MAIRA, O.; ALEXANDER, M.; VARGAS, T.E. Micropropagation and organogenesis  
2696 of *Anthurium andreanum* Lind cv Rubrun. In: JAIN, S.M.; OCHATT, S.J. (Ed.).  
2697 **Protocols for in vitro propagation of ornamental plants, methods in molecular**  
2698 **biology**. Totowa, New Jersey: Humana Press Edition, 2010. p.3-14.
- 2699 MOURA, E.F.; VENTRELLA, M.C.; MOTOIKE, S.Y.; DE SÁ JÚNIOR, A.Q.;  
2700 CARVALHO, M.; MANFIO, C.E. Histological study of somatic embryogenesis  
2701 induction on zygotic embryos of macaw palm (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex  
2702 Martius). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.95, p.175-184, 2008.
- 2703 NHUT, D.T.; NGUYEN, D.; VY, N.N.H.; KHUE, C.D.; KHIEM, D.V.; VINH, D.N.  
2704 Impact of *Anthurium* spp. genotype on callus induction derived from leaf explants, and  
2705 shoot and root regeneration capacity from callus. **Journal of Applied Horticulture**,  
2706 v.8, p.135-137, 2006.
- 2707 NINKOVIĆ, S.; DJORDJEVIĆ, T.; VINTERHALTER, B.; UZELAC, B.; CINGEL,  
2708 A.; SAVIĆ, J.; RADOVIĆ, S. Embryogenic responses of *Beta vulgaris* L. callus  
2709 induced from transgenic hairy roots. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** v.103,  
2710 p.81-91, 2010.
- 2711 NOLAN, K.E.; IRWANTO, R.R.; ROSE, R.J. Auxin up-regulates *MtSERK1* expression  
2712 in both *Medicago truncatula* root-forming and embryogenic cultures. **Plant Physiology**,  
2713 v.133, p.218-230, 2003.
- 2714 NOLAN, K.E.; KURDYUKOV, S.; ROSE, R.J. Expression of the *SOMATIC*  
2715 *EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE1* (*SERK1*) gene is associated with  
2716 developmental change in the life cycle of the model legume *Medicago truncatula*.  
2717 **Journal of Experimental Botany**, v.60, p.1759-1771, 2009.
- 2718 NOLAN, K.E.; KURDYUKOV, S.; ROSE, R.J. Characterisation of the legume *SERK-*  
2719 *NIK* gene superfamily including splice variants: implications for development and  
2720 defence. **BMC Plant Biology**, v.11, p.1-16, 2011.
- 2721 O'BRIEN, T.P.; MCCULLY, M.E. **The study of plant structure principles and select**  
2722 **methods**. Melbourne: Termarcarphi Pty Ltd, 1981.

2723 PARK, H.; RYU, H.; KIM, B.; KIM, S.; YOON, I.; NAM, K. A subset of *OsSERK*  
2724 genes, including *OsBAK1*, affects normal growth and leaf development of rice.  
2725 **Molecules and Cells**, v.32, p.561-569, 2011.

2726 PÉREZ-NÚÑEZ, M.T.; SOUZA, R.; SÁENZ, L.; CHAN, J.L.; ZÚÑIGA-AGUILAR,  
2727 J.J.; OROPEZA, C. Detection of a *SERK*-like gene in coconut and analysis of its  
2728 expression during the formation of embryogenic callus and somatic embryos. **Plant**  
2729 **Cell Reports**, v.28, p.11-19, 2009.

2730 PIERIK, R.L.M. *Anthurium andraeanum* plantlets produced from callus tissues  
2731 cultivated *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, v.37, p.80-82, 1976.

2732 PINHEIRO, M.V.M.; MARTINS, F.B.; CRUZ, A.C.F.; CARVALHO, A.C.P.P.;  
2733 OLIVEIRA, E.J.; OTONI, W.C. Somatic embryogenesis in anthurium (*Anthurium*  
2734 *andraeanum* cv. Eidibel) as affected by different explants. **Acta Scientiarum.**  
2735 **Agronomy**, v.36, p.87-98, 2014.

2736 PINHEIRO, M.V.M.; MARTINS, F.B.; CRUZ, A.C.F.; CARVALHO, A.C.P.P.;  
2737 VENTRELLA, M.C.; OTONI, W.C. Maturation of *Anthurium andraeanum* cv. Eidibel  
2738 somatic embryos from explants of nodal segments. **In Vitro Cellular and**  
2739 **Developmental Biology - Plant**, v.49, p.304-312, 2013.

2740 ROCHA, D.I.; VIEIRA, L.M.; TANAKA, F.A.O.; SILVA, L.C.; OTONI, W.C.  
2741 Somatic embryogenesis of a wild passion fruit species *Passiflora cincinnata* Masters:  
2742 histocytological and histochemical evidences. **Protoplasma**, v.249, p.747-758, 2012.

2743 SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing  
2744 phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v.4, p.406-425, 1987.

2745 SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular cloning - a laboratory manual**. 3. ed.  
2746 New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001. 2344p.

2747 SANTA-CATARINA, C.; HANAI, L.R.; DORNELAS, M.C.; VIANA, A.M.; FLOH,  
2748 E.I.S. *SERK* gene homolog expression, polyamines and amino acids associated with  
2749 somatic embryogenic competence of *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae). **Plant**  
2750 **Cell, Tissue and Organ Culture**, v.79, p.53-61, 2004.

2751 SANTOS, M.D.O.; ROMANO, E.; YOTOKO, K.S.C.; TINOCO, M.L.P.; DIAS,  
2752 B.B.A.; ARAGÃO, F.J.L. Characterisation of the cacao *somatic embryogenesis*  
2753 *receptor-like kinase (SERK)* gene expressed during somatic embryogenesis. **Plant**  
2754 **Science**, v.168, p.723-729, 2005.

2755 SANTOS, M.O.; ROMANO, E.; VIEIRA, L.S.; BALDONI, A.B.; ARAGÃO, F.J.L.  
2756 Suppression of *SERK* gene expression affects fungus tolerance and somatic  
2757 embryogenesis in transgenic lettuce. **Plant Biology**, v.11, p.83-89, 2009.

2758 SAVONA, M.; MATTIOLI, R.; NIGRO, S.; FALASCA, G.; DELLA ROVERE, F.;  
2759 COSTANTINO, P.; DE VRIES, S.; RUFFONI, B.; TROVATO, M.; ALTAMURA,  
2760 M.M. Two *SERK* genes are markers of pluripotency in *Cyclamen persicum* Mill.  
2761 **Journal of Experimental Botany**, v.63, p.471-488, 2012.

2762 SCHELLENBAUM, P.; JACQUES, A.; MAILLOT, P.; BERTSCH, C.; MAZET, F.;  
2763 FARINE, S.; WALTER, B. Characterization of *VvSERK1*, *VvSERK2*, *VvSERK3* and  
2764 *VvLIL* genes and their expression during somatic embryogenesis of grapevine (*Vitis*  
2765 *vinifera* L.). **Plant Cell Reports**, v.27, p.1799-1809, 2008.

2766 SCHERWINSKI-PEREIRA, J.; DA SILVA GUEDES, R.; DA SILVA, R.; FERMINO,  
2767 P.; LUIS, Z.; DE OLIVEIRA FREITAS, E. Somatic embryogenesis and plant  
2768 regeneration in açai palm (*Euterpe oleracea*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**,  
2769 v.109, p.501-508, 2012.

2770 SCHMIDT, E.D.L.; GUZZO, F.; TOONEN, M.A.J.; DE VRIES, S.C. A leucine-rich  
2771 repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form  
2772 embryos. **Development**, v.124, p.2049-2062, 1997.

2773 SHAH, K. The Arabidopsis kinase-associated protein phosphatase controls  
2774 internalization of the somatic embryogenesis receptor kinase 1. **Genes & Development**,  
2775 v.16, p.1707-1720, 2002.

2776 SHARMA, S.K.; MILLAM, S.; HEIN, I.; BRYAN, G.J. Cloning and molecular  
2777 characterisation of a potato *SERK* gene transcriptionally induced during initiation of  
2778 somatic embryogenesis. **Planta**, v.228, p.319-330, 2008.

2779 SHIMADA, T.; HIRABAYASHI, T.; ENDO, T.; FUJII, H.; KITA, M.; OMURA, M.  
2780 Isolation and characterization of the somatic embryogenesis receptor-like kinase gene

2781 homologue (CitSERK1) from *Citrus unshiu* Marc. **Scientia Horticulturae**, v.103,  
2782 p.233-238, 2005.

2783 SHIU, S.H.; BLEECKER, A.B. Plant receptor-like kinase gene family: diversity,  
2784 function, and signaling. **Science's STKE**, v.2001, p.1-13, 2001.

2785 SINGLA, B.; KHURANA, J.P.; KHURANA, P. Characterization of three somatic  
2786 embryogenesis receptor kinase genes from wheat, *Triticum aestivum*. **Plant Cell**  
2787 **Reports**, v.27, p.833-843, 2008.

2788 SOMLEVA, M.N.; SCHMIDT, E.D.L.; DE VRIES, S.C. Embryogenic cells in *Dactylis*  
2789 *glomerata* L. (Poaceae) explants identified by cell tracking and by SERK expression.  
2790 **Plant Cell Reports**, v.19, p.718-726, 2000.

2791 SONG, D.; LI, G.; SONG, F.; ZHENG, Z. Molecular characterization and expression  
2792 analysis of *OsBISERK1*, a gene encoding a leucine-rich repeat receptor-like kinase,  
2793 during disease resistance responses in rice. **Molecular Biology Reports**, v.35, p.275-  
2794 283, 2008.

2795 STEINER, N.; SANTA-CATARINA, C.; GUERRA, M.; CUTRI, L.; DORNELAS, M.;  
2796 FLOH, E. A gymnosperm homolog of SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-  
2797 LIKE KINASE-1 (*SERK1*) is expressed during somatic embryogenesis. **Plant Cell**,  
2798 **Tissue and Organ Culture**, v.109, p.41-50, 2012.

2799 TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR,  
2800 S. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood,  
2801 evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and**  
2802 **Evolution**, v.28, p.2731-2739, 2011.

2803 THOMAS, C.; MEYER, D.; HIMBER, C.; STEINMETZ, A. Spatial expression of a  
2804 sunflower *SERK* gene during induction of somatic embryogenesis and shoot  
2805 organogenesis. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.42, p.35-42, 2004.

2806 TOMBOLATO, A.F.C.; QUIRINO, E.A.; COSTA, A.M.M. Antúrio (*Anthurium*  
2807 *andraeanum* Lindl.). In: TOMBOLATO, A.F.C.C., A. M. M (Ed.). **Micropropagação**  
2808 **de plantas ornamentais**. Campinas: Instituto Agrônômico, 1998. p.18-21.

2809 TOMBOLATO, A.F.C.; UZZO, R.P.; CASTRO, A.C.R.; SAKAI, M.; SAES, L.A.  
2810 Recursos genéticos e melhoramento do antúrio (*Anthurium andraeanum* Linden) no  
2811 IAC–APTA. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v.10, p.1-5, 2004.

2812 TUCKER, M.R.; ARAUJO, A.-C.G.; PAECH, N.A.; HECHT, V.; SCHMIDT, E.D.L.;  
2813 ROSSELL, J.-B.; DE VRIES, S.C.; KOLTUNOW, A.M.G. Sexual and apomictic  
2814 reproduction in *Hieracium* subgenus *Pilosella* are closely interrelated developmental  
2815 pathways. **The Plant Cell Online**, v.15, p.1524-1537, 2003.

2816 WEIJIE, X.; BIN, X.; GUANGDONG, W.; WEIMING, G.; FANGDE, W.; JIANPING,  
2817 J. Somatic embryogenesis and plant regeneration of *Anthurium andraeanum*. **Acta**  
2818 **Horticulturae Sinica**, v.33, p.1281-1286, 2006.

2819 YANG, C.; ZHAO, T.; YU, D.; GAI, J. Isolation and Functional Characterization of a  
2820 SERK Gene from Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). **Plant Molecular Biology**  
2821 **Reporter**, v.29, p.334-344, 2011.

2822 YANG, J.L.; SEONG, E.S.; KIM, M.J.; GHIMIRE, B.K.; KANG, W.H.; YU, C.Y.; LI,  
2823 C.H. Direct somatic embryogenesis from pericycle cells of broccoli (*Brassica oleracea*  
2824 L. var. *italica*) root explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.100, p.49-58,  
2825 2010.

2826 YOU, C.; FAN, T.; GONG, X.; BIAN, F.; LIANG, L.; QU, F. A high-frequency cyclic  
2827 secondary somatic embryogenesis system for *Cyclamen persicum* Mill. **Plant Cell,**  
2828 **Tissue and Organ Culture**, v.107, p.233-242, 2011.

2829 ZAKIZADEH, H.; STUMMANN, B.M.; LÜTKEN, H.; MÜLLER, R. Isolation and  
2830 characterization of four somatic embryogenesis receptor-like kinase (*RhSERK*) genes  
2831 from miniature potted rose (*Rosa hybrida* cv. Linda). **Plant Cell, Tissue and Organ**  
2832 **Culture**, v.101, p.331-338, 2010.

2833 ZHANG, S.; LIU, X.; LIN, Y.; XIE, G.; FU, F.; LIU, H.; WANG, J.; GAO, S.; LAN,  
2834 H.; RONG, T. Characterization of a *ZmSERK* gene and its relationship to somatic  
2835 embryogenesis in a maize culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.105, p.29-  
2836 37, 2011.

2837

## CONCLUSÕES GERAIS

2838

2839

2840 No presente trabalho constatou-se que as condições mais indicadas para a fase  
2841 de alongamento e enraizamento *in vitro* de plantas de *Etilingera elatior* cv Porcelana,  
2842 são as fotomixotróficas sob enriquecimento de CO<sub>2</sub> (1000 μmol mol<sup>-1</sup>), em frascos  
2843 vedados com membranas porosas a gases e mantidas em meio MS suplementado com  
2844 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose. O enriquecimento da atmosfera com CO<sub>2</sub> associado à redução de  
2845 sacarose adicionada ao meio de cultura promoveu a maior taxa de sobrevivência das  
2846 plantas às condições *ex vitro*. Durante as condições *in vitro*, foram observadas  
2847 alterações na anatomia da folha das plantas, que resultaram na melhoria do  
2848 desenvolvimento das mudas durante a fase de aclimatização.

2849 A indução de embriogênese somática em *Anthurium andraeanum* cv. Eidibel  
2850 originou-se a partir do padrão multicelular, com divisões celulares do meristema axilar  
2851 do segmento nodal; e com a sequência de eventos, foi possível observar a formação de  
2852 calos embriogênicos provenientes do meristema axilar. Com relação à mobilização das  
2853 reservas, constatou-se grãos de amido ao longo da etapa de diferenciação celular do  
2854 meristema axilar, durante a indução da embriogênese somática; e de proteínas totais na  
2855 fase de calos embriogênicos. Dessa forma, foi possível revelar tanto a origem quanto as  
2856 mudanças que ocorrem durante as etapas da indução da embriogênese somática em *A.*  
2857 *andraeanum*, ampliando a compreensão de como esse processo ocorre.

2858 O estudo de clonagem e caracterização molecular do gene *SERK* envolvido na  
2859 embriogênese somática de *A. andraeanum* permitiu isolar um possível membro dessa  
2860 família. Devido à elevada similaridade entre as sequências de aminoácidos das proteínas  
2861 *SERK* de *A. andraeanum* com as de outras plantas, ratificou-se que esse mecanismo é  
2862 bem conservado. Sendo assim, *SERK* pode ser utilizado para monitorar a transição de  
2863 células competentes em células e tecidos embriogênicos de *A. andraeanum*. Estudos de  
2864 hibridização *in situ*, demonstraram sinal positivo tanto nas células em divisão da região  
2865 do meristema axilar quanto em calos embriogênicos. No entanto, não foi observado  
2866 sinal de transcritos do gene *SERK* durante a fase de maturação dos embriões somáticos.

2867 O presente trabalho contribuiu na geração de conhecimentos a cerca da  
2868 propagação *in vitro* das espécies a partir das técnicas de propagação fotoautotrófica, em  
2869 bastão-do-imperador, caracterizando as respostas morfofisiológicas das plantas  
2870 submetidas às condições de crescimento heterotrófico, fotomixotrófico e  
2871 fotoautotrófico; e propagação *in vitro* do antúrio via embriogênese somática, abordando

2872 alterações estruturais e o acúmulo de reservas envolvidos durante a ontogênese dos  
2873 calos embriogênicos, além de caracterizar e analisar a expressão do gene *SERK* nessa  
2874 espécie.  
2875