



# The *in vitro* multiplication of anthurium cv. Eidibel

## Multiplicação *in vitro* de antúrio cv. Eidibel

Isabelly Maria Barros de Lima<sup>1</sup>, Arlene Santisteban Campos<sup>2</sup>, Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho<sup>3\*</sup>

**Abstract:** Anthurium is one of the most marketed species in international floriculture. The availability of sufficient plants of phytosanitary quality is a limiting factor in their commercial cultivation. Micropropagation is the most common technique used in producing plantlets on a large scale. The aim of this study was to determine the most suitable relationship between growth medium, BAP concentration and photoperiod for increasing the *in vitro* multiplication rate of the 'Eidibel' cultivar. A completely randomised design was used in a 2 x 9 x 2 factorial scheme with 20 replications. The treatments comprised combinations of two types of growth medium (MS and Pierik), nine concentrations of BAP (0.0; 1.11; 2.22; 3.33; 4.44; 5.55; 6.66; 7.77 and 8.88 µM), and two photoperiods (12 and 16 h). The number of shoots per explant (NSE) and percentage of explants forming organogenic calli (FOC) and roots (FR) were evaluated after 60 days. The highest values for NSE, 3.66 and 4.69, were obtained in the MS and Pierik growth media, containing 8.88 µM and 4.85 µM BAP respectively. The NSE was higher under the 12-hour regime in the MS medium, and equal under the two photoperiods in the Pierik medium. The lower the BAP concentration, the greater the percentage of root formation and the smaller the percentage of organogenic calli. The Pierik medium is recommended for the production of micropropagated 'Eidibel' plantlets, with the addition of 4.85 µM BAP, under a photoperiod of 12 h.

**Key words:** *Anthurium andraeanum*. Plant tissue culture. Floriculture.

**Resumo:** O antúrio é uma das espécies mais comercializadas no mercado internacional de floricultura. A disponibilidade de mudas em quantidade e qualidade fitossanitária é fator limitante para seu cultivo comercial. A micropropagação é a técnica mais utilizada na produção de mudas em larga escala. Assim, objetivou-se determinar a relação mais adequada entre meio de cultivo, concentração de BAP e fotoperíodo, para aumentar a taxa de multiplicação *in vitro* da cultivar 'Eidibel'. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 9 x 2, com 20 repetições. Os tratamentos foram gerados pela combinação de dois meios de cultivo (MS e Pierik), nove concentrações de BAP (0.0; 1,11; 2,22; 3,33; 4,44; 5,55; 6,66; 7,77 e 8,88 µM) e dois fotoperíodos (12 e 16 h). Aos 60 dias, avaliou-se número de brotos por explante (NBE) e porcentagem de explantes com calos organogênicos (FCO) e raízes (FR). Os maiores NBE, 3,66 e 4,69, foram obtidos nos meios de cultivo MS e Pierik, contendo 8,88 µM e 4,85 µM de BAP, respectivamente. NBE foi superior no regime de 12 h, no meio MS, e igual nos dois fotoperíodos, no meio Pierik. Quanto menor a concentração de BAP, maior a porcentagem de formação de raízes e menor a de calos organogênicos. Para produção de mudas micropropagadas de 'Eidibel', recomenda-se utilização do meio Pierik adicionado de 4,85 µM de BAP, no fotoperíodo de 12 h.

**Palavras-chave:** *Anthurium andraeanum*. Cultura de tecidos vegetais. Floricultura.

\*Corresponding author

Submitted for publication on 25/04/2020, approved on 21/06/2020 and published on 31/08/2020

<sup>1</sup>Departamento de Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. E-mail: [isabellydelima18@gmail.com](mailto:isabellydelima18@gmail.com)

<sup>2</sup>Departamento de Ciência do Solo, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil. E-mail: [arlenesan@yahoo.com.br](mailto:arlenesan@yahoo.com.br)

<sup>3</sup>Embrapa Agroindústria Tropical, Rua Doutora Sara Mesquita, 2270, Bairro Pici, 60511-110, Fortaleza, Ceará, Brasil. E-mail: [cristina.carvalho@embrapa.br](mailto:cristina.carvalho@embrapa.br)

## INTRODUCTION

Anthurium (*Anthurium andraeanum* Linden) is one of the most cultivated flowers in tropical and subtropical countries (BHAVANA *et al.*, 2018). On the global market for tropical cut flowers, orchids and anthuriums rank first and second respectively in commercial value (PERERA *et al.*, 2016). Anthurium is also sought after as a potted plant and for landscaping (GUADALUPE; MAYANIN, 2017).

Among the varieties of anthurium launched by the Instituto Agronomico (IAC), 'Eidibel' has a strong red spathe, the most sought-after colour on the cut-flower market, and for this reason is the most cultivated in Brazil (PINHEIRO *et al.*, 2009).

Despite the high demand, the cultivation of anthurium is still limited, mainly due to the lack of plants of high phytosanitary and genetic quality (SOSA-FLORES *et al.*, 2019). Propagation is both sexual (via seeds) and asexual (DESAI *et al.*, 2015). However, micropropagation has been used as an alternative for the large-scale multiplication of cultivars of high commercial value and high phytosanitary quality (DESAI *et al.*, 2015).

Several protocols are available in the scientific literature for the production of micropropagated plantlets of *Anthurium andraeanum* via organogenesis (ISLAM *et al.*, 2010; GU *et al.*, 2012; CARDOSO; HABERMANN, 2014; AJDARBIN *et al.*, 2015; BHATTACHARYA *et al.*, 2015; PERERA *et al.*; 2016; GUADALUPE; MAYANIN, 2017; PRAKASHA *et al.*, 2017; SAPTARI *et al.*, 2017; THOKCHOM; MAITRA, 2017; ZHANG *et al.*, 2017). Silva *et al.* (2015) state that the MS growth medium (MURASHIGE; SKOOG, 1962) is the most often used in the *in vitro* propagation of anthurium. Although Pierik (1976) was the first to test several modifications of the MS medium, changing the concentration of the components. The methodology proposed by Tombolato *et al.* (1998) for the *in vitro* propagation of varieties launched by the IAC uses the Pierik medium. The main difference between the MS (1962) and Pierik (1976) growth media is the macronutrient concentration. Pierik medium is formulated with concentrations lower than those recommended for the MS medium. Despite the majority of studies on the production of micropropagated anthurium plantlets using the MS growth medium, the Pierik medium has been recommended as the most suitable for inducing the *in vitro* etiolation of stem segments in anthurium 'Eidibel' (PINHEIRO *et al.*, 2009).

## INTRODUÇÃO

Antúrio (*Anthurium andraeanum* Linden) é uma das flores mais cultivadas nos países tropicais e subtropicais (BHAVANA *et al.*, 2018). No mercado global, entre as flores de corte tropicais, as orquídeas e os antúrios têm primeiro e segundo lugares, respectivamente, em valores comercializados (PERERA *et al.*, 2016). Além de flor de corte, o antúrio é também demandado como planta envasada e para paisagismo (GUADALUPE; MAYANIN, 2017).

Dentre as variedades de antúrio lançadas pelo Instituto Agrônomo (IAC), 'Eidibel' possui espata de coloração vermelho forte, cor de maior demanda de mercado entre as flores de corte, por esta razão é a mais cultivada no Brasil (PINHEIRO *et al.*, 2009).

Apesar da alta demanda, o cultivo de antúrio ainda é limitado, principalmente devido à carência de mudas de alta qualidade fitossanitária e genética (SOSA-FLORES *et al.*, 2019). Sua propagação é sexuada (via sementes) e assexuada (DESAI *et al.*, 2015). Contudo, a micropropagação tem sido a alternativa para a multiplicação de cultivares com alto valor comercial, em larga escala e de alta qualidade fitossanitária (DESAI *et al.*, 2015).

Na literatura científica estão disponíveis vários protocolos para a produção de mudas micropropagadas de *Anthurium andraeanum* pela via organogênica (ISLAM *et al.*, 2010; GU *et al.*, 2012; CARDOSO; HABERMANN, 2014; AJDARBIN *et al.*, 2015; BHATTACHARYA *et al.*, 2015; PERERA *et al.*; 2016; GUADALUPE; MAYANIN, 2017; PRAKASHA *et al.*, 2017; SAPTARI *et al.*, 2017; THOKCHOM; MAITRA, 2017; ZHANG *et al.*, 2017). Silva *et al.* (2015) mencionam que o meio de cultivo MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) é o mais utilizado como meio basal na propagação *in vitro* de *Anthurium*. Embora, Pierik (1976) tenham sido o primeiro a testar várias modificações do meio MS, alterando as concentrações dos seus componentes. A metodologia proposta por Tombolato *et al.* (1998) para propagação *in vitro* das variedades lançadas pelo IAC, emprega o meio Pierik. A principal diferença entre os meios de cultivo MS (1962) e Pierik (1976) é a concentração dos macronutrientes. O meio Pierik é formulado com concentrações inferiores às recomendadas pelo meio MS para esses componentes. Apesar da maioria dos trabalhos com a produção de mudas micropropagadas de antúrio utilizar o meio de cultivo MS, o meio Pierik tem sido recomendado como o mais adequado para a indução do estiolamento *in vitro* de segmentos caulinares de antúrio 'Eidibel' (PINHEIRO *et al.*, 2009).

Among the cytokinins used during the multiplication phase in the production of micropropagated anthurium plantlets, 6-benzylaminopurine (BAP) has been mentioned as the most efficient for shoot regeneration at concentrations ranging from 0.27  $\mu\text{M}$  to 25.00  $\mu\text{M}$  (ISLAM *et al.*, 2010; GU *et al.*, 2012; CARDOSO; HABERMANN, 2014; AJDARBIN *et al.*, 2015; BHATTACHARYA *et al.*, 2015; PERERA *et al.*, 2016; GUADALUPE; MAYANIN, 2017; PRAKASHA *et al.*, 2017; SAPTARI *et al.*, 2017; THOKCHOM; MAITRA, 2017; ZANG *et al.*, 2017; BHAVANA *et al.*, 2018).

Studies on the production of micropropagated plantlets of anthurium 'Eidibel' are scarce, with recorded multiplication rates of from 3.95 to 6.11 (PINHEIRO *et al.*, 2009). In addition, although the photoperiod of 12 h is used for the *in vitro* production of anthurium plantlets (GU *et al.*, 2012; SAPTARI *et al.*, 2017, ZANG *et al.*, 2017), the most common is the photoperiod of 16 hours (ISLAM *et al.*, 2010; CARDOSO; HABERMANN, 2014; AJDARBIN *et al.*, 2015; BHATTACHARYA *et al.*, 2015; GUADALUPE; MAYANIN, 2017; THOKCHOM; MAITRA, 2017; BHAVANA *et al.*, 2018). The aim of this study, therefore, was to determine the most suitable relationship between growth medium, BAP concentration and photoperiod for increasing the *in vitro* multiplication rate of the 'Eidibel' cultivar.

## MATERIAL AND METHODS

Plantlets of *Anthurium andraeanum* 'Eidibel' were established *in vitro* from callus induction in young leaf explants, with subsequent shoot regeneration, as per the methodology proposed by Tombolato *et al.* (1988). These plantlets are part of the Tropical Flower Germplasm Bank of Embrapa Agroindústria Tropical, and are maintained in Pierik growth medium (PIERIK, 1976) without the addition of growth regulators; they are transferred to new growth medium once a year. To obtain the explants, the plantlets were defoliated under aseptic conditions and cut into nodal segments with an approximate size of 0.5 cm and containing only one node.

A completely randomised design (CRD) was used in a 2 x 9 x 2 factorial scheme with 20 replications. The treatments comprised the combination of two types of growth medium: MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) and Pierik (PIERIK, 1976); nine concentrations of 6-benzylaminopurine (BAP): 0.0, 1.11, 2.22, 3.33, 4.44, 5.55, 6.66, 7.77 and 8.88  $\mu\text{M}$ ; and two photoperiods: 12 and 16 h. Each experimental unit consisted of one test tube containing one explant (nodal segment including one node).

Na produção de mudas micropropagadas de antúrio, entre as citocininas utilizadas na fase de multiplicação, a 6-benzilaminopurina (BAP) tem sido mencionada como a mais eficiente na regeneração de brotos, com concentrações variando de 0,27  $\mu\text{M}$  a 25,00  $\mu\text{M}$  (ISLAM *et al.*, 2010; GU *et al.*, 2012; CARDOSO; HABERMANN, 2014; AJDARBIN *et al.*, 2015; BHATTACHARYA *et al.*, 2015; PERERA *et al.*, 2016; GUADALUPE; MAYANIN, 2017; PRAKASHA *et al.*, 2017; SAPTARI *et al.*, 2017; THOKCHOM; MAITRA, 2017; ZANG *et al.*, 2017; BHAVANA *et al.*, 2018).

São poucos os estudos sobre a produção de mudas micropropagadas de antúrio 'Eidibel', sendo as taxas de multiplicação registradas de 3,95 a 6,11 (PINHEIRO *et al.*, 2009). Além disso, embora o fotoperíodo de 12 h seja utilizado na produção *in vitro* de mudas de antúrio (GU *et al.*, 2012; SAPTARI *et al.*, 2017, ZANG *et al.*, 2017), o mais empregado é o de 16 horas (ISLAM *et al.*, 2010; CARDOSO; HABERMANN, 2014; AJDARBIN *et al.*, 2015; BHATTACHARYA *et al.*, 2015; GUADALUPE; MAYANIN, 2017; THOKCHOM; MAITRA, 2017; BHAVANA *et al.*, 2018). Assim, objetivou-se com esse estudo determinar a relação mais adequada entre meio de cultivo, concentração de BAP e fotoperíodo, para aumentar a taxa de multiplicação *in vitro* de 'Eidibel'.

## MATERIAL E MÉTODOS

As mudas de *Anthurium andraeanum* 'Eidibel' foram estabelecidas *in vitro* a partir da indução de calos em explantes de folhas jovens, com posterior regeneração das brotações, de acordo com a metodologia proposta por Tombolato *et al.* (1988). Essas mudas fazem parte do Banco de Germoplasma de Flores Tropicais, da Embrapa Agroindústria Tropical, e vêm sendo mantidas em meio de cultivo Pierik (PIERIK, 1976) sem a adição de reguladores de crescimento, sendo transferidas para meio de cultivo novo uma vez por ano. Para a obtenção dos explantes, sob condições assépticas, as mudas foram desfolhadas e cortadas em segmentos nodais com tamanho aproximado de 0,5 cm e contendo apenas um nó.

Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 2 x 9 x 2, com 20 repetições. Os tratamentos foram gerados pela combinação de dois meios de cultivo MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e Pierik (PIERIK, 1976); nove concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP), sendo: 0,0; 1,11; 2,22; 3,33; 4,44; 5,55; 6,66; 7,77 e 8,88  $\mu\text{M}$  e dois fotoperíodos, 12 e 16 h. Cada unidade experimental foi composta por um tubo de ensaio, contendo um explante (segmento nodal contendo um nó).

The explants were inoculated in the vertical position, in test tubes measuring 150 x 25 mm containing 10 mL of growth medium as per each treatment. The growth media were solidified with 1.8 g L<sup>-1</sup> Gelrite®, with the pH adjusted to 5.8 before autoclaving at 121 °C under 1 atm for 15 min.

One explant was established in each test tube. The cultures were maintained under growth room conditions at a temperature of 24 ± 1 °C, a photoperiod of 12 or 16 h (depending on the treatment) and light intensity of 30 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. After 60 days of *in vitro* cultivation, the explants were evaluated for number of shoots per explant (NSE), and percentage of formed organogenic calli (FOC) and roots (FR).

The data were submitted to analysis of variance by F-test ( $p < 0.05$ ). The qualitative data, referring to the growth media and the photoperiods, were analysed comparatively by the Scott-Knott test ( $p < 0.05$ ), using the Sisvar v5.6 software (FERREIRA, 2011). Due to the number of concentrations involved and their quantitative nature, the data obtained during the shoot regeneration phase, when significant by F-test, were analysed using regression.

## RESULTS AND DISCUSSION

There was a significant effect from the concentration of BAP growth regulator added to the growth medium on the three characteristics under evaluation: number of shoots per explant (NSE), percentage of explants that formed organogenic calli (FOC) and roots (FR). However, for the variable, NSE, there was a significant interaction between growth medium and photoperiod, growth medium and BAP concentration, and BAP concentration and photoperiod. For the characteristics, FOC and FR, differences were seen in the interactions, growth medium x BAP concentration and BAP concentration x photoperiod.

For the number of regenerated shoots per explant (NSE), in the MS growth medium, the maximum point of the regression curve was reached at a concentration of 8.88 µM BAP, with an average of 3.66 shoots per explant, whereas in the Pierik growth medium, the maximum point was reached at a concentration of 4.85 µM BAP, with an average of 4.69 shoots per explant (Figure 1).

Os explantes foram inoculados na posição vertical, em tubos de ensaio de dimensões 150 x 25 mm, contendo 10 mL de meio de cultivo, de acordo com o tratamento. Os meios de cultivo utilizados foram solidificados com Gelrite® a 1,8 g L<sup>-1</sup>, e pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, realizada a 121 °C e sob 1 atm por 15 min.

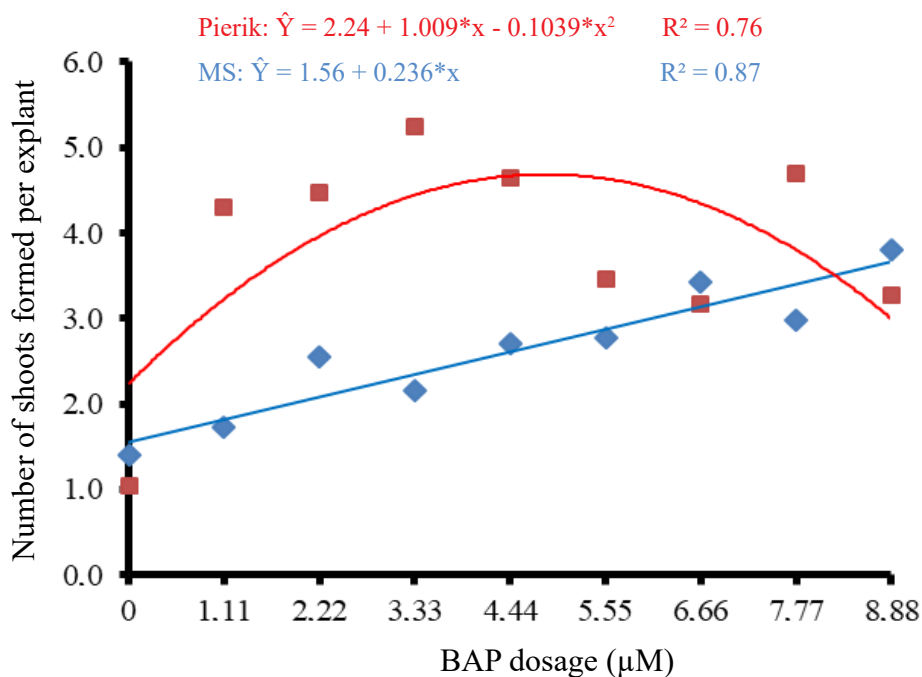
Em cada tubo de ensaio foi estabelecido um explante. As culturas foram mantidas em condições de sala de crescimento com temperatura de 24 ± 1 °C, fotoperíodo de 12 ou 16 h (de acordo com o tratamento) e intensidade luminosa de 30 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Aos 60 dias de cultivo *in vitro*, os explantes foram avaliados quanto ao número de brotos obtidos por explante (NBE), a porcentagem de formação de calos organogênicos (FCO) e raízes (FR).

Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F ( $p < 0,05$ ). Os dados qualitativos, referentes aos meios de cultivo e aos fotoperíodos foram analisados comparativamente pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ), utilizando-se do programa Sisvar versão 5.6 (FERREIRA, 2011). Os dados obtidos na fase de regeneração das brotações, quando significativos pelo teste F, foram analisados por meio de regressão em virtude do número de concentrações envolvidas e da natureza quantitativa destas.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve efeito significativo para a concentração do regulador de crescimento BAP no meio de cultivo para as três características avaliadas: número de brotos por explante (NBE), porcentagem de explantes que formaram calos organogênicos (FCO) e raízes (FR). Entretanto, para variável NBE houve interação significativa em meio de cultivo e fotoperíodo, meio de cultivo e concentração de BAP e concentração de BAP e fotoperíodo. Para as características FCO e FR diferenças foram verificadas nas interações meio de cultivo x concentração de BAP e concentração de BAP x fotoperíodo.

Para a variável número de brotos regenerados por explante (NBE), foi observado que, no meio de cultivo MS, o ponto de máximo da curva de regressão foi alcançado na concentração de 8,88 µM de BAP, com média de 3,66 brotos por explante, já no meio de cultivo Pierik, o ponto máximo foi atingido na concentração de 4,85 µM de BAP, com média de 4,69 brotos por explante (Figura 1).



**Figure 1** - Number of shoots formed per explant (NSE) of *Anthurium andraeanum* 'Eidibel', as a function of BAP concentration in the MS and Pierik growth media, at 60 days of *in vitro* growth, irrespective of photoperiod.

\*Significant at 5% probability.

**Figura 1** - Número de brotos regenerados por explante (NBE) de *Anthurium andraeanum* cv. Eidibel, em função das concentrações de BAP adicionada ao meio de cultivo MS e Pierik, aos 60 dias de cultivo *in vitro*, independentemente do fotoperíodo.

\* Significativo a 5% de probabilidade.

There are few studies on the production of micropropagated plantlets of anthurium 'Eidibel' (PINHEIRO *et al.*, 2009). In the literature, the multiplication rates quoted for anthurium vary, depending mainly on the cultivar, and the type and concentration of the growth regulator added to the growth medium. Values of from 0.63 to 15.62 have been recorded in the 'Red One' (CARDOSO; HABERMANN, 2014) and 'Arizona' (ATAK; ÇELIK, 2009), cultivars respectively, in MS growth medium containing 4.44 µM BAP. Similar values to those obtained in the present study for 'Eidibel' have been reported by Bhattacharya *et al.* (2015) in the 'Tinora' cultivar (4.3) cultivar and by Thokchom and Maitra (2017) in the 'Jewel' cultivar (5.58) with the growth medium containing 8.88 µM and 0.88 µM BAP respectively. This variation in multiplication rates confirms the effect of genotype on the *in vitro* morphogenetic response, justifying the need to develop specific protocols for each variety of anthurium (GANTAIT; MANDAL, 2010).

São poucos os estudos sobre produção de mudas micropropagadas de antúrio 'Eidibel' (PINHEIRO *et al.*, 2009). Na literatura, as taxas de multiplicação mencionadas para o antúrio variam principalmente, em função da cultivar e do tipo e concentração do regulador de crescimento adicionado ao meio de cultivo. Valores de 0,63 até 15,62 foram registrados nas cultivares 'Red One' (CARDOSO; HABERMANN, 2014) e 'Arizona' (ATAK; ÇELIK, 2009) respectivamente, em meio de cultivo MS contendo 4,44 µM de BAP. Valores semelhantes aos obtidos no presente estudo para 'Eidibel', foram relatados por Bhattacharya *et al.* (2015) para cultivar 'Tinora' (4,3) e Thokchom e Maitra (2017) para 'Jewel' (5,58) no meio de cultivo contendo 8,88 µM e 0,88 µM de BAP, respectivamente. Essas variações nas taxas de multiplicação ratificam o efeito do genótipo na resposta morfogênica *in vitro*, justificando a necessidade do desenvolvimento de protocolos específicos para cada variedade de antúrio (GANTAIT; MANDAL, 2010).



The number of regenerated shoots per explant in the MS growth medium with no added cytokinin was 1.56, less than recorded in the Pierik medium, of 2.24 (Figure 1). However, these multiplication rates are considered low, corroborating the results obtained by Cardoso and Habermann (2014), and Islam *et al.* (2010), who reported the need in anthurium to add cytokinin BAP to the growth medium to induce shoots.

The formulation of the Pierik medium is the most recommended for the multiplication phase of anthurium 'Eidibel', as it requires a lower BAP concentration (4.85  $\mu\text{M}$ ) compared to the MS medium (8.88  $\mu\text{M}$ ), in addition to the higher NSE estimate with the Pierik medium (4.69) compared to the MS medium (3.66) (Figure 1).

The ionic strength of the growth media used in the present study had a significant influence on the number of shoots. The average number of shoots formed in the Pierik growth medium (3.82) was notably higher than in the MS medium (2.61) (Table 1). The most relevant difference between the growth media is the macronutrient concentration, with the Pierik medium formulated with half the concentration of these components. Growth media containing reduced macronutrient concentrations were more effective in producing micropropagated anthurium plantlets by both organogenesis (CARDOSO; HABERMANN, 2014; BHATTACHARYA *et al.*, 2015; GUADALUPE; MAYANIN, 2017; ZAPTARI *et al.*, 2017) and embryogenesis (BHAVANA *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2019).

This is the first study carried out to compare different photoperiods in the production of micropropagated anthurium plantlets. The breakdown of the interaction between growth medium and photoperiod for NSE is shown in Table 1.

O número de brotações regeneradas por explante no meio de cultivo MS sem a adição da citocinina foi de 1,56, valor inferior ao registrado no meio Pierik, que foi de 2,24 (Figura 1). Contudo, essas taxas de multiplicação são consideradas baixas, corroborando os resultados obtidos por Cardoso e Habermann (2014) e Islam *et al.* (2010), os quais relataram a necessidade da adição da citocinina BAP, ao meio de cultivo, para a indução de brotações em antúrio.

A formulação do meio Pierik se torna a mais recomendada para a fase de multiplicação de antúrio cv. Eidibel, por demandar uma concentração de BAP inferior (4,85  $\mu\text{M}$ ) quando comparada a do meio MS (8,88  $\mu\text{M}$ ), além da maior estimativa de NBE no meio Pierik (4,69) quando comparada a do meio MS (3,66) (Figura 1).

A força iônica, dos meios de cultivo utilizados no presente estudo, teve influência significativa no número de brotos. O número médio de brotos formados no meio de cultivo Pierik (3,82) foi significativamente maior do que no meio MS (2,61) (Tabela 1). A diferença de maior relevância entre esses dois meios de cultivo é a concentração dos macronutrientes, sendo o meio Pierik formulado com a metade das concentrações destes componentes. Meios de cultivo contendo redução da concentração dos macronutrientes foram mais efetivos na produção de mudas micropropagadas de antúrio tanto pela via organogênica (CARDOSO; HABERMANN, 2014; BHATTACHARYA *et al.*, 2015; GUADALUPE; MAYANIN, 2017; ZAPTARI *et al.*, 2017) quanto embriogênica (BHAVANA *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2019).

Em relação ao fotoperíodo, este é o primeiro estudo realizado comparando diferentes fotoperíodos na produção de mudas micropropagadas de antúrio. O desdobramento da interação meio de cultivo e fotoperíodo para NBE encontra-se na Tabela 1.

**Table 1** - Mean number of shoots per explant (NSE) of anthurium (*Anthurium andraeanum*) 'Eidibel', at 60 days of in vitro growth

**Tabela 1** - Médias do número de brotos por explante (NBE) de antúrio (*Anthurium andraeanum*) cv. Eidibel, aos 60 dias de cultivo in vitro

Photoperiod (h)	NSE		
	MS Medium	Pierik Medium	CV%
12	2.84 bA	3.78 aA	19.91
16	2.38 bB	3.86 aA	23.14
Mean	2.61 b	3.82 a	-
CV%	18.29	23.64	-

Mean values followed by the same lowercase letter in a row and uppercase letter in a column do not differ by F-test at  $p \leq 0.05$ .

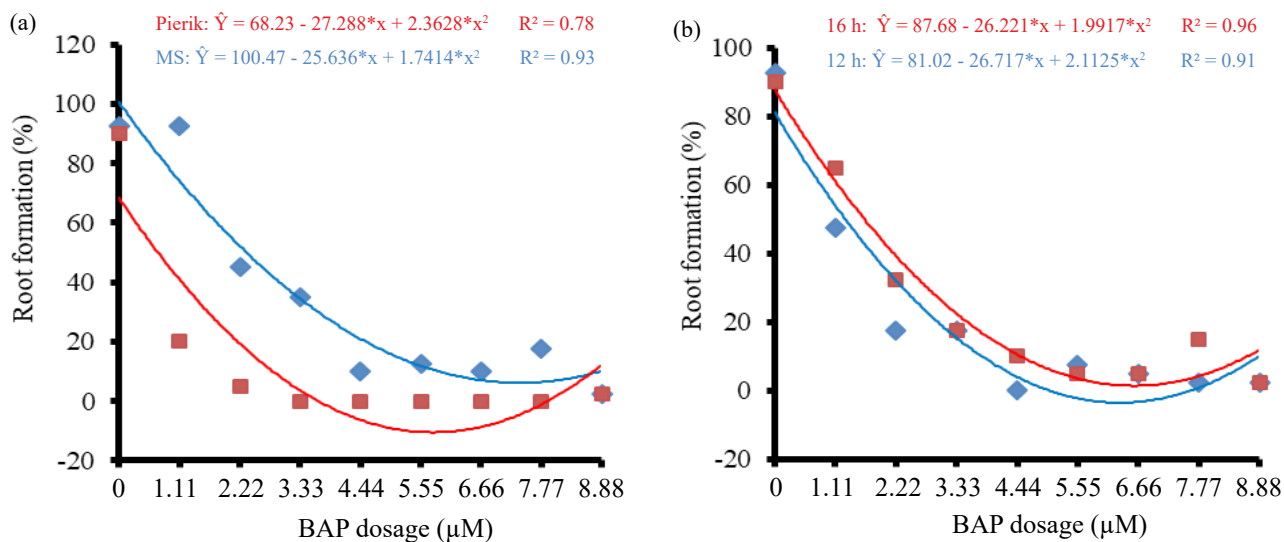
Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem pelo teste F a  $p \leq 0.05$  de probabilidade.

Under both light regimes, the number of shoots obtained per explant (NSE) within each medium was statistically similar, with better results for the Pierik medium. As such, the Pierik medium is the most suitable for the production of micropropagated plantlets of anthurium 'Eidibel', as it can be used under a 12-hour regime (Table 1), resulting in a 4-hour reduction in light daily, thereby lowering production costs; furthermore, the use of lower concentrations of BAP minimises the formation of calli, and consequently, the possibility of obtaining plantlets showing somaclonal variation (GANTAIT; MANDAL, 2010; SILVA *et al.*, 2015).

A significant difference was found in the percentage of root formation (FR) in the interactions growth medium x BAP concentration (Figure 2a) and photoperiod x BAP concentration (Figure 2b) due to the increased concentration of BAP growth regulator.

Nos dois regimes de luz, o número de brotos obtidos por explante (NBE), dentro de cada meio, foi estatisticamente semelhante, sendo o meio Pierik superior. Logo o meio Pierik, é mais indicado para a produção de mudas micropropagadas de antúrio 'Eidibel', pois pode ser empregado em regime de 12 h (Tabela 1), acarretando diminuição de 4 h de luz diária, ocasionando redução dos custos de produção, além disso, o uso de concentrações menores de BAP minimiza a formação de calos, consequentemente a possibilidade da obtenção de mudas com variação somaclonal (GANTAIT; MANDAL, 2010; SILVA *et al.*, 2015).

Na porcentagem de formação de raízes (FR), constatou-se diferença significativa em função do aumento da concentração do regulador de crescimento BAP nas interações meio de cultivo x concentração de BAP (Figura 2a) e fotoperíodo x concentração de BAP (Figura 2b).



**Figure 2** - Percentage of root formation (FR) in *Anthurium andraeanum* 'Eidibel', as a function of the concentration of BAP regulator added (a) to the MS and Pierik growth media, and (b) under a photoperiod of 12 or 16 h, at 60 days of *in vitro* growth.

\*Significant at 5% probability.

**Figura 2** - Porcentagem de formação de raízes (FR) de *Anthurium andraeanum* cv. *Eidibel*, em função das concentrações do regulador BAP adicionado (a) ao meio de cultivo MS e Pierik e (b) sob condições de fotoperíodo de 12 e 16 h, aos 60 dias de cultivo *in vitro*.

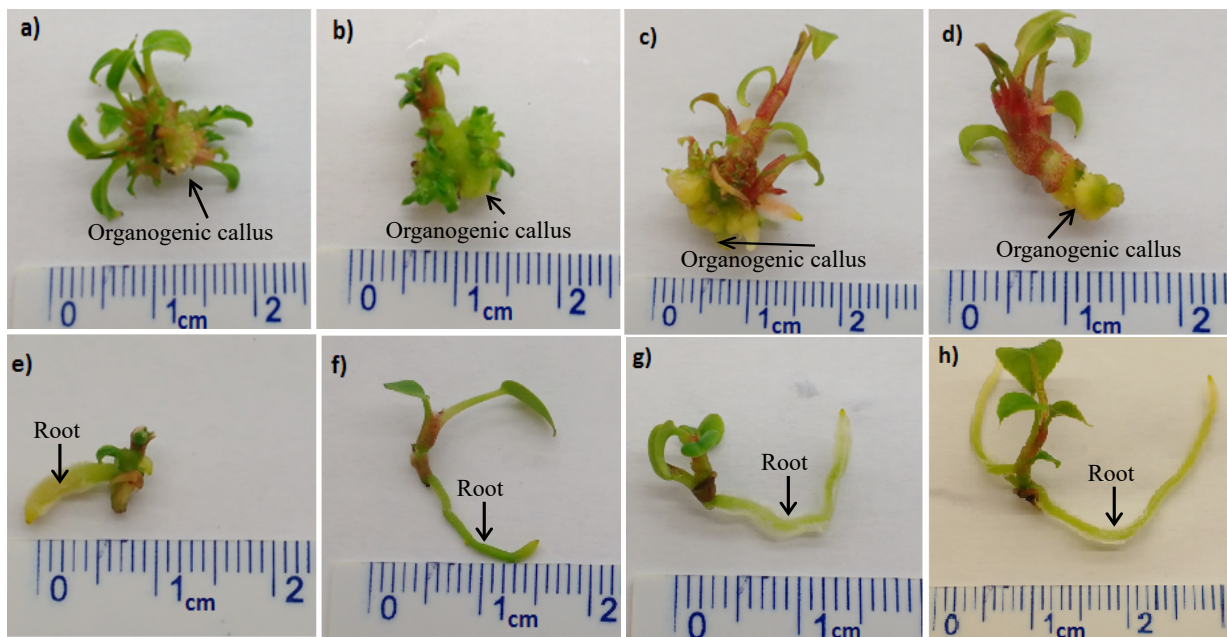
\* Significativo a 5% de probabilidade.

It can be seen that the increase in BAP concentration reduces the percentage of root formation, up to a limit, which in each of the cases under analysis is greater than  $5.55 \mu\text{M}$ , and after which the behaviour of the curve inverts due to the choice of model (Figures 2a and b). Figure 3 shows that, with the addition of cytokinin, root formation (Figures 3a to d) is less than with no added BAP (Figures 3e to h). According to Lacerda *et al.* (2008), high concentrations of cytokinin generally inhibit or delay root formation, in addition to cancelling out the beneficial effects of auxins. This corroborates the results found in this study for FR in ‘Eidibel’ as a function of the BAP concentrations under test.

The calli formed at the base of the nodal segment explants displayed a green colour, showing them to be of organogenic origin (FOC) (Figures 3a to d). According to Wang *et al.* (2019), the cytokinin BAP used alone in this study induces the formation of non-embryogenic calli in anthurium.

Verifica-se que o aumento na concentração de BAP reduz a porcentagem de formação de raízes, até um limite, em todos os casos analisados acima de  $5,55 \mu\text{M}$ , em que o comportamento da curva inverte devido à escolha do modelo (Figuras 2a e b). Na Figura 3 é possível observar que a formação de raiz com adição de citocinina (Figuras 3a a d) é menor do que sem adição de BAP (Figuras 3e a h). Segundo Lacerda *et al.* (2008), altas concentrações de citocinina geralmente inibem ou retardam a formação de raízes, além de anular os efeitos benéficos das auxinas. Tal afirmação corrobora os resultados obtidos nesse estudo para a FR da ‘Eidibel’ em função das concentrações testadas de BAP.

Os calos formados, na base dos explantes de segmento nodal, apresentaram coloração verde, indicando, portanto, serem de origem organogênica (FCO) (Figuras 3a a d). Segundo Wang *et al.* (2019), a citocinina BAP, utilizada neste estudo, de forma isolada, induz a formação de calos não-embriogênicos, em antúrio.



**Figure 3** - Formation of organogenic calli (a, b, c and d) and roots (e, f, g and h) in shoots of *Anthurium andraeanum* ‘Eidibel’, multiplied *in vitro* in the Pierik (a, b, e and f) and MS (c, d, g and h) growth media, without the addition of BAP (e, f, g and h) and with an added  $5.55 \mu\text{M}$  BAP (a, b, c and d), and under a photoperiod of 12 h (a, c, e and g) and 16 h (b, d, f and h).

**Figura 3** - Formação de calos organogênicos (a, b, c e d) e de raízes (e, f, g e h) em brotos de *Anthurium andraeanum* cv. *Eidibel* multiplicados *in vitro* nos meios de cultura Pierik (a, b, e e f) e MS (c, d, g e h), sem adição de BAP (e, f, g e h) e adicionados de  $5,55 \mu\text{M}$  de BAP (a, b, c e d) e sob regime de fotoperíodo de 12 h (a, c, e e g) e 16 h (b, d, f e h).

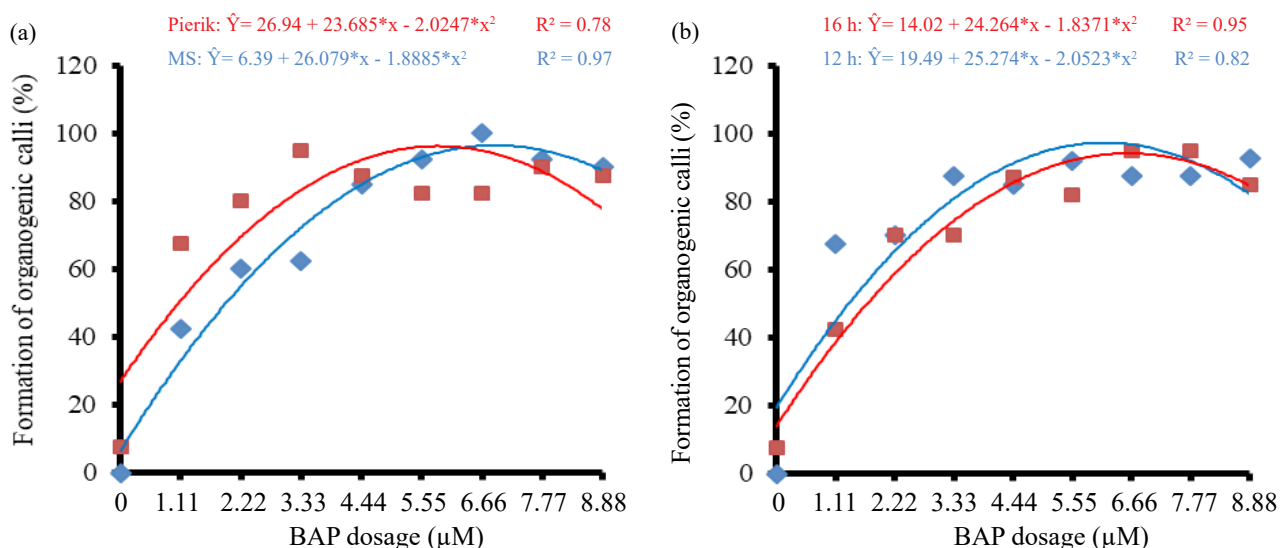


Figures 4a and 4b show the percentage values for the formation of organogenic calli (FOC). The FOC as a function of BAP concentration (4a) and photoperiod (4b) was described using a quadratic model.

It can be seen from Figures 4a and 4b that the increase in BAP concentration increases the percentage of organogenic calli formation, up to a limit, which in each of the cases under analysis is greater than 5.55  $\mu\text{M}$ , and after which the behaviour of the curve inverts due to the choice of model. According to Ajdarbin *et al.* (2015), the lowest percentage of leaf explants that produced calli was seen in the growth medium with no added BAP, concluding that the cytokinin plays an important role in inducing this morphogenetic response in *Anthurium andraeanum*. However, in this species, callus induction is usually achieved by the addition of auxins to the growth medium, either alone or together with cytokinins (SAPTARI *et al.*, 2017).

Nas Figuras 4a e 4b são apresentados os valores percentuais para a formação de calo organogênico (FCO). A FCO em função da concentração de BAP (4a) e fotoperíodo (4b) foram descritos por modelo quadrático.

Verifica-se nas Figuras (4a e b) que o aumento na concentração de BAP aumenta a porcentagem de formação de raízes, até um limite, em todos os casos analisados acima de 5,55  $\mu\text{M}$ , em que o comportamento da curva inverte devido a escolha do modelo. Segundo Ajdarbin *et al.* (2015) as menores porcentagens de explantes foliares que produziram calos foram observadas no meio de cultura sem a adição de BAP, concluindo que esta citocinina possui papel importante na indução desta resposta morfogenética em *Anthurium andraeanum*. Entretanto, nessa espécie, a indução de calos é geralmente obtida mediante a adição de auxinas isoladas ou em combinação com citocininas, ao meio de cultivo (SAPTARI *et al.*, 2017).



**Figure 4** - Percentage of organogenic calli (FOC) in *Anthurium andraeanum* 'Eidibel', as function of BAP concentration added (a) to the MS and Pierik growth media, and (b) under a photoperiod of 12 or 16 h, at 60 days of *in vitro* growth.

\*Significant at 5% probability.

**Figura 4** - Porcentagem de calos organogênicos (FCO) de *Anthurium andraeanum* cv. Eidibel, em função das concentrações de BAP adicionado (a) ao meio de cultivo MS e Pierik (b) sob condições de fotoperíodo de 12 e 16 horas, aos 60 dias de cultivo *in vitro*.

\*Significativo a 5% de probabilidade.

Low organogenic calli formation is a desirable characteristic in protocols for *in vitro* plantlet production. Atak and Çelik (2012) point out that when micropropagation is carried out through indirect organogenesis, i.e. at the intermediate callus phase, instability may occur in the genotype of the obtained plantlets, becoming an obstacle to large-scale propagation. Furthermore, less organogenic calli formation favours the large-scale production of plantlets, in view of the greater somaclonal stability of plant material grown *in vitro* (SOARES *et al.*, 2012).

## CONCLUSIONS

Higher the BAP concentration in the growth medium, the smaller the percentage of root formation and the higher the percentage of organogenic calli;

For the phase of *in vitro* multiplication, the use of Pierik growth medium is recommended, with 4.85  $\mu\text{M}$  of added BAP, under a photoperiod of 12 h;

This protocol reduces energy consumption, as it uses a photoperiod of 12 h and Pierik medium with lower concentrations of BAP, achieving a lower percentage of calli; it is therefore suggested for the micropropagation of anthurium 'Eidibel'.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Embrapa Agroindústrias Tropical (CNPAT) for the financial support and infrastructure, and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for the grant of a scholarship to the lead author.

A baixa formação de calos organogênicos é uma característica desejável nos protocolos de produção *in vitro* de mudas. Atak e Çelik (2012) ressaltam que quando a micropropagação é realizada por meio da organogênese indireta, isto é, por meio da fase intermediária de calo, pode ocorrer instabilidade no genótipo das mudas obtidas, se constituindo num entrave na propagação em larga escala. E, menos formação de calos organogênicos favorece a produção em larga escala de mudas, tendo em vista a maior estabilidade somaclonal do material vegetal cultivado *in vitro* (SOARES *et al.*, 2012).

## CONCLUSÕES

Observou-se que quanto maior a concentração de BAP, no meio de cultivo, menor a porcentagem de formação de raízes e maior a de calos organogênicos;

Para a fase de multiplicação *in vitro* recomenda-se a utilização do meio de cultivo Pierik adicionado de 4,85  $\mu\text{M}$  de BAP, no fotoperíodo de 12 horas;

Esse protocolo possibilita a redução no consumo de energia, por utilizar fotoperíodo de 12 h, o emprego do meio Pierik e a adição de baixas concentrações de BAP, resultam em menor porcentagem de calos, sendo, portanto, sugerido para a micropropagação de antúrio cv. Eidibel.

## AGRADECIMENTOS

À Embrapa Agroindústria Tropical (CNPAT), pelo apoio financeiro e infraestrutura, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa ao primeiro autor.

## CITED SCIENTIFIC LITERATURE

- AJDARBIN, M.; KAFI, M.; MIRMASOUMI, M.; AZADI, P. Indirect shoot regeneration in *Anthurium andraeanum* 'Clisto' from leaf explant. **Journal of Ornamental Plants**, v. 5, n. 3, p. 159-166, 2015.
- ATAK, Ç.; ÇELİK, Ö. Micropropagation of *Anthurium andraeanum* from leaf explants. **Pakistan Journal of Botany**, v. 43, n. 3, p. 1155-1161, 2009.
- ATAK, C.; ÇELİK, Ö. Micropropagation of *Anthurium* spp. In: DHAL, N. K.; SAHU, S. C. (Eds) **Plant Science**, p. 241-254, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/51426>.
- BHATTACHARYA, C.; DAM, A.; KARMAKAR, J.; BANDYOPADHYAY, T. K. Efficient organogenesis from the induced meristemoid of *Anthurium andraeanum* Linden cv. Tinora. **Plant Science Today**, v. 2, n. 2, p. 82-86, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.14719/pst.2015.2.2.110>
- BHAVANA, G. P.; SATYAN, K. B.; ASWATH, C. A regenerative protocol and SEM study for *in vitro* propagation of *Anthurium* crossed lines via indirect somatic embryogenesis. **Bioscience Biotechnology Research Communications**, v. 11, n. 1, p. 31-40, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.21786/bbrc/11.1/5>
- CARDOSO, J. C.; HABERMANN, G. Adventitious shoot induction from leaf segments in *Anthurium andraeanum* is affected by age of explant, leaf orientation and plant growth regulator. **Horticulture, Environment and Biotechnology**, v. 55, n. 1, p. 56-62, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s13580-014-0022-9>
- DESAI, C.; INGHALIHALLI, R.; KRISHNAMURTHY, R. Micropropagation of *Anthurium andraeanum* - An important tool in floriculture. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 4, n. 3, p. 112-117, 2015.
- FERREIRA D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542011000600001>
- GANTAIT, S.; MANDAL, N. Tissue culture of *Anthurium andraeanum*: a significant review and future prospective. **International Journal of Botany**, v. 6, n. 3, p. 207-219, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.3923/ijb.2010.207.219>
- GU, A.; LIU, W.; MA, C.; CUI, J.; HENNY, R. J.; CHEN, J. Regeneration of *Anthurium andraeanum* from leaf explants and evaluation of microcutting rooting and growth under different light qualities. **HortScience**, v. 47, n. 1, p. 88-92, 2012. DOI: <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.47.1.88>
- GUADALUPE, L. P.; MAYANIN, R. B. I. Morphogenesis and plant regeneration from *Anthurium andraeanum* cv Calypso leaf explant. **African Journal of Biotechnology**, v. 16, n. 44, p. 2092-2099, 2017. DOI: <https://doi.org/10.5897/AJB2015.14718>
- ISLAM, S. A.; DEWAN, M. M. R.; MUKUL, M. H. R.; HOSSENI, M. A.; KHATUN, F. *In vitro* regeneration of *Anthurium andraeanum* cv. Nitta. **Bangladesh Journal of Agricultural Research**, v. 35, n. 2, p. 217-226, 2010.
- LACERDA, G. A.; CHALFUN-JÚNIOR, A.; PAIVA, L. V.; MELO, E. F.; OLIVEIRA, A. C. S.; REZENDE, J. C. Influência de reguladores de crescimento no desenvolvimento radicular de sementes de *Coffea arabica* L. 'Rubi' *in vitro*. **Coffee Science**, v. 3, n. 1, p. 81-84, 2008.
- MURASHIGE T.; SKOOG F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissues cultures. **Journal Plant Physiology**, v. 15, p. 473-497, 1962. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- PERERA, R. N. I.; RAJAPAKSHA, R.G.A.S.; BANDARANAYAKE, W.M.E.K.; SAMARASINGHA, D. A. Micropropagation of new anthurium varieties: Lanka Beauty and Lanka Kumari. **Annals of the Sri Lanka Department of Agriculture**, v. 18, p. 56-60, 2016.
- PIERIK, R. L. M. *Anthurium andraeanum* Lind. plantlets produced from callus tissues cultivated *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, v. 37, n. 1, 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. DOI: <https://doi.org/10.14295/rbho.v15i2.494>
- PRAKASHA, D. P.; RAMYA, G.; SRINIVASALU, G. B. *In vitro* mass multiplication of *Anthurium andraeanum* (HORT) cultivars. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 6, n. 9, p. 2579-2584, 2017. DOI: <https://doi.org/10.20546/ijemas.2017.609.317>

SAPTARI, R. T.; SINTA, M.; BUDIANI, A. *In vitro* propagation of *Anthurium andreaeanum* cv. Nitta through organogenesis. **AGRIVITA Journal of Agricultural Science**, v. 39, n. 2, p. 192-200, 2017. DOI: <https://doi.org/10.17503/agrivita.v39i2.752>

SILVA, J. A. T. S.; DOBRÁNSZKI, J.; WINARTO, B.; ZENG, S. *Anthurium in vitro*: A review. **Scientia Horticulturae**, v. 186, p. 266-298, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.11.024>

SOARES, W. S.; RÊGO, M. M.; RÊGO, E. R.; BARROSO, P. A.; NASCIMENTO, K. S.; FERREIRA, K. T. Estabelecimento *in vitro* e micropropagação de maracujá silvestre (*Passiflora foetida* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, p. 138-142, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-05722012000500002>

SOSA-FLORES, P. V.; VALDEZ-AGUILAR, L. A.; CARTMILL, D.; CARTMILL, A. D.; BENAVIDES-MENDOSOSA, A. Response of potted anthurium (*Anthurium andreaeanum* Lind.) to the K<sup>+</sup>: Ca<sup>+2</sup>: Mg<sup>+2</sup> balance in the nutrient solution. **Journal of Plant Nutrition**, v. 42, n. 4, p. 351-361, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1080/01904167.2018.1555848>

THOKCHOM, R.; MAITRA, S. Micropopagation of *Anthurium andreaeanum* cv. Jewel from leaf explants. **Journal of Crop and Weed**, v. 13, n. 1, p. 23-27, 2017.

TOMBOLATO, A. F. C.; QUIRINO, E. A.; COSTA, A. M. M. Antúrio (*Anthurium andraeanum* Lind.). In: TOMBOLATO, A. F. C.; COSTA, A. M. M. Micropropagação de plantas ornamentais. Campinas: Instituto Agronômico, p. 18-21, 1998. (Instituto Agronômico. Boletim Técnico 174.)

WANG, G.; XU, C.; YAN, S.; XU, B. An efficient somatic embryo liquid culture system for potential use in large-scale and synchronic production of *Anthurium andraeanum* seedlings. *Frontiers in Plant Science*, v. 10, artigo 29, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00029>

ZHANG, H.; WANG, G.; QIAO, Y.; CHEN, C. Effects of timentin and other  $\beta$ -lactam antibiotics on callus induction shoot regeneration, and rooting in *Anthurium andraeanum* Linden ex Andre. **In vitro Cell, Development Biology - Plant**, v. 53, p. 219-225, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11627-017-9823-8>