



Induction of somatic embryogenesis in two cultivars of anthurium analysed by scanning electron microscopy

Indução à embriogênese somática em duas cultivares de antúrio analisadas por microscopia eletrônica de varredura

Priscila Bezerra dos Santos Melo¹, Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho^{2*}, Cândida Hermínia Campos de Magalhães Bertini¹, Celli Rodrigues Muniz², Adroaldo Guimarães Rossetti²

Abstract: Somatic embryogenesis is an advantageous tool in the commercial production of micropropagated anthurium plantlets. As such, the aim of this study was to establish a protocol for the induction of somatic embryogenesis in Jureia and Luau cultivars. Defoliated nodal segments, 1.0 cm in length and containing one bud, were used as explants. The experimental design was completely randomised, in a 2 x 3 x 5 factorial scheme (cultivar: Jureia and Luau x auxin: 2,4-D, NAA and Picloram x concentration: 0, 2.5, 5.0, 7.5, and 10.0 μM), with 30 treatments in a scheme of plots split over time (15, 30, 45, 60, 75 and 90 days). The anatomy and percentage of embryogenic callus formation were analysed. The structures formed, analysed by scanning electron microscopy, corresponded to embryogenic calli. The Luau cultivar was superior in forming embryogenic calli. For the two cultivars, among the auxins under study, NAA demonstrated a greater induction potential for somatic embryogenesis, with the concentration of 7.5 μM giving the highest mean values. The 90-day evaluation period showed the maximum formation of embryogenic calli; however, mean values were fairly similar to the 75-day evaluation period. To induce embryogenic calli, therefore, it is suggested that the nodal segments be inoculated into a culture medium with added NAA growth regulator at a concentration of 7.5 μM , and that the explants remain in this medium for 75 days after inoculation.

Key words: Microstructural analysis. Embryogenic calli. Micropropagation. *In vitro* morphogenesis.

Resumo: A embriogênese somática é uma vantajosa ferramenta para a produção comercial de mudas micropropagadas de antúrio. Assim, objetivou-se com este trabalho estabelecer um protocolo de indução à embriogênese somática das cultivares Jureia e Luau. Foram utilizados como explantes segmentos nodais desfolhados, de 1,0 cm de comprimento, contendo uma gema. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, conduzido em ensaio fatorial 2 x 3 x 5 (cultivar: Jureia e Luau x auxina: 2,4-D, ANA e Picloram x concentração: 0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10,0 μM), com 30 tratamentos em arranjo de parcelas subdivididas no tempo (15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias). Foram analisadas a anatomia e a percentagem de formação de calos embriogênicos. As estruturas formadas, analisadas por microscopia eletrônica de varredura, corresponderam a calos embriogênicos. A cultivar Luau foi superior quanto à formação de calos embriogênicos. Para as duas cultivares em estudo, dentre as auxinas estudadas, ANA demonstrou maior potencial de indução à embriogênese somática, e a concentração de 7,5 μM proporcionou as maiores médias. O período de 90 dias de avaliação foi aquele que apresentou a máxima formação de calos embriogênicos, porém, as médias foram bastante similares ao período de 75 dias de avaliação. Assim, são indicados, para a indução de calos embriogênicos, a inoculação dos segmentos nodais em meio de cultura suplementado com o regulador de crescimento ANA, na concentração de 7,5 μM , e que os explantes permaneçam nesse meio até os 75 dias após a inoculação.

Palavras-chave: Análise microestrutural. Calos embriogênicos. Micropropagação. Morfogênese *in vitro*.

*Corresponding author

Submitted for publication on 04/12/2018 and approved 19/01/2019

¹Departamento de Fitotecnia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil; priscila.santos07@outlook.com; candida_bertini@yahoo.com.br;

²Embrapa Agroindústria Tropical, Rua Doutora Sara Mesquita, 2270, Bairro Pici, 60511-110, Fortaleza, Ceará, Brasil; cristina.carvalho@embrapa.br; celli.muniz@embrapa.br; adroaldo.rossetti@embrapa.br

INTRODUCTION

The global market for the production and consumption of flowers and ornamental plants is valued at more than BRL 226 billion (IBRAFLO, 2017). In this economic sector, tropical floriculture is considered a profitable and viable alternative for small rural areas (JUNQUEIRA; PEETZ, 2011), making it possible to diversify both income and crops (OLIVEIRA FILHO *et al.*, 2014).

Among the tropical flowers of economic interest, the cultivation of anthurium both as a pot plant and as cut flowers is widely accepted on the domestic and foreign markets. Belonging to the genus *Anthurium* Schott., the main commercial species of anthurium is *Anthurium andraeanum* Linden (PINHEIRO *et al.*, 2009).

The propagation of anthurium can be carried out either sexually or asexually. The use of tissue culture favours vegetative multiplication in plants of this species through *in vitro* micropropagation, as well as providing new and promising perspectives for breeding and conservation of genetic resources (YUNUS *et al.*, 2012).

In the commercial micropropagation of anthurium, the plantlets are obtained by indirect organogenesis, i.e. from the induction of calli, with the later regeneration of adventitious buds (ATAK; ÇELIK, 2009). However, this method results in the frequent occurrence of somaclonal variation in the generated plantlets (BAUTISTA *et al.*, 2008), which is not desirable from the point of view of cloning.

Somatic embryogenesis is an *in vitro* morphogenetic pathway that has been used to obtain anthurium plantlets on a large scale and with less possibility of obtaining variant plants (PINHEIRO *et al.*, 2014). The formation of somatic embryos can be direct, when they originate directly from the explant, or indirect, when there is an intermediate callus phase (MENEZES *et al.*, 2012). With the indirect pathway, the formation of different types of calli may occur, which by monitoring the microstructure using Scanning Electron Microscopy (SEM) among other techniques, may be divided into embryogenic and non-embryogenic structures (CARVALHO *et al.*, 2015).

Somatic embryogenesis is generally induced by strong auxins i.e. more stable to degradation (ULISSES *et al.*, 2011). In anthurium, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and naphthaleneacetic acid (NAA) are, in that order, the most commonly used auxins. The most widely used explants are the leaves, but other organs/tissue can also be used with satisfactory results, such as nodal segments (BAUTISTA *et al.*, 2008; XU *et al.*, 2010; PINHEIRO *et al.*, 2013; PINHEIRO *et al.*, 2014; BHATTACHARYA *et al.*, 2016). Another interesting growth regulator to be studied is the auxin Picloram (4-amino-3,5,6-trichloropyridine-2-carboxylic acid), which also promotes high callus induction (PACHECO *et al.*, 2012).

INTRODUÇÃO

Mundialmente, o mercado de produção e consumo de flores e plantas ornamentais é avaliado em mais de R\$ 226 bilhões (IBRAFLO, 2017). Dentro deste setor econômico, a floricultura tropical é tida como um negócio lucrativo e considerada como alternativa viável para pequenas áreas rurais (JUNQUEIRA; PEETZ, 2011), possibilitando a diversificação de renda e cultivos (OLIVEIRA FILHO *et al.*, 2014).

Dentre as flores tropicais de interesse econômico, o cultivo do antúrio em vaso e como flor de corte tem boa aceitação nos mercados interno e externo (ANEFALOS *et al.*, 2010). Pertencente ao gênero *Anthurium* Schott., o antúrio tem como principal espécie comercializada o *Anthurium andraeanum* Linden (PINHEIRO *et al.*, 2009).

A propagação do antúrio pode ser feita por via sexuada ou assexuada. A utilização de técnicas da cultura de tecidos propicia a multiplicação vegetativa de plantas dessa espécie pela micropropagação *in vitro*, além de proporcionar perspectivas novas e promissoras para o melhoramento e a conservação dos recursos genéticos (YUNUS *et al.*, 2012).

Na micropropagação comercial do antúrio, as mudas são obtidas por organogênese indireta, isto é, a partir da indução de calos com posterior regeneração de gemas adventícias (ATAK; ÇELIK, 2009). No entanto, esse método proporciona taxas frequentes de ocorrência de variação somaclonal nas mudas obtidas (BAUTISTA *et al.*, 2008), que do ponto de vista clonal não é desejada.

Dessa forma, a embriogênese somática é uma via de morfogênese *in vitro* que vem sendo utilizada para obtenção de mudas de antúrio, em larga escala e com menores chances de obtenção de plantas variantes (PINHEIRO *et al.*, 2014). A formação dos embriões somáticos pode ocorrer de forma direta, quando são originados diretamente a partir do explante, ou indiretamente, quando há a fase intermediária de calo (MENEZES *et al.*, 2012). Na via indireta, pode ocorrer a formação de diferentes tipos de calos que por acompanhamento microestrutural podem ser diferenciados em estruturas embriogênicas e não embriogênicas, utilizando-se, entre outras técnicas, a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (CARVALHO *et al.*, 2015).

De maneira geral, a embriogênese somática é induzida por auxinas fortes, ou seja, mais estáveis à degradação (ULISSES *et al.*, 2011). Em antúrio, o ácido 2,4-diclorofenóxiacético (2,4-D) e o ácido naftalenoacético (ANA) são, nesta ordem, as auxinas mais utilizadas. Os explantes mais comumente empregados são as folhas, mas outros órgãos/tecidos também podem ser usados com resultados satisfatórios, como segmentos nodais (BAUTISTA *et al.*, 2008; XU *et al.*, 2010; PINHEIRO *et al.*, 2013; PINHEIRO *et al.*, 2014; BHATTACHARYA *et al.*, 2016). Outro regulador de crescimento interessante a ser estudado é a auxina Picloram (ácido 4-amino-3,5,6-tricloropiridina-2-carboxílico), que também promove alta indução de calos (PACHECO *et al.*, 2012).

With a view to optimising the *in vitro* production of anthurium plantlets (*Anthurium andraeanum* Linden) with a reduction in somaclonal variation in plantlets micropropagated by the use of somatic embryogenesis, the aim of this study was to establish a protocol for the induction of embryogenic calli from nodal segments in Jureia and Luau cultivars and visualise them in a scanning electron microscope.

MATERIAL AND METHODS

Induction of somatic embryogenesis

During the first semester of 2015, the induction stage of somatic embryogenesis was carried out in the Plant Tissue Culture Laboratory.

For the plant material, plantlets of the *Anthurium andraeanum* cultivars Jureia and Luau established *in vitro* were used, from which explants were obtained for the induction of somatic embryogenesis, comprising defoliated nodal segments, approximately 1.0 cm in length, containing one bud.

The basic culture medium used was ESA (PIERIK, 1976, modificado), containing macronutrients (NH_4NO_3 , KNO_3 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 and $\text{CaCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), micronutrients, FeDTA, myo-inositol and vitaminas, with 20 g L⁻¹ sucrose, solidified with 1.8 g L⁻¹ Gelrite, and pH adjusted to 5.8 prior to autoclaving at 121°C for 15 minutes.

The explants were inoculated horizontally, one per test tube (150 mm x 25 mm) containing 10.0 mL of culture medium under aseptic conditions, in a laminar flow hood. The tubes were sealed with a polypropylene cap wrapped in adherent stretch film and kept in a growth chamber at 25 ± 2°C, where they remained in the dark for 90 days.

The experiment was conducted in a completely randomised design, in a 2 x 3 x 5 factorial scheme: anthurium cultivars (Luau and Jureia); auxin (2,4-D - 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, NAA - Naphthaleneacetic Acid, and Picloram - 4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid); and concentrations (0, 2.5, 5.0, 7.5, and 10 µM), with 5 replications, each consisting of six test tubes, in split-plot over time. Periodic evaluations were made during the 90 days of inoculation in the dark, at 15, 30, 45, 60, 75 and 90 days. During this period, the formation of calli with embryogenic characteristics, semi-friable, of yellow colouration and radial growth (PINHEIRO *et al.*, 2014), was evaluated and expressed as a percentage (%).

Visando otimizar a propagação *in vitro* de antúrio (*Anthurium andraeanum* Linden) com redução da ocorrência de variação somaclonal nas mudas micropropagadas, pelo uso da técnica de embriogênese somática, objetivou-se com este trabalho estabelecer um protocolo de indução de calos embriogênicos a partir de segmentos nodais para as cultivares de Jureia e Luau e visualizá-los em microscópio eletrônico de varredura.

MATERIAL E MÉTODOS

Indução à embriogênese somática

Durante o primeiro semestre de 2015 foi realizada a etapa de indução à embriogênese somática no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais.

Como material vegetal, foram utilizadas mudas, estabelecidas *in vitro*, de *Anthurium andraeanum* cultivares Jureia e Luau, a partir das quais foram obtidos os explantes para indução à embriogênese somática, que constaram de segmentos nodais desfolhados com aproximadamente 1,0 cm de comprimento, contendo uma gema.

O meio de cultura básico utilizado foi o ESA (PIERIK, 1976, modificado), contendo macronutrientes (NH_4NO_3 , KNO_3 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 e $\text{CaCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), micronutrientes, FeDTA, mio-inositol e vitaminas, 20 g L⁻¹ de sacarose, solidificado com 1,8 g L⁻¹ de Gelrite, e pH ajustado para 5,8 antes de ser autoclavado a uma temperatura de 121 °C, por 15 minutos.

Os explantes foram inoculados, na horizontal, um por tubo de ensaio (150 x 25 mm), contendo 10,0 mL de meio de cultura, sob condições assépticas, em capela de fluxo laminar. Esses tubos foram vedados com tampa de polipropileno envolta por película esticável aderente e mantidos em câmara de crescimento a 25 ± 2 °C, permanecendo no escuro por 90 dias.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 2 x 3 x 5, sendo: cultivares de antúrio (Luau e Jureia); auxina (2,4-D - ácido 2,4-diclorofenóxiacético; ANA - ácido naftalenoacético; e Picloram - ácido 4- amino - 3, 5, 6 - tricloro picolínico) e concentrações (0; 2,5; 5,0; 7,5; e 10 µM), com 5 repetições, constituídas por 6 tubos de ensaio cada, em parcelas subdivididas no tempo. As avaliações periódicas foram realizadas durante os 90 dias de inoculação no escuro aos 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias. Nesse período foi avaliada a formação de calos com características embriogênicas, calos semifriáveis, de coloração amarela e crescimento radial (PINHEIRO *et al.*, 2014), expressa em percentagem (%).

For the analysis of variance, the collected data were transformed into $\arcsin \sqrt{p\%/100}$. The quantitative factors were studied using regression analysis. For the qualitative factors (auxins), the mean values were compared using Tukey's test, and the for cultivars (Luau and Jureia) by F-test, both at 5% probability.

Scanning Electron Microscopy (SEM)

The second stage of the experiment was carried out during the second semester of 2015 in the Microscopy Laboratory. To analyse the anatomical aspects of the structures formed in the nodal segments of Luau and Jureia cultivars of anthurium, samples were collected at 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63 and 70 days (two samples per day) after inoculation of the explants into a culture medium with an added 7.5 μM NAA.

The samples were fixed in Karnovsky solution, diluted in a 0.2 M phosphate buffer solution at pH 7.2 for a minimum period of 48 hours and placed in a refrigerator. The samples were then washed in three changes of phosphate buffer, each of 10 minutes, and post-fixed in osmium tetroxide (1%) for 1 h; they were then washed in distilled water and dehydrated in an ethanol solution of increasing concentration (20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90%) for 15 minutes each time, followed by three times in a 100% alcohol solution, again for 15 minutes each time. The samples were then dried in a critical point dryer, mounted on stubs and coated with platinum in a metalliser. Finally, they were placed in the SEM at an acceleration voltage of 15 Kv, to obtain the digital images.

RESULTS AND DISCUSSION

Induction of somatic embryogenesis

The experiment involved different factors that influenced responses relative to the formation of embryogenic calli. Analysis of variance of the data showed that these factors had an interactive effect on the responses that were obtained. In presenting the results, only interactions that showed a level of significance at 5% by the F-test were considered. The significant interactions were cultivar and auxin, concentration and auxin, concentration and cultivar, period of evaluation and cultivar, and period of evaluation and concentration.

In the interaction between cultivar and auxin (Tabela 1), the greatest percentage of embryogenic calli was obtained in the medium with added NAA for Jureia cultivar (12.24%), and added NAA (17.97%) and Picloram (16.12%) for Luau cultivar. With the Luau cultivar, all mean values were statistically superior to the Jureia cultivar, irrespective of the auxin under test, revealing a greater potential for indirect embryogenesis.

Para a análise de variância, os dados coletados foram transformados para $\arcsen \sqrt{p\%/100}$. Os fatores quantitativos foram estudados por meio da análise de regressão. As médias dos fatores qualitativos auxinas foram comparadas utilizando-se teste de Tukey, e as das cultivares (Luau e Jureia) o teste F, ambos a 5% de probabilidade.

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A segunda etapa do experimento foi conduzida durante o segundo semestre de 2015 no Laboratório de Microscopia. Para análise dos aspectos anatômicos das estruturas formadas nos segmentos nodais de antúrio das cultivares Luau e Jureia, foram recolhidas amostras aos 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63 e 70 dias (duas amostras por dia de coleta), após inoculação dos explantes em meio de cultura adicionado de 7,5 μM de ANA.

As amostras foram fixadas em solução Karnovsky, diluída em solução tampão fosfato 0,2 M de pH 7,2, por um período mínimo de 48 h e acondicionadas em geladeira. Em seguida, as amostras foram lavadas com 3 trocas de tampão fosfato de 10 minutos cada, sendo pós-fixadas em tetróxido de ósmio (1%) por 1 h, posteriormente foram lavadas em água destilada e desidratadas em soluções de etanol de concentração crescente (20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90%), por 15 minutos cada, e em solução 100% de álcool, por 3 vezes, de 15 minutos cada. As amostras foram secas em aparelho de secagem ao ponto crítico, montadas em stubs e recobertas com platina em metalizadora. Por fim, foram levadas ao MEV, sob uma voltagem de aceleração de 15 Kv, para a obtenção das imagens digitais.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Indução à embriogênese somática

O experimento envolveu diferentes fatores que influenciaram as respostas quanto à formação de calos embriogênicos. A análise de variância dos dados coletados demonstrou que estes fatores apresentaram efeito de interação sobre as respostas que foram obtidas. Para apresentação dos resultados, foram consideradas apenas as interações que apresentaram nível de significância a 5%, pelo teste F. As interações significativas foram: cultivar e auxina; concentração e auxina; concentração e cultivar; período de avaliação e cultivar; período de avaliação e concentração.

Para a interação entre cultivar e auxina (Tabela 1), o maior percentual de calos embriogênicos foi obtido no meio acrescido de ANA para a cv. Jureia (12,24%), e ANA (17,97%) e Picloram (16,12%) para a cv. Luau. Para cv. Luau, todas as médias foram estatisticamente superiores à cv. Jureia, independente da auxina testada, revelando maior potencial para embriogênese indireta.

The effect of the interaction between the factors concentration and auxin on the formation of embryogenic calli is shown in Figure 1.

O efeito da interação entre os fatores concentração e auxina na formação de calos embriogênicos está apresentado na Figura 1.

Table 1 - Breakdown of the interaction between cultivar x auxin, relative to the formation of embryogenic calli, for 90 days after the inoculation of nodal segments of the *Anthurium andraeanum* cultivars, Jureia and Luau

Tabela 1 - Desdobramento do efeito da interação entre cultivar e auxina, referente à formação de calos embriogênicos, durante 90 dias após a inoculação de segmentos nodais de *Anthurium andraeanum*, cvs. Jureia e Luau

Auxine	Embryogenic calli (%)	
	Cultivar	
	Jureia	Luau
2,4-D	7.13 Bb	10.60 Ab
NAA	12.24 Ba	17.97 Aa
Picloram	7.99 Bb	16.12 Aa

*Mean values followed by the same uppercase letter on a line and lowercase letter in a column do not differ by F-test ($p < 0.05$) or Tukey's test ($p < 0.05$) respectively.

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

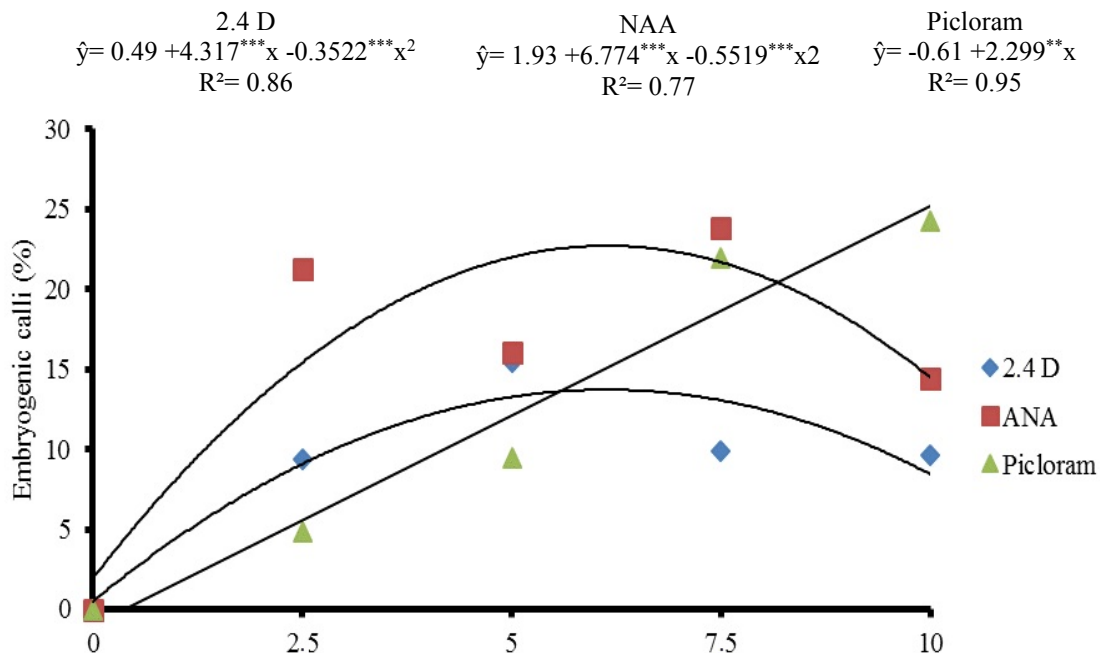


Figure 1 - Percentage of embryogenic calli as a function of auxin concentration, for nodal segments of *Anthurium andraeanum* inoculated into a somatic embryogenesis induction medium. ** $p < 0.001$ and *** $p < 0.0001$.

Figura 1 - Percentagem de calos embriogênicos em função das concentrações de auxinas, em segmentos nodais inoculados em meio de indução à embriogênese somática de *Anthurium andraeanum*. ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$.

For the 2,4-D and NAA auxins, the highest percentage of embryogenic calli was seen at a concentration of 5.0 μM (15.47%) and 7.5 μM (23.8%) respectively. From these concentrations on, the inhibitory effect of higher concentrations on the formation of embryogenic calli was seen.

For Picloram, the maximum mean value of formed embryogenic calli (24.22%) was seen at a concentration of 10.0 μM and was higher than the maximum found for the NAA medium. However, the medium with added NAA demonstrates a greater potential for the formation of embryogenic calli in Jureia and Luau cultivars, since it requires a lower concentration for the induction of somatic embryogenesis.

Auxins play an important role in inducing somatic embryogenesis. In anthurium, research involving the embryogenic pathway of *in vitro* morphogenesis is mostly conducted with NAA and 2,4-D. In the present study, NAA was the principal auxin responsible for the induction of somatic embryogenesis in Jureia and Luau cultivars of anthurium. Pinheiro (2010) obtained a similar result working with the Eidibel cultivar. In that study the author found that the NAA auxin at a concentration of 10 μM gave superior results for the establishment of embryogenic calli in nodal segments of the cultivar under study (1.23), expressed as the number of embryogenic calli formed. Bhattacharya *et al.* (2016) achieved the best results for obtaining embryogenic calli from leaf explants in a medium supplemented with NAA (2.68 μM) and BAP - 6-benzylaminopurine (0.27 μM). Other authors have been successful in inducing somatic embryos in anthurium with the 2,4-D auxin, such as in the research by Bautista *et al.* (2008) and Bhavana *et al.* (2018).

The effect of the interaction between the factors concentration and cultivar on the formation of embryogenic calli is shown in Figure 2.

For Jureia cultivar, increases in the concentration of auxins in the culture medium resulted in positive increments in the percentage of embryogenic calli. For this reason, the greatest mean value for the evaluated characteristic (15.20%) also coincided with the highest concentration of growth regulator (10.0 μM).

For Luau cultivar, the increase in concentration of the auxins results in an increase in the percentage of embryogenic calli up to a concentration of 7.5 μM , when the highest mean value is seen (22.48%).

The sensitivity of cell response to a stimulus depends on the endogenous substances present (GUERRA *et al.*, 1999). Thus, the results of the present study show that the endogenous hormone concentrations for an effect on somatic embryogenesis should be higher in the Luau cultivar, as it requires lower concentrations of growth regulator for the formation of embryogenic calli than does the Jureia cultivar.

The effect of the interaction between the factors period of evaluation and cultivar on the formation of embryogenic calli is shown in Figure 3.

Para as auxinas 2,4-D e ANA, as máximas percentagens de calos embriogênicos foram verificadas nas concentrações de 5,0 μM (15,47%) e 7,5 μM (23,8%), respectivamente. A partir destas concentrações foi observado efeito inibitório de concentrações mais elevadas sob a formação de calos embriogênicos.

Para Picloram, a média máxima de calos embriogênicos formados, de 24,22%, foi observada na concentração de 10,0 μM , sendo superior à máxima encontrada no meio ANA. No entanto, o meio adicionado de ANA demonstra maior potencial para a formação de calos embriogênicos para Jureia e Luau, pois requer menor concentração para a indução à embriogênese somática.

Auxinas desempenham importante papel na indução à embriogênese somática. Em antúrio, pesquisas envolvendo a via embriogênica de morfogênese *in vitro* são em sua maioria conduzidas com ANA e 2,4-D. No presente estudo, ANA foi a principal auxina responsável pela indução à embriogênese somática nas cultivares de antúrio Jureia e Luau. Pinheiro *et al.* (2014) tiveram resultado semelhante trabalhando com a cv. Eidibel. Nesse estudo, o autor constatou que a auxina ANA, na concentração de 10 μM , proporcionou resultado superior no estabelecimento de calos embriogênicos em segmentos nodais da cultivar estudada (1,23), expresso em número de calos embriogênicos formados. Bhattacharya *et al.* (2016) alcançaram melhores resultados para obtenção de calos embriogênicos em meio suplementado com ANA (2,68 μM) e BAP - 6, benzilaminopurina (0,27 μM), a partir de explante de folha. Outros autores tiveram sucesso na indução de embriões somáticos em antúrio, com a auxina 2,4-D, como nas pesquisas de Bautista *et al.* (2008) e Bhavana *et al.* (2018).

O efeito da interação entre os fatores concentrações e cultivares na formação de calos embriogênicos está apresentado na Figura 2.

Para Jureia, o aumento na concentração das auxinas no meio de cultura determinou incrementos crescentes no percentual de calos embriogênicos. Dessa forma, a maior média para a característica avaliada (15,20%), também coincide com a maior concentração dos reguladores de crescimento (10,0 μM).

Para Luau, o incremento da concentração das auxinas, resulta no aumento do percentual de calos embriogênicos até a concentração de 7,5 μM , quando se verifica maior média (22,48%).

A sensibilidade da célula em responder a um estímulo depende das substâncias endógenas presentes (GUERRA *et al.*, 1999). Assim, os resultados do presente estudo indicam que as concentrações endógenas hormonais com efeito sobre a embriogênese somática devem ser maiores na cv. Luau, que necessita de menor concentração de reguladores de crescimento para formação de calos embriogênicos do que a cv. Jureia.

O efeito da interação entre os fatores períodos de avaliação e cultivares na formação de calos embriogênicos está apresentado na Figura 3.

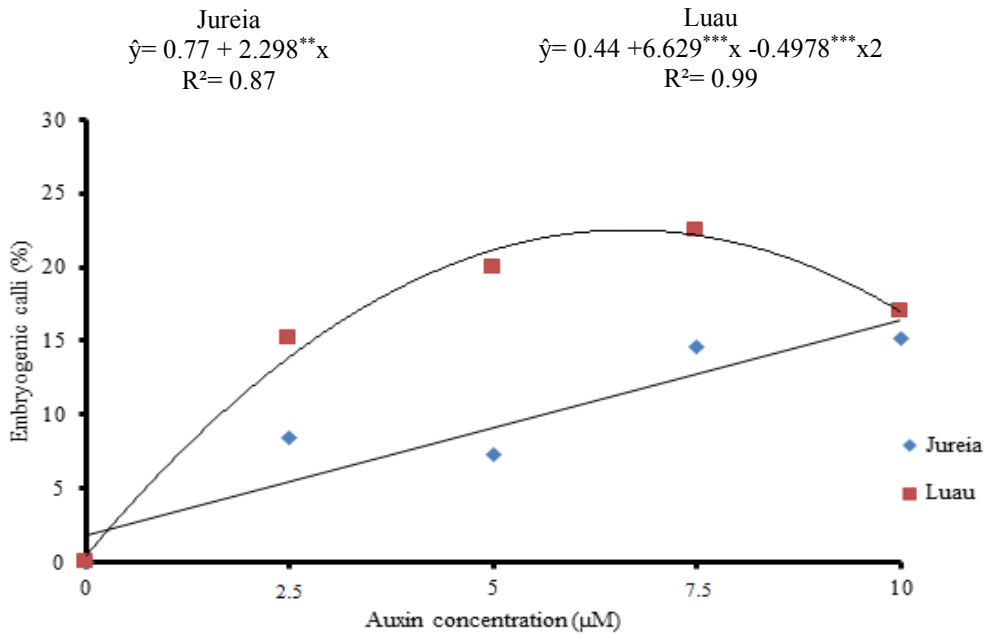


Figure 2 - Percentage of embryogenic calli as a function of auxin concentration for Jureia and Luau cultivars, in nodal segments of *Anthurium andraeanum* inoculated into a somatic embryogenesis induction medium. ** p <0.001 and *** p<0.0001.

Figura 2 - Percentagem de calos embriogênicos em função das concentrações de auxinas, para as cultivares Jureia e Luau, em segmentos nodais inoculados em meio de indução à embriogênese somática de *Anthurium andraeanum*. ** p<0,001 e *** p<0,0001.

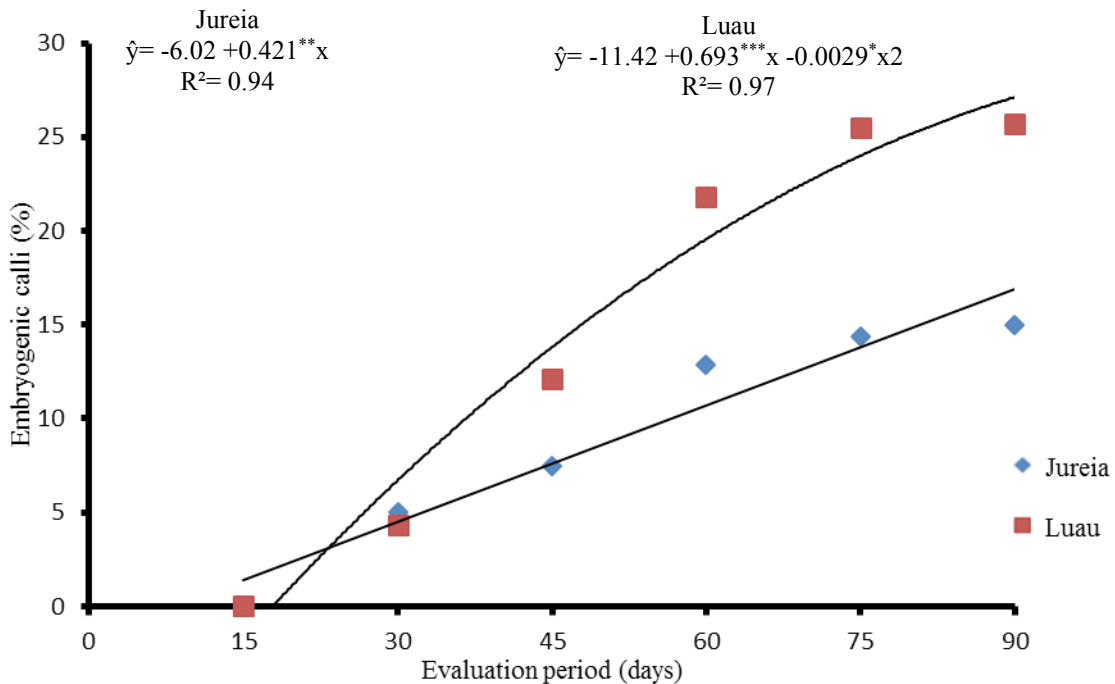


Figura 3 - Percentage of embryogenic calli as a function of the period of evaluation for Jureia and Luau cultivars, in nodal segments of *Anthurium andraeanum* inoculated into a somatic embryogenesis induction medium. *p <0.05, ** p <0.001 and *** p<0.0001.

Figura 3 - Percentagem de calos embriogênicos em função dos períodos de avaliação para as cultivares Jureia e Luau, em segmentos nodais inoculados em meio de indução à embriogênese somática de *Anthurium andraeanum*. * p<0,05, ** p<0,001 e *** p<0,0001.

Before day 30 of the evaluation, the first embryogenic calli were seen in the two cultivars under study. Other authors have reported similar periods for the onset of embryogenic callus formation in anthurium, such as Bautista *et al.* (2008), who noted the presence of calli from the fourth week of *in vitro* culture on leaf segments of *Anthurium andraeanum* Lind. 'Lambada'. Pinheiro (2010) saw the formation of the first embryogenic calli in the Eidibel cultivar from nodal segments and petioles after the fifth week of culture. In a study conducted by Bhattacharya *et al.* (2016) of *Anthurium andraeanum* 'Fantasia' with leaf explants, the first somatic embryos appeared after 28 days of culture in a somatic embryogenesis induction medium. Therefore, for anthurium, around at least four weeks may be necessary for *in vitro* morphogenesis to occur by the embryogenic pathway.

After 30 days, a positive linear increase was seen for Jureia cultivar in the percentage of embryogenic calli, due to the longer residence time of the explants in the induction medium. For Luau cultivar, there was a more pronounced increase in formed calli between 30 and 45 days evaluation. The mean values from 45 to 90 days evaluation were higher than those for the same period of evaluation in Jureia cultivar, however, this increase was not linear, and the maximum percentage of calli occurred at 90 days evaluation.

Because of the variety of morphogenic responses afforded by genotype-dependence, it is important that the procedures for *in vitro* propagation show specifications for the different *Anthurium* genotypes. In the present study, in order to obtain the same percentage of embryogenic calli, the explants of Jureia cultivar required a longer *in vitro* residence time than did the explants of Luau cultivar. Despite belonging to the same species, Jureia and Luau are distinct cultivars, which may explain these different responses. However, Guerra *et al.* (1999) state that responses to culture conditions are influenced not only by genotype but also by the source of the explant.

In the present study, the nodal segment of the explant proved to be responsive to somatic embryogenesis in the two cultivars under study. Various explants can be used to obtain somatic embryos, which may be either more or less responsive. Pinheiro *et al.* (2014) used as explants nodal segments containing only one node, petioles, root segments with no apex, complete leaves, and leaves sectioned perpendicular to the central vein to induce somatic embryogenesis. The most competent explants for the induction of embryogenic calli were derived from the petioles and nodal segments. The leaf explants showed no response to embryogenesis; however, Bhavana *et al.* (2018), working with leaf explants, obtained satisfactory results when inducing somatic embryogenesis.

Antes de 30 dias de avaliação foram observados os primeiros calos embriogênicos para as duas cultivares estudadas. Outros autores relataram períodos similares para o início da formação de calos embriogênicos em antúrio, como Bautista *et al.* (2008), em segmentos de folha de *Anthurium andraeanum* Lind. cv. Lambada, observaram a presença de calos a partir da quarta semana de cultivo *in vitro*. Pinheiro *et al.* (2014) verificaram a formação dos primeiros calos embriogênicos da cv. Eidibel, a partir de segmento nodal e pecíolo, após a quinta semana de cultivo. Em estudo conduzido por Bhattacharya *et al.* (2016), para *Anthurium andraeanum* cv. Fantasia, a partir de explantes de folha, após 28 dias de cultivo em meio de indução à embriogênese somática, surgiram os primeiros embriões somáticos. Assim, para antúrio, cerca de no mínimo quatro semanas, podem ser necessárias para que ocorra a morfogênese *in vitro* pela rota embriogênica.

A partir de 30 dias, para Jureia, foi observado aumento linear positivo no percentual de calos embriogênicos, em função do maior tempo de permanência dos explantes no meio de indução. Para Luau, entre 30 e 45 dias de avaliação, houve aumento mais acentuado de calos formados. As médias dos 45 aos 90 dias de avaliação foram superiores àquelas para os mesmos períodos de avaliação em Jureia, no entanto, este aumento não foi linear, e a máxima percentagem de calos ocorreu aos 90 dias de avaliação.

Em virtude da variedade de respostas morfogênicas propiciadas pelo genótipo-dependência, é importante que os procedimentos de propagação *in vitro* apresentem especificações quanto aos diferentes genótipos de antúrio. No presente trabalho, para obter um mesmo percentual de calos embriogênicos, foi necessário maior tempo de permanência *in vitro* dos explantes da cv. Jureia, e menor tempo para os explantes da cv. Luau. Apesar de pertencerem à mesma espécie, Jureia e Luau são cultivares distintas, o que pode justificar essas diferentes respostas. No entanto, Guerra *et al.* (1999) afirmam que as respostas às condições de cultivo são influenciadas não somente quanto ao genótipo, mas também quanto à fonte de explante.

No presente estudo, o explante segmento nodal se mostrou responsivo para a embriogênese somática nas duas cultivares estudadas. Vários são os explantes que podem ser utilizados para a obtenção de embriões somáticos, podendo ser mais ou menos responsivos. Pinheiro *et al.* (2014) utilizaram, como explantes de antúrio cv. Eidibel, segmentos nodais contendo apenas um nó, pecíolo, segmentos de raiz sem o ápice, folhas completas e folhas seccionadas perpendicularmente à nervura central para indução à embriogênese somática. Os explantes mais competentes para a indução de calos embriogênicos foram derivados a partir de pecíolos e segmentos nodais. Os explantes foliares não tiveram resposta para a embriogênese, no entanto, Bhavana *et al.* (2018), trabalhando com explantes foliares, obtiveram resultados satisfatórios de indução à embriogênese somática.

The effect of the interaction between the factors period of evaluation and concentration on the formation of embryogenic calli is shown in Figure 4.

Irrespective of the auxin concentration, the percentage of embryogenic calli as a function of the evaluation period was described by linear model. The concentration of 7.5 μM resulted in greater increments, 0.91 calli per day of evaluation, exceeding the concentration of 10 μM . Guerra *et al.* (1999) point out that keeping embryogenic cultures for a prolonged period in a medium containing 2,4-D can induce genetic and epigenetic variations. Furthermore, according to the authors, somatic embryos may become accustomed to prolonged periods of subculture in 2,4-D, resulting in the loss of maturation potential. These factors affect the embryogenic potential of the cultures. It is therefore probable that in the present study there was a certain loss of somatic embryogenesis induction capacity due to the prolonged residence time of the explants in the embryogenesis induction medium.

O efeito da interação entre os fatores período de avaliação e concentração na formação de calos embriogênicos está apresentado na Figura 4.

Independentemente da concentração de auxina, o percentual de calos embriogênicos em função do período de avaliação foi descrito por modelo linear. A concentração de 7,5 μM determinou maiores incrementos, 0,91 calos por dia de avaliação, superando a concentração de 10 μM . Guerra *et al.* (1999) ressaltam que a manutenção prolongada das culturas embriogênicas em meio com 2,4-D pode induzir variações genéticas e epigenéticas. Além disso, ainda segundo os autores, os embriões somáticos podem se tornar habituados durante períodos prolongados de subcultivos em 2,4-D, resultando na perda de potencial de maturação. Estes fatores afetam o potencial embriogênico das culturas. Assim, é provável que no presente estudo tenha ocorrido uma certa perda da capacidade de indução à embriogênese somática pelo tempo prolongado de permanência dos explantes no meio de indução à embriogênese.

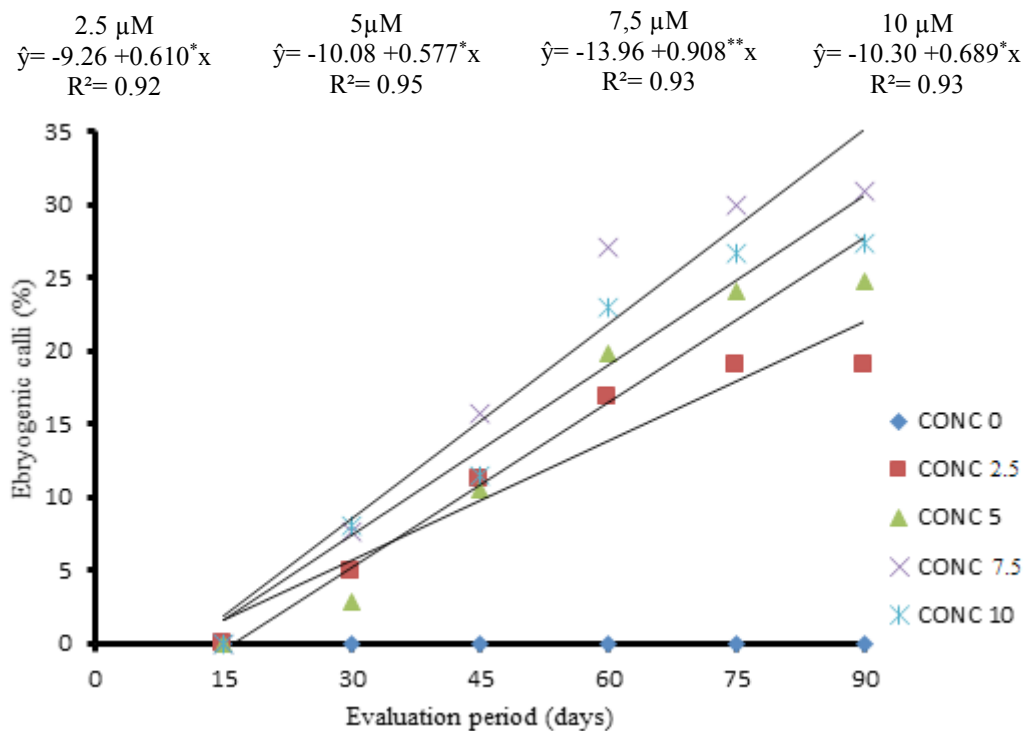


Figure 4 - Percentage of embryogenic calli as a function of the period of evaluation for auxin concentration, in nodal segments of *Anthurium andraeanum* inoculated into a somatic embryogenesis induction medium. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.001$.

Figura 4 - Percentagem de calos embriogênicos em função dos períodos de avaliação para as concentrações de auxina, em segmentos nodais inoculados em meio de indução à embriogênese somática de *Anthurium andraeanum*. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$.

From 45 days, mean values at the concentration level of 7.5 μM were higher than at the other concentrations, and despite the 90-day period giving the highest mean values for all concentrations, these were similar to those found after 75 days evaluation, i.e. with 15 less days for obtaining embryogenic calli at a similar rate.

These results demonstrate that for this study the concentration of 7.5 μM is the most suitable for obtaining embryogenic calli in greater quantity and over a shorter period, just as 75 days is the ideal period for obtaining a satisfactory percentage of embryogenic calli in the cultivars under study.

Scanning Electron Microscopy (SEM)

The SEM images of the samples collected from the 7th day of culture in the somatic embryogenesis induction medium can be seen in Figure 5 for Jureia (5A) and Luau (5B) cultivars. It can be seen that the two cultivars presented similar calli development, and that the structures registered only after 21 days of culture in the induction medium.

The structures formed during the 70 days the explants were submitted to the somatic embryogenesis induction medium had a friable appearance, with yellow colouration, radial growth and rounded cells, and were more easily separated from one another. These same observations were made by Pinheiro *et al.* (2014), for embryogenic structures formed on explants of nodal segments of the anthurium cultivar Eidibel after the fifth week of culture in a medium with an added 10.0 μM NAA.

Of the SEM images, those showing the most relevant information for the development of embryogenic calli were selected for Jureia and Luau cultivars (Figures 6A and 6B respectively).

After 7 days of culture, the samples of Jureia (Figura 6A) and Luau (Figura 6B) cultivars, presented a structural appearance with no swelling of the cells. However, at 21 days, the samples of the two cultivars displayed a marked increase in cells, indicating intense cell division. After swelling, the cells went from elongated to rounded, and at 42 days, it was possible to visualise these cells clearly inside the structure of the callus in both cultivars. With time, the cells became more individualised and similar to somatic embryos at the globular stage. Images of the samples from Jureia cultivar at day 56 (Figura 6A) and from the Luau cultivar at day 70 (Figura 6B) demonstrate these findings.

A partir dos 45 dias, as médias obtidas na concentração de 7,5 μM foram superiores àquelas apresentadas pelas demais concentrações e, apesar do período de 90 dias proporcionar as maiores médias para todas as concentrações, estas foram similares àquelas verificadas aos 75 dias de avaliação, ou seja, com 15 dias a menos para obtenção de calos embriogênicos a uma taxa similar.

Esses resultados evidenciam que neste estudo a concentração de 7,5 μM é a mais adequada para obter calos embriogênicos em maior quantidade e menor período de tempo, bem como o período de 75 dias é o ideal para obtenção de percentual satisfatório de calos embriogênicos para as cultivares em estudo.

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As imagens de MEV referentes às amostras coletadas a partir do 7º dia de cultivo em meio de indução à embriogênese somática podem ser observadas na Figura 5, para Jureia (5A) e Luau (5B). Pode-se observar que as duas cultivares apresentaram desenvolvimento de calos de forma similar, e que o registro dessas estruturas só ocorreu a partir dos 21 dias de cultivo no meio de indução.

As estruturas formadas, no decorrer dos 70 dias em que os explantes foram submetidos ao meio de indução à embriogênese somática, apresentaram aspecto friável, de coloração amarela e de crescimento radial, células com formato arredondado e mais facilmente separáveis umas das outras. Essas mesmas observações foram feitas por Pinheiro *et al.* (2014), para as estruturas embriogênicas formadas em explantes de segmentos nodais de antúrio cv. Eidibel, após a quinta semana de cultivo em meio adicionado de 10,0 μM de ANA.

A partir da MEV, foram selecionadas as imagens que apresentaram as informações mais relevantes sobre o desenvolvimento dos calos embriogênicos, para as cultivares Jureia e Luau (Figuras 6A e 6B, respectivamente).

Aos 7 dias de cultivo, as amostras das cultivares Jureia (Figura 6A) e Luau (Figura 6B), apresentaram aspecto estrutural sem intumescimento das células. Porém, aos 21 dias, as amostras correspondentes às duas cultivares, apresentaram aumento proeminente das células, indicando intensa divisão celular. A partir do intumescimento, as células passaram do formato alongado para arredondado. E aos 42 dias, foi possível visualizar nitidamente essas células por dentro da estrutura do calo, para ambas cultivares. Com o tempo, as células se tornaram mais individualizadas, passando a ser semelhantes a embriões somáticos em estágio globular. As imagens das amostras dos 56 dias para Jureia (Figura 6A) e 70 dias para Luau (Figura 6B) demonstram essas observações.



Figure 5 - Samples of nodal segment explants (± 1.0 cm) of the anthurium cultivars Jureia (5A) and Luau (5B) used in the SEM for three-dimensional analysis of the structures formed at 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63 e 70 days (d) of culture in the somatic embryogenesis induction medium (ESA + 7.5 μ M NAA).

Figura 5 – Amostras de explantes de segmento nodal ($\pm 1,0$ cm) de antúrio cv. Jureia (A) e cv. Luau (B), utilizadas na MEV, para análise tridimensional das estruturas formadas aos 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63 e 70 dias (d) de cultivo em meio de indução à embriogênese somática (ESA + 7,5 μ M de ANA).

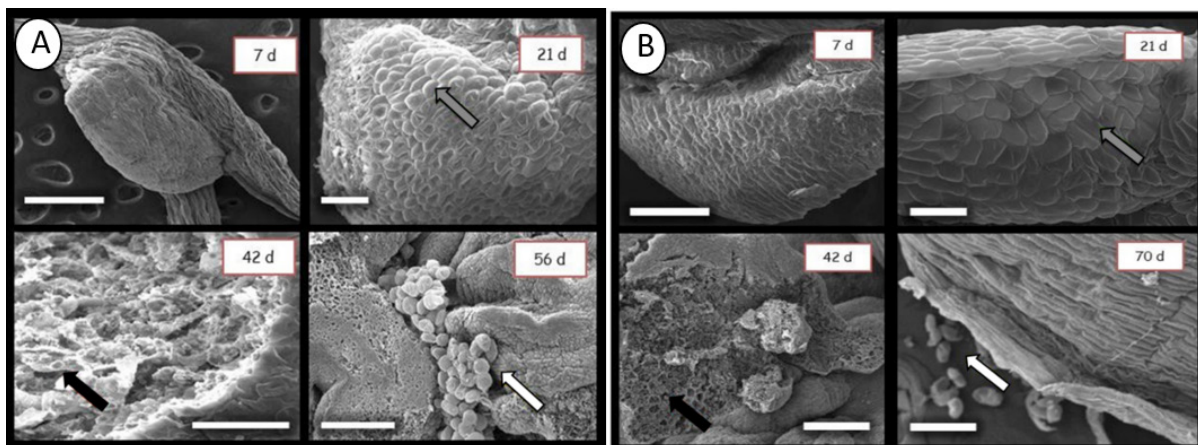


Figure 6 - Images obtained by SEM of samples of nodal segments of the anthurium cultivars Jureia (A) and Luau (B), corresponding to 7, 21, 42 and 70 days of culture in the somatic embryogenesis induction medium (ESA + 7.5 μ M NAA). The arrows show: grey, swollen and elongated cells; black, rounded cells; white, individualised cells. Bars: 200 μ m (7 d, 42 d e 70 d); 100 μ m (21 d).

Figura 6 – Imagens, obtidas por MEV, das amostras de segmento nodal de antúrio cv Jureia (A) e cv. Luau (B), correspondentes aos 7, 21, 42 e 70 dias de cultivo em meio de indução à embriogênese somática (ESA + 7,5 μ M de ANA). As setas indicam: cinza, células intumescidas e alongadas; preta, células com formato arredondado; branca, células individualizadas. Barras: 200 μ m (7 d, 42 d e 70 d); 100 μ m (21 d).

Similar results were reported by Pinheiro (2014). Using SEM and histological analysis, the author followed the development of somatic embryos in the anthurium 'Eidibel', noting that after 15 days in the somatic embryogenesis induction medium the axillary meristem of the explants presented swelling; at 40-45 days, after rupturing of the nodal segment epidermis, the embryogenic calli became visible; at 50-55 days it was possible to see the formation of friable embryogenic calli from differentiation of the meristematic cells; and at 90 days somatic embryos were evident. Bhavana *et al.* (2018) using SEM, also followed the formation of embryogenic calli in the A1P and A2W strains of anthurium. In images obtained from leaf explants, completely compacted cells were seen on the external surface, and a large number of cells with a defined division plane, globular protrusions and the torpedo, heart and cotyledonary stages of somatic embryos.

In the present study, embryogenic characteristics were seen in the structures formed from explants of Jureia and Luau cultivars of anthurium.

CONCLUSIONS

The induction of somatic embryogenesis in nodal segments is viable as a first step in obtaining plantlets of anthurium (*Anthurium andraeanum*) from somatic embryos in Luau and Jureia cultivars;

To achieve efficient induction of somatic embryogenesis in these cultivars, the culture medium should be supplemented with NAA growth regulator at a concentration of 7.5 μM .

After inoculation, the explants should remain in the induction medium for 75 days.

The two cultivars under study show the development of calli with embryogenic characteristics, which can be visualised after 21 days of culture in the induction medium.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the Instituto Agronômico (IAC) for supplying the *in vitro* plantlets for this work and Embrapa Agroindústria Tropical for access to the Plant Tissue Culture Laboratory and the Microscopy Laboratory for the work to be carried out. The authors would also like to thank the Universidade Federal do Ceará for their assistance with the research and CNPq, for the scholarship offered to the lead author.

Resultados similares foram relatados por Pinheiro (2014). Por MEV e análises histológicas, o autor acompanhou o desenvolvimento de embriões somáticos em antúrio cv. Eidibel, constatando aos 15 dias, em meio de indução de embriogênese somática, que o meristema axilar dos explantes apresentou intumescimento; aos 40-45 dias, os calos embriogênicos tornaram-se visíveis, após rompimento da epiderme do segmento nodal; aos 50-55 dias foi possível observar a formação de calos embriogênicos friáveis, a partir da diferenciação das células meristemáticas; e aos 90 dias foram evidenciados embriões somáticos. Bhavana *et al.* (2018) também acompanharam a formação de calos embriogênicos nas linhas de antúrio A1P e A2W por MEV. Nas imagens obtidas, a partir de explantes foliares, foram observadas células totalmente compactadas da superfície externa e grande número de células com plano definido de divisões, saliências globulares e estágios torpedo, cardíaco e cotiledonar de embriões somáticos.

No presente estudo, características embriogênicas foram observadas nas estruturas formadas a partir dos explantes de antúrio Jureia e Luau.

CONCLUSÕES

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

Para obtenção de uma eficiente indução à embriogênese somática dessas cultivares, é indicado que o meio de cultura seja suplementado com o regulador de crescimento ANA, na concentração de 7,5 μM ;

Os explantes devem permanecer em meio de indução até os 75 dias após a inoculação;

As duas cultivares estudadas possuem o desenvolvimento de calos com características embriogênicas, podendo ser visualizados a partir dos 21 dias de cultivo no meio de indução.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Instituto Agronômico (IAC) por ceder as mudas *in vitro* para a realização deste trabalho; à Embrapa Agroindústria Tropical por ceder o Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais e o Laboratório de Microscopia para condução do trabalho; à Universidade Federal do Ceará, pelo auxílio à pesquisa; e ao CNPq, pela concessão de bolsa ao primeiro autor.

CITED SCIENTIFIC LITERATURE

- ANEFALOS, L. C.; TOMBOLATO, A. F. C.; RICORDI, A. Panorama atual e perspectivas futuras da cadeia produtiva de flores tropicais: o caso do antúrio. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 16, n. 1, p. 107-111, 2010.
- ATAK, Ç.; ÇELIK, Ö. Micropropagation of *Anthurium andraeanum* from leaf explants. **Pakistan Journal of Botany**, v. 43, n. 3, p. 1155-1161, 2009.
- BAUTISTA, N. R.; PEÑALVER, D. A.; RODRÍGUEZ, R. B.; CHIU, W. C.; LÓPEZ, R. C.; TERRY, F. J.; PERALTA, M. P.; MARTÍNEZ, O. G. Embriogénesis somática en (*Anthurium andraeanum* Lind.) variedad “Lambada”. **Revista Ra Ximhai**, v. 4, n. 1, p. 135-149, 2008.
- BHATTACHARYA, C.; DAM, A.; KARMAKAR, J.; BANDYOPADHYAY, T. K. Direct somatic embryogenesis and genetic homogeneity assessment of regenerated plants of *Anthurium andraeanum* Linden cv. Fantasia. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 52, p. 512-519, 2016.
- BHAVANA, G. P.; SATYAN, K. B.; ASWATH, C. A regenerative protocol and SEM study for *in vitro* propagation of *Anthurium* crossed lines via indirect somatic embryogenesis. **Biotechnological Communication**, v. 11, n. 1, p. 31-40, 2018.
- CARVALHO, M. A. F.; PAIVA, R.; HERRERA, R. C. H.; ALVES, E.; CASTRO, E. M.; PAIVA, P. D. O.; VARGAS, D. P. Indução, análises morfológicas e ultraestruturais de calos de maracujazeiro nativo. **Revista Ceres**, v. 62, n. 4, p. 340-346, 2015.
- GUERRA, P. G.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogénesis somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, I. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-CNPQ, v. 2, p. 533-568, 1999.
- IBRAFLOR. Dados do setor: O mercado internacional. Informativo IBRAFLOR, v.81, dez-2017. Disponível em <http://www.ibraflor.com/site/wp-content/uploads/2017/12/Boletim-Ibraflor-12-2017.pdf>. Acessado em 03/03/2018.
- JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, M. S. Balanço do comércio exterior da floricultura brasileira. **Hórtica consultoria e treinamento**, 2011.
- MENEZES, T. S. A.; SANTOS, T. C.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; BLANK, A. F. Embriogénesis somática de variedades superiores de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). **Revista Gestão, Inovação e Tecnologias**, v. 2, n. 1, p. 32-41, 2012.
- OLIVEIRA FILHO, S. F. S.; MELO, A. S.; XAVIER, L. F.; SOBEL, T. F.; COSTA, E. F. Adoção de estratégias para redução de riscos: identificação dos determinantes da diversificação produtiva no Polo Petrolina-Juazeiro. **Revista Economia e Sociologia Rural**, v. 52, n. 1, p. 117-138, 2014.
- PACHECO, G.; GARCIA, R.; LUGATO, D.; VIANNA, M.; Mansur, E. Plant regeneration, callus induction and establishment of cell suspension cultures of *Passiflora alata* Curtis. **Scientia Horticulturae**, v. 144, p. 42-47, 2012.
- PIERIK, R. L. M. *Anthurium andraeanum* Lindl. plantlets produced from callus tissuescultivated *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, v. 37, p. 80-82, 1976.
- PINHEIRO, M. V. M.; DIAS, G. M. G.; CARVALHO, A. C. P. P.; BARROS, L. M. Micropropagação de antúrio ‘IAC Eidibel’ por meio da indução ao estiolamento e regeneração de plantas. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 15, n. 2, p. 133-142, 2009.
- PINHEIRO, M. V. M.; MARTINS, F. B.; CRUZ, A. C. F.; CARVALHO, A. C. P. P.; VENTRELLA, M. C.; OTONI, W. Maturation of *Anthurium andraeanum* cv. Eidibel somatic embryos from nodal segments. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 49, p. 304-312, 2013.
- PINHEIRO, M. V. M. **Propagação fotoautotrófica de *Etinglera elatior* ‘Porcelana’ e aspectos anatômicos e caracterização e expressão do gene *SERK* na embriogénesis somática em *Anthurium andraeanum* ‘Eidibel’**. 2014. 115 f. Tese (Doutorado em Botânica) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.
- PINHEIRO, M. V. M.; MARTINS, F. B.; CRUZ, A. C. F.; CARVALHO, A. C. P. P.; OLIVEIRA, E. J.; OTONI, W. C. Somatic embryogenesis in anthurium (*Anthurium andraeanum* cv. Eidibel) as affected by different explants. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 36, n. 1, p. 87-98, 2014.
- ULISSES, C.; ALBUQUERQUE, C. C.; WILLADINO, L.; CAMARA, T. R. Indução de embriões somáticos a partir de embriões zigóticos de *Heliconia bihai* (L.) L. cv. Lobster Claw Two. **Revista Ceres**, v. 58, n. 5, p. 537-541, 2011.
- XU C. Y.; CHEN, X. X.; XIN, W. J.; WANG G. D. Some physiological and biochemical characteristics of different developmental stages of somatic embryogenesis in *Anthurium andraeanum*. **Guangxi Zhiwu / Guihaia**, v. 30, n. 1, p. 117-121, 2010.
- YUNUS, M. F.; AZIZ, M. A.; KADIR, M. A.; RASHID, A. A. *In vitro* propagation of *Etilingera elatior* (Jack) (torch ginger). **Scientia Horticulturae**, v. 135, p. 145-150, 2012.