



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS**

**EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM SEGMENTOS DE TÉPALAS DE AMARÍLIS
(*Hippeastrum* sp. Herb.)**

ANA VICTÓRIA CONDE VAN DEN BROEK

**Araras
2024**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM SEGMENTOS DE TÉPALAS DE AMARÍLIS
(*Hippeastrum* sp. Herb.)

ANA VICTÓRIA CONDE VAN DEN BROEK

ORIENTADOR: PROF. DR. JEAN CARLOS CARDOSO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados como requisito parcial à obtenção do título de MESTRE EM PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS

Araras

2024

Conde van den Broek, Ana Victória

Embriogênese somática em segmentos de tépalas de amarílis (*Hippeastrum* sp. Herb.) / Ana Victória Conde van den Broek -- 2024.
76f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, campus Araras, Araras
Orientador (a): Jean Carlos Cardoso
Banca Examinadora: Jean Carlos Cardoso, Déborah Yara Alves Cursino dos Santos, Mariana Altenhofen da Silva
Bibliografia

1. Amaryllidaceae. 2. Cultivo in vitro. 3. Embriogênese somática. I. Conde van den Broek, Ana Victória. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática (SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Maria Helena Sachi do Amaral - CRB/8
7083



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Agrárias

Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Ana Victória Conde van den Broek, realizada em 04/10/2024.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Jean Carlos Cardoso (UFSCar)

Profa. Dra. Deborah Yara Alves Cursino dos Santos (USP)

Profa. Dra. Mariana Altenhofen da Silva (UFSCar)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter iluminado meus caminhos para que eu chegasse até aqui, por toda força e por ouvir as minhas orações, com Deus o meu caminhar foi mais leve.

Ao meu marido Rafael Niens van den Broek, pelos cuidados com nossa filha para que esta dissertação pudesse ser escrita, por sempre me apoiar e estar comigo nos momentos de dificuldade. À minha sogra, ao meu sogro e aos padrinhos da nossa filha, pela rede de apoio nas minhas ausências e por me ajudarem com todo o suporte que precisei.

A minha filha Marcela Conde van den Broek, por me inspirar e me alegrar todos os dias da minha vida sendo o meu ponto de paz. Pelas tardes que passamos juntas e por sempre colaborar quando a mama precisava escrever esta dissertação.

A minha mãe Ana Paula Conde da Silva, por toda jornada dedicada à minha criação, por todas as dificuldades que passamos juntas e mesmo assim nunca deixou nada faltar. Agradeço também pelo seu incansável incentivo para que eu seguisse me aperfeiçoando como pesquisadora e por acreditar no meu potencial.

Ao meu avô José Conde da Silva, por ter dito para uma garotinha de 8 anos que a profissão do futuro seria Biotecnologia. Por me apresentar as infinitas possibilidades que a minha carreira teria. Por ser o meu pai em todas as ocasiões da minha vida e por todo amor que o senhor me deu.

A minha avó Eneida Figueiredo Conde da Silva, que já não está mais entre nós, mas cuja memória e ensinamentos continuam a me guiar. Sua presença, ensinamentos e amor foram fundamentais em minha jornada até aqui. Embora não possa mais estar fisicamente ao meu lado, sei que sua influência e sabedoria permanecerão comigo para sempre.

Ao meu orientador Prof. Dr. Jean Carlos Cardoso que está comigo desde a Iniciação Científica e que teve/tem um papel importantíssimo na minha vida profissional e carreira que escolhi seguir dentro da cultura de tecidos vegetais. Agradeço por todas as conversas e ensinamentos ao longo desses muitos anos, pelos puxões de orelha e pelos inúmeros elogios. Por mostrar que as carreiras acadêmica e empresarial podem caminhar juntas, pois uma complementa a outra.

Agradeço também pelas decisões tomadas em conjunto, por sempre levantar questionamentos importantes e embasados. O senhor foi crucial na minha carreira acadêmica/profissional.

Aos meus colegas e a técnica Ana Lúcia Cerri Arruda do Laboratório de Fisiologia Vegetal e Cultura de Tecidos – Lfvct da Universidade Federal de São Carlos Campus Araras – UFSCar CCA, em especial a Ana Carolina da Cruz Alves que inúmeras vezes não mediu esforços para me ajudar, tendo sempre muito carinho e atenção. Agradeço também a Julia e a Beatriz por auxiliarem nos repiques finais dos experimentos.

Aos colegas que fiz no Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Botânica do Instituto de Biociências IB-USP, por estarem sempre dispostos a me auxiliar com as amostras e análises. Em especial a Prof^a. Dr^a. Déborah Yara Alves Cursino dos Santos pelos aprendizados e prontidão em receber e analisar as amostras, sem o seu auxílio não seria possível tanto avanço nas pesquisas. E agradeço também a doutoranda Tamara Machado Matos por toda ajuda e pelos momentos de descontração e ao doutorando Elielson Rodrigo Silveira, pelas correções, pelas análises realizadas e por realmente transmitir todo o seu conhecimento tanto de bancada quanto interpretação de dados, o apoio de vocês foi muito importante pra mim.

À Prof^a. Dr^a. Monalisa Sampaio Carneiro e à Técnica Isabella Valadão pelo uso de equipamentos e reagentes no Laboratório de Biotecnologia de Plantas.

Um agradecimento especial a empresa Terra Viva Flores e Plantas que forneceu os bulbos para que toda a pesquisa fosse realizada. Em especial ao Joni, Everton, Ricardo e todos os colaboradores que de alguma forma contribuíram com o meu projeto e pela amizade.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

Agradeço ao Centro de Ciências Agrárias (CCA) pelo auxílio financeiro via FAI (projeto n° 14.205).

SUMÁRIO

	Página
ÍNDICE DE TABELAS.....	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	li
RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
INTRODUÇÃO.....	01
OBJETIVOS.....	03
REVISÃO DA LITERATURA.....	04
1 <i>Hippeastrum</i> sp. Herb.....	04
2 Potencial ornamental e medicinal.....	04
3 Cultivo <i>in vitro</i>	06
4 Embriogênese somática.....	08
5 Bioquímica do cultivo <i>in vitro</i>	09
6 Análises bioquímicas.....	10
6.1 Método do DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil).....	11
6.2 Método FRAP (Poder Antioxidante Redutor do Ferro).....	11
6.3 Método Folin-Ciocalteu.....	11
6.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).....	12
LITERATURA CITADA.....	14
CAPÍTULO 1. Antioxidantes e espectro luminoso na embriogênese somática a partir de tépalas de amarílis (<i>Hippeastrum</i> sp. Herb.).....	23
1 RESUMO.....	24
2 INTRODUÇÃO.....	25
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1 Material vegetal.....	27
3.2 Assepsia e estabelecimento.....	27
3.3 Experimento 1: Idade do botão floral e período de escuro para indução da ES em amarílis.....	29
3.4 Experimento 2: PVP 40 e espectros luminosos na indução e regeneração de ES em segmentos de tépalas de amarílis.....	29
3.5 Obtenção do extrato metanólico.....	30
3.6 Ensaio da atividade antioxidante <i>in vitro</i>	30
3.7 Determinação de flavonas/flavonoides.....	31
3.8 Análise estatística.....	32
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
4.1 Estabelecimento do material.....	33
4.2 Experimento 1: Idade do botão floral e período de escuro para indução da ES em amarílis.....	33

4.3	Experimento 2: PVP 40 e espectros luminosos na indução e regeneração de ES em segmentos de tépalas de amarílis.....	35
4.4	Efeito do tempo de cultivo e do espectro luminoso na comparação da atividade antioxidante <i>in vitro</i>	37
4.5	Efeito do tempo de cultivo e do espectro luminoso na comparação do conteúdo de flavonas/flavonoides <i>in vitro</i>	40
5	CONCLUSÕES	46
6	LITERATURA CITADA	47

CAPÍTULO 2. Fontes nutricionais e açúcares na embriogênese somática a partir de tépalas de amarílis (*Hippeastrum* sp. Herb.).....

1	RESUMO	53
2	INTRODUÇÃO	54
3	MATERIAL E MÉTODOS	56
3.1	Material vegetal.....	56
3.2	Assepsia e estabelecimento.....	56
3.3	Obtenção do extrato metanólico.....	58
3.4	Ensaio da atividade antioxidante <i>in vitro</i>	59
3.5	Determinação do conteúdo de flavonas/flavonoides.....	60
3.6	Análise estatística.....	60
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
4.1	Assepsia e estabelecimento.....	62
4.2	Nutrientes e fontes de carbono na indução e regeneração de ES em segmentos de tépalas de amarílis.....	62
4.3	Efeito de fontes nutricionais na comparação do conteúdo de flavonas/flavonoides <i>in vitro</i>	67
5	CONCLUSÕES	70
6	LITERATURA CITADA	71
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	74
	APÊNDICE	75

ÍNDICE DE TABELAS

Página

Capítulo 1

Tabela 1. Efeito da concentração do antioxidante PVP 40 e dos Espectros luminosos no aumento da massa embriogênica de <i>H. hybridum</i> cv. Intokase....	35
Tabela 2. Quantidade de agentes redutores analisados pelos métodos de DPPH, Folin e FRAP aos 45 dias de cultivo nos diferentes espectros luminosos.....	38
Tabela 3. Quantidade de agentes redutores analisados pelos métodos de DPPH, Folin e FRAP aos 90 dias de cultivo nos diferentes espectros luminosos.....	39
Tabela 4. Efeito dos diferentes comprimentos de onda e concentração de PVP 40 na quantidade de embriões e massa dos calos aos 120 dias de cultivo.....	45

Capítulo 2

Tabela 1. Composição dos meios de cultura dos quatro tratamentos.....	63
Tabela 2. Efeito de fontes nutricionais e carboidratos no aumento da massa embriogênica de <i>H. hybridum</i> cv. Intokase aos 60 dias de cultivo.....	63
Tabela 3. Efeito de fontes nutricionais e carboidratos no aumento da massa embriogênica de <i>H. hybridum</i> cv. Intokase aos 120 dias de cultivo.....	63
Tabela 4. Quantidade de embriões em cada tratamento ao longo do tempo de cultivo.....	64
Tabela 5. Quantidade total de embriões em cada tratamento ao longo do tempo de cultivo.....	64
Tabela 6. Quantidade de agentes redutores analisados pelos métodos de DPPH, Folin e FRAP aos 60 dias de cultivo nos diferentes tratamentos.....	67

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Conjunto de flores de <i>Hippeastrum hybridum</i> cv. Intokase.....	05
Capítulo 1	
Figura 1 – Bulbos com 7 dias de plantio de <i>H. hybridum</i> cv. Intokase fornecidos pela Terra Viva (Holambra, SP).....	27
Figura 2. Demonstração dos passos de manipulação dos botões florais. a. Botões florais submetidos à assepsia. b. Botão floral inteiro contendo tépalas externas e internas. c. Tépalas externas sendo retiradas, restando somente as tépalas internas. d. Tépalas internas que serão separadas dos pistilos e posteriormente seccionadas em quadrados de 1 cm ² e servindo como explante para a ES.....	28
Figura 3. Espatas com brácteas fechadas, demonstrando o momento com maior taxa de indução da ES em amarílis.....	34
Figura 4. Embriogênese somática de segmentos de tépalas de <i>Hippeastrum hybridum</i> cv. Intokase. a. Calos embriogênico de segmentos de tépalas (es: escutelo); b. embriogênese somática <i>in vitro</i> mostrando os calos embriogênicos em formação (eg: estágio globular); c. desenvolvimento de embriões globulares verdes de forma direta, sem a intermediação de calos; d. desenvolvimento de estágio globular para escutelar; e. massa de embriões somáticos em pleno desenvolvimento; f-g germinação dos embriões somáticos sob condições de luz branca.....	34
Figura 5. Efeito do espectro luminoso e concentração de PVP40 na produção de flavonoides. Sendo A. Quantificação de ácido gálico; B. Quantificação de Rutina; C. Quantificação de Luteolina; D. Quantificação de Quercetina; E. Quantificação de Flavonóide_a (tempo de retenção 28.00 minutos); F. Flavonóide_b (tempo de retenção 28.05 minutos). Dados expressos em mg/g de Rutina.....	41
Figura 6. Efeito dos diferentes comprimentos de onda e concentração de PVP40 na massa fresca do explante em regeneração <i>in vitro</i> de <i>H. hybridum</i> cv. Intokase analisados aos 45 e 90 dias de cultivo em meio de cultura MS ½	

acrescidos de 0,5 mg L⁻¹ de 2,4-D e 1,0 mg L⁻¹ TDZ..... 43

Figura 7. Diferentes comprimentos de onda e concentração de PVP40 na formação dos explantes em regeneração *in vitro* de *H. hybridum* cv. Intokase aos 90 dias cultivados em meio de cultura MS ½ acrescidos de 0,5 mg L⁻¹ de 2,4-D e 1,0 mg L⁻¹ de TDZ..... 44

Capítulo 2

Figura 1. Massa fresca do explante em regeneração (g/explante) aos 60 dias e 120 dias de cultivo nos diferentes tratamentos..... 65

Figura 2. Quantificação da quantidade de flavonoides nos diferentes tratamentos. Dados expressos em mg/g de Rutina (mgEQR/g). Flavonoide_a correspondente ao tempo 28.00 de retenção. Flavonoide_b correspondente ao tempo 28.08 de retenção..... 68

Figura 3. Cromatogramas dos extratos metanólicos de tépalas cultivadas *in vitro* de *H. hybridum* cv. Intokase nos diferentes tratamentos. Sendo **a** – MS½|N6 + Sacarose; **b** – MS½|N6 + Galactose|Lactose; **c** – MS½|MS½ + Sacarose; **d** – MS½|MS ½ + Galactose|Lactose..... 69

APÊNDICE

Figura 1. Curva padrão de DPPH com ácido gálico usada para cálculo do equivalente de ácido gálico/g de amostra. O gráfico foi plotado em função das respectivas absorbâncias lidas em 517 nm..... 75

Figura 2. Curva padrão de FRAP com ácido gálico usada para cálculo do equivalente de ácido gálico/g de amostra. O gráfico foi plotado em função das respectivas absorbâncias lidas em 595 nm..... 75

Figura 3. Curva padrão de Fenóis Totais com trolox usado para cálculo do equivalente de trolox/g de amostra. O gráfico foi plotado em função das respectivas absorbâncias lidas em 760 nm..... 76

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM SEGMENTOS DE TÉPALAS DE AMARÍLIS (*Hippeastrum* sp. Herb.)

Autor: ANA VICTÓRIA CONDE VAN DEN BROEK

Orientador: Prof. Dr. JEAN CARLOS CARDOSO

RESUMO

O Brasil é um importante exportador de produtos propagativos como bulbos e mudas, com destaque para o amarílis ou *Hippeastrum*. O *Hippeastrum hybridum*, uma planta bulbosa pertencente a *Amaryllidaceae* é nativa da América do Sul e encontrada em regiões tropicais e subtropicais. Seu uso comercial, como ornamental, é resultante de híbridos interespecíficos provenientes de seis espécies principais. A propagação massal dessa espécie é feita pela técnica conhecida como escamas duplas. Todavia, os métodos vegetativos de propagação favorecem o surgimento e multiplicação de microrganismos endógenos, especialmente fitopatógenos, como Cumcuber Mosaic Vírus (CMV), Mosaico-do-*Hippeastrum* (HiMV) e vírus vira-cabeça-do-tomateiro – Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV). Nesse sentido, é essencial a busca por métodos que garantam plantas livres de vírus, como por exemplo a embriogênese somática (ES), que é uma técnica de cultivo *in vitro* a qual visa regenerar embriões originados a partir de células e tecidos somáticos, e na qual os tecidos resultam em calos embriogênicos e embriões. Portanto, é uma forma de viabilizar estratégias de propagação mais rápidas e eficientes, garantindo a geração de tecnologias que poderão, no futuro, transformar o mercado de produção de amarílis. Sob essa perspectiva, a embriogênese somática (ES) é uma tecnologia que possibilita estudos dos mecanismos de formação de embriões somáticos, informações sobre compostos envolvidos nesse processo e a correlação de dados bioquímicos com os processos embriogênicos. Em tal cenário, este trabalho teve como principais resultados o aumento da eficiência da indução da ES, de 11% para 85,4% de segmentos de tépalas contendo embriões ou calos embriogênicos. Esse aumento na frequência de ES se deu principalmente pelo uso de tépalas de botões florais mais jovens, pelo cultivo em iluminação LED branca ou LED vermelho-branco (V+B), e a presença de PVP 40 no meio de cultura, o que resultou em até 13,57 embriões/explante e massa fresca de calos de 0,96 (g/explante). Foi possível observar a correlação de compostos como quercetina em tépalas cultivadas *in vitro* com aumento de massa de calos embriogênicos. Outro ponto importante da melhoria da frequência da ES foi a realizar o subcultivo dos segmentos de tépalas após 30 dias da primeira inoculação em meio de cultura MS $\frac{1}{2}$, o qual demonstrou aumento do poder redutor e favoreceu a biossíntese nas tépalas da substância antioxidante rutina.

Palavras-chave: *Amaryllidaceae*, flavonoides, embriogênese somática, cultivo *in vitro*, reguladores vegetais.

SOMATIC EMBRYOGENESIS IN AMARYLLIS TEPAL SEGMENTS (*Hippeastrum* sp. Herb.)

Author: ANA VICTÓRIA CONDE VAN DEN BROEK

Adviser: Prof. Dr. JEAN CARLOS CARDOSO

ABSTRACT

Brazil is an important exporter of propagative products such as bulbs and seedlings, with a highlight on the amaryllis or *Hippeastrum*. *Hippeastrum hybridum*, a bulbous plant belonging to the Amaryllidaceae family, is native to South America and found in tropical and subtropical regions. Its commercial use, as an ornamental plant, results from interspecific hybrids originating from six main species. The mass propagation of this species is done through the technique known as double scales. However, vegetative propagation methods favor the emergence and multiplication of endogenous microorganisms, especially phytopathogens such as Cucumber Mosaic Virus (CMV), *Hippeastrum* Mosaic Virus (HiMV), and Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV). Therefore, it is essential to seek methods that ensure virus-free plants, such as somatic embryogenesis (SE), which is an *in vitro* cultivation technique aimed at regenerating embryos originating from somatic cells and tissues, resulting in embryogenic calli and embryos. Thus, it is a way to enable faster and more efficient propagation strategies, ensuring the generation of technologies that could transform the amaryllis production market in the future. In this perspective, somatic embryogenesis (SE) is a technology that enables studies on the mechanisms of somatic embryo formation, information on the compounds involved in this process, and the correlation of biochemical data with embryogenic processes. In this scenario, the main results of this work were the increased efficiency of SE induction, from 11% to 85.4% of tepal segments containing embryos or embryogenic calli. This increase in SE frequency was mainly due to the use of tepals from younger flower buds, cultivation under white LED or red-white LED lighting (R+W), and the presence of PVP 40 in the culture medium, which resulted in up to 13.57 embryos/ explant and fresh callus mass of 0.96 (g/explant). It was possible to observe the correlation of compounds such as quercetin in tepal segments cultivated *in vitro* with an increase in embryogenic callus mass. Another important point in improving SE frequency was subculturing the tepal segments 30 days after the initial inoculation in MS $\frac{1}{2}$ culture medium, which demonstrated increased reducing power and favored the biosynthesis of the antioxidant rutin in the tepals.

Key-words: *Amaryllidaceae*, flavonoids, somatic embryogenesis, *in vitro* culture, and plant growth regulators.

INTRODUÇÃO

O Brasil é ativo na produção de bulbos de flores com área cultivada de cerca de 15.600 ha e um valor de produção de 1,7 bilhão de euros (Yasemin & Beruto, 2024). No mercado internacional, a floricultura brasileira vem se especializando na multiplicação de material de propagação, que são exportados em quantidades significativas. Nesse contexto, destaca-se o amarílis, em que grande parte de sua produção é destinada à exportação e ao mercado interno (Tombolato et al., 2010; Junqueira & Peetz, 2018).

O *Hippeastrum hybridum*, é uma planta bulbosa pertencente a *Amaryllidaceae*, sendo nativa da América do Sul, é encontrada em regiões tropicais e subtropicais (Dahlgren & Clifford, 1982). O gênero *Hippeastrum* conta com cerca de 50 espécies, das quais 38 estão no Brasil, embora estimativas variem entre 50 e 75 espécies (Dutilh, 2005; Judd et al., 1999; Dahlgren et al., 1982). Seubert (1847) classificou *Hippeastrum* como um subgênero de *Amaryllis*, com 20 espécies descritas (Dutilh, 1996). Neste cenário, a maioria dos híbridos comerciais disponíveis no mercado são resultado do cruzamento entre espécies como *Hippeastrum papilio*; *Hippeastrum striatum*; *Hippeastrum reginae*; *Hippeastrum reticulatum* e *Hippeastrum equestre*. Além dessas, outras duas espécies como *Hippeastrum vittatum* e *Hippeastrum cybister*, também tem papel importante na geração de novas variedades (Tombolato, 2004).

Os bulbos de *Hippeastrum* são perenes, possuem folhas dísticas laminares, com duas brácteas espatais livres e escapos ocos. As inflorescências são principalmente em umbela, constituídas de até oito flores trímeras individuais e ligeiramente zigomorfas (Tombolato, 2004). A propagação em larga escala dessa espécie é feita pela técnica conhecida como escamas duplas. Todavia, esta técnica promove a disseminação de doenças sistêmicas, dentre elas os vírus, que reduzem a produtividade, atrasam e diminuem a qualidade da floração. Desse modo, a busca por técnicas que conciliem a propagação clonal associando a produção de plantas livres de vírus, bactérias e fungos poderia resultar em ganhos consideráveis para o aumento da qualidade e comercialização de amarílis no mercado internacional. Sob essa perspectiva, há um vasto potencial de recursos ainda não explorados a partir da embriogênese somática (ES), que é uma técnica de cultivo *in vitro* a qual visa regenerar embriões originados a partir de células e tecidos somáticos, portanto de

origem clonal, e na qual os tecidos resultam em calos embriogênicos e embriões (Ikeuchi, *et al.*, 2016).

O desenvolvimento de tecnologias *in vitro* viáveis para a produção de plantas de interesse econômico pode contribuir para o estabelecimento de plantações comerciais, e o cultivo *in vitro* é uma forma de viabilizar estratégias propagativas mais rápidas e eficientes, garantindo a aquisição de conhecimentos sobre a planta e a geração de tecnologias que poderão, no futuro, transformar o mercado de produção de amarílis (Yasemin & Beruto, 2024).

Além disso, é necessário conhecer mais sobre os mecanismos de formação de embriões somáticos em plantas ornamentais, à exemplo do gênero *Hippeastrum*, visando aumentar a frequência da embriogênese somática e a produção de embriões, que ainda é limitada e altamente genótipo-dependente (Almeida et al. 2022) especialmente as informações sobre os metabólitos secundários e a atividade antioxidante envolvidos nesse processo e a relação desse metabolismo com os processos embriogênicos.

Visando melhor estabelecer essa correlação, este trabalho foi dividido em dois capítulos e juntos tiveram como objetivo obter um protocolo eficiente com o intuito de obter embriões somáticos de *H. hybridum* cv. Intokase. Esse trabalho objetivou estudar os fatores que afetam a embriogênese somática, a exemplo de fator endógeno, como a idade dos tecidos utilizados como explantes e de fatores exógenos como o meio de cultura, fontes de açúcar, fitorreguladores, antioxidantes aplicados ao meio de cultivo e necessidade de subcultivos dos explantes. A fundamentação do presente projeto se baseia no fato de que a partir de um protocolo prévio gerado pelo nosso grupo, as alterações de alguns desses fatores externos durante a indução da ES poderiam auxiliar no aumento da frequência de regeneração de ES. Ao mesmo tempo, o projeto teve como objetivo correlacionar o aumento da frequência da ES com a atividade antioxidante, produção de fenóis e quantificação e identificação de alguns compostos fenólicos nos tecidos vegetais.

OBJETIVOS

Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi aumentar a frequência da embriogênese somática em segmentos de tépalas de amarílis a partir de experimentos com meios de cultura, carboidratos, PVP40 e espectro luminoso e analisar nos tecidos a relação de alguns componentes do metabolismo secundário com a frequência de embriogênese somática em tépalas de amarílis.

Objetivos específicos

- Testar a aplicabilidade do protocolo de embriogênese somática para uma cultivar recalcitrante de amarílis;
- Testar o fator idade dos tecidos florais na frequência de regeneração dos embriões somáticos
- Testar diferentes concentrações de antioxidantes no meio de cultura e avaliar as respostas dos tecidos florais nos diferentes espectros de luzes;
- Avaliar os efeitos do uso de antioxidantes na obtenção embriões somáticos e calos embriogênicos.
- Avaliar os efeitos de duas fontes nutricionais na obtenção de embriões somáticos e calos embriogênicos.
- Avaliar o potencial antioxidante dos extratos metanólicos.
- Identificar quais flavonoides estão envolvidos com a embriogênese somática.

REVISÃO DA LITERATURA

1. *Hippeastrum* sp. Herb.

A Amaryllidaceae é originária do sul da África e da América do Sul, e sua distribuição ocorre em regiões tropicais e subtropicais (Dahlgren; Clifford, 1982).

O gênero *Hippeastrum* possui cerca de 50 espécies, das quais 38 são citadas para o Brasil (Dutilh, 2005). Porém na literatura, segundo Dahlgren et al. (1982) esse número está entre 50 à 75, entretanto Judd et al. (1999) cita cerca de 70 espécies.

A versão mais recente da taxonomia do gênero foi elaborada por Seubert (1847) a qual está publicada na Flora Brasiliensis, o autor considera *Hippeastrum* como subgênero de *Amaryllis* definindo-se 20 espécies. (Dutilh, 1996). Entretanto, a maioria dos híbridos comerciais disponíveis no mercado são derivados de cruzamentos entre 6 espécies.

Os bulbos de *Hippeastrum* emitem um caule de flor oco e ereto, geralmente antes das folhas serem produzidas. Quando os bulbos são grandes podem produzir mais de um pedúnculo, simultaneamente ou sequencialmente. Cada escapo de 18-24 centímetros de altura produz de quatro a cinco flores grandes em uma inflorescência umbeliforme. Duas brácteas livres envolvem os botões florais terminais até florescerem (Meerow, 1998).

O nome "*Hippeastrum*" foi definido pelo botânico William Herbert, o qual descreveu a primeira espécie de nome *Hippeastrum reginae* (Herbert, 1821).

2. Potencial ornamental e medicinal

Os fenótipos desse gênero incluem flores grandes e de coloração variada, podendo ser brancas, vermelhas, rosa, salmão, damasco, rosa ou bicolores. No mercado atual existem híbridos os quais são comercializados como flores de vasos, o híbrido *Hippeastrum hybridum* cv. Intokase apresenta flores grandes e de coloração branca (Figura 1) (Silberbush et al., 2003).



Figura 1. Conjunto de flores de *Hippeastrum hybridum* cv. Intokase. Fonte: Terra Viva Flores e Plantas.

O bulbo de amarílis armazena nutrientes importantes para o seu crescimento e desenvolvimento, sendo fonte de matéria prima para o plantio, sua floração apresenta crescimento acelerado, sendo que cada bulbo pode produzir de uma a três hastes, cada uma com conjuntos de quatro a cinco flores, com durabilidade de cerca de quinze dias. Após esse período, o bulbo entra em estado vegetativo, com produção de novas folhas. E logo após ocorre o estado de dormência, perdendo suas folhas, florescendo novamente na primavera (Terra Viva, 2019).

Uma característica peculiar das *Amaryllidaceae* é o uso de compostos medicinais na medicina popular para tratamento de doenças (Döpke et al., 1995; Louw et al., 2002). Esses compostos podem ser encontrados em toda a planta,

porém estão predominantemente nos bulbos (Bruneton, 2001), e devido a inúmeras espécies o teor e conteúdo sofrem variações (Elgorashi *et al.*, 2003).

Os extratos de *Hippeastrum* possuem alcaloides, fenóis e flavonóides caracterizado por serem compostos bioativos com propriedades antioxidantes, anti-cancerígenas, anti-inflamatórias e antimicrobianas. Além das propriedades mencionadas, estudos têm investigado o potencial das espécies de *Hippeastrum* para o tratamento de doenças metabólicas e como agentes neuroprotetores (Shahzad *et al.* 2022; Liang *et al.*, 2020; Stark *et al.*, 2019; Cortes *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2010).

3. Cultivo *in vitro*

A produção de *Hippeastrum sp.* no Brasil é muito significativa e abrange tanto o cultivo comercial de empresas produtoras de bulbos quanto o uso ornamental em jardins domésticos (Pizano, 2022). Todavia, a sua comercialização depende da multiplicação dos bulbos nos viveiros e estufas (Pereira, *et al.*, 2018), e essa técnica possui limitações devido a necessidade de utilização de extensas áreas de plantio.

Nesse contexto, a técnica de micropropagação apresenta vantagens ao produtor, pois permite a preservação do germoplasma, fornece plantas em larga escala a partir de pequenos explantes, garante a produção de plantas livre de patógenos e doenças sistêmicas, além da produção de plantas independente das condições sazonais externas (De Klerk, 2012; Hartmann, 1959; Debergh *et al.*, 1981).

Em amarílis a regeneração *in vitro* tem sido estudada por vários autores, há relatos de autores que utilizaram segmentos de escamas do bulbo visando a embriogênese somática (Mujib, *et al.*, 2005) (Yu *et al.*, 2018), bulbos *in vitro* (Gong, *et al.*, 2012), ovários (Huang & Chang, 2005a) e pedicelos (Huang & Chang, 2005b). Recentemente, foi desenvolvido também um protocolo que utilizou como explante inicial tépalas internas das flores visando a ES, a qual resultou em sucesso na obtenção dos embriões somático, com aclimatização das plântulas e 100% de plantas livres dos dois principais vírus causadores do mosaico nessa espécie, *Hippeastrum Mosaic Virus* (HiMV) e *Cucumber Mosaic Virus* (CMV) (de Almeida *et al.*, 2022).

Para que as plantas sejam propagadas visando uniformidade de produção, sazonalidade e sanidade, a cultura de tecidos vegetais é uma aliada caracterizando-se pelo cultivo de material vegetal sobre um meio de cultura nutritivo, em condições assépticas e cultivo em ambiente (iluminação e temperatura) controlado. A principal técnica é a de micropropagação, sendo amplamente utilizada por laboratórios ao redor do mundo (Cardoso *et al.*, 2018).

Dentro da sala de cultivo, as prateleiras são equipadas com iluminação artificial, garantindo que as plantas recebam um mínimo de quantidade necessária de luz. Para tanto, o uso de diodos emissores de luz (LEDs) garante eficiência energética (Sena, *et al.*, 2024) e auxiliam nas diversas respostas fisiológicas que se pode obter, como aumento da taxa fotossintética (Kozai, 2016), influência na morfogênese das plantas cultivadas *in vitro* (Lian *et al.*, 2002) e produção de compostos fenólicos (Costa, *et al.*, 2019).

Diversos são os fatores que influenciam no sucesso da técnica, dessa forma para obter um protocolo viável recorreremos aos aspectos envolvidos na escolha assertiva como por exemplo o meio de cultura, os hormônios, a fonte de carbono, o tipo e a qualidade da fonte luminosa, a temperatura ideal, a idade da planta, a época de colheita, o material vegetal, dentre outros fatores que estão interligados nesse processo de micropropagação (George, *et al.*, 2008). Portanto, essa etapa de ajuste é crucial para que seja possível micropropagar o *Hippeastrum* em condição laboratorial.

Dentro os objetivos citados do cultivo *in vitro*, destaca-se a produção em larga escala de clones idênticos a planta-mãe, isso só é possível pela totipotência celular, a qual poderá seguir a rota da organogênese ou da embriogênese somática (Haberlandt, 1902) (Segura, 1993) (Phillips; Garda, 2019).

O processo de indução que leva à embriogênese somática ocorre em células transientes expostas a estresse intenso e/ou altas concentrações de fitorreguladores. De acordo com os modelos aceitos pelos pesquisadores, essa indução resulta na desdiferenciação das células somáticas vegetais, seguida ou acompanhada pela recuperação da totipotência. Em seu estágio totipotente, as células tornam-se capazes de perceber sinais de desenvolvimento apropriados para iniciar a

embriogênese, o que ocorre naturalmente em condições adequadas tanto *in vivo* quanto *in vitro* (Ramírez-Mosqueda, 2022).

4. Embriogênese somática

Dentre os modelos morfogenéticos, a embriogênese somática é caracterizada pela formação de embriões assexuados em que células somáticas diploides desenvolvem-se em plantas sem fusão de gameta e que não dispõe de conexão vascular com o tecido mãe (Werner *et al.*, 2012). Podendo ocorrer pela seleção e ativação de células competentes (modelo direto), sem a formação de estádios intermediários de calos, ou com a indução de células (modelo indireto), formação de calos, sendo necessário condições controladas e meio de cultura balanceado para originar plantas inteiras (Mantell *et al.*, 1994).

As mudanças no desenvolvimento do embrião são visíveis e ocorre na maioria das vezes com a formação de células com competência embriogênica, passando pelas etapas de estágio globular, codiforme e torpedo (Toonen; Vries, 1996).

Entretanto, existe evidência que em monocotiledôneas, os embriões somáticos compreendem estruturas globulares, que se desenvolvem assemelhando-se a um coleótilo e um esculeto (George, 1996).

No processo embriogênico é frequentemente relacionado o uso de auxinas, conforme comprovado pelo uso desta classe de fitorreguladores em vários protocolos (Karami, et al., 2021). Durante as fases iniciais da embriogênese, observa-se um aumento nos níveis de auxina endógena, o qual está associado à ativação de sinais de estresse e alterações no estado da cromatina (Ribnicky, et al., 2002; Phillips, et al., 1994). A necessidade de auxinas é temporária e específica para os estágios iniciais da embriogênese, os quais geralmente são marcados pela formação de tecido embriogênico; as próximas fases do cultivo podem ocorrer na ausência de auxina (Pasqual, et al.1997; Jiménez, 2005). Esta ideia geral é aplicável a várias espécies, incluindo *Arabidopsis*, um sistema modelo na biologia vegetal (Ji, et al., 2019; Horstman, et al., 2017).

Um dos aspectos relevantes da embriogênese vegetal *in vitro* é a grande diversidade das condições de cultivo que podem iniciar o desenvolvimento de embriões, incluindo tratamentos hormonais e de estresse (Fehér et al., 2003).

5. Bioquímica do cultivo *in vitro*

Em virtude do ambiente laboratorial ser totalmente controlado, e moldável, os explantes que são inoculados *in vitro* passam por sucessivas manipulações e dessa forma, estão sujeitos a condições ambientais incomuns, quando comparadas as condições de uma casa de vegetação ou campo por exemplo (Gaspar et al., 2002). A citar, a alta umidade relativa no interior dos frascos e tubos; o acúmulo de gases, principalmente o etileno; elevadas concentrações de reguladores de crescimento vegetal; acúmulo de substâncias reativas, como por exemplo as espécies reativas de oxigênio; elevadas quantidades de carboidratos; dentre outros.

Todos esses fatores, somados, favorecem dois tipos de estresse: sendo um benéfico para o desenvolvimento vegetal e outro com efeitos danosos. Portanto, um estresse leve ativa o metabolismo celular, induzindo uma resposta defensiva ou adaptativa (Pinto et al., 2010). O estresse *in vitro* expressa-se na forma de estresse oxidativo, que é um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO's), como peróxidos e radicais livres, e a capacidade das células em neutralizá-las por meio de sistemas antioxidantes (Pinto et al., 2010). Dessa forma, acarreta na elevação das concentrações das ERO's, que atacam moléculas vitais como proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, promovendo distúrbios estruturais, metabólicos e fisiológicos, que podem levar a morte (Bray; Bailey; Weretilnyk, 2000).

Entretanto, as ERO's são produzidas naturalmente nas plantas, pela cadeia transportadora de elétrons no cloroplasto e mitocôndria e pela fotorrespiração (Dat et al., 2000) e têm papel crucial na sinalização o crescimento e desenvolvimento das plantas. Nesse sentido, é benéfico e necessário níveis baixos de estresse oxidativo para desencadear uma determinada rota morfogênica (Obert et al., 2005; Blazquez et al., 2009).

Dessa forma, as ERO's têm papel duplo como compostos tóxicos, e como reguladoras chaves de muitos processos biológicos, tais como crescimento, ciclo celular, morte celular programada, sinalização hormonal, resposta celular aos fatores bióticos e abióticos e desenvolvimento (Foyer; Noctor, 2005; Fujita et al., 2006; Miller et al., 2009; Mittler et al., 2004).

Com isso, a evolução de um mecanismo eficiente das células vegetais permitiu a mitigação da toxicidade das espécies reativas de oxigênio. A exemplo o mecanismo que compõe o sistema antioxidante, sendo representado pelas enzimas, tais como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase

(APX), entre outras. Ademais, o equilíbrio desse sistema é essencial para suprimir quantidades tóxicas EROs em uma célula e para auxiliar no desenvolvimento sadio e vigoroso do tecido (Hung et al., 2005).

A superóxido dismutase (SOD) é a enzima intracelular antioxidante mais eficaz, e está presente em todos os organismos aeróbicos e em todos os compartimentos subcelulares propensos ao estresse oxidativo mediado por ROS. Atualmente é bem estabelecido que vários estresses ambientais frequentemente levam ao aumento da geração de ERO's e a SOD tem sido considerada importante para as plantas na tolerância ao estresse ERO's por fornecer a primeira linha de defesa contra os efeitos tóxicos de níveis elevados de ERO's (Gill & Tuteja, 2010). A SOD atua na remoção do $O_2^{\cdot-}$ liberando H_2O_2 e O_2 . Em seguida, as moléculas de H_2O_2 produzidas são removidas pela CAT e APX. Estes metabólitos são importantes para a eliminação dos radicais OH^{\cdot} , considerados as mais reativas e danosas formas das ERO's (Foyer & Noctor, 2011).

6. Análises bioquímicas

Durante a embriogênese somática, as células vegetais enfrentam estresses físicos, químicos e biológicos. Nesse sentido, a bioquímica ajuda a entender as respostas adaptativas das células a esses estresses, a atividade antioxidante das células, incluindo a capacidade de neutralizar radicais livres através de antioxidantes endógenos como compostos fenólicos, enzimas antioxidantes e outras moléculas redutoras. Avaliar esses compostos norteiam os estudos para elucidar como as células respondem ao estresse oxidativo e para melhorar a eficiência na produção de plantas regeneradas (Hasanuzzaman, et al., 2012).

Portanto, existem diversas metodologias usadas para avaliar a capacidade antioxidante, podendo ser expressas por meio de parâmetros, como: a capacidade de redução de um metal (método FRAP, do inglês ferric reducing antioxidant power, a capacidade de remoção de um radical orgânico (método DPPH – peroxidação do 2,2-difenil-1-picrilidrazil), entre outros (Kang & Saltveit, 2002).

Além da atividade antioxidante, a análise de compostos fenólicos também está inserida nesse contexto. Fenóis estão envolvidos em várias funções fisiológicas, incluindo defesa contra estresses ambientais e regulação do crescimento celular. A quantificação desses compostos gera informações sobre os

estágios de desenvolvimento e a qualidade dos embriões vegetais formados *in vitro* (Pratyusha, 2022).

6.1 Método do DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil)

O método do sequestro do radical estável DPPH● é o mais utilizado em avaliações preliminares acerca da atividade antioxidante de compostos isolados ou extratos vegetais. O DPPH● possui coloração violácea e absorção no λ de 517 nm. Na presença de um doador de hidrogênio, ou seja, um átomo de hidrogênio proveniente de um composto antioxidante (X-H), o radical se reduz a DPPH-H, com mudança da coloração para amarelo (Brand-Williams et al., 1995). A reação é monitorada pelo decréscimo da absorbância, que pode ser avaliada em espectrofotômetro UV-Vis. Como parâmetro de comparação com os resultados da amostra, é comum a utilização neste ensaio de padrões de antioxidantes. Exemplos de compostos utilizados como padrão de antioxidantes são o ácido gálico, ácido ascórbico, tocoferol, quercetina e trolox (Furlan et al., 2015).

6.2 Método FRAP (Poder Antioxidante Redutor do Ferro)

O ensaio pelo método FRAP baseia-se na redução do íon Fe^{3+} (forma férrica), presente no complexo 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ), a íon Fe^{2+} (forma ferrosa), na presença de um antioxidante. O complexo formado após a redução apresenta coloração roxa, com absorção de λ 593 nm. Desta forma, quanto maior a absorbância medida após a reação, maior será o potencial antioxidante da amostra avaliada. O resultado final pode ser expresso como a concentração de antioxidante capaz de reduzir 1 μmol de sulfato ferroso, usado como padrão no ensaio. Outras formas de expressar o resultado final incluem equivalentes de ácido ascórbico (número de μmoles de ácido ascórbico capaz de produzir a mesma atividade de 1g de amostra) ou outros compostos antioxidantes utilizados como padrão no ensaio (Amorati & Valgimigl, 2015).

6.3 Método Folin-Ciocalteu

Na literatura há várias metodologias de quantificação para compostos fenólicos, sendo o ensaio de Folin-Ciocalteu o mais usado e amplamente estudado. Basicamente, este ensaio mede a capacidade de transferência de elétrons de substâncias redutoras, como por exemplo os compostos fenólicos, em meio alcalino

para o reagente ácido fosfotúngsticofosfomolibdico, resultando em complexos azuis que são detectados espectrofotometricamente (Pires et al., 2017).

6.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC, do inglês High Performance Liquid Chromatography) é uma técnica analítica utilizada na separação, identificação e quantificação dos componentes de uma amostra, os quais se distribuem em duas fases, uma estacionária e a outra móvel (Snyder & Kirkland, 2009).

O processo começa com a preparação da amostra, que é dissolvida em um solvente adequado e injetada em um sistema de HPLC. A amostra é então forçada a passar através de uma coluna preenchida com uma fase estacionária, geralmente um material sólido que interage com os componentes da amostra de forma diferente. A fase móvel, que é o solvente que flui pela coluna, transporta a amostra e ajuda a separar seus componentes com base nas interações dessas substâncias com a fase estacionária (Shieppati, et al., 2021).

À medida que os diferentes componentes saem da coluna, eles passam por um detector, que pode usar diversos princípios, como absorção UV-Vis, fluorescência ou condutividade, para gerar um sinal registrado em forma de um cromatograma. Esse cromatograma é um gráfico que exhibe picos correspondentes aos diferentes componentes da amostra, permitindo a análise e quantificação dos mesmos com base no tempo de retenção e na área dos picos (Guiochon; Gritti, 2013).

O detector de arranjo linear de diodos, do inglês, Diode array Detector (DAD), consiste em um sistema em que a luz policromática é incidida em uma cela em fluxo pelo qual o eluente da coluna é bombeado. Após passar pela amostra, o feixe luminoso é espalhado em um grid de difração em diversos comprimentos de onda, que são detectados pelos diodos, cada um dedicado a uma faixa de fótons incidentes. Dessa forma, quando um analito é eluído da coluna, se ele absorve algum comprimento de onda que pode ser detectado pelo DAD, a atenuação de intensidade luminosa nos diodos promove uma diferença de potencial elétrico, que, por sua vez, promove um sinal amplificável e conversível em um sinal digital registrado pelo software do equipamento (Shieppati, et al., 2021).

O DAD permite o monitoramento de múltiplos comprimentos de onda simultaneamente, a obtenção do espectro de absorção de Ultravioleta-Visível dos analitos, e pode fornecer informações sobre a pureza da banda cromatográfica, caso compostos coeluídos apresentem diferentes perfis de absorção da faixa do espectro eletromagnético medido (Patterson, 2008).

Assim, o HPLC-DAD pode medir qualquer analito desde que ele absorva em algum comprimento de onda dentro da faixa de 190 a 800 nm (faixa UV-VÍIS do espectro eletromagnético) (Meyer, V.; Reusch, 2002).

LITERATURA CITADA

AMORATI, R.; VALGIMIGLI, L. Advantages and limitations of common testing methods for antioxidants. **Free Radic. Res**, v. 49, p.633–649, 2015.

BLAZQUEZ, S.; OLMOS, E.; HERNÁNDEZ, J.A.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, N.; FERNÁNDEZ, J.A.; PIQUERAS, A. Somatic embryogenesis in saffron (*Crocus sativus* L.). Histological differentiation and implication of some components of the antioxidant enzymatic system. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, v. 97, p. 49-57, 2009.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT–Food Sci. Technol**, v.28, p.25, 1995.

BRAY, E.A.; BAILEY-SERRES, J.; WERETILNYK, E. Responses to abiotic stresses. In: BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. (Ed.). *Biochemistry & molecular biology of plants*. Rockville: **American Society of Plant Physiologists**. p. 1189-1197, 2000.

BRUNETON, J. *Farmacognosia: Fitoquímica - Plantas Medicinales*. 2. ed. Zaragoza: Acribia S.A. 1099p, 2001.

CARDOSO, J. C.; SHENG GERALD, L. T.; TEIXEIRA DA SILVA, J. A. Micropropagation in the Twenty-First century. **Methods in Molecular Biology**, v. 1815, p. 17–46, 2018.

CORTES, N.; CASTAÑEDA, C.; OSORIO, E. H.; CARDONA-GOMEZ, G. P.; OSORIO, E. Amaryllidaceae alkaloids as agents with protective effects against oxidative neural cell injury. **Life Sciences**, v. 203, p.54-65, 2018.

COSTA, G., GASCA, C., GOMES, J.V., TORRES, A., SANTOS, I., de ALMEIDA, F. T. C., FAGG, C. SIMEONI, L., SILVEIRA, D., COPELAND, K. Influence of in vitro micropropagation on lycorine biosynthesis and anticholinesterase activity in *Hippeastrum goianum*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 2019.

DAHLGREN, R.M.T.; CLIFFORD, H.T. **The monocotyledons: a comparative study**. London: Academic Press, p. 378, 1982.

DAT, J.; VANDENABEELE, S.; VRANOVÁ, E.; VAN MONTAGU, M.; INZE, D.; VAN BREUSEGEM, F. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences*, Basel, v. 57, p. 779-795, 2000.

de ALMEIDA, N.V.; RIVAS, E.B.; CARDOSO, J.C. Somatic embryogenesis from flower tepals of *Hippeastrum* aiming regeneration of virus-free plants. **Plant Sci.** 2022. DOI: 10.1016/j.plantsci.2022.111191

DE KLERK, G. J. M. Micropropagation of bulbous crops: technology and present state. **Floriculture and Ornamental Biotechnology**, v. 6, n. 1, p. 1-8, 2012.

DEBERGH, P. C.; MAENE, L. J. A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. **Scientia horticultrae**, v. 14, n. 4, p. 335-345, 1981.

DÖPKE, W.; PHAM, L. H.; GRÜNDEMANN, E.; BARTOSZEK, M.; FLATAU, S. Alkaloids from *Hippeastrum* equestre; Part I: Phamine, a new phenanthridone alkaloid. *Planta Medica*, v. 61, p. 564-566, 1995.

DUTILH, J. H. A. Amaryllidaceae In: Wanderley, M.G.L., Shepherd, G.J., Melhem, T.S., Martins, S.E., Kirizawa, M., Giulietti, A.M. (eds.) *Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo*. Instituto de Botânica, São Paulo, vol. 4, pp: 244-256, 2005.

DUTILH, J. H. A. Biosistemática de quatro espécies de *Hippeastrum* Herb. (Amaryllidaceae). 153 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biologia, Universidade estadual de Campinas, Campinas, 1996.

ELGORASHI, E. E.; DREWES, S. E.; MORRIS, C.; STADEN, J. V. Variation among three *Crinum* species in alkaloid content. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 31, p. 601-615, 2003.

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

FOYER, C.H., NOCTOR, G. Ascorbate and Glutathione: The Heart of the Redox Hub. *Plant Physiol.* v. 155, p. 2–18, 2011. doi:10.1104/pp.110.167569

FOYER, C.H.; NOCTOR, G. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell*, Berlin, v. 17, p. 1866-1875, 2005. DOI 10.1105/tpc.105.033589.

FUJITA, M.; FUJITA, Y.; NOUTOSHI, Y.; TAKAHASHI, F.; NARUSAKA, Y.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Current Opinion in Plant Biology*, Cambridge, p. 436-442, 2006. DOI 10.1016/j.pbi.2006.05.014.

FURLAN, C. M., SANTOS, K. P., SEDANO-PARTIDA, M. D., DA MOTTA, L. B., SANTOS, D. Y. A. C., SALATINO, M. L. F., NEGRI, G., BERRY, P. E., VAN EE, B. W., & SALATINO, A. Flavonoids and antioxidant potential of nine Argentinian species of *Croton* (Euphorbiaceae). **Brazilian Journal of Botany**, 38(4), 693–702, 2015.

GASPAR, T.; FRANCK, T.; BISBIS, B.; Kevers, C.; Jouve, L.; Hausman, J.F.; Dommes, J. Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. **Plant Growth Regulation**. v. 37, p.263–285, 2002.

GASPAR, T.; FRANCK, T.; BISBIS, B.; KEVERS, C.; JOUVE, L.; HAUSMAN, J.F.; DOMMES, J. Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. *Plant Growth Regulation*, v.37, p.263-285, 2002.

GEORGE, E. F. Plant propagation by tissue culture. Part 2: In Practice. Second edition. Edington: Exegetics Limited, 1361p. 1996.

GEORGE, E.F., HALL, M.A., KLERK, G.J.D. Micropropagation: Uses and Methods. *In: Plant Propagation by Tissue Culture: Volume 1. The Background*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2008. p. 65-113.

GILL, S., TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiol. Biochem.** v. 48, p. 909–930, 2010. doi:10.1016/j.plaphy.2010.08.016

GONG, X. Q.; YOU, C. R.; QU, F. N.; CHEN, L. X.; YU, W. S.; JIE, X. X. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Hippeastrum hybridum*. **Acta Horticulturae Sinica**, v.39, p. 381–386, 2012.

GUIOCHON, G.; GRITTI, F. *Fundamentals of Preparative and Nonlinear Chromatography*. 2. ed. Amsterdam: Elsevier, 2013.

HABERLANDT, G. Culturversuche mit isolierten. Pflanzenzellen. Sitzungsberichte der Kaiserlichen. Akademie der Wissenschaften. Mathematisch-Naturwiss. Kl, Abt I, p. 69-92, 1902

HARTMANN, Hudson Thomas; KESTER, Dale E. *Plant propagation: principles and practices*. 1959.

HASANUZZAMAN, M.; HOSSAIN, M. A.; DA SILVA, J. A. T.; FUJITA, M. Plant response and tolerance to abiotic oxidative stress: antioxidant defense is a key factor. **Environmental and Experimental Botany**, v. 77, p. 57-66, 2012.

HERBERT, W. *An Appendix: [General index to the Botanical magazine, vol. 43–48 containing a treatise on bulbous roots]*. James Ridgway & Sons, London, 52 p., 1821.

HORSTMAN, A.; LI, M.; HEIDMANN, I.; WEEMEN, M.; CHEN, B.; MUIÑO, J.M.; ANGENENT, G.C.; BOUTILIER, K. The BABY BOOM transcription factor activates the LEC1-ABI3-FUS3-LEC2 network to induce somatic embryogenesis. **Plant Physiol.**, 175, 848–857, 2017.

HUANG, C.L.; CHANG, K.C.; KUBO, H. *In vitro* morphogenesis from ovaries of *Hippeastrum x hybridum*, J. Fac. Agric. Kyushu Univ. v. 50, p. 19–25, 2005a.

HUANG, C.L.; CHANG, K.C.; KUBO, H. *In vitro* morphogenesis from pedicels of *Hippeastrum x hybridum*, J. Fac. Agric. Kyushu Univ, v. 50, p. 27–33, 2005b.

HUNG, S-H.; YU, C-W & LIN, C.H. Hydrogen peroxide functions as a stress signal in plants. **Bot Bull Acad Sin.** v 46, p 1–10, 2005.

IKEUCHI, M.; OGAWA, Y.; IWASE, A.; SUGIMOTO, K. Plant regeneration: Cellular origins and molecular mechanisms. **Development**, v. 143, p. 1442–1451, 2016.

JI, L.; MATHIONI, S.M.; JOHNSON, S.; TUCKER, D.; BEWICK, A.J.; DO KIM, K.; DARON, J.; SLOTKIN, R.K.; JACKSON, S.A.; PARROTT, W.A.; et al. Genome-wide reinforcement of DNA methylation occurs during somatic embryogenesis in soybean. **Plant Cell**, 31, 2315–2331, 2019.

JIMÉNEZ, V. M. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. **Plant Growth Regulation**, v. 47, n.2-3, p. 91-110, 2005.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F. Plant systematics: a phylogenetic approach. **Ecología mediterránea**, v.25(2), p.215, 1999.

JUNQUEIRA, A.H.; PEETZ, M.S. Sustainability in Brazilian floriculture: introductory notes to a systemic approach. **Ornamental Horticulture**, v.24, n.2, p.155-162, 2018.

KANG, H. M.; SALTVEIT, M. E. Reduced chilling tolerance in elongating cucumber seedling radicles is related to their reduced antioxidant enzyme and DPPH-radical scavenging activity. **Physiologia Plantarum**, v. 115, p. 244-250, 2002.

KARAMI, O.; PHILIPSEN, C.; RAHIMI, A.; NURILLAH, A.R.; BOUTILIER, K.; OFFRINGA, R. Endogenous auxin directs development of embryonic stem cells into somatic proembryos in Arabidopsis. **bioRxiv**, 152, 118–128, 2021.

KOZAI, T. Why LED Lighting for Urban Agriculture? *In*: Kozai, T., Fujiwara, K., Runkle, E. (eds) **LED Lighting for Urban Agriculture**. Singapura: Springer, 2016.

LIAN, M. L., MURTHY, H.N., PAEK, K-Y. Effects of light emitting diodes (LEDs) on the *in vitro* induction and growth of bulblets of *Lilium* oriental hybrid 'Pesaro'. **Scientia Horticulturae**, v. 94, n. 3-4, p. 365-370, 2002.

LIANG, Q.; CAI, W.; ZHAO, Y.; XU, H.; TANG, H.; CHEN, D.; QIAN, F.; SUN, L. Lycorine ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis via inhibiting NLRP3 inflammasome activation and pyroptosis. **Pharmacological Research**. v. 158, p. 104884- 104926, 2020.

LIU, J.; HU, J. L.; SHI, B. W.; HE, Y.; HU, W. X. Up-regulation of p21 and TNF- α is mediated in Lycorine-induced death of HL-60 cells. **Cancer Cell International**. v. 10, n. 25, p. 1-9, 2010.

LOUW, C. A. M.; REGNIER, T. J. C.; KORSTEN, L. Medicinal bulbous plants of South Africa and their traditional relevance in the control of infectious diseases. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 82, p. 147-154, 2002.

MANTELL, S.H.; MATHEWS, J.A.; MCKEE, R.A. Princípios de biotecnologia em plantas: uma introdução a engenharia genética em plantas. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 344 p., 1994.

MEEROW A.W., SNIJMAN D.A. Amaryllidaceae. In: Kubitzki K., editor. *The families and genera of vascular plants. Flowering Plants, Monocotyledons Liliaceae. (except Orchidaceae.)* Volume 3. Springer; Berlin, Germany; p. 83–110, 1998.

MEYER, V.; REUSCH, M. "Advantages of diode array detection in high-performance liquid chromatography." **Chromatographia**, v. 55, p. 587-591, 2002.

MILLER, G.; SCHLAUCH, K.; TAM, R.; CORTES, D.; TORRES, M.; SHULAEV, V.; DANGL, J.L.; MITTLER, R. The plant NADPH oxidase RBOHD mediates rapid systemic signaling in response to diverse stimuli. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 2, p. 1-11, 2009. DOI 10.1126/scisignal.2000448.

MITTLER, R.; VANDERAUWERA, S.; GOLLERY, M.; VAN BREUSEGEM, F. Reactive oxygen gene network of plants. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 9, n. 10, p. 490-498, 2004. DOI 10.1016/j.tplants.2004.08.009.

MUJIB, A.; BANERJEE, S.; GHOSH, P.D. Origin, Development and Structure of Somatic Embryos in Selected Bulbous Ornamentals: BAP as Inducer. Somatic Embryogenesis: **Plant Cell Monographs**, Berlin, v. 2, p.15-24, dez. 2005.

OBERT, B.; BENSON, E.E.; MILLAM, S.; PRET'OVÁ, A.; BREMNER, D.H. Moderation of morphogenetic and oxidative stress responses in flax *in vitro* cultures by hydroxynonenal and desferrioxamine. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 162, n. 5, p. 537-547, 2005.

PASQUAL, M.; HOFFMANN, A.; RAMOS, J.D. **Cultura de tecidos: tecnologia e aplicações**. Lavras: Ed. Brasil, 1997.

PATTERSON, D. "Diode array detectors in high performance liquid chromatography." **Journal of Chromatography A**, v. 1186, p. 148-162, 2008.

PEREIRA, R., BEZERRA, A. M. E., ALMEIDA, F. D. C. S., BEZERRA, A. M. E. Produção de mudas de açucena (*Hippeastrum elegans* (Spreng.) HE Moore). **Embrapa**. 2018.

PHILLIPS, G.; GARDA, M. Plant tissue culture media and practices: an overview. ***In vitro Cellular & Developmental Biology*** – Plant, v. 55, 2019.

PHILLIPS, R.L.; KAEPLER, S.M.; OLHOFT, P. Genetic instability of plant tissue cultures: Breakdown of normal controls. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 91, 5222–5226, 1994.

PINTO, K.S.; FERREIRA, L.T.; RIBEIRO, A.M.; CAMARA, T.R.; WILLADINOS, L.G. Avaliação do estresse *in vitro* em cana-de-açúcar: variedade rb867515. In: JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO, 10., 2010, Recife. Anais... Recife: UFRPE, p. 12-15, 2010

PIRES, J., TORRES, P., DOS SANTOS, D. & CHOW, F. Ensaio em microplaca de substâncias redutoras pelo método do Folin-Ciocalteu para extratos de algas. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 2017. Disponível em: ISBN 978-85-85658-70-0.1-5.

PIZANO, M. Innovation and sustainability in South American floriculture. **Acta Horticulturae**. pp. 77–84, 2023.

Pratyusha, S. (2022). Phenolic compounds in the plant development and defense: an overview. In: Hasanuzzaman, M. & Nahar, K. (Eds.), *Plant stress physiology - perspectives in agriculture* (pp. 125–140). DOI: <https://doi.org/10.5772/intechopen.102873>

RAMÍREZ-MOSQUEDA, M. A. Overview of somatic embryogenesis. In: **Somatic Embryogenesis: Methods and Protocols**. New York: Humana Press, 2022. p. 1-8.

RIBNICKY, D.M.; COHEN, J.D.; HU, W.S.; COOKE, T.J. An auxin surge following fertilization in carrots: A mechanism for regulating plant totipotency. **Plants**, 214, 505–509, 2002.

SCHIEPPATI, D.; PATIENCE, N. A.; CAMPISI, S.; PATIENCE, G. S. Experimental methods in chemical engineering: High performance liquid chromatography—HPLC. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 99, n. 4, p. 1-22, 2021.

SEGURA, J. Morfogenesis *in vitro*. In: BIETO, J.A.; TALON, M. (Ed.) **Fisiologia y bioquímica vegetal**. Madrid: Ed. Interamericana, 625p, 1993.

SENA, S.; KUMARI, S.; KUMAR, V.; HUSEN, A. Light emitting diode (LED) lights for the improvement of plant performance and production: A comprehensive review. **Current Research in Biotechnology**. v. 7, 2024.

SEUBERT, M. Amaryllidaceae. In: Flora Brasiliensis. 1st ed. Vol. 3 part 1., 1847.

SHAHZAD, A.; AFZAL, S.; AHMAD, I. Spectrophotometric quantification of total phenol, flavonoid and alkaloid content and in-vitro investigation of antioxidant and cytotoxic potential of *Hippeastrum equestre* bulbs. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 56, p. 1263–1271, 2022. DOI: 10.1007/s11094-022-02784-y.

SILBERBUSH, M.; EPHRATH, J. E.; ALEKPAROV-ALEKPAROV, H. K.; BEN-ASHER, J. Nitrogen and potassium fertilization interactions with carbon dioxide enrichment in *Hippeastrum* bulb growth. **Scientia horticultrae**, v. 98, n. 1, p. 85 - 90, 2003.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J. *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. 3. ed. Hoboken: Wiley, 2009.

STARK, A.; SCHWENK, R.; WACK, G.; ZUCHTRIEGEL, G.; HATEMLER, M. G.; BRÄUTIGAM, J.; SCHMIDTKO, A.; REICHEL, C. A.; BISCHOFF, I.; FÜRST, R. Narciclasine exerts anti-inflammatory actions by blocking leukocyte–endothelial cell interactions and down-regulation of the endothelial TNF receptor 1. **The Faseb Journal**. v. 33, n. 8, p. 8771-8781, 2019.

TERRA VIVA, 2019. Disponível em: <<https://www.terraviva.agr.br/amaryllis>>. Acesso em: 21 de abril de 2023.

TOMBOLATO, A.F.C. Cultivo comercial de plantas ornamentais. Campinas: C & M. 211p, 2004.

TOMBOLATO, A.F.C.; UZZO, R.P.; JUNQUEIRA, A.H.; PEETZ M.D.S.; STANCATO, G.C.; ALEXANDRE, M.A.V. Bulbosas ornamentais no Brasil. *Ornamental Horticulture*, v. 16, n. 2, p. 127-138, 2010

TOONEN, M.A.J.; VRIE S, S.C.de. Initiation of somatic embryos from single cells. In: WANG, T.L.; CUMING A. (Eds), *Embryogenesis: the generation of a plant*. Oxford: **Bios Scientific**, p. 173–189, 1996.

WERNER, E.; LIMA, A.; AMARAL, J. A. Expressão Gênica na Embriogênese Somática Vegetal. **Enciclopedia Biosfera**, v. 8, n. 14, 29 p., 2012.

YASEMIN, S.; BERUTO, M. A Review on Flower Bulb Micropropagation: Challenges and Opportunities. **Horticulturae**, vol. 10 (3), p. 284, 2024.

YU, B.; LIU, M.; ZHU, Y.; ZHONG, A.; HUANG, L.; ZHU, D.; LI, C.; ZHU, G.; SUN, Y. Cultivation of *Hippeastrum vittatum* embryogenic Calli and Their sensitivity to antibiotic. **Agricultural Biotechnology**. v. 7(1), p. 5-8, 2018.

CAPÍTULO 1. Antioxidantes e espectro luminoso na embriogênese somática a partir de tépalas de amarílis (*Hippeastrum* sp. Herb.)

1 RESUMO

Hippeastrum sp., comercialmente chamada de amarílis, pertencente a Amaryllidaceae sendo perene e bulbosa. O bulbo do amarílis é um importante produto florícola, valorizado no mercado mundial pelas suas longas inflorescências contendo 3-5 flores de grande diâmetro e coloração ornamental. A propagação em larga escala dessa espécie é feita pela técnica conhecida como escamas duplas. No entanto, esta técnica promove a disseminação de doenças sistêmicas, dentre elas vírus causadores de sintomas de mosaico. Desse modo, a busca por técnicas que conciliem a propagação clonal associando a produção de plantas livres de vírus poderia resultar em ganhos consideráveis para o aumento da qualidade e comercialização de amarílis no mercado internacional. A embriogênese somática (ES) é uma técnica de cultivo *in vitro* que visa a regeneração de embriões originados a partir de células e tecidos somáticos, e na qual os tecidos resultam em calos embriogênicos e embriões. Vários fatores afetam a embriogênese somática, a exemplo de fatores endógenos, como o genótipo e a idade do tecido e de fatores ambientais como, fitorreguladores e antioxidantes aplicados ao meio de cultivo. A fundamentação do presente projeto se baseia no fato de que a partir de um protocolo prévio gerado pelo nosso grupo, as alterações de alguns desses fatores externos durante a indução da ES poderia auxiliar no aumento da frequência de regeneração de ES. Para tanto, foram propostos e realizados diferentes experimentos para teste de fatores endógenos (idade dos tecidos) e exógenos (agentes antioxidantes e iluminação) na ES de segmentos de tépalas de *Hippeastrum* sp. Tecidos jovens foram mais responsivos na geração de ES combinados com presença de PVP 40 e espectro luminoso LED Branco e/ou LED vermelho-branco. Com resultados de massa de calos de 1,5 (g/explante) e quantidade de embriões de 10 embriões/explante para o LED Branco e 0,96 (g/explante) de massa de calos e 13 embriões/explante para o LED vermelho-branco. Foi possível correlacionar os dados bioquímicos com a resposta da ES em tépalas de amarílis.

Palavras-chave: Amarílis, planta ornamental, calos embriogênicos, Ácido 2,4 diclorofenoxiacético, antioxidantes.

2 INTRODUÇÃO

As geófitas ornamentais desempenham um papel significativo para a indústria ornamental global. Devido a sua versatilidade os bulbos podem ser comercializados como flores de corte, flores em vasos, paisagismo e jardinagem (Benschop et al., 2010).

A propagação usualmente é feita por meio de sementes, bulbilhos laterais e escamas duplas, sendo que as sementes têm maior aplicação para o melhoramento genético e desenvolvimento de novas cultivares (Kim & De Hertogh, 1997), enquanto os métodos vegetativos, especialmente o de escama-duplas tem sido aplicado na produção de mudas clonais em larga escala (Bach & Sochacki 2013).

Contudo, apesar de atender as exigências do mercado de flores e bulbos, os métodos vegetativos de propagação apresentam limitações notáveis, como o surgimento e multiplicação de microrganismos endógenos, especialmente fitopatógenos, como os descritos por Alexandre et al. (2005), *Cumcuber Mosaic Virus* (CMV), Mosaico-do-*Hippeastrum* (HiMV) e vírus vira-cabeça-do-tomateiro – *Tomato Spotted Wilt Virus* (TSWV).

As técnicas de cultura de tecidos, como por exemplo a micropropagação a partir de ápices caulinares e a embriogênese somática (ES), oferecem soluções eficazes para os desafios da propagação convencional de bulbos, pois permitem a produção clonal de plantas em larga escala, além de gerar plantas e bulbos saudáveis livres de doenças sistêmicas, e que podem ser usados como matrizes para a propagação convencional por escamas-duplas, gerando cultivos com inóculo inicial zero, visando produções mais eficientes e livres de doenças de grande relevância.

Nesse contexto, recentemente, nosso grupo de pesquisas desenvolveu um protocolo que permitiu a indução e regeneração de ES livres dos dois principais tipos de vírus do amarílis, o HiMV e o CMV (de Almeida et al. 2022) e mais recentemente observados que as plantas provenientes da ES são estáveis geneticamente, apresentando as principais características dos clones utilizados como doadores de explantes. Esses dois pontos permitem um avanço considerável na técnica e um potencial ainda pouco explorado que pode resultar em mudas de altíssima qualidade visando a propagação clonal. No entanto, entre os principais entraves para se usar ou não a ES estão a baixa taxa de indução e regeneração de embriões somáticos e a possibilidade de se obter mutações não desejáveis, também chamadas de

variações somaclonais, devido a reações em cadeia derivadas do processo, que induzem diversos estresses oxidativos e conseqüentemente amplificam a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Apel & Hirt, 2004). Um dos principais produtos produzidos nessa reação são os radicais livres, que possuem um ou mais elétrons desemparelhados no seu orbital de valência e isso os torna altamente reativos. As quantidades elevadas de radicais livres e seus produtos de reação podem levar à recalcitrância morfogênica na cultura de tecidos vegetais (Benson, 2000).

Além disso, dependendo das características do estresse e da planta, haverá uma resposta de resistência ou suscetibilidade a ele, resultando na morte do organismo ou em sua sobrevivência e crescimento (Zhang et al., 2015) (Sen, 2022).

Para tentar contornar esse processo, o uso de antioxidantes no meio de cultura durante as etapas da ES podem ser um fator de alívio do estresse oxidativo, pois a sua adição pode auxiliar em mecanismos celulares que regulam as EROs, protegendo as células dos danos oxidativos, além de absorver os produtos da oxidação fenólica o que pode propiciar o aumento da ES (Goulart et al., 2010).

No entanto, estudos com antioxidantes no cultivo *in vitro* tem sido realizado de modo ainda simples, avaliando-se na maioria dos casos os efeitos dos antioxidantes no estabelecimento das plantas *in vitro*, seus efeitos na produção de compostos fenólicos e na atividade enzimática antioxidante. Associações mais distantes e complexas, como a capacidade de um agente antioxidante em estimular ou inibir um processo embriogênico *in vitro*, ainda são escassos e requerem estudos mais detalhados. Outro ponto importante que foi explorado é a correlação dos efeitos antioxidantes na regeneração via ES e a composição dos fenólicos presentes.

O objetivo do presente trabalho foi propor um protocolo para aumentar a porcentagem de geração de embriões somáticos em segmentos de tépalas de amarílis, testando fatores endógenos como idade dos tecidos e exógenos à exemplo de agentes antioxidantes e iluminação, além de estudar a correlação da formação da ES com alguns componentes do metabolismo secundário de amarílis.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Os bulbos de *Hippeastrum hybridum* cv. Intokase previamente induzidos a floração em câmaras frias, foram obtidos junto a empresa Terra Viva (Holambra, SP). Essa cultivar foi escolhida pelo fato de ser uma das líderes de mercado, além de demonstrar certa recalcitrância para a ES utilizando o protocolo previamente desenvolvido. Foi realizado o plantio (Figura 1) em potes plásticos número 15 (1,4 L capacidade) contendo substrato a base de turfa, perlita expandida, vermiculita expandida, e casca de arroz torrefada (Carolina Soil ®) e areia lavada 2:1 (v/v).

O cultivo foi realizado em casa de vegetação coberta na face superior com plástico agrícola difusor de 150 micras e tela Freshnet como sombreamento de 65%, e nas laterais com sombrite preto para 50% de sombreamento, e irrigados por microaspersão, com quantidade de água aplicada de aproximadamente 5 mm/dia. As plantas foram cultivadas até o momento da floração, quando as espatas foram coletadas e utilizadas para o experimento.



Figura 1. Bulbos com 7 dias de plantio de *H. hybridum* cv. Intokase fornecidos pela Terra Viva (Holambra, SP). Autoria: Ana Victória Conde van den Broek.

3.2 Assepsia e estabelecimento

Os botões florais foram colhidos e armazenados em sacos plásticos sob temperatura de geladeira (8-10°C) por dois a quatro dias antes do uso. Os botões

florais foram lavados externamente com antisséptico 2% de digliconato de clorexidina (Riohex®), em seguida submetido à desinfecção em solução de hipoclorito de sódio (cloro ativo 1,0–1,5%) por 10 minutos sob agitação manual. Em seguida, foi retirado os botões florais de dentro da espata com auxílio de bisturi estéril e alocados em frascos estéreis. Então foram submetidos a assepsia com álcool 70% por 30 segundos e solução de hipoclorito de sódio (cloro ativo 2,0-2,5%) por 15 minutos. Só então foram lavados por três vezes consecutivas em água deionizada autoclavada por 3 minutos cada. As três tépalas externas foram eliminadas (Figura 2) e apenas as tépalas internas foram usadas como explantes, buscando repetir os resultados positivos obtidos com a cultivar Bingo (Almeida et al. 2022) e com o objetivo de diminuir a chances de contaminação por microorganismos.

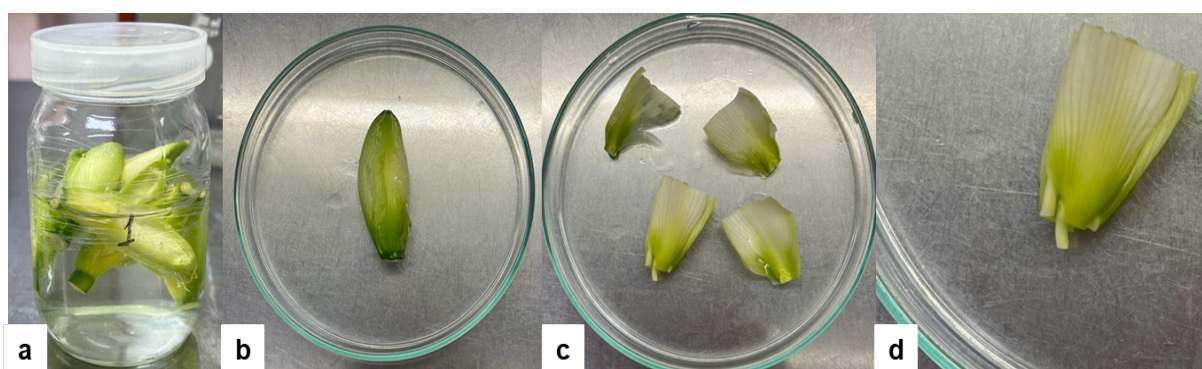


Figura 2. Demonstração dos passos de manipulação dos botões florais. a. Botões florais submetidos à assepsia. b. Botão floral inteiro contendo tépalas externas e internas. c. Tépalas externas sendo retiradas, restando somente as tépalas internas. d. Tépalas internas que serão separadas dos pistilos e posteriormente seccionadas em quadrados de 1 cm² e servindo como explante para a ES. Autoria: Ana Victória Conde van den Broek.

Essas tépalas internas foram seccionadas em quadrados de 1 cm² cada e inoculadas em meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) com metade da concentração de macronutrientes (MS^{1/2}), acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose; 0,1 g L⁻¹ de mio-inositol; acrescido de 0,5 mg L⁻¹ de Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e 1,0 mg L⁻¹ de Thidiazuron (TDZ) e com o pH ajustado para 5,8 antes da adição de 6,4 g L⁻¹ de ágar, o qual foi autoclavado a 120 °C por 20 min.

3.3 Experimento 1: Idade do botão floral e período de escuro para indução da ES em amarílis

Durante o primeiro ano do projeto, foram realizados testes a fim de elucidar qual idade de botão floral seria mais responsivo no aumento da regeneração para a cultivar Intokase, essa considerada recalcitrante para a ES a partir de resultados de estudos anteriores (dados não publicados). Dessa forma, foram testadas duas idades dos botões florais: com a espata totalmente fechada (estágio 1), e em fase de pré-antese (estágio 2), ou seja, com os botões florais fora da espata e um dia antes da antese. O meio de cultura básico foi o mesmo citado no tópico anterior.

Em outro experimento, foi usado a idade mais responsiva dos botões florais (estágio 1) integrado com três tempos de iluminação, sendo eles: - tubos colocados imediatamente na luz branca após estabelecimento ou inoculação dos segmentos de tépalas; - tubos que permaneceram no escuro por 30 dias; – tubos que permaneceram no escuro por 60 dias antes de serem expostos a luz branca. Nos três tratamentos, o experimento durou 120 dias.

3.4 Experimento 2: PVP 40 e espectros luminosos na indução e regeneração de ES em segmentos de tépalas de amarílis

O meio de cultura base para esse experimento foi o mesmo descrito ao final do tópico 3.2 e os tratamentos consistiram em três concentrações do antioxidante PVP 40: 0 ; 1 e 2 g.L⁻¹. Esses foram combinados com três comprimentos de onda fornecidos por diodos emissores de luz (LEDs), sendo essas: branca (109,15 $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$); vermelha (77,5 $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$); vermelha e branca (57,66 $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$), totalizando nove tratamentos em um fatorial em DIC 3 × 3. Cada tratamento foi composto por 14 repetições, constituídos individualmente de um tubo de ensaio contendo um segmento de tépala cada (1 cm²). Os tubos contendo os segmentos de tépalas foram mantidos no escuro nos primeiros 30 dias de crescimento (conforme resultados obtidos no subitem 3.3), e depois transferidos para os diferentes espectros luminosos com fotoperíodo de 16h e à temperatura de 25 ± 2 °C.

As porcentagens de regeneração de calos embriogênicos foram avaliadas aos 45 dias de cultivo. Já as quantidades de embriões e massa de calos foi obtida com 120 dias de cultivo. Aos 45 dias e aos 90 dias de cultivo, foram retirados sete tubos que

compuseram uma amostra composta contendo explantes sem formação de calos e com formação de calos, a fim de se obter o extrato metanólico proveniente de amostra composta, conforme descrito no tópico 3.5. Para separação dos extratos de 45 dias e 90 dias, foi utilizado letras do alfabeto sendo que a sequência de letras A-I estão relacionadas aos 45 dias de cultivo e a sequência de letras M-U aos 90 dias de cultivo.

3.5 Obtenção do extrato metanólico

Segmentos de tépalas utilizados como explantes e cultivados *in vitro* foram obtidos de diferentes tratamentos proveniente dos experimentos de indução da ES. Este material vegetal foi mantido em liofilizador por 72 horas. Em seguida, foi submetido a trituração em cadinho com auxílio de pistilo e nitrogênio líquido. O pó resultante foi pesado para obtenção do rendimento e uma alíquota de 100 mg foi retirada da amostra composta para preparação do extrato metanólico.

Em seguida, na alíquota da amostra foi adicionado 1 mL de Metanol (MeOH) 70% e colocado em banho maria por 10 minutos. Após esse período, a essa solução foi centrifugada em centrífuga refrigerada (Eppendorf, 5810B) 4°C a 2.000 rpm por 2 minutos. O sobrenadante foi coletado e armazenado e esse processo foi repetido por três vezes consecutivas até obter ao final um extrato metanólico de 3 mL.

O extrato foi armazenado em geladeira por 1 dia, e transportado em isopor refrigerado para manutenção da temperatura até o Instituto de Biociências da USP, onde foram realizadas as análises espectrofotométricas.

A metodologia em questão foi descrita por Pires *et al.* (2017a); Pires *et al.* (2017b) e Urrea-Victoria *et al.* (2016); com modificações para obter a proporção ideal da solubilidade das amostras e respectivas diluições.

3.6 Ensaio da atividade antioxidante *in vitro*

Este ensaio foi realizado em colaboração com a Prof^a. Dr^a. Déborah Yara A. C. dos Santos, do Departamento de Botânica – USP.

Todos os extratos metanólicos foram analisados no mesmo dia, assim como a realização das respectivas curvas padrão de cada protocolo e leitura dos brancos das amostras. Para isso foram realizados em microplaca de 96 poços e as leituras de absorbância realizadas em leitor de microplacas (SynergyTMH1). Os ensaios foram feitos em triplicatas procedimentais.

O ensaio de DPPH foi desenvolvido de acordo com o protocolo descrito por Pires e colaboradores (2017a). Uma solução 80 μM de DPPH em metanol foi preparada no momento do teste. Em cada poço da microplaca foram acrescentados 280 μL da solução de DPPH e 20 μL de cada amostra. Após a incubação da microplaca por 30 minutos a temperatura ambiente, a absorbância foi verificada a 517 nm. Através de uma curva de calibração de ácido gálico (0-54 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), os valores foram calculados em equivalente de ácido gálico (EAG) por grama de extrato ($\mu\text{g/g}$).

O poder redutor de ferro (FRAP) foi obtido conforme protocolo descrito por Urrea-Victoria e colaboradores (2016). Uma solução de reagente FRAP foi preparada no momento do teste. Em cada poço da microplaca uma alíquota de 20 μL de cada amostra foi adicionada a 15 μL de água ultrapura e 265 μL de reagente FRAP. Após a incubação da microplaca por 30 minutos a temperatura de 37°C, a absorbância foi verificada a 595 nm. Através de uma curva de calibração de ácido gálico (0-7,2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), os valores foram calculados em equivalente de ácido gálico (EAG) por grama de extrato ($\mu\text{g/g}$).

No ensaio com o reagente de Folin-Ciocalteu, em cada poço da microplaca uma alíquota de 20 μL das amostras foi adicionada a 200 μL de água ultrapura e 20 μL do reagente Folin-Ciocalteu 1:10 (Dinâmica®). Entre 5-8 min, foi adicionada a essa mistura 60 μL de uma solução saturada de carbonato de sódio (250 mg/mL utilizada após formação de um precipitado). Após 30 min, as absorbâncias foram lidas a 760nm. Através de uma curva de calibração de ácido gálico (0-120 $\mu\text{g/mL}$), os valores foram calculados em equivalente de ácido gálico (EAG) por grama de extrato ($\mu\text{mol/g}$).

3.7 Determinação do conteúdo de flavonas/flavonoides

Para determinação do conteúdo de flavonas/flavonoides, foi utilizado o mesmo extrato proveniente de amostra composta (réplica distinta) conforme descrito nos tópicos 3.4 e 3.5, e foi injetado uma única vez a amostra para realização dessa análise.

Os extratos foram suspensos em MeOH grau HPLC e preparados na concentração de 2 mg/mL para serem analisados. As análises por CLAE-DAD foram feitas utilizando o sistema Agilent 1260. Os cromatogramas foram obtidos com detecção em 352 nm e 280 nm, empregando-se a coluna Zorbax C18 (150 mm \times 4.6 mm \times 3.5 μm) a 45 °C. Como fase móvel foi empregado gradiente de ácido acético

0,1% (AcOH) e acetonitrila (CH₃CN), começando a corrida com 10% de CH₃CN (0-6 min), aumentando para 15% (6-7 min), mantendo isocrático por 15 minutos, seguido de aumento para 50% (22-32 min) e para 100% (32-42 min), mantendo isocrático por mais 8 minutos. O fluxo de solvente foi de 1,0 mL/min. O volume de amostra injetado para análise foi de 3 µL.

Para obtenção da curva de calibração, utilizou-se Rutina nas concentrações de 15-300 µg.mL⁻¹ em metanol. Os valores de área resultantes do cromatograma foram representados graficamente e uma equação linear foi utilizada para calcular o teor dos flavonoides das amostras.

3.8 Análise estatística

Valores obtidos em porcentagem foram transformados utilizando a transformação de $\sqrt{X + 1}$ para atender as pressuposições da análise de variância. Já os valores das triplicatas obtidas nas análises espectrofotométricas não foram transformados. Em ambos os casos, os dados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA), foi realizado também o teste de Shapiro-Wilk a 5% para avaliar a normalidade dos resíduos e o teste de Bartlett a 5% para homogeneidade das variâncias. Em casos de diferença estatística, foi realizado os testes de comparação de médias Tukey e Scott-Knott. O software utilizado foi o RStudio versão 4.2.1 (RSTUDIO TEAM, 2022).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estabelecimento do material

Nas duas primeiras tentativas de estabelecimento dos segmentos de pétalas houveram problemas de contaminação dos explantes e do meio de cultura, atrasando o sucesso dos experimentos. Dessa forma foi necessário reajustar o protocolo de assepsia, como por exemplo o uso de Riohex 2% ® para lavagem externa dos botões florais seguido de uma pré-assepsia em solução de hipoclorito de sódio (cloro ativo 1,0–1,5%) por 10 minutos sob agitação manual, para que pudessemos ter eficiência no processo, conforme já descrito no tópico 3.2. Após todos os ajustes, não foram observadas contaminações bacterianas e nem fúngicas no experimento, resultando num protocolo de assepsia eficiente para continuidade dos testes de fatores isolados ou em fatorial.

4.2 Experimento 1: Idade do botão floral e período de escuro para indução da ES em amarílis

Sobre a idade dos botões florais, a maior porcentagem de explantes com calos embriogênicos ou embriões somáticos foi obtida com segmentos de tépalas coletados de botões florais ainda com a espata da inflorescência totalmente fechada (Figura 3) onde foi possível obter até 45% de explantes com calos embriogênicos ou embriões somáticos (Figura 4), comparados aos 11% de ES obtidos com o uso de botões florais em pré-antese. Almeida et al. (2022) utilizando de botões florais em pré-antese obteve 48% de ES em segmentos de tépalas para a cultivar Bingo e 25 plantas aclimatizadas ao final do experimento. Esses resultados demonstram que para a cultivar Intokase o uso de botões florais mais jovens que aqueles utilizados por Almeida et al. (2022) é um fator preponderante para a indução e aumento da frequência da ES.



Figura 3. Espatas com brácteas fechadas, demonstrando o momento com maior taxa de indução da ES em amarílis. A autoria: Ana Victória Conde van den Broek.

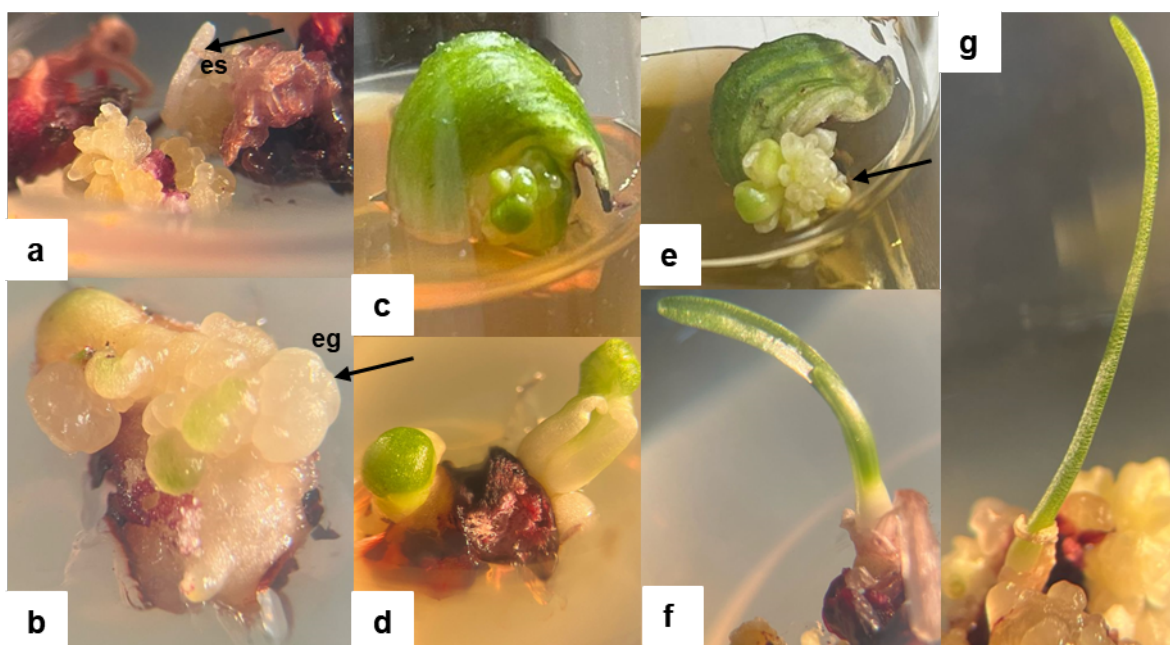


Figura 4. Embriogênese somática de segmentos de tépalas de *Hippeastrum hybridum* cv. Intokase: a. Calos embriogênico de segmentos de tépalas (es: escutelo); b. embriogênese somática *in vitro* mostrando os calos embriogênicos em formação (eg: estágio globular); c. desenvolvimento de embriões globulares verdes de forma direta, sem a intermediação de calos; d. desenvolvimento de estágio

globular para escutelar; e. massa de embriões somáticos em pleno desenvolvimento; f-g germinação dos embriões somáticos sob condições de luz branca. Autoria: Ana Victória Conde van den Broek.

Em relação aos testes com diferentes períodos de escuro antes do cultivo dos segmentos de tépalas na luz, foi observado que o tempo de 30 dias de escuro, utilizado por Almeida et al. (2022) para a cultivar Bingo, não resultou em diferenças na cultivar Intokase, quando comparado com os tempos de 0 (sem período de escuro) e 60 dias de escuro. Dessa forma, e considerando os resultados de Almeida et al. (2022) para *H. hybridum* cv. Bingo, foi mantido o padrão de 30 dias de escuro para indução da ES em amarílis nos experimentos com a cultivar Intokase.

4.3 Experimento 2: PVP 40 e espectros luminosos na indução e regeneração de ES em segmentos de tépalas de amarílis

Em *H. hybridum* cv. Intokase, o uso do antioxidante PVP 40, independente da concentração demonstrou ser essencial para o aumento de segmentos de tépalas contendo calos embriogênicos, podendo chegar a 79,2-85,4% de ES em tratamentos com o uso do PVP40, quando comparado com o controle na ausência PVP, no qual a porcentagem foi apenas de 45%, conforme demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1. Efeito da concentração do antioxidante PVP 40 e dos Espectros luminosos no aumento da massa embriogênica de *H. hybridum* cv. Intokase.

Concentração de PVP 40 (mg L ⁻¹)	Porcentagem de explantes com ES (%)	Espectro de luz fornecidos por LEDs	Porcentagem de explantes com ES (%)
1	85,4 (±2,71) a	Branco	81,9 (±2,95) a
2	79,2 (±3,20) a	Vermelho	79,2 (3,26) ab
0	45,1 (±4,26) b	Vermelho e Branco	60,4 (±4,22) b
P valor PVP 40	0,0044 *		
P valor Espectro	0,0297 *		
P valor interação	0,5433 ^{ns}		

*Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ^{ns} não significativo.

Levando em conta que tecidos vegetais submetidos a assepsia com hipoclorito de sódio favorecem a produção de compostos fenólicos que desencadeiam a oxidação fenólica (escurecimento dos tecidos) e até mesmo morte desses tecidos, a utilização de antioxidantes, nesses casos, pode resultar em maior sobrevivência e aumento das porcentagens de regeneração de explantes *in vitro* (Appleton et al., 2012). Na literatura existem relatos que a utilização de PVP, de fato, promovem a redução da oxidação dos explantes e aumento da porcentagem de explantes regenerados, como por exemplo em *Crinum* (Amaryllidaceae) que aos 41 dias de cultivo apresentou rápido crescimento de calos friáveis e formação de embriões somáticos globulares e alongados em meio de cultura suplementado com PVP e cisteína (Osorio et al., 2010). Dessa forma, foi possível verificar a relação entre o metabolismo oxidativo e a resposta a embriogênese somática em amarílis.

Com base na análise estatística verificou-se que o espectro luminoso também foi significativo e influenciou no aumento da porcentagem de calos embriogênicos. A iluminação na cor branca foi mais eficiente no aumento de explantes com calos embriogênicos chegando a 81,9% de explantes que apresentaram calos, resultando em maior porcentagem de explantes regenerados, quando comparado ao espectro luminoso vermelho e branco, com 60,4% explantes com ES.

A luz foi um fator importante que afetou a ES em amarílis, sendo frequentemente atribuída ao crescimento e a organogênese das plantas *in vitro*. Uma observação interessante aqui é que foi obtida uma gradativa resposta de aumento da ES nos explantes em luzes com maiores valores de radiação fotossinteticamente ativa. Essas conclusões se deram por medições nas lâmpadas com diferentes espectros utilizadas no atual experimento, sendo uma taxa maior de ES na lâmpada com maior PPFD (branco) e uma taxa menor de ES na lâmpada com menor PPFD (branco e vermelho), demonstrando que além do comprimento de onda, o fator intensidade luminosa pode ter sido um fator relevante para a indução da ES em segmentos de tépalas de amarílis. Outros autores também observaram resultados similares com resposta aumentada de frequência da ES em resposta ao uso de maiores valores de PPFD (Kintzios & Taravira, 1997; Fiorino & Loreti, 1987).

Modificações no espectro luminoso visando o aumento do crescimento *in vitro* e ativação de processos fisiológicos rizogênicos é reportado por autores há décadas, nas mais diversas culturas. Também, trabalhos apresentam resultados promissores e correlacionam a influência de diferentes espectros de luz LED na produção de

metabólitos secundários de calos cultivados *in vitro* (CHEN, *et al.*, 2016) (IIYAMA, *et al.*, 2024), associando mudanças na morfogênese e no metabolismo em decorrência do espectro luminoso utilizado para o cultivo.

4.4 Efeito do tempo de cultivo e do espectro luminoso na comparação da atividade antioxidante *in vitro*

Na cultura de tecidos é relatado o escurecimento do meio de cultura pela liberação de fenóis como polifenol oxidase (PPO) (Litz *et al.*, 1988) e fenilalanina amônia liase (PAL) e peroxidase (POD) (Anderson *et al.*, 2002; Tabiyeh *et al.*, 2006) após o corte dos explantes, e esse escurecimento foi relatado sendo maior em meio de cultura que não utiliza adsorventes antioxidantes (Zhou *et al.*, 2010). Portanto, a suplementação com PVP controla a oxidação fenólica e suprime o escurecimento dos tecidos (Ahmad *et al.*, 2013). Isso também foi observado em nosso experimento com o uso do PVP40 no meio de cultura, sendo que independente da concentração, os meios contendo PVP40 ficaram menos avermelhados que o controle, resultado de uma maior atividade antioxidante no amarílis.

Os resultados obtidos na Tabela 1, nos mostram que a presença do antioxidante PVP40 e o uso do espectro luminoso fornecido por LED branco favorecem o aumento de explantes com calos embriogênicos. Todavia a interação PVP*LUZ não foi significativa, portanto, não são dependentes entre si.

Correlacionando as tabelas 1 e 2 compreendemos que as menores frequências de ES em V+B resultaram em maiores valores de DPPH, fenóis totais e FRAP. Desdobrando a interação luz dentro de concentrações de PVP40 (Tabela 2), foi possível observar que na concentração 1 g. L⁻¹ PVP40 a luz V+B foi superior estatisticamente as demais para DPPH, Fenóis e FRAP. Indicando que nessa condição o espectro luminoso V+B teve a maior atividade antioxidante.

Ainda analisando o desdobramento (Tabela 2), a análise estatística indica que para DPPH na concentração 1 g. L⁻¹ PVP40 a luz branca e a luz vermelha são iguais estatisticamente assim como na Tabela 1 em que ambos os espectros não diferem entre si. Essa interação sugere que na menor atividade antioxidante teve a maior formação de calos contendo calos embriogênicos.

Tabela 2. Quantidade de agentes redutores analisados pelos métodos de DPPH, Folin e FRAP aos 45 dias de cultivo nos diferentes espectros luminosos.

DPPH (μg EAG /g extrato)			
	V	B	V+B
0	2,26 \pm 0,42 aB	3,08 \pm 0,36 aA	2,90 \pm 0,18 aA
1	2,05 \pm 0,17 aB	2,17 \pm 0,04 bB	2,67 \pm 0,25 aA
2	2,42 \pm 0,10 aA	2,36 \pm 0,13 bA	2,42 \pm 0,12 aA
FOLIN (g EQT/g extrato)			
	V	B	V+B
0	8,31 \pm 0,35 aA	9,07 \pm 0,31 aA	8,73 \pm 0,50 aA
1	7,18 \pm 0,37 bC	7,94 \pm 0,21 bB	9,19 \pm 0,25 aA
2	7,99 \pm 0,30 aB	8,53 \pm 0,39 aA	8,87 \pm 0,15 aA
FRAP (μg EAG /g extrato)			
	V	B	V+B
0	431,40 \pm 36,36 aB	478,58 \pm 18,34 aA	409,26 \pm 29,01 cB
1	298,35 \pm 32,17 bC	381,87 \pm 29,31 bB	546,84 \pm 31,06 aA
2	408,15 \pm 46,53 aB	455,58 \pm 15,28 aA	479,56 \pm 33,32 bA
ANOVA	DPPH (μg EAG /g extrato)	Folin (g EQT/g extrato)	FRAP (μg EAG /g extrato)
p-valor Espectro	0,004*	<0.001**	<0,001**
p-valor PVP 40	0,0018*	0,005*	0,0414*
p-valor interação	0,0116*	0,0032*	<0,001**
CV (%)	9,34	3,97	7,26

Os dados foram coletados aos 45 dias de cultivo. Os valores representam média (n = 3). Médias seguidas com a mesmas letras minúsculas na coluna e maiúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Scott-knott. ** significativo p < 0,01. *significativo p < 0,05. ^{ns} não significativo. V: Vermelho. B: Branco. V+B: Vermelho-branco. EAG: Equivalente em ácido gálico. EQT: Equivalente em Trolox.

Tabela 3. Quantidade de agentes redutores analisados pelos métodos de DPPH, Folin e FRAP aos 90 dias de cultivo nos diferentes espectros luminosos.

DPPH ($\mu\text{g EAG/g extrato}$)			
	V	B	V+B
0	3,65 \pm 0,24 aA	2,64 \pm 0,09 bB	2,14 \pm 0,01 cC
1	2,93 \pm 0,05 bA	2,95 \pm 0,04 aA	2,56 \pm 0,13 bB
2	2,88 \pm 0,10 bB	3,02 \pm 0,06 aB	4,73 \pm 0,10 aA
FOLIN (g EQT/g extrato)			
	V	B	V+B
0	4,68 \pm 0,22 aA	3,23 \pm 0,08 bB	3,12 \pm 0,15 cB
1	4,30 \pm 0,14 bA	3,86 \pm 0,34 aB	3,89 \pm 0,02 bB
2	4,03 \pm 0,12 bB	4,02 \pm 0,14 aB	6,57 \pm 0,13 aA
FRAP ($\mu\text{g EAG/g extrato}$)			
	V	B	V+B
0	343,38 \pm 7,28 aA	278,86 \pm 21,35 bB	245,90 \pm 8,86 cB
1	289,56 \pm 36,40 bB	372,97 \pm 9,34 aA	294,13 \pm 9,83 bB
2	290,80 \pm 13,44 bC	345,29 \pm 33,85 aB	616,33 \pm 24,27 aA
ANOVA	DPPH ($\mu\text{g EAG/g extrato}$)	Folin (g EQT/g extrato)	FRAP ($\mu\text{g EAG/g extrato}$)
P valor Espectro	<0,001**	<0,001**	<0,001**
P valor PVP 40	<0,001*	<0,001*	<0,001*
P valor interação	<0,001**	<0,001*	<0,001**
CV (%)	3,75	4,23	6,18

Os dados foram coletados aos 90 dias de cultivo. Os valores representam média (n = 3). Médias seguidas com a mesmas letras minúsculas na coluna e maiúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Scott-knott. ** significativo p < 0,01. *significativo p < 0,05. ^{ns} não significativo. V: Vermelho. B: Branco. V+B: Vermelho-branco. EAG: Equivalente em ácido gálico. EQT: Equivalente em Trolox.

Contudo, quando observamos na Tabela 3 as análises aos 90 dias de cultivo na concentração 2 g.L⁻¹ de PVP 40 e na luz V+B os valores de Fenóis e FRAP reduzem, mas continuam superiores e diferentes estatisticamente a concentração 1 g.L⁻¹ de PVP 40 e ausência de PVP 40. Para DPPH, a mesma concentração 2 g.L⁻¹ de PVP 40 e luz V+B apresenta o maior valor e diferente estatisticamente.

Portanto, na Tabela 2 constatamos que aos 45 dias de cultivo na concentração 1 g. L⁻¹ PVP 40 estava ocorrendo o pico de produção da atividade antioxidante e de fenólicos na luz V+B, e que aos 90 dias de cultivo (Tabela 3) na luz V+B ocorreram os picos da atividade antioxidante e da produção de fenólicos na concentração 2 g. L⁻¹ PVP 40.

Na tabela 2 certificamos que a adição de PVP 40 no meio de cultura não alterou a atividade antioxidante nos tecidos *in vitro*, sendo que na luz branca e na ausência

de PVP 40 foi observado o maior valor de DPPH (3,08 μg EAG /g extrato), comparado a sua adição (2,17-2,36 μg EAG /g extrato). Assim como nos espectros V+B e V, em que não teve diferença estatística entre usar ou não o antioxidante. O PVP 40 é relatado como um polímero sintético solúvel em água, com boa solubilidade e compatibilidade fisiológica (Zhou et al., 2022). Relatos também que o PVP é um polímero inerte, não tóxico, resistente à temperatura, estável ao pH e que aumenta a solubilidade de compostos (Kurakula & Koteswara Rao, 2020). Com relação a cultura de tecidos é relatado o uso de PVP 40 como um antioxidante (Chai et al., 2018) para atuar como um aliviador do estresse causado pelo processo de assepsia e pelo ferimento do tecido no momento da inoculação, portanto, era esperado que os valores de DPPH aos 45 dias de cultivo (Tabela 2) fossem maiores na presença de PVP 40, o que não ocorreu nesse período, mas foi observado nas avaliações de 90 dias de cultivo na luz branca (Tabela 3).

Desdobrando a interação (Tabela 3) constatamos que tanto para DPPH quanto para Fenóis e FRAP a presença de PVP 40 na luz branca apresentam valores maiores e diferentes estatisticamente da condição de ausência de PVP 40. Corroborando com os dados já apresentados na Tabela 1, que a presença de PVP 40 confere maiores porcentagens de explantes com calos embriogênicos. E, portanto, elucidando que é possível correlacionar os fatores bioquímicos com o aumento de calos de culturas *in vitro* de *H. hybridum* cv Intokase.

4.5 Efeito do tempo de cultivo e do espectro luminoso na comparação do conteúdo de flavonas/flavonoides *in vitro*.

Na comparação do conteúdo de flavonoides a Figura 5 mostra os flavonoides que foram possíveis quantificar aos 45 dias e aos 90 dias de cultivo, sendo o a Figura 5(A) a quantificação de ácido gálico, Figura 5(B) rutina, Figura 5(C) Luteolina, Figura 5(D) quercetina, Figura 5(E) flavonoide_a (corresponde ao tempo de retenção 28.00 minutos) e Figura 5(F) flavonoide_b (corresponde ao tempo de retenção 28.05 minutos).

Analisando a Figura 5(D) constatamos uma produção maior de Quercetina nos tratamentos com luz Branca e luz V+B na presença de PVP 40 (45 dias) e uma produção menor de Luteolina (Figura 5C) na presença de PVP 40 (45 dias). Sugerindo que a taxa de formação de alguns compostos fenólicos pode estar relacionada com o crescimento dos tecidos cultivados (Barz, 1977).

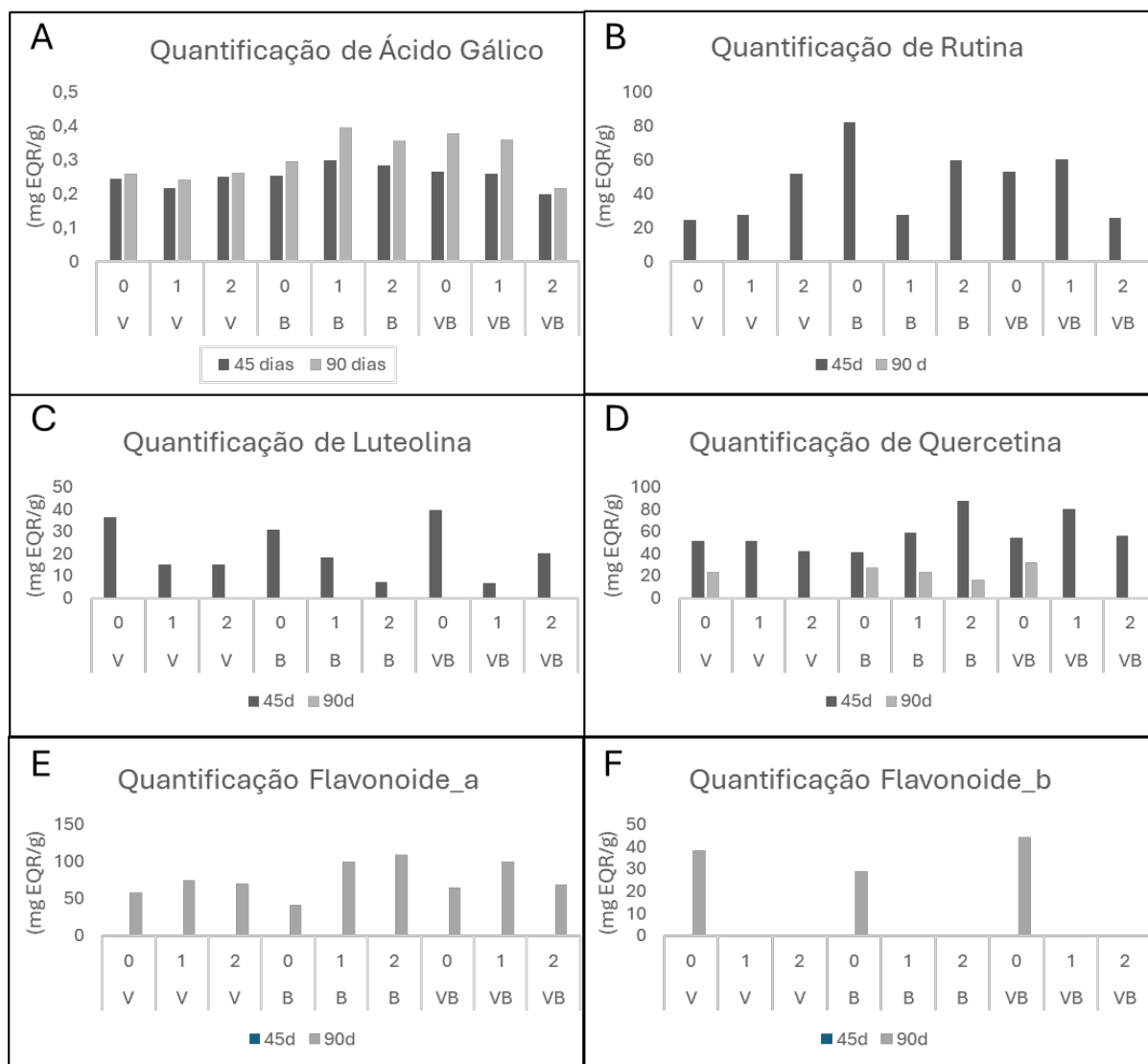


Figura 5. Efeito do espectro luminoso e concentração de PVP40 na produção de flavonoides. Sendo A. Quantificação de ácido gálico; B. Quantificação de Rutina; C. Quantificação de Luteolina; D. Quantificação de Quercetina; E. Quantificação de Flavonoide_a (tempo de retenção 28.00 minutos); F. Flavonoide_b (tempo de retenção 28.05 minutos). Dados expressos em mg/g de Rutina. Autoria: Ana Victória Conde van den Broek.

Ao longo do tempo de cultivo ocorre oxidação dos tecidos e conseqüentemente, as células tentam produzir uma quantidade maior de compostos que irão compensar esse processo (Mittler, 2002), como por exemplo a produção de flavonoides, os quais atuam na proteção contra agentes oxidantes.

Outro exemplo é a formação da espécie altamente reativa peroxinitrito, a qual é formada em condição de estresse oxidativo. Os flavonoides podem inibir a sua formação seguindo por duas vias: seja pela captação do óxido nítrico (VAN ACKER, *et al.*, 1995) ou inibição da enzima xantina oxidase (importante fonte biológica de superóxido) (COS, *et al.*, 1998). Alguns flavonoides, como por exemplo a quercetina identificada nesse projeto, tem atuação na inibição da reação de Fenton (geração de radicais altamente reativos hidroxil) através do efeito quelante de ferro, um catalisador da reação (FERRALI, *et al.*, 1997), sendo, portanto, um flavonóide protetor.

A quantidade de luz que uma planta recebe tem grande impacto em seu desenvolvimento. O crescimento, a produção e o metabolismo secundário das plantas são todos influenciados pela luz em geral e pela qualidade da luz em particular (Hashim *et al.*, 2021). As luzes LED têm sido amplamente utilizadas para induzir a produção de metabólitos secundários importantes em vários sistemas de cultura de plantas.

Aos 45 dias de cultivo (Figura 5A), por exemplo, o tratamento luz branca + 0 g. L⁻¹ PVP 40 teve a maior produção de ácido gálico, e o mesmo espectro luminoso combinado com 2 g. L⁻¹ de PVP 40 teve a maior produção de quercetina (Figura 5D) em *H. hybridum* cv. Intokase. Resultados parecidos foram obtidos com o LED branco em sementes de *Triticum aestivium* com 4-12 dias de exposição, com produção de ácido gálico e quercetina (Cuong *et al.*, 2019).

Quando observamos a Figura 5 (E-F), verificamos que aos 90 dias de cultivo novos flavonoides são formados, como o Flavonóide_a em altas concentrações em tratamentos com luz Branca e na presença de PVP 40. Já o Flavonóide_b foi produzido em todos os espectros luminosos, porém somente por tépalas cultivadas na ausência de PVP 40.

Em relação ao ganho de massa dos explantes em regeneração (Figura 6) constatamos que os espectros luminosos LED branco com 1 g. L⁻¹ PVP 40 apresentaram valores superiores de massa (g/explante) tanto aos 45 dias de cultivo, quanto aos 90 dias de cultivo quando comparado aos demais tratamentos. Esses

resultados estão em consonância com o que foi anteriormente abordado no tópico 4.4.

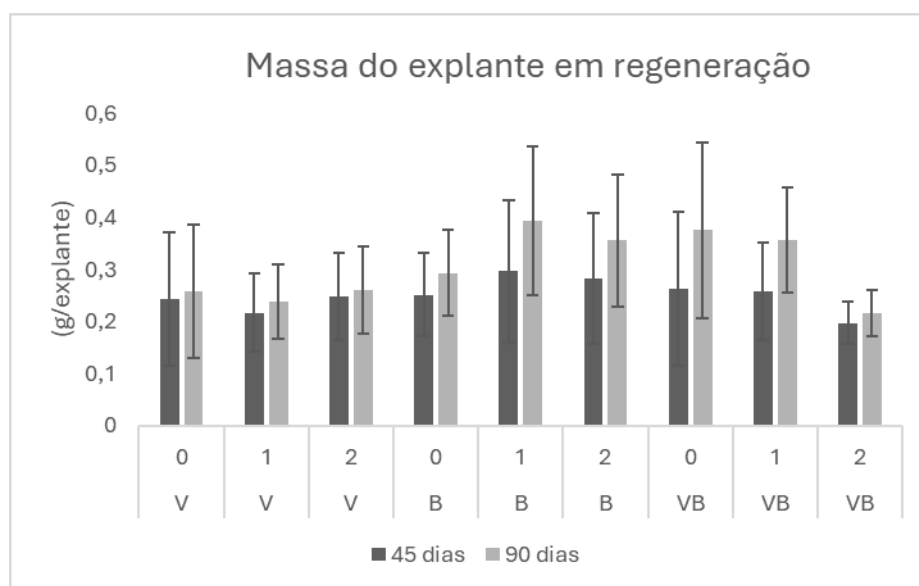


Figura 6. Efeito dos diferentes comprimentos de onda e concentração de PVP40 na massa fresca do explante em regeneração *in vitro* de *H. hybridum* cv. Intokase analisados aos 45 e 90 dias de cultivo em meio de cultura MS $\frac{1}{2}$ acrescidos de 0,5 mg L⁻¹ de 2,4-D e 1,0 mg L⁻¹ TDZ. Autoria: Ana Victória Conde van den Broek

Na Luz Branca e na presença de PVP 40 aos 45 dias de cultivo (Figura 5D) os valores de quercetina são maiores, que na ausência de PVP 40. O mesmo resultado ocorre, na massa (g/explante) dos explantes em regeneração (Figura 6) aos 45 dias, sendo maior na presença de PVP 40. Sugerindo que a formação de quercetina na presença de PVP 40 pode estar relacionada com o aumento da massa (g/explante) de tépalas cultivadas *in vitro*. Segundo Feucht & Nachit, 1978 observaram que o aumento na massa de calos no cultivo de *Prunus avium* L. está relacionada a presença rutina e quercetina.

Na Figura 7 é possível observar as tépalas de *H. hybridum* cv. Intokase com formação de calos embriogênicos aos 90 dias cultivados em meio de cultura MS $\frac{1}{2}$ nas diferentes concentrações de PVP 40 e nos diferentes espectros luminosos.

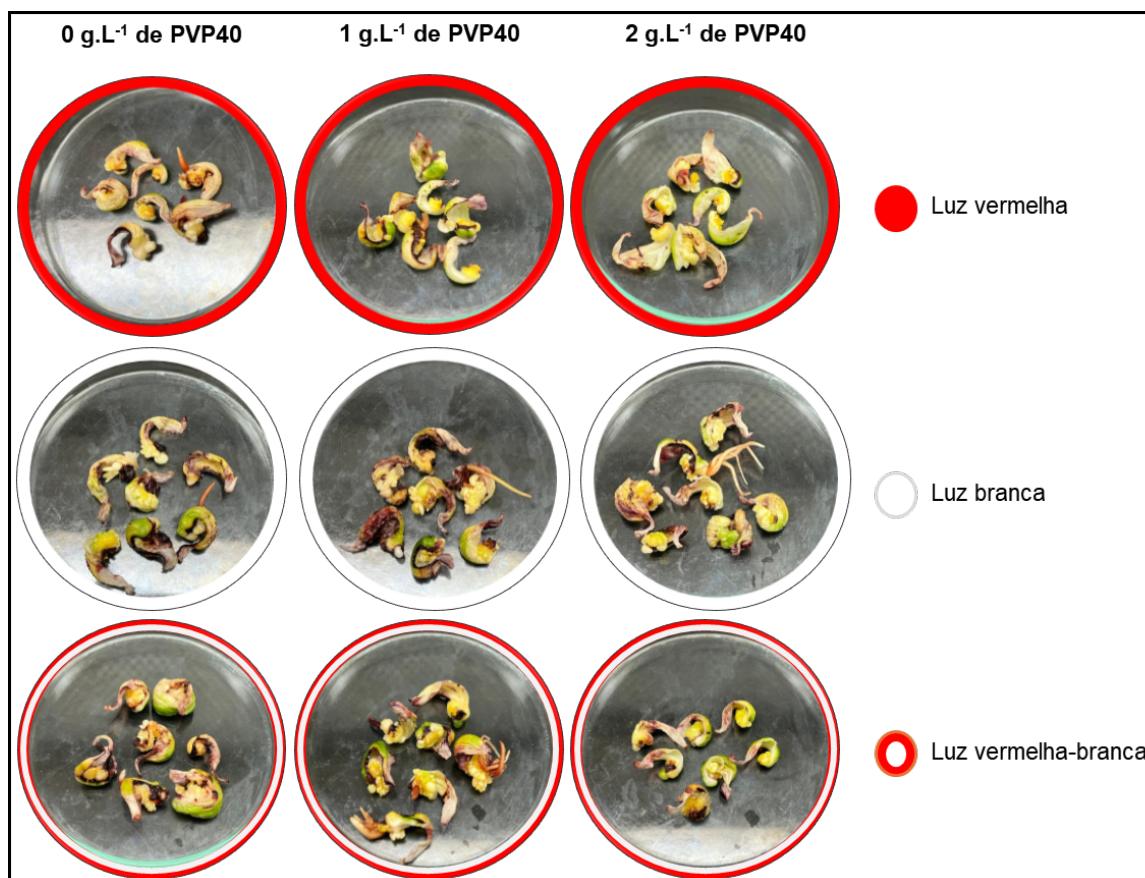


Figura 7. Diferentes comprimentos de onda e concentração de PVP40 na formação dos explantes em regeneração *in vitro* de *H. hybridum* cv. Intokase aos 90 dias cultivados em meio de cultura MS ½ acrescidos de 0,5 mg L⁻¹ de 2,4-D e 1,0 mg L⁻¹ de TDZ. Autoria: Ana Victória Conde van den Broek

De acordo com as observações anteriores a respeito da resposta positiva dos espectros luminosos LED branco e LED vermelho-branco e da presença de PVP40, continuamos constatando o mesmo benefício na quantidade superior de embriões (nº embriões/explante) aos 120 dias de cultivo conforme demonstrado na tabela 4. No entanto, em relação aos valores de massa dos calos (g/explante), não foi observada diferença estatisticamente significativa.

Tabela 4. Efeito dos diferentes comprimentos de onda e concentração de PVP 40 na quantidade de embriões e massa dos calos aos 120 dias de cultivo.

Fonte de luz	PVP 40 (g.L ⁻¹)	Quantidade de embriões (n° embriões/explante)	Massa de calo (g/explante)
Luz vermelha	0	5,28 (0,7963)	0,4952 (0,7289)
Luz vermelha	1	4,57 (0,5208)	0,6482 (0,2778)
Luz vermelha	2	6,57 (0,4895)	0,5392 (0,7330)
Luz branca	0	6,66 (0,7605)	0,5433 (0,6668)
Luz branca	1	7,42 (0,3902)	0,9246 (1,0356)
Luz branca	2	10,71 (0,9497)	1,3047 (1,1050)
Luz vermelha-branca	0	8,28 (1,0512)	0,3146 (0,3799)
Luz vermelha-branca	1	13,57 (1,1856)	0,8291 (1,3374)
Luz vermelha-branca	2	12,14 (1,1588)	0,4129 (0,5431)
p-valor Luz		0,0097*	0,2386 ^{ns}
p-valor concentração		0,122 ^{ns}	0,3524 ^{ns}
p-valor interação		0,6285 ^{ns}	0,6685 ^{ns}
Luz vermelha		5,57 b	-
Luz branca		8,26 ab	-
Luz vermelha-branca		11,33 a	-

*Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ^{ns} não significativo.

Na Tabela 4, devido o fator luz ser significativo, visualizamos que tanto o LED branco quanto o LED vermelho-branco são superiores ao LED vermelho para quantidade de embriões (n° embriões/explante). Contudo, esses resultados são contrários ao relatado no tópico 4.3 em que o LED vermelho-branco mostrou ter a menor porcentagem de explantes contendo calos embriogênicos e se diferenciava estatisticamente do LED Branco.

Para o LED Branco, verifica-se uma correlação entre maior porcentagem de explantes contendo calos embriogênicos (Tabela 1), com uma maior quantidade de DPPH aos 45 dias de cultivo (Tabela 2) e valor superior de quercetina aos 45 dias de cultivo (Figura 6).

5 CONCLUSÕES

Diante dos dados obtidos, podemos concluir que foi possível obter um protocolo eficiente, com aumento da porcentagem de segmentos de tépalas contendo calos embriogênicos e maior massa e número de embriões por explante para o cultivo *in vitro* de *H. hybridum* cv. Intokase. Esse aumento ocorreu pelo uso de botões florais mais jovens, em meio de cultura acrescido de PVP 40 e quando os segmentos de tépalas foram cultivados sob LEDs branca ou na combinação de LEDs branca e vermelha. E dessa forma, nos tratamentos com maior produção de embriões somáticos foi constatado nos tecidos uma maior atividade antioxidante (DPPH e FRAP) bem como uma maior produção de fenóis totais e flavonoides.

6 LITERATURA CITADA

AHMAD, I.; HUSSAIN, T.; ASHRAF, I.; NAFEEES, M.; MARYAM; RAFAY, M.; IQBAL, M. LETHAL Effects of Secondary Metabolites on Plant Tissue Culture. **American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.** v. 13(4), 539-547, 2013. DOI: 10.5829/idosi.aejjaes.2013.13.04.1975

ALEXANDRE, M.A.V.; SEABRA, P.V.; RIVAS, E.B.; DUARTE, L.M.L; GALLETI, S.R. Vírus, viróides, fitoplasmas e espiroplasmas detectados em plantas ornamentais no período de 1992 a 2003. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v.11, n. 1, p. 49-57, 2005.

ANDERSONE, U.; IEVINSH, G. Changes of morphogenic competence in mature *Pinus sylvestris* L. buds *in vitro*. **Ann. Bot.**, 90: 293-298, 2002.

APEL, K. & HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal antibiotic transduction. **Annu Rev Plant Biol.** v.55, p. 373-399, 2004.

APPLETON, M. R.; ASCOUGH, G. D.; VAN STADEN, J. *In vitro* regeneration of *Hypoxis colchicifolia* plantlets. **South African Journal of Botany**, v. 80, p. 25-35, 2012.

BACH, A.; SOCHACKI, D. Propagation of Ornamental Geophytes: Physiology and Management Systems. *Ornamental Geophytes. Basic Science to Sustainable Production*; Kamenetsky, R., Okubo, H., Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, p. 261–286, 2013.

BARZ, W.; REINHARD, E.; ZENK, M.H. (eds.). Plant Tissue Culture and its Biotechnological Application. **Springer-Verlag**, Berlin, Heidelberg, New York. 1977.

BENSCHOP, M.; KAMENETSKY, R.; LE NARD, M.; OKUBO, H.; DE HERTOIGH, A. The global flower bulb industry: Production, utilization, research. **Hortic. Rev.** v.36, p. 1–115, 2010.

BENSON, E.E. Do Free Radicals Have a Role in Plant Tissue Culture Recalcitrance? ***In vitro Cellular & Developmental Biology. Plant.*** v. 36, n°3, p. 163-170, 2000.

CHAI, J.; GAO, Y.; DONG, Y.; KONG, L.; ZHANG, Y. Browning Treatment in Tissue Culture of 'Hongyang' Kiwifruit. IOP Conf. Series: **Materials Science and Engineering**. 2018. DOI:10.1088/1757-899X/452/2/022075.

CHEN, C.C.; AGRAWAL, D.C.; LEE, M.R.; LEE, R.J.; KUO, C.L.; WU, C.R.; TSAY, H.S.; CHANG, H.C. Influence of LED light spectra on *in vitro* somatic embryogenesis and LC–MS analysis of chlorogenic acid and rutin in *Peucedanum japonicum* Thunb.: a medicinal herb. **Botanical Studies**. v. 57(9), 2016. doi: 10.1186/s40529-016-0124-Z

COS, P.; YING, L.; CALOMME, M.; HU, J.P.; CIMANGA, K.; VAN POEL, B.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A.J.; VAN DEN BERGHE, D. Structure–Activity relationship and Classification of Flavonoids as Inhibitors of Xanthine Oxidase and Superoxide Scavengers. **J. Nat. Prod.** Vol. 61(1), p. 71-6, 1998.

CUONG, D.M.; HA, T.W.; PARK, C.H.; KIM, N.S.; YEO, H.J.; CHUN, S.W.; KIM, C.; PARK, S.U. Effects of LED lights on expression of genes involved in phenylpropanoid biosynthesis and accumulation of phenylpropanoids in wheat sprout. **Agronomy**, v. 9, p.307, 2019.

de ALMEIDA, N.V.; RIVAS, E.B.; CARDOSO, J.C. Somatic embryogenesis from flower tepals of *Hippeastrum* aiming regeneration of virus-free plants. **Plant Sci**. 2022. DOI: 10.1016/j.plantsci.2022.111191

FERRALI, M.; SIGNORINI, C.; CACIOTTI, B.; SUGHERINI, L.; CICCOLI, L.; GIACHETTI, D.; COMPORTI, M. Protection against oxidative damage of erythrocyte membrane by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. **FEBS Lett**. Vol. 416(2), p.123-9, 1997.

FEUCHT, W.; NACHIT, M. Flavonol glycosides of different species and hybrids from the *Prunus* section eucerasus and the growth-promoting activity of quercetin derivatives. **Scientia Horticulturae**. v. 8 (1), p 51-56, 1978. DOI: 10.1016/0304-4238(78)90069-9

FIORINO, P.; LORETI, F. Propagation of fruit trees by tissue culture in Italy. **HortScience**. v.22, p.353-358, 1987.

GOULART, P. B.; XAVIER, A.; DIAS, J. M. M. Efeito de antioxidantes no enraizamento de miniestacas de clones de *Eucalyptus grandis* E. urophylla. **Revista Árvore**, v. 34, p. 961-972, 2010.

HABERLANDT, G. Culturversuche mit isolierten. Pflanzenzellen. Sitzungsberichte der Kaiserlichen. Akademie der Wissenschaften. Mathematisch-Naturwiss. Kl, Abt I, p. 69-92, 1902

HASHIM, M.; AHMAD, B.; DROUET, S.; HANO, C.; ABBASI, B. H.; ANJUM, S. Comparative effects of different light sources on the production of key secondary metabolites in plants in vitro cultures. **Plants**, v. 10, n. 8, p. 1521, 2021.

IYAMA, C. M.; SARTORATTO, A.; CARDOSO, J.C. Tissue-specific and novel secondary metabolites identified by SPME/GC-MS in *Artemisia annua* calli cultured under different wavelength, **Industrial Crops and Products**, v. 208, 2024. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.117767>>.

KIM, K.-W.; DE HERTOOGH, A. Tissue culture of ornamental flowering bulbs (geophytes). **Hortic. Rev.** v. 18, p.87–169, 1997.

KINTZIOS, S. E.; TARAVIRA, N. Effect of genotype and light intensity on somatic embryogenesis and plant regeneration in melon (*Cucumis melo* L.). **Plant Breeding**, v. 116, p. 359–362, 1997.

KURAKULA, M.; KOTESWARA RAO, G.S.N. Pharmaceutical assessment of polyvinylpyrrolidone (PVP): As excipient from conventional to controlled delivery systems with a spotlight on COVID-19 inhibition. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**. v.60, 24 p., 2020.

LITZ, R.E.; N, VIJAYAKUMAR. *In vitro* somatic embryogenesis from the nucellus of mango. **Acta Hortic**, 231: 473-5, 1988.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**. v. 7, p405-410, 2002.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

OSORIO, J. N.; RÍOS, A. M. R.; BEDOYA, C. P.; MARTÍNEZ, Ó. M. M. Inducción de la embriogénesis somática a partir de cormos de *Crinum x powellii* "álbum"(Amaryllidaceae). **Scientia et technica**, v. 3, n. 46, p. 113-118, 2010.

PIRES, J., TORRES, P., DOS SANTOS, D. & CHOW, F. Ensaio em microplaca do potencial antioxidante do método de sequestro do radical livre DPPH para extratos de algas. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 2017a. Disponível em: ISBN 978-85-85658-71-7. 1-6.

PIRES, J., TORRES, P., DOS SANTOS, D. & CHOW, F. Ensaio em microplaca de substâncias redutoras pelo método do Folin-Ciocalteu para extratos de algas. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 2017b. Disponível em: ISBN 978-85-85658-70-0.1-5.

RSTUDIO TEAM. RStudio: Integrated Development for R. RStudio, Inc., Boston, VMA. Disponível em: <http://www.rstudio.com/>. 2022.

SEN, A. Oxidative stress studies in plant tissue culture. Antioxid. **Enzym.** v. 3, p. 59–88, 2022..

TABIYEH, D.T.; BERNARD, F.; SHACKER, H. Investigation of glutathione, salicylic acid and GA3 effects on browning in *Pistacia vera* shoot tips culture. **Acta Hort.**, 726: 201-204, 2006.

TERRA VIVA, 2019. Disponível em: <<https://www.terraviva.agr.br/amaryllis>>. Acesso em: 21 de abril de 2024.

URREA-VICTORIA, V., PIRES, J. P., TORRES, P.B., SANTOS, D. Y. A. C. & CHOW, F. (2016). Ensaio antioxidante em microplaca do poder de redução do ferro (FRAP) para extratos de algas. São Paulo: Instituto de Biociências, 2016. Disponível em: ISBN 978-85-85658-62-5.

VAN ACKER, AS.; TROMP, MN.; HAENEN, GR.; van der VIJGH, W.J.; BAST, A. Flavonoids as scavengers of nitric oxide radical. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** Vol. 214(3), p. 755-759, 1995.

ZHANG, D.; REN, L.; CHEN, G.; ZHANG, J.; REED, B.M., SHEN, X. ROS-induced oxidative stress and apoptosis-like event directly affect the cell viability of cryopreserved embryogenic callus in *Agapanthus praecox*, *Plant Cell Rep*, v. 34, p.1499–1513, 2015.

ZHOU Z.; JUAN C.; ZHI-XIN Z.; FANG-BIN W.; LU W.; YAN L.; XIAN Z.; JIAN L. Solubilization of luteolin in PVP40 solid dispersion improves inflammation-induced insulin resistance in mice. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 174, 9 p., 2022.

ZHOU, B.; WEI, X.; WANG, R.; JIA, J. Quantification of the enzymatic browning and secondary metabolites in the callus culture system of *Nigella glandulifera* Freyn et Sint. **Asian Journal of Traditional Medicines**, 5: 109-116, 2010

CAPÍTULO 2. Fontes nutricionais e açúcares na embriogênese somática a partir de tépalas de amarílis (*Hippeastrum* sp. Herb.)

1 RESUMO

A embriogênese somática (ES) é uma técnica da agricultura moderna que permite o desenvolvimento de um embrião a partir da célula somática e tem sido utilizada como uma técnica alternativa de propagação *in vitro* de plantas utilizadas na Horticultura. Essa técnica tem demonstrado algumas vantagens em relação a micropropagação, especialmente na eliminação de vírus em plantas. Não tem sido diferente a aplicação da ES na propagação *in vitro* de flores, fornecendo embriões somáticos, com grande possibilidade de ser o inóculo inicial zero, visando cultivos mais eficientes. No entanto, a eficiência da ES na geração de embriões ainda é um dos fatores limitantes da aplicação comercial dessa técnica. Fatores como meios de cultura, carboidratos, fitorreguladores e luz estão associados ao sucesso da ES. O presente trabalho teve como objetivo desenvolver um protocolo de ES para *Hippeastrum hybridum* cv. Intokase, a partir segmentos de tépalas e relacionar a produção de embriões com fatores exógenos como fontes nutricionais e carboidratos juntamente com a atividade antioxidante e a produção de fenóis totais. A combinação de sacarose com o meio de cultura MS $\frac{1}{2}$ + 0,5 mg L⁻¹ de Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e 1,0 mg L⁻¹ de Thidiazuron (TDZ), gerou 40 embriões/explante e massa de calos de 0,89 (g/explante). A quantificação de flavonoides mostrou presença de rutina nas tépalas da cultivar Intokase cultivadas *in vitro* no meio de cultura MS $\frac{1}{2}$ + sacarose. Os resultados do meio de cultura MS $\frac{1}{2}$ demonstraram maior massa de explante em regeneração, tendo correlação com maiores valores de agentes redutores analisados pelo método de Folin-Ciocalteu e presença de rutina nos tecidos *in vitro*.

Palavras-chave: Cultivo *in vitro*, Embriões somáticos, Flor de bulbo, Atividade antioxidante, Metabolismo Secundário

2 INTRODUÇÃO

A manipulação de plantas em ambiente laboratorial é uma técnica muito usada para se obter um número elevado de indivíduos, em qualquer época do ano, e é caracterizada por ser um sistema eficiente e de grande importância no mercado mundial devido a sua versatilidade em obter mudas frutíferas, ornamentais e florestais (Podwyszyńska et al., 2022).

Em cultura de tecidos vegetais, a técnica de micropropagação tornou-se importante para a obtenção de plantas com características desejáveis, permitindo a propagação rápida e eficiente de clones geneticamente idênticos, sendo crucial para a produção comercial de diversas espécies (Debergh & Maene, 1981).

Por outro lado, a embriogênese somática envolve a regeneração de embriões a partir de células somáticas, sem a fertilização. Essa técnica visa a propagação de plantas que são recalcitrantes à propagação convencional. Ambas as técnicas desempenham um papel fundamental na agricultura moderna, facilitando o melhoramento genético, a conservação de espécies e a produção eficiente de plantas ornamentais (Féher, 2019).

Todavia, mesmo com o advento de técnicas modernas de propagação, a propagação comercial de amarílis ainda é feita pelo método de duplas-escamas, em ambiente de casa de vegetação, o qual utiliza o bulbo como material vegetal, e inevitavelmente dissemina as principais doenças da cultura como por exemplo as descritas por Alexandre et al. (2005), *Cumcuber Mosaic Virus* (CMV), Mosaico-do-*Hippeastrum* (HiMV) e vírus vira-cabeça-do-tomateiro – *Tomato Spotted Wilt Virus* (TSWV).

Dessa forma, o uso de técnicas modernas de biotecnologia beneficiará o mercado de flores bulbosas fornecendo embriões somáticos mais saudáveis e com grande possibilidade de ser o inóculo inicial zero, visando cultivos mais eficientes. Recentemente, nosso grupo de pesquisas desenvolveu um protocolo que permitiu a indução e regeneração de ES livres dos dois principais tipos de vírus do amarílis, o HiMV e o CMV (de Almeida et al. 2022) e que as plantas provenientes da ES são estáveis geneticamente, apresentando as principais características dos clones utilizados como doadores de explantes. Nesse contexto, a técnica apresenta um potencial subexplorado que pode levar ao desenvolvimento de mudas de excelente qualidade para fins de propagação clonal.

Entretanto, existem inúmeras formas de se propagar uma espécie e o sucesso ou não da técnica depende de alguns fatores, podendo ser físicos ou químicos além da combinação entre eles. Como por exemplo o controle da temperatura, a intensidade luminosa e o espectro luminoso, as fontes nutricionais podendo ter variações dos macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, hormônios, açúcares, dentre outros (Yasemin & Beruto, 2024).

O meio de cultura mais conhecido e utilizado no cultivo *in vitro* de plantas é o Murashige & Skoog (1962), conhecido pela sigla MS. Contudo, outras formulações como o N6 (CHU, et.al. 1975), são usadas em casos específicos para obtenção de embriogênese somática.

Outro grande fator impactante para obter embriões somáticos é o uso dos fitorreguladores, podendo ser usado separadamente a auxina da citocinina, ou até mesmo combinações de dois ou mais reguladores. Em tal circunstância, as auxinas têm uma forte influência na atividade celular ao interagir com hormônios endógenos e alterar a expressão genética, o que facilita a desdiferenciação das células e sua rediferenciação para um estado embriogênico específico (Benjamins, et al., 2008).

Segundo Gaj (2004) em diversos protocolos as auxinas são utilizadas para a indução de embriões somáticos, com destaque para duas auxinas citadas na literatura pro cultivo *in vitro* de *Hippeastrum* spp. com por exemplo o Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) e do Thidiazuron (TDZ) combinados entre si como precursores para a indução da ES (de Almeida et al., 2022).

A fonte de carbono amplamente usada na micropropagação é a sacarose (Stepan-Sarkissian et al., 1977; Neto & Otoni, 2003; Tokuhara, 2003), pelo fato de fornecer energia prontamente disponível no meio de cultura e pela sua estabilidade. Todavia outras fontes de açúcares como a glicose, a lactose, a maltose, a galactose e a frutose também vem sendo estudadas como alternativas para obter um protocolo eficiente de produção de embriões somáticos (Yaseen et al., 2013).

Um fator pouco abordado nos artigos, mas que desempenha um papel crucial é a idade do material, pois tecidos jovens e saudáveis são compostos por células indiferenciadas e têm alta capacidade de regeneração e proliferação celular (Hoque & Mansfield, 2004). Desse modo, são capazes de formar clones quando colocados em condições laboratoriais adequadas devido a totipotência celular.

O objetivo deste trabalho foi aumentar a eficiência de um protocolo de embriogênese somática para *Hippeastrum hybridum* cv. Intokase, a partir segmentos

de tépalas e relacionar fatores exógenos como fontes nutricionais e carboidratos com a embriogênese somática, a atividade antioxidante e a produção de fenóis totais.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Os bulbos de *Hippeastrum hybridum* cv. Intokase previamente induzidos a floração em câmaras frias, foram obtidos junto a empresa Terra Viva (Holambra, SP). Essa cultivar foi escolhida pelo fato de ser uma das líderes de mercado, além de demonstrar certa recalcitrância para a ES quando usado protocolo previamente desenvolvido. Foi realizado o plantio dos bulbos em potes plásticos número 15 (1,4 L capacidade) contendo substrato a base de turfa, perlita expandida, vermiculita expandida, e casca de arroz torrefada (Carolina Soil ®) e areia lavada 2:1 (v/v).

O cultivo foi realizado em casa de vegetação coberta na face superior com plástico agrícola difusor de 150 micras e tela Freshnet como sombreamento de 65%, e nas laterais com sombrite preto para 50% de sombreamento, e irrigados por microaspersão, com quantidade de água aplicada de aproximadamente 5 mm/dia. As plantas foram cultivadas até o momento da floração, quando as espatas totalmente fechadas foram coletadas e utilizadas para o experimento.

3.2 Assepsia e estabelecimento

Os botões florais foram colhidos e armazenados em sacos plásticos sob temperatura de geladeira (8-10°C) por dois a quatro dias antes do uso. Foi realizada uma pré-lavagem dos botões florais externamente com antisséptico 2% de digliconato de clorexidina (Riohex®), em seguida lavagem em água corrente e então submetidos à desinfecção em solução de hipoclorito de sódio (cloro ativo 1,0–1,5%) por 10 minutos sob agitação manual. Em seguida, foi retirado os botões florais de dentro da espata com auxílio de bisturi estéril e alocados em frascos estéreis. Então foram submetidos a assepsia com álcool 70% por 30 segundos e solução de hipoclorito de sódio (cloro ativo 2,0-2,5%) por 15 minutos. Só então foram lavados por três vezes consecutivas em água deionizada autoclavada por 3 minutos cada. As três tépalas externas foram eliminadas e apenas as tépalas internas foram usadas como explantes, buscando repetir os resultados positivos obtidos com a

cultivar Bingo (Almeida et al. 2022) e com o objetivo de diminuir a chances de contaminação por microorganismos.

Essas tépalas internas foram seccionadas em quadrados de 1 cm² cada e inoculadas em meio de cultura contendo 0,5 mg L⁻¹ de Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e 1,0 mg L⁻¹ de Thidiazuron (TDZ). O meio de cultura básico foi o Murashige e Skoog (MS) com metade da concentração de macronutrientes (MS^{1/2}), acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose; 0,1 g L⁻¹ de mio-inositol; e com o pH ajustado para 5,8 antes da adição de 6,4 g L⁻¹ de ágar, o qual foi autoclavado a 120 °C por 20 min.

Após 30 dias de cultivo no meio de cultura descrito no parágrafo acima e na ausência de luz, os segmentos de tépalas foram transferidos para novos meios de cultura divididos em 2 fontes de nutrientes e 2 fontes de açúcares, seguindo o esquema demonstrado na tabela 1, em um fatorial DIC 2 × 2. Cada tratamento foi composto por 15 repetições, e em cada frascos possuía quatro segmentos de tépalas.

Tabela 1. Composição dos meios de cultura dos quatro tratamentos.

	Reagentes (mg.L ⁻¹)	N6 + SACAROSE	N6 + GALAC/LAC	MS ^{1/2} + SACAROSE	MS ^{1/2} + GALAC/LAC
MACROSUTRIENTES	NH ₄ NO ₃	720,0	720,0	825,0	825,0
	KNO ₃	950,0	950,0	950,0	950,0
	CaCl ₂ *2H ₂ O	166,0	166,0	220,0	220,0
	MgSO ₄ *7H ₂ O	90,27	90,27	185,0	185,00
	KH ₂ PO ₄	68,00	68,00	85,0	85,00,0
	FeSO ₄ *7H ₂ O			27,80	27,80
	Na-EDTA			37,30	37,30
	FeNaEDTA	36,70	36,70		
MICRONUTRIENTES	Mn SO ₄ *H ₂ O	18,94	18,94	16,90	16,90
	ZnSO ₄ *7H ₂ O	10,00	10,00	8,600	8,600
	H ₃ BO ₃	10,00	10,00	6,200	6,200
	KI			0,830	0,830
	Na ₂ MoO ₄ *H ₂ O	0,250	0,250	0,250	0,250
	CuSO ₄ *5H ₂ O	0,025	0,025	0,025	0,025
	CoCL ₂ *6H ₂ O			0,025	0,025
VITAMINAS	GLICINA	2,00	2,00	2,00	2,00
	THIAMINA HCl	1,00	1,00	0,10	0,10
	PIRIDOXINA HCl	0,50	0,50	0,50	0,50
	ÁCIDO NICOTÍNICO	0,50	0,50	0,50	0,50

ADITIVOS	GLUTAMINA	200,0	200,0		
	ÁCIDO ASCÓRBICO	500,0	500,0		
	MYO-INOSITOL	100,0	100,0	100,0	100,0
CARBOIDRATOS	SACAROSE	30.000		30.000	
	LACTOSE		18.000		18.000
	GALACTOSE		9.000		9.000
HORMÔNIOS	BAP	1,000	1,000		
	ANA	0,050	0,050		
	2,4-D	0,050	0,050	0,50	0,50
	TDZ			1,00	1,00
	ÁGAR	6.400,0	6.400,0	6.400,0	6.400,0
	pH	5,8	5,8	5,8	5,8

Todos os tratamentos foram alocados em prateleiras com iluminação fornecida por diodos emissores de luz (LEDs) branca ($109,15 \mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$), em sala com fotoperíodo de 16h à temperatura de $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, conforme resultados previamente obtidos (Capítulo 1).

As quantidades de embriões foram obtidas aos 60, 120 e 180 dias e massa dos explantes em regeneração foi obtida com 60 e 120 dias. Aos 60 dias de cultivo, sete explantes proveniente de réplicas distintas (tépalas sem formação de calos embriogênicos e tépalas apresentando formação de calos embriogênicos) foram retirados a fim de obter um extrato metanólico de amostra composta, conforme descrito no tópico 3.3.

3.3 Obtenção do extrato metanólico

Segmentos de tépalas utilizados como explantes e cultivados *in vitro* foram obtidos de 4 tratamentos proveniente dos experimentos de indução da ES. Este material vegetal foi mantido em liofilizador até completa secagem. Em seguida, o material foi submetido a trituração em cadinho com auxílio de pistilo e nitrogênio líquido. O pó resultante foi pesado para obtenção do rendimento e uma alíquota de 100 mg foi retirada da amostra composta para preparação do extrato metanólico.

Em seguida, na alíquota da amostra foi adicionado 1 mL de Metanol (MeOH) 70% e colocado em banho maria por 10 minutos. Após esse período, a essa solução foi centrifugada em centrífuga refrigerada (Eppendorf, 5810B) 4°C a 2.000 rpm por 2 minutos. O sobrenadante foi coletado e armazenado e esse processo foi repetido por três vezes consecutivas até obter ao final um extrato metanólico de 3 mL.

O extrato foi armazenado em geladeira por 1 dia, e transportado em isopor refrigerado para manutenção da temperatura até o Instituto de Biociências da USP, onde foram realizadas as análises espectrofotométricas.

A metodologia em questão foi descrita por Pires *et al.* (2017a); Pires *et al.* (2017b) e Urrea-Victoria *et al.* (2016); com modificações para obter a proporção ideal da solubilidade das amostras e respectivas diluições.

3.4 Ensaio da atividade antioxidante *in vitro*

Este ensaio foi realizado em colaboração com a Prof^a. Dr^a. Déborah Yara A. C. dos Santos, do Departamento de Botânica – USP.

Todos os extratos metanólicos foram analisados no mesmo dia, assim como a realização das respectivas curvas padrão de cada protocolo e leitura dos brancos das amostras. Para isso foram realizados em microplaca de 96 poços e as leituras de absorbância realizadas em leitor de microplacas (Synergy™H1). Os ensaios foram feitos em triplicatas procedimentais.

O ensaio de DPPH foi desenvolvido de acordo com o protocolo descrito por Pires e colaboradores (2017a). Uma solução 80 µM de DPPH em metanol foi preparada no momento do teste. Em cada poço da microplaca foram acrescentados 280 µL da solução de DPPH e 20 µL de cada amostra. Após a incubação da microplaca por 30 minutos a temperatura ambiente, a absorbância foi verificada a 517 nm. Através de uma curva de calibração de ácido gálico (0-54 µg.mL⁻¹), os valores foram calculados em equivalente de ácido gálico (EAG) por grama de extrato (µg/g).

O poder redutor de ferro (FRAP) foi obtido conforme protocolo descrito por Urrea-Victoria e colaboradores (2016). Uma solução de reagente FRAP foi preparada no momento do teste. Em cada poço da microplaca uma alíquota de 20 µL de cada amostra foi adicionada a 15 µL de água ultrapura e 265 µL de reagente FRAP. Após a incubação da microplaca por 30 minutos a temperatura de 37°C, a absorbância foi verificada a 595 nm. Através de uma curva de calibração de ácido gálico (0-7,2

$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), os valores foram calculados em equivalente de ácido gálico (EAG) por grama de extrato ($\mu\text{g}/\text{g}$).

No ensaio com o reagente de Folin-Ciocalteu, em cada poço da microplaca uma alíquota de 20 μL das amostras foi adicionada a 200 μL de água ultrapura e 20 μL do reagente Folin-Ciocalteu 1:10 (Dinâmica®). Entre 5-8 min, foi adicionada a essa mistura 60 μL de uma solução saturada de carbonato de sódio (250 mg/mL utilizada após formação de um precipitado). Após 30 min, as absorvâncias foram lidas a 760nm. Através de uma curva de calibração de ácido gálico (0-120 $\mu\text{g}/\text{mL}$), os valores foram calculados em equivalente de ácido gálico (EAG) por grama de extrato ($\mu\text{mol}/\text{g}$).

3.5 Determinação do conteúdo de flavonas/flavonoides

Os extratos foram suspensos em MeOH grau HPLC e preparados na concentração de 2 mg/mL para serem analisados. As análises por CLAE-DAD foram feitas utilizando o sistema Agilent 1260. Os cromatogramas foram obtidos com detecção em 352 nm e 280 nm, empregando-se a coluna Zorbax C18 (150 mm \times 4.6 mm \times 3.5 μm) a 45 °C. Como fase móvel foi empregado gradiente de ácido acético 0,1% (AcOH) e acetonitrila (CH_3CN), começando a corrida com 10% de CH_3CN (0-6 min), aumentando para 15% (6-7 min), mantendo isocrático por 15 minutos, seguido de aumento para 50% (22-32 min) e para 100% (32-42 min), mantendo isocrático por mais 8 minutos. O fluxo de solvente foi de 1,0 mL/min. O volume de amostra injetado para análise foi de 3 μL .

Para obtenção da curva de calibração, utilizou-se Rutina nas concentrações de 15-300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ em metanol. Os valores de área resultantes do cromatograma foram representados graficamente e uma equação linear foi utilizada para calcular o teor dos flavonoides das amostras.

3.6 Análise estatística

Valores obtidos das quantidades de embriões foram transformados utilizando a transformação de $\sqrt{X + 1}$ para atender as pressuposições da análise de variância. Já os valores das massas dos explantes em regeneração e triplicatas obtidas nas análises espectrofotométricas não foram transformados. Em ambos os casos, os dados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA), foi realizado também o teste de Shapiro-Wilk a 5% para avaliar a normalidade dos resíduos e o teste de

Bartlett a 5% para homogeneidade das variâncias. Em casos de diferença estatística, foi realizado o teste de comparação de médias de Scott-Knott. O software utilizado foi o RStudio versão 4.2.1 (RSTUDIO TEAM, 2023).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Assepsia e estabelecimento

Não foram observadas contaminações bacterianas e nem fúngicas nos segmentos de tépalas inoculados *in vitro*, demonstrando a alta eficiência do protocolo de assepsia elaborado para o amarílis.

4.2 Nutrientes e fontes de carbono na indução e regeneração de ES em segmentos de tépalas de amarílis

No experimento em questão foram testados dois meios de culturas com fontes nutricionais diferentes entre si, combinados com duas fontes de carbono (açúcares) conforme a Tabela 1 mostrada no tópico 3.2 para verificar se mudanças bruscas no meio de cultura favorecem ou não o aumento de embriões e a massa dos explantes em regeneração.

Foi observado que, em relação às porcentagens de explantes que apresentavam calos embriogênicos aos 60 dias de cultivo, não foi detectada diferença estatisticamente significativa (Tabela 2).

No entanto, ao contrário do que foi observado aos 60 dias de cultivo, o subcultivo em meio de cultura MS $\frac{1}{2}$, independentemente da fonte de carboidrato, mostrou resultados superiores e estatisticamente distintos em comparação ao subcultivo no meio de cultura N6 (Tabela 3).

Tabela 2. Efeito de fontes nutricionais e carboidratos no aumento da massa embriogênica de *H. hybridum* cv. Intokase aos 60 dias de cultivo.

Fontes nutricionais	Porcentagem de explantes com ES (%)	Fontes de carboidratos	Porcentagem de explantes com ES (%)
MS ½	37,5 (±3,14) a	SACAROSE	33,9 (±3,23) a
N6	30,3 (±3,05) a	GALACTOSE + LACTOSE	33,9 (2,99) a
p-valor meios	0,4406 ^{ns}		
p-valor açúcares	0,8704 ^{ns}		
p-valor interação	0,6832 ^{ns}		

*Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Skott-Knott a 5% de probabilidade. ^{ns} não significativo.

Tabela 3. Efeito de fontes nutricionais e carboidratos no aumento da massa embriogênica de *H. hybridum* cv. Intokase aos 120 dias de cultivo.

Fontes nutricionais	Porcentagem de explantes com ES (%)	Fontes de carboidratos	Porcentagem de explantes com ES (%)
MS ½	56,2 (±1,98) a	SACAROSE	44,6 (±3,00) a
N6	34,8 (±3,00) b	GALACTOSE + LACTOSE	46,4 (2,49) a
p-valor meios	0,0037*		
p-valor açúcares	0,6076 ^{ns}		
p-valor interação	0,8112 ^{ns}		

*Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Skott-Knott a 5% de probabilidade. ^{ns} não significativo.

Os resultados obtidos mostraram que as tépalas que permaneceram todo o tempo do cultivo no meio de cultura MS½ - MS½ tiveram quantidades de embriões superiores (Tabela 4), como por exemplo 1,87 aos 60 dias e 3,72 embriões aos 120 dias, em relação a combinação de meios de cultura MS½ - N6, com quantidades de embriões de 1,48 e 2,76 aos 60 dias e 120 dias de cultivo, respectivamente. Aos 180 dias de cultivo não foi possível observar diferença estatística.

Assim como, na substituição da Sacarose pelos açúcares Lactose + Galactose (Tabela 4) em que não foi detectada diferença estatisticamente significativa. Portanto, pode-se usar ambos como fonte de açúcares no meio de cultura visando a indução da ES em amarílis.

Tabela 4. Quantidade de embriões em cada tratamento ao longo do tempo de cultivo.

Meio de Cultura	Quantidade de embriões		
	60 dias	120 dias	180 dias
MS ½ - MS ½	1,87 ± 0,25 a	3,72 ± 0,95 a	5,38 ± 3,70 a
MS ½ - N6	1,48 ± 0,31 b	2,76 ± 1,14 b	5,79 ± 3,02 a
P valor meios	0,0016*	0,0279*	0,7592ns
P valor interação	0,346ns	0,882ns	0,703ns

Fonte de carbono	Quantidade de embriões		
	60 dias	120 dias	180 dias
SACAROSE	1,63 ± 0,34 a	3,41 ± 1,20 a	6,29 ± 3,96 a
LACTOSE/GALAC	1,71 ± 0,35 a	3,07 ± 1,10 a	4,88 ± 2,47 a
P valor açúcares	0,4611ns	0,416ns	0,2884ns
P valor interação	0,346ns	0,882ns	0,703ns

Os dados foram coletados aos 60, 120 e 180 dias de cultivo. Os valores representam média (n = 7). Letras diferentes indicam diferença de significância em $p < 0,05$ de acordo com ANOVA e teste de Scott-knott. ** significativo $p < 0,01$ *significativo $p < 0,05$ ns não significativo. *Valores ajustados para $\sqrt{X + 1}$ para atender as pressuposições da análise de variância.

Na quantidade total de embriões (Tabela 5), notamos que houve diferença estatística apenas aos 60 dias de cultivo em que o tratamento N6 combinado com sacarose foi inferior e se diferenciou dos demais tratamentos.

Tabela 5. Quantidade total de embriões em cada tratamento ao longo do tempo de cultivo.

Tratamentos	Quantidade total de embriões (n° embriões/explante)		
	60 dias	120 dias	180 dias
N6+Sacarose	0,93 (0,30) b	4,65 (1,32) a	25,5 (3,13) a
N6+Galatose Lactose	1,43 (0,32) a	2,23 (1,00) a	18,64 (3,07) a
MS ½ + Sacarose	1,93 (0,14) a	7,36 (0,96) a	40,57 (4,92) a
MS ½+ Galatose Lactose	2,14 (0,35) a	6,36 (1,00) a	30,86 (1,83) a

Os dados foram coletados aos 60, 120 e 180 dias de cultivo. Os valores representam média (n = 7). Letras diferentes indicam diferença de significância em $p < 0,05$ de acordo com ANOVA e teste de Scott-knott. *Valores ajustados para $\sqrt{X + 1}$ para atender as pressuposições da análise de variância.

De acordo com os valores maiores e/ou diferente estatisticamente dos tratamentos MS $\frac{1}{2}$ aos 60 e 120 dias de cultivo (Tabela 4) em comparação com tratamentos que foram transferidos para o meio de cultura N6, pode-se dizer que utilizar MS $\frac{1}{2}$ - MS $\frac{1}{2}$ é a condição mais indicada para a geração de embriões *in vitro* de *H. hybridum* cv. Intokase. Essa vantagem também foi observada na comparação da massa dos explantes em regeneração (g/explante) aos 60 e 120 dias de cultivo (Figura 1), em que na presença de MS $\frac{1}{2}$ - MS $\frac{1}{2}$ a massa dos explantes em regeneração eram maiores do que os tratamentos MS $\frac{1}{2}$ - N6.

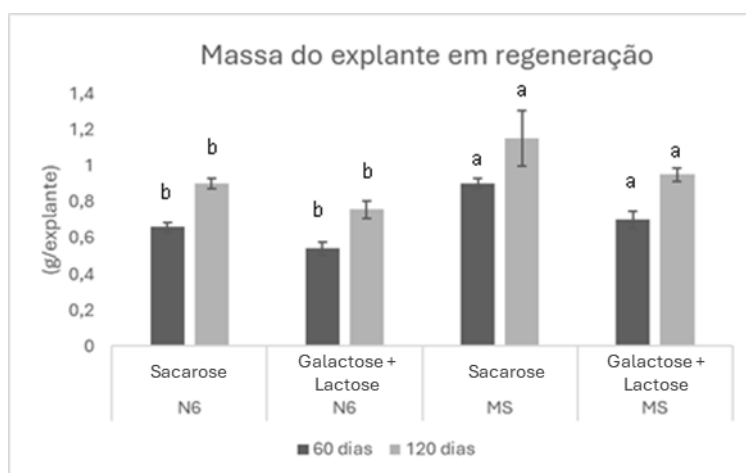


Figura 1. Massa fresca do explante em regeneração (g/explante) aos 60 dias e 120 dias de cultivo nos diferentes tratamentos. Autoria: Ana Victória Conde van den Broek.

Certamente macronutrientes e micronutrientes são fatores fundamentais para que haja formação de órgãos e estruturas celulares *in vitro* (George & Klerk, 2008), levando isso em conta, o meio de cultura mais difundido na literatura é o Murashige e Skoog (MS) por ser o mais usado na cultura de tecidos vegetais (Mehbud et al., 2022). Essa relação positiva de ganho de massa (g/explante) dos explantes em regeneração (Figura 1), pode ser explicada pelo fato das tépalas já estarem no meio de cultura MS $\frac{1}{2}$ desde o início da inoculação e com 30 dias de cultivo serem transferidas para novo meio de cultura, mas com a mesma formulação salina, portanto, o subcultivo no meio de cultivo MS $\frac{1}{2}$ - MS $\frac{1}{2}$ aumentou a frequência da ES. O aumento de massa (g/explante) dos explantes em regeneração no meio de cultivo MS $\frac{1}{2}$ pode ser decorrente da concentração maior de magnésio (Mg) no meio de cultura MS $\frac{1}{2}$ sendo 18,2 mg L⁻¹ quando comparado a concentração de 8,9 mg L⁻¹ no meio de cultura N6. Os pesquisadores Walker e Sato (1981) observaram em

seus experimentos que quando era omitido o nutriente Mg^{2+} do meio de cultura ocorria uma grande redução do número de embriões somáticos formados do calo de *Medicago sativa*, demonstrando a importância desse nutriente para a ES.

Outro ponto relevante e que provavelmente teve influência sobre a ES, especialmente pela melhor performance do meio $MS\frac{1}{2}$ - $MS\frac{1}{2}$ foi a manutenção dos dois fitorreguladores 2,4-D e TDZ já testados e demonstrado sua eficiência na obtenção de ES em amarílis (de Almeida et al., 2022), em comparação a combinação $MS\frac{1}{2}$ - N6, no qual o meio N6 continha como fitorreguladores o BAP, o ANA e o 2,4-D, e que nesse caso, o 2,4-D foi reduzido 10x em relação a concentração utilizada no meio $MS\frac{1}{2}$. Isso reforça dois pontos relevantes da ES em amarílis, que o TDZ parece ser mais eficiente que o BAP na indução da ES, e que o 2,4-D em maiores concentrações ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$) resulta em aumento da taxa de ES comparado ao uso de baixas concentrações ($0,05 \text{ mg L}^{-1}$).

Uma das diferenças no atual experimento em relação ao anterior (capítulo 1) foi o subcultivo dos explantes para um novo meio de cultura após 30 dias da inoculação *in vitro* dos segmentos de tépalas, enquanto no capítulo 1 esses explantes foram mantidos no mesmo meio, sem subcultivos, por até 120 dias. Foi notável que após a assepsia dos tecidos inoculados no meio de cultura, esses liberam muitos compostos fenólicos que sofrem oxidação, tornando os meios de cultura da coloração creme para vermelho-róseo, sendo essa oxidação fenólica, por algumas vezes, associadas a inibição do surgimento de embriões (Oliveira et al., 2021). Quando fornecemos novo meio de cultivo, esse fator com potencial inibidor para a ES parece ter sido reduzido, diminuindo a presença da oxidação fenólica, observada pela diminuição da intensidade vermelho-rósea nos meios, o que provavelmente aumentou a frequência de segmentos de tépalas que resultaram em ES.

Essa maior eficiência de regeneração parece estar de alguma forma associada ao conteúdo de fenóis nos explantes utilizados. O tratamento $MS\frac{1}{2}$ - $MS\frac{1}{2}$ resultou em valor maior de fenóis totais $3,45 \text{ g EQT/g}$ de extrato (Tabela 4) e maior massa dos explantes em regeneração (Figura 1). Dessa forma, o maior poder redutor em extratos provenientes dos tratamentos $MS\frac{1}{2}$ - $MS\frac{1}{2}$ parece estar diretamente relacionada à uma maior massa de calos (g/explante). Já as análises de atividade antioxidante (DPPH e FRAP) não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos $MS\frac{1}{2}$ - $MS\frac{1}{2}$ e $MS\frac{1}{2}$ - N6 (Tabela 4).

Tabela 6. Quantidade de agentes redutores analisados pelos métodos de DPPH, Folin e FRAP aos 60 dias de cultivo nos diferentes tratamentos.

Fonte de carbono	Conteúdo total de metabólitos		
	DPPH (μg EAG /g extrato)	Folin (g Trolox/g extrato)	FRAP (μg EAG /g extrato)
SACAROSE	2,43 \pm 0,25 b	3,21 \pm 0,12 a	18,30 \pm 2,19 b
LACTOSE/GALAC	2,74 \pm 0,24 a	3,32 \pm 0,49 a	19,73 \pm 2,35 a
P valor açúcares	<0.001*	0,0596ns	<0.001*
P valor interação	<0.001*	<0.001*	<0.001*

Meio de Cultura	Conteúdo total de metabólitos		
	DPPH (μg EAG /g extrato)	Folin (g Trolox/g extrato)	FRAP (μg EAG /g extrato)
MS $\frac{1}{2}$ - MS $\frac{1}{2}$	2,57 \pm 0,41 a	3,45 \pm 0,36 a	19,09 \pm 3,05 a
MS $\frac{1}{2}$ - N6	2,59 \pm 0,07 a	3,08 \pm 0,23 b	18,94 \pm 1,48 a
P valor meios	0,6329ns	<0.001*	0,3484ns
P valor interação	<0.001*	<0.001*	<0.001*

Os dados foram coletados aos 60 dias de cultivo. Os valores representam média (n = 3). Letras diferentes indicam diferença de significância em $p < 0,05$ de acordo com ANOVA e teste de Scott-knott. ** significativo $p < 0,01$ *significativo $p < 0,05$ ^{ns} não significativo. EAG: Equivalente em ácido gálico.

4.3 Efeito de fontes nutricionais na comparação do conteúdo de flavonas/flavonoides *in vitro*

Na Figura 2 demonstramos a quantificação dos flavonoides das tépalas cultivadas *in vitro* da cultivar Intokase e constatamos a presença de Rutina somente nos tratamentos em que o meio de cultura MS $\frac{1}{2}$ foi mantido em todo tempo de cultivo. Considerando que o tratamento MS $\frac{1}{2}$ - MS $\frac{1}{2}$ também apresentou maior massa (g/explante) de calos (Figura 1) e maior quantidade de embriões em média aos 60 e 120 dias de cultivo (Tabela 2), é possível concluir que a presença de rutina nos tecidos parece estar envolvida de alguma forma no aumento da ES.

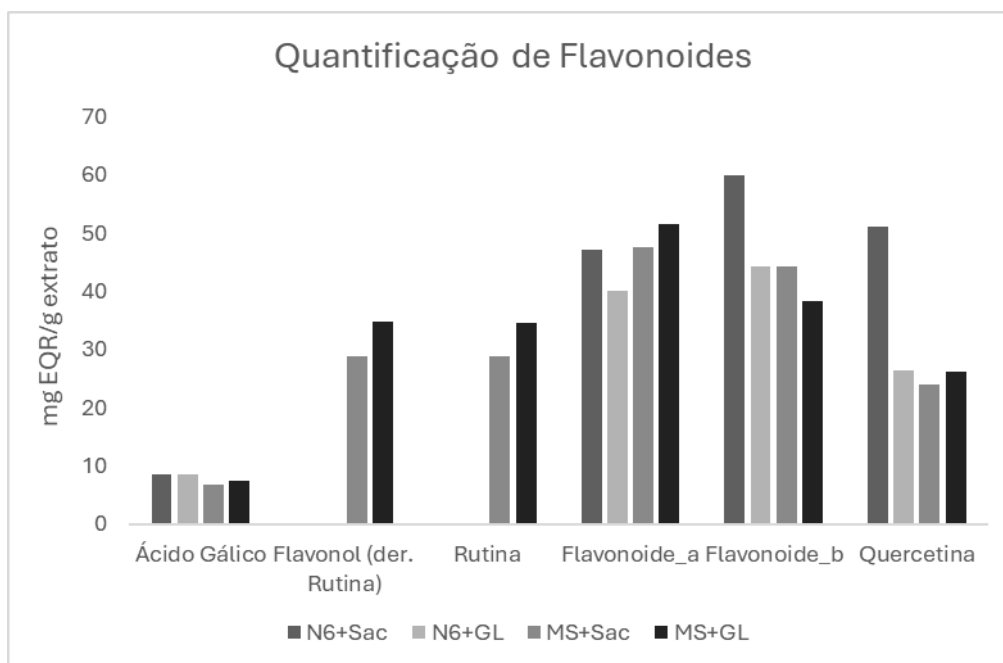


Figura 2. Quantificação da quantidade de flavonoides nos diferentes tratamentos. Dados expressos em mg/g de Rutina (mgEQR/g). Flavonoide_a correspondente ao tempo 28.00 de retenção. Flavonoide_b correspondente ao tempo 28.08 de retenção. Autoria: Ana Victória Conde van den Broek.

Os tratamentos MS $\frac{1}{2}$ - N6 não apresentaram rutina nos tecidos (Figura 2), e tiveram valores menores de fenóis (3,08 g TE/g de extrato; Tabela 6), quando comparados com tratamentos MS $\frac{1}{2}$ - MS $\frac{1}{2}$, que apresentam valores superiores (Tabela 6). A combinação de meios de cultura MS $\frac{1}{2}$ + N6 resultou em desempenho inferior em número de embriões (Tabela 4), massa fresca (g/explante) dos explantes em regeneração aos 60 e 120 dias de cultivo (Figura 1), ausência de rutina (Figura 2). Esses resultados sugerem que a menor concentração de Mg $^{2+}$ no meio de cultura N6 influenciou negativamente a geração de embriões para *H. hybridum* cv. Intokase.

Ao comparar os resultados do presente estudo com os dados de Khalifa et al. (2023), observamos algumas diferenças interessantes. Khalifa et al. reportaram que os bulbos de *Hippeastrum vittatum* apresentaram 6,45 mg de flavonoides totais, expressos como equivalente de rutina por grama, utilizando uma subfração 100% MeOH. Em contraste, nosso estudo com *Hippeastrum hybridum* cv. Intokase cultivado in vitro revelou quantidades significativamente mais altas de compostos fenólicos nas tépalas. O flavonoide quercetina, por exemplo, alcançou 51 mg EQR/g no tratamento MS $\frac{1}{2}$ - N6 com sacarose, um valor aproximadamente oito vezes

superior ao encontrado por Khalifa et al. Esses resultados sugerem que as condições de cultivo *in vitro*, como a formulação do meio de cultura e o tipo de açúcar, podem influenciar de maneira significativa a biossíntese de flavonoides.

Além disso, o presente estudo identificou o menor valor de compostos fenólicos para o ácido gálico, com 6,83 mg EQR/g no tratamento MS $\frac{1}{2}$ - MS $\frac{1}{2}$ (sacarose), que se aproxima dos valores encontrados para os flavonoides totais em *H. vittatum* no estudo de Khalifa et al. Esses dados indicam que, embora a concentração de fenólicos possa variar consideravelmente entre espécies e tecidos, também existe uma influência clara das condições de cultivo *in vitro* na produção desses compostos.

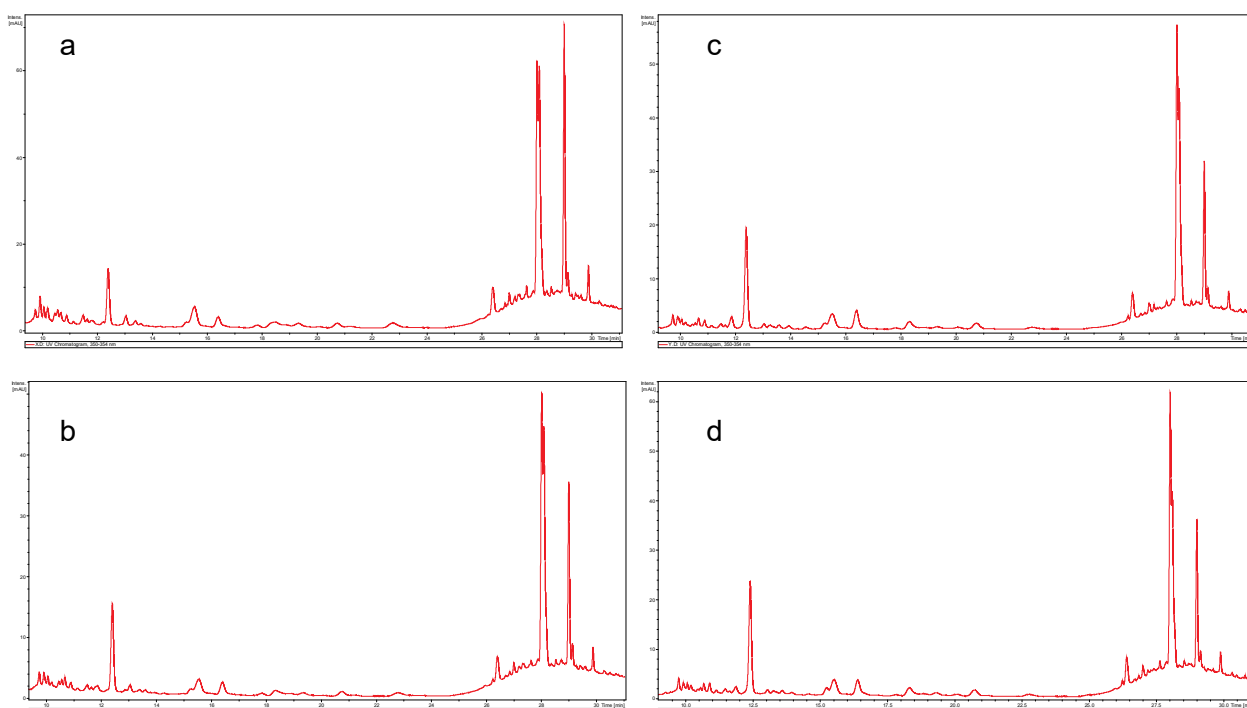


Figura 3. Cromatogramas dos extratos metanólicos de tépalas cultivadas *in vitro* de *H. hybridum* cv. Intokase nos diferentes tratamentos. Sendo a – MS $\frac{1}{2}$ - N6 + Sacarose; b – MS $\frac{1}{2}$ - N6 + Galactose e Lactose; c – MS $\frac{1}{2}$ - MS $\frac{1}{2}$ + Sacarose; d – MS $\frac{1}{2}$ - MS $\frac{1}{2}$ + Galactose e Lactose. Autoria: Ana Victória Conde van den Broek.

5 CONCLUSÕES

O subcultivo dos segmentos de tépalas na combinação $MS^{1/2}$ - $MS^{1/2}$, ou seja, mantendo a formulação original no subcultivo após 30 dias da inoculação, resultou em ganhos em relação à indução da ES. Nesse tratamento, com maior ganho de massa de calos embriogênicos e número de embriões formados, foram observadas a maior quantidade de compostos fenólicos e a presença do metabólito rutina nos tecidos, sugerindo um envolvimento específico e ainda não desvendado do metabolismo secundário durante o processo da ES em amarílis.

6 LITERATURA CITADA

ALEXANDRE, M.A.V.; SEABRA, P.V.; RIVAS, E.B.; DUARTE, L.M.L; GALLETI, S.R. Vírus, viróides, fitoplasmas e espiroplasmas detectados em plantas ornamentais no período de 1992 a 2003. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v.11, n. 1, p. 49-57, 2005.

BENJAMINS, R.; SCHERES, B. Auxin: the looping star in plant development. **Annu Rev Plant Biol.**, v. 59, p. 443-465, 2008.

CHU, C. C.; WANG, C. C.; SUN, C. S.; HSU, C.; YIN, K. C.; BI, C. V. Establishment of an efficient medium for another culture of rice through comparative experiments on the nitrogen source. **Scientia Sinica**, Pequim, v. 18, p. 659-668, 1975.

de ALMEIDA, N.V.; RIVAS, E.B.; CARDOSO, J.C. Somatic embryogenesis from flower tepals of *Hippeastrum* aiming regeneration of virus-free plants. **Plant Sci.** 2022. DOI: 10.1016/j.plantsci.2022.111191

DEBERGH, P.; MAENE, L. A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. **Sci. Hortic.**, v.14, p.335–345, 1981.

FEHÉR, A. Callus, dedifferentiation, totipotency, somatic embryogenesis: What these terms mean in the era of molecular plant biology? **Front. Plant Sci.**, v.10, artigo 536, 2019.

GAJ, M. D. Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Plant Growth Regulation**, n.43, p. 27-47, 2004.

GEORGE, E.; DE KLERK, G. The components of plant tissue culture media I: Macro- and micro-nutrients. In *Plant Propagation by Tissue Culture. Volume 1: The Background*; **Springer**: p. 65–113, 2008.

HOQUE, M. E.; MANSFIELD, J. W. Effect of genotype and explant age on callus induction and subsequent plant regeneration from root-derived callus of Indica Rice genotypes. **Plant Cell Tissue Organ Cult.** vol. 78, p. 217–223, 2004.

KHALIFA, M. F.; REFAAT, J.; ALLAM, A. E.; SHOMAN, M. E.; EL ZAWILY, A. E.; KAMEL, M. S.; SHIMIZU, K.; SHIHATA, E. Z. A. Studies on the nonalkaloidal secondary metabolites of *Hippeastrum vittatum* (L'Her.) Herb. Bulbs. **ACS Omega**, v. 8, n. 30, p. 26749-26761, 2023.

MEHBUB, H.; AKTER, A.; AKTER, M.A.; MANDAL, M.S.H.; HOQUE, M.A.; TULEJA, M.; MEHRAJ, H. Tissue Culture in Ornamentals: Cultivation Factors, Propagation Techniques, and Its Application. **Plants**, v.11, 3208, 2022.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NETO, V.B.D.P.; OTONI, W.C. Carbon sources and their osmotic potential in plant tissue culture: Does it matter? **Sci. Hortic.**, v.97, p.193–202, 2003.

OLIVEIRA, N. P.; RIBEIRO, S. A. F; DE SOUZA, M. M. Controle de contaminação e oxidação no cultivo *in vitro* de oliveira (*Olea europaea* L.) cv. "Koroneiki". **Research, Society and Development**. v. 10(5). 2021. DOI: <10.33448/rsd-v10i5.14929>

PIRES, J., TORRES, P., DOS SANTOS, D. & CHOW, F. Ensaio em microplaca do potencial antioxidante do método de sequestro do radical livre DPPH para extratos de algas. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 2017a. Disponível em: ISBN 978-85-85658-71-7. 1-6.

PIRES, J., TORRES, P., DOS SANTOS, D. & CHOW, F. Ensaio em microplaca de substâncias redutoras pelo método do Folin-Ciocalteu para extratos de algas. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 2017b. Disponível em: ISBN 978-85-85658-70-0.1-5.

PODWYSZYŃSKA, M.; ORLIKOWSKA, T.; TROJAK-GOLUCH, A.; WOJTANIA, A. Application and improvement of *in vitro* culture systems for commercial production of ornamental, fruit, and industrial plants in Poland. **Acta Societatis Botanicorum Poloniae**, v. 91, p. 914, 2022.

STEPAN-SARKISSIAN, G.; FOWLER, M.W. Carbohydrates by suspension cultures. **Plant Physiol.**, v.59, p.151–181, 1977.

TOKUHARA, K.; MII, M. Highly-efficient somatic embryogenesis from cell suspension cultures of *Phalaenopsis* orchids by adjusting carbohydrate sources. **Vitr. Cell Dev. Biol. Plant**, v.39, p.635–639, 2003.

URREA-VICTORIA, V., PIRES, J. P., TORRES, P.B., SANTOS, D. Y. A. C. & CHOW, F. (2016). Ensaio antioxidante em microplaca do poder de redução do ferro (FRAP) para extratos de algas. São Paulo: Instituto de Biociências, 2016. Disponível em: ISBN 978-85-85658-62-5.

WALKER, K. A.; SATO, S. J. Morphogenesis in callus tissue of *Medicago sativa*: the role of ammonium ion in somatic embryogenesis. **Plant Cell Tissue Organ Cult.** v.1, p.109-121, 1981.

YASEEN, M.; AHMAD, T.; SABLOK, G.; STANDARDI, A.; HAFIZ, I.H. Review: Role of carbon sources for *in vitro* plant growth and development. **Mol. Biol. Rep.**, v.40, p.2837–2849, 2013.

YASEMIN, S.; BERUTO, M. A Review on Flower Bulb Micropropagation: Challenges and Opportunities. **Horticulturae**, vol. 10 (3), p. 284, 2024.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A embriogênese somática se apresenta como uma alternativa para a propagação de explantes isentos de bactérias e fungos em *Hippeastrum* sp., sendo neste trabalho obtido um protocolo para aumento da porcentagem de segmentos de tépalas contendo calos embriogênicos para a cultivar Intokase.

A presença de PVP 40 no meio de cultura juntamente com o cultivo em LED branca ou na combinação de LEDs branca e vermelha de segmento de tépalas provenientes de botões florais jovens, contribuiu para uma maior porcentagem de segmentos de tépalas contendo calos embriogênicos, maior massa e maior número de embriões por explante.

Assim como no cultivo *in vitro* de *H. hybridum* cv. Intokase o subcultivo dos segmentos de tépalas em meio de cultura MS ½ utilizando a iluminação LED branca, propiciou maior massa de explantes em regeneração, maior quantidade de agentes redutores e presença de rutina nos tecidos.

Os capítulos 1 e 2 contribuíram com informações relevantes acerca do cultivo *in vitro* de *H. hybridum* cv. Intokase, como a utilização de PVP 40 no meio de cultura e/ou subcultivo das tépalas para redução da fenolização e concomitantemente o aumento de massa embriogênica, sendo possível observar correlação positiva com os dados dos experimentos e as análises fitoquímicas.

APÊNDICE

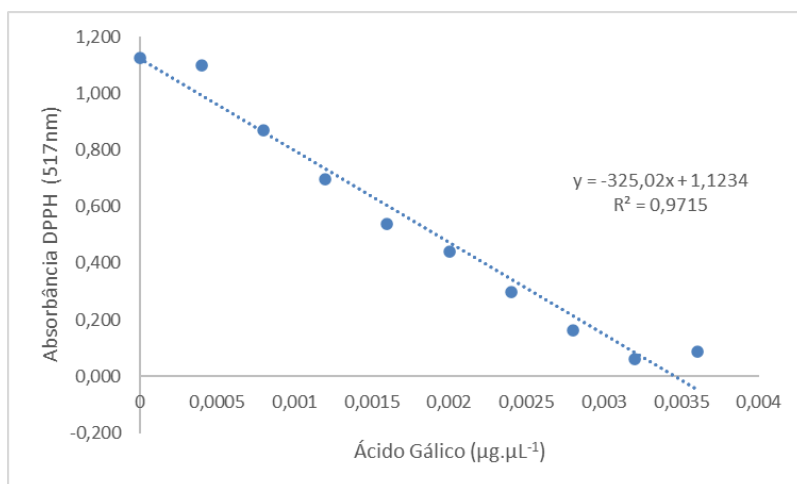


Figura 1. Curva padrão de DPPH com ácido gálico usada para cálculo do equivalente de ácido gálico/g de amostra. O gráfico foi plotado em função das respectivas absorbâncias lidas em 517 nm.

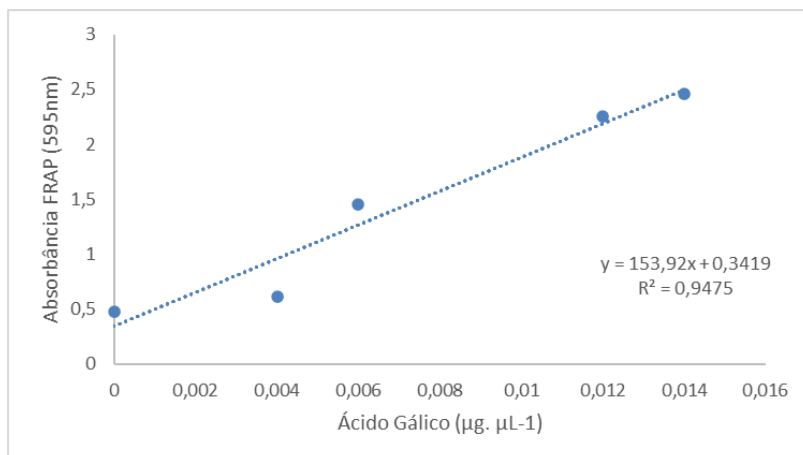


Figura 2. Curva padrão de FRAP com ácido gálico usada para cálculo do equivalente de ácido gálico/g de amostra. O gráfico foi plotado em função das respectivas absorbâncias lidas em 595 nm.

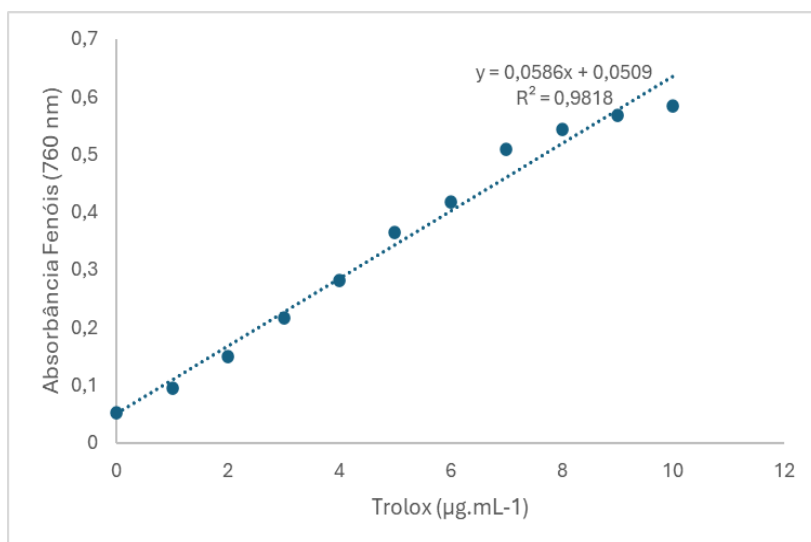


Figura 3. Curva padrão de Fenóis Totais com trolox usado para cálculo do equivalente de trolox/g de amostra. O gráfico foi plotado em função das respectivas absorbâncias lidas em 760 nm.