



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

**NAIARA VALLADO DE ALMEIDA**

**Araras  
2019**



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

**BIOLOGIA REPRODUTIVA, EMBRIOGÊNESE GAMÉTICA E SOMÁTICA EM  
CULTIVARES DE AMARÍLIS (*Hippeastrum* sp. Herb.)**

**NAIARA VALLADO DE ALMEIDA**

**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

2019



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

Centro de Ciências Agrárias  
Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados

---

**Folha de Aprovação**

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Naiara Vallado de Almeida, realizada em 17/06/2019:

---

Prof. Dr. Jean Carlos Cardoso  
UFSCar

---

Profa. Dra. Mariângela Cristofani-Yaly  
IAC

---

Prof. Dr. Everton Gomes da Costa  
Terra Viva

Vallado de Almeida, Naiara

BIOLOGIA REPRODUTIVA, EMBRIOGÊNESE GAMÉTICA E  
SOMÁTICA EM CULTIVARES DE AMARÍLIS (*Hippeastrum* sp. Herb.) /  
Naiara Vallado de Almeida. -- 2019.  
92 f. : 30 cm.

Dissertação (mestrado)-Universidade Federal de São Carlos, campus  
Araras, Araras

Orientador: Jean Carlos Cardoso

Banca examinadora: Jean Carlos Cardoso, Mariângela Cristofani-Yaly,  
Everton Gomes da Costa

Bibliografia

1. Cultura de tecidos. 2. Melhoramento Vegetal. 3. Regulador Vegetal. I.  
Orientador. II. Universidade Federal de São Carlos. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelo Programa de Geração Automática da Secretaria Geral de Informática (SIn).

DADOS FORNECIDOS PELO(A) AUTOR(A)

Bibliotecário(a) Responsável: Maria Helena Sachi do Amaral – CRB/8 7083

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela vida e saúde ao longo de toda a minha jornada.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Jean Carlos Cardoso pela paciência e compreensão, pelos ensinamentos e sempre incentivar o desenvolvimento profissional e pessoal.

A Empresa Terra Viva, por todo o suporte e bolsa concedida para que esse trabalho fosse realizado.

Ao Centro de Ciências Agrárias (CCA) por me receber e conceder a oportunidade de desenvolver esse trabalho.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP) e ao técnico Felipe Buck Campana por disponibilizarem os equipamentos e o tempo para a irradiação de todo o material vegetal.

Ao Centro de Citricultura 'Sylvio Moreira' por todo o suporte técnico para as análises moleculares. A professora doutora Mariângela Cristonafi-Yaly por toda ajuda e paciência. A Ana Lúcia e Maiara, por me ajudarem nesse desafio.

A equipe do Laboratório de Fisiologia Vegetal e Cultura de Tecidos, em especial Camilla, Bárbara, 'Duda', Beatriz, Tayla, Ana Victória. Obrigada pelos almoços, momentos de descontração e superação das dificuldades do dia-a-dia acadêmico.

Aos meus pais, Josemar e Maria Célia; aos meus irmãos Naíra e Daniel pela força e incentivo para sempre continuar crescendo. Aos meus pequenos sobrinhos, João Lucas, Samuel e Heitor, por sempre alegrarem os meus dias.

E por último, não menos especial, ao meu noivo Ricardo por nunca desistir de mim e ser sempre a minha maior inspiração.

Muito obrigada!!

## SUMÁRIO

<b>ÍNDICE DE TABELAS</b> .....	i
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	ii
<b>RESUMO</b> .....	iii
<b>ABSTRACT</b> .....	iv
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>OBJETIVOS</b> .....	3
<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	4
1. Importância da floricultura e espécies de ‘bulbos’ utilizadas como flores .....	4
2. <i>Hippeastrum</i> sp. ....	5
3. Melhoramento genético de flores.....	6
4. Cultura de tecidos e propagação <i>in vitro</i> .....	7
5. Utilização da biotecnologia na floricultura .....	8
5.1. Embriogênese somática .....	8
5.2. Embriogênese gamética .....	9
<b>LITERATURA CITADA</b> .....	13
<b>CAPÍTULO 1. Caracterização de cultivares e armazenamento de grãos de pólen de cultivares de amarílis (<i>Hippeastrum</i> sp.)</b> .....	22
1. Resumo.....	22
2. Introdução .....	23
3. Material e Métodos.....	26
3.1 Características das flores e inflorescências das cultivares utilizadas na conservação dos grãos de pólen.....	26
3.2 Experimento de conservação da viabilidade de grãos de pólen armazenados em diferentes temperaturas.....	26
4. Resultados e Discussão.....	28
4.1 Características das flores e inflorescências das cultivares utilizadas na conservação dos grãos de pólen.....	28
4.2 Experimento de conservação da viabilidade de grãos de pólen armazenados em diferentes temperaturas.....	32
4.2.1 Efeitos da temperatura de armazenamento.....	34
4.2.2 Efeitos da interação entre a cultivar e a temperatura de armazenamento	34
5. Conclusões .....	37
6. Literatura Citada.....	37
<b>CAPÍTULO 2. Embriogênese gamética em cultivares de <i>Hippeastrum</i> sp.</b> .....	41
1. Resumo.....	41
2. Introdução .....	42
3. Material e Métodos.....	44
3.1 Cultura de anteras .....	45
3.2 Cultura de ovários .....	46
3.3 Ginogênese <i>in situ</i> utilizando pólenes tratados com diferentes doses de irradiação .....	48
3.3.1 Análises de citometria .....	49
3.3.2 Análises moleculares .....	49
3.3.3 Análises estatísticas.....	50
4. Resultados e Discussão.....	50
4.1 Cultura de anteras .....	50
4.2 Cultura de ovários .....	51
4.3 Ginogênese <i>in situ</i> utilizando pólenes tratados com diferentes doses de irradiação .....	52

4.3.1 Análises de citometria .....	58
4.3.2 Análises moleculares .....	59
5. Conclusões .....	59
6. Literatura Citada.....	60
<b>CAPÍTULO 3. Embriogênese somática em segmentos de pétalas de cultivares de</b>	
<b><i>Hippeastrum</i> sp.....</b>	<b>63</b>
1. Resumo.....	63
2. Introdução .....	64
3. Material e Métodos.....	67
4. Resultados e Discussão.....	69
5. Conclusões .....	74
6. Literatura Citada.....	74
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>78</b>

## ÍNDICE DE TABELAS

	Página
<b>Capítulo 1</b>	
Tabela 1. Características morfológicas de cultivares de amarílis ( <i>Hippeastrum</i> sp.) quanto ao florescimento.....	31
Tabela 2. Germinação <i>in vitro</i> de grãos de pólen (viabilidade) de diferentes cultivares de <i>Hippeastrum</i> sp., aos 0, 75 e 125 dias, em diferentes temperaturas de armazenamento.....	35
<b>Capítulo 2</b>	
Tabela 1. Germinação <i>in vitro</i> dos grãos de pólen da cultivar 'Pink Panther' em função das doses de irradiação.....	53
Tabela 2. Germinação de sementes, em porcentagem, nas cultivares 'Intokazie', 'Olaf' e 'Pink Panther' de acordo com as doses de irradiação.....	55
Tabela 3. Porcentagem de pegamento de frutos nas cultivares 'Intokazie', 'Olaf', 'Pink Panther' e de acordo com as doses de irradiação.....	56
Tabela 4. Número de sementes obtidas em função das doses de irradiação com as cultivares 'Intokazie', 'Olaf', 'Pink Panther' e em função das doses de irradiação.....	56
Tabela 5. Germinação das sementes das cultivares 'Intokazie', 'Olaf', 'Pink Panther' de acordo com cada tratamento.....	57
<b>Capítulo 3</b>	
Tabela 1. Porcentagem de segmentos de pétalas de amarílis induzidas a embriogênese somática em diferentes concentrações e combinações de 2,4-D e TDZ no meio de cultura.....	70
Tabela 2. Porcentagem de segmentos de pétalas de amarílis de diferentes cultivares induzidas a embriogênese somática em diferentes concentrações e combinações de 2,4-D e TDZ no meio de cultura.....	73



## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
<b>Capítulo 1</b>	
Figura 1. Características morfológicas das flores de cinco cultivares de <i>Hippeastrum</i> sp.....	29
Figura 2. Abertura das anteras na cultivar 'Bull'. <b>A:</b> Anteras ainda fechadas. <b>B:</b> Posição do pistilo em relação as anteras. <b>C:</b> Antera totalmente com 24 horas após antese.....	31
Figura 3. Análise de regressão para o período de armazenamento e germinação <i>in vitro</i> de grãos de pólen de diferentes cultivares de amarílis submetidas a diferentes temperaturas para preservação da viabilidade.....	33
<b>Capítulo 2</b>	
Figura 1. Micrósporos no estágio uninucleado de <i>Hippeastrum</i> sp. cultivar 'Olaf'.....	45
Figura 2. Segmento de anteras de <i>Hippeastrum</i> oxidado após 30 dias no escuro.....	50
Figura 3. Inoculação dos ovários de <i>Hippeastrum</i> sp. cultivar 'Olaf'. <b>A:</b> No momento da inoculação. <b>B:</b> Intumescimento dos ovários após 30 dias no escuro. <b>C:</b> Oxidação dos ovários após 30 dias na luz.....	51
Figura 4. Porcentagem de pegamento de frutos em <i>Hippeastrum</i> sp. cultivares 'Intokazie' e 'Orange Sovereign' em função das doses de irradiação.....	53
Figura 5. Número de sementes obtidas nas cultivares 'Intokazie' e 'Orange Sovereign' em função das doses de irradiação.....	53
Figura 6. Representação gráfica de haploidia de <i>Hippeastrum</i> em função da dose de irradiação utilizada. (R = repetição) .....	59
<b>Capítulo 3</b>	
Figura 1. Embriogênese somática a partir de segmentos de pétalas de <i>Hippeastrum</i> cv. Bin. <b>A:</b> segmentos verdes com 30 dias de cultivo no escuro. <b>B:</b> Embriões somáticos nos segmentos após 30 dias de exposição a luz. <b>C:</b> Germinação e desenvolvimento da plântula.....	71

## BIOLOGIA REPRODUTIVA, EMBRIOGÊNESE GAMÉTICA E SOMÁTICA EM CULTIVARES DE AMARÍLIS (*Hippeastrum* sp. Herb.)

**Autor:** NAIARA VALLADO DE ALMEIDA

**Orientador:** Prof. Dr. JEAN CARLOS CARDOSO

### RESUMO

O gênero *Hippeastrum* sp. é conhecido popularmente como amarílis e sua produção destina-se ao mercado de flores em vaso. Com uma grande variedade de híbridos, sua propagação é feita a partir de bulbos. Contudo, há grandes entraves fitossanitários na sua produção devido a esse tipo de propagação. Para tanto, os objetivos do presente trabalho foram: caracterizar e avaliar a viabilidade polínica de diferentes cultivares de amarílis; obter embriões haploides e/ou duplo-haploides através da embriogênese gamética, visando o melhoramento genético e desenvolver um protocolo de propagação *in vitro*, por meio de técnicas de embriogênese somática. Para a caracterização, foram avaliados o comprimento da inflorescência, o número de botões florais por inflorescência, o diâmetro de abertura floral e a coloração. A conservação da viabilidade polínica foi avaliada em diferentes temperaturas (-20, 8 e 25°C) por 245 dias. Na embriogênese gamética, foram utilizadas técnicas de cultura de anteras em cinco cultivares: 'Apple Blossom', 'Bull', 'Olaf', 'Super Star' e 'Tos'; na cultura de ovários, as cultivares foram: 'Intokazie', 'Olaf', 'Orange Sovereign' e 'Super Star'. Na ginogênese *in situ* foram testadas diferentes doses de irradiação (0, 40, 80, 120, 160 e 200 Grays) nas cultivares 'Intokazie', 'Olaf', 'Orange Sovereign' e 'Pink Panther'. Para a indução da embriogênese somática, foram utilizados segmentos de pétalas de cinco cultivares de amarílis e inoculados em meio de cultura MS ½ contendo diferentes combinações de 2,4-D e TDZ. A caracterização das cultivares mostrou diferença entre florescimento e principalmente em relação a coloração. A temperatura de -20°C foi que a melhor manteve a manutenção da viabilidade polínica das cultivares. Tanto para a cultura de anteras quanto para a cultura de ovários, não houve resposta do material para a formação de calos ou embriões. As plântulas obtidas foram avaliadas por meio da citometria de fluxo. Verificou-se que a doses de irradiação a 40 e 80 Grays foram as que apresentaram melhor indução de haploidia. A cultivar 'Bin' apresentou as maiores taxas de indução de calos (48%) na concentração 0,5 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D e 1,0 mg L<sup>-1</sup> de TDZ. As demais cultivares apresentaram melhores taxas de indução de embriões somáticos na concentração 0,5 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D e TDZ. Para todos os experimentos, o genótipo foi o fato de maior influência.

**Palavras-chave:** viabilidade polínica, pólen irradiado, segmento de pétalas.

## REPRODUCTIVE BIOLOGY, GAMETIC AND SOMATIC EMBRYOGENESIS IN CULTIVARS OF AMARYLLIS (*Hippeastrum* sp. Herb)

**Author:** NAIARA VALLADO DE ALMEIDA

**Adviser:** Prof. Dr. JEAN CARLOS CARDOSO

### ABSTRACT

The genus *Hippeastrum* sp. is popularly known as amaryllis and its production is intended for the market of potted flowers. With a wide variety of hybrids, its spread is made from bulbs. Nevertheless, there are major phytosanitary barriers to its production due to this type of propagation. Therefore, the objectives of the present work were: to characterize and evaluate the pollen viability of different cultivars of amaryllis; to obtain haploid and / or double-haploid embryos through gametic embryogenesis, aim at genetic improvement and developing an in vitro propagation protocol through somatic embryogenesis techniques. For the characterization, the length of the inflorescence, the number of flower buds per inflorescence, the floral opening diameter and the coloration were evaluated. The conservation of pollen viability was evaluated at different temperatures (-20, 8 and 25 ° C) for 245 days. In the gametic embryogenesis, anther culture techniques were used in five cultivars: 'Apple Blossom', 'Bull', 'Olaf', 'Super Star' and 'Cough'; in ovary culture, the cultivars were: 'Intokazie', 'Olaf', 'Orange Sovereign' and 'Super Star'. In the gynogenesis *in situ*, different irradiation doses (0, 40, 80, 120, 160 and 200 Grays) were tested in the cultivars 'Intokazie', 'Olaf', 'Orange Sovereign' and 'Pink Panther'. For the induction of somatic embryogenesis, petal segments of five cultivars of amaryllis and inoculated in MS ½ culture medium containing different combinations of 2,4-D and TDZ were used. The characterization of the cultivars showed difference between flowering and mainly in relation to coloration. The temperature of -20°C was that the best kept the pollen viability of the cultivars. For both anther culture and ovary culture, there was no response of the material to the formation of callus or embryo. The obtained seedlings were evaluated by means of flow cytometry. It was found that irradiation doses at 40 and 80 Grays were the ones that presented better induction of haploidy. The 'Bin' cultivar presented the highest induction rates (48%) in the concentration of 0.5 mg L<sup>-1</sup> of 2,4-D and 1,0 mg L<sup>-1</sup> of TDZ. The other cultivars had the best rates of induction of somatic embryos in the concentration of 0.5 mg L<sup>-1</sup> of 2,4-D and TDZ. For all experiments, the genotype was the most influential fact.

**Keywords:** pollen viability, irradiated pollen, petal segment.

## INTRODUÇÃO

A floricultura atualmente caracteriza-se por ser um dos mais dinâmicos e promissores segmentos do agronegócio, englobando diversos países produtores e consumidores, além de apresentar uma enorme variedade de produtos. No Brasil, a atividade se concentra na região Sudeste, e teve seu início com os imigrantes holandeses na década de 1950 (SEBRAE, 2014) e é dividido em diferentes segmentos: o mercado de flores de vaso, de flores de corte, de paisagismo e o de mudas de flores, folhas verdes e suculentas.

As chamadas flores de 'bulbos' são aquelas produzidas para diferentes finalidades, vaso, corte ou mesmo paisagismo, no qual o órgão propagativo utilizado é uma túbera com diferentes origens de formação, sendo uma delas o bulbo verdadeiro.

Dentre as flores de 'bulbos', destacam-se os gladiólos (*Gladiolus* sp.), as amarílis (*Hippeastrum* sp.), os lírios (*Lilium* sp.), dentre muitas outras espécies com essas características. A amarílis (gênero *Hippeastrum*, família Amarilidaceae) possui aproximadamente 40 espécies nativas do Brasil.

No entanto, a produção comercial para este exigente mercado é basicamente composta por seus híbridos, pois esses apresentam como vantagens maior uniformidade de produção e variedade de cores (MII, 2012). Sua principal forma comercial de progação é vegetativa, no entanto, a produção encontra alguns

entraves, como a presença de viroses que afetam negativamente na qualidade das flores (ALEXANDRE et al., 2011).

O desenvolvimento de novos materiais nacionais buscando atributos ornamentais diferenciados e com alta qualidade fitossanitária pode ser uma alternativa viável para reduzir esses entraves, e promover a competitividade destes materiais no mercado nacional e internacional, além de incentivar a independência tecnológica do país em relação a outros (VEIGA et al., 2003). Dessa forma, o desenvolvimento de programas nacionais de melhoramento genético visa também a autossuficiência da floricultura nacional em relação ao desenvolvimento de novas cultivares (CARDOSO, 2013).

Além das técnicas convencionais envolvendo cruzamentos entre genótipos superiores, seguido da seleção de híbridos de interesse, um dos principais métodos utilizados no melhoramento de diferentes espécies de flores (CARDOSO et al., 2013), é necessário também a utilização de ferramentas biotecnológicas em consorciação as técnicas convencionais, visando ampliar as tecnologias disponíveis e utilizadas no melhoramento, buscando a obtenção de diferentes características, tanto ornamentais como hortícolas, de forma a trazer melhorias à produção de flores.

Dentre essas tecnologias, pode-se citar a embriogênese gamética, que tem como principais objetivos a obtenção de plantas haploides e/ou duplo-haploides, que podem ser utilizadas no melhoramento genético como linhagens homozigotas visando à obtenção de híbridos (GERMANÁ, 2011), similar ao que ocorre com outras hortícolas que se utilizam da técnica de hibridação para o desenvolvimento de novas cultivares.

Outro problema associado ao plantio de flores de bulbos está na alta quantidade de viroses, associada e disseminada pela propagação vegetativa. Para tanto, compreender aspectos da biologia reprodutiva para o melhoramento genético e combiná-los com ferramentas da biotecnologia podem contribuir tanto para a obtenção de novas cultivares, bem como na obtenção de plantas elite livres de doenças, por meio de técnicas como a embriogênese somática (GAMBINO et al., 2007), a multiplicação em alta escala com a micropropagação *in vitro* (JUNG; MÜLLER, 2009). Portanto, são necessários novos estudos que combinem diferentes ferramentas da biotecnologia que auxiliem a cultura na obtenção dessas plantas elites.

## **OBJETIVOS**

Este trabalho teve como objetivo caracterizar diferentes cultivares de amarílis disponíveis no mercado, desenvolver protocolos de cultivo *in vitro* visando a obtenção de embriões somáticos como técnica de propagação clonal para eliminação de viroses, e obter embriões de origem gamética, visando o uso no melhoramento genético de amarílis.

### **Objetivos específicos**

- I) Avaliar a viabilidade polínica de diferentes cultivares de amarílis, bem como a melhor temperatura durante o armazenamento;
- II) Avaliar diferentes técnicas visando a embriogênese gamética em amarílis, a citar, a cultura de anteras, a partenogênese *in vitro* e a ginogênese *in situ*;
- III) Avaliar os efeitos da irradiação dos grãos de pólen, bem como de diferentes doses de irradiação, na obtenção de frutos, sementes e plântulas de amarílis;
- IV) Avaliar se a técnica de irradiação dos grãos de pólen pode ser uma ferramenta na obtenção de plantas homozigotas de amarílis;
- VI) Avaliar a utilização de segmentos provenientes de órgãos florais como potenciais para uso na embriogênese somática de amarílis.

## **REVISÃO DA LITERATURA**

### **1. Importância da floricultura e espécies de ‘bulbos’ utilizadas como flores**

A floricultura vem apresentando, ao longo dos últimos anos, um notável desenvolvimento, e já se consolidou como um dos mais promissores segmentos do agronegócio brasileiro e com desempenho percentual de indicadores posicionados acima da média obtida por outros setores da produção rural recente (JUNQUEIRA; PEETZ, 2018).

De acordo com o Instituto Brasileiro de Floricultura (IBRAFLOR, 2015), houve um crescimento de 9,0% e um faturamento de cerca de 7,3 bilhões de reais no ano de 2017; isto representa um aumento de 8% em relação ao ano anterior e está entre os 15 maiores produtores do mundo. A floricultura comercial praticada no Brasil é concentrada no Estado de São Paulo (48,9%), particularmente as regiões geográficas em torno dos municípios de Atibaia (Atibaia, Mogi das Cruzes, Suzano e outros) e Holambra (Holambra, Santo Antônio de Posse, Campinas e outros) (JUNQUEIRA, PEETZ; 2018).

Kiyuna et al. (2004) ressaltam que a variedade climática e de solos brasileira favorece o cultivo de inúmeras espécies de flores e plantas ornamentais, cujo potencial de produção beneficia a competitividade do país no mercado nacional e internacional. Países em condições parecidas com as do Brasil conquistaram seu

espaço no comércio internacional da floricultura, como Índia, Uganda, Costa Rica, Colômbia e Equador.

A atividade é dividida entre o cultivo de flores e folhagens para corte, flores e plantas verdes de vaso, e plantas ornamentais para o paisagismo. No Brasil, o segmento de flores e plantas envasadas é destacado principalmente pela produção de orquídeas, no entanto os produtores buscam frequentemente introduzir no mercado cada vez mais novidades em espécies e cultivares (SEBRAE, 2014).

Dentre as principais flores de corte comercializadas estão as rosas, crisântemos, astromélias, lírios e lisantos. Em relação às plantas em vasos, encontram-se as orquídeas, principalmente as do gênero *Phalenopsis*, kalanchoe, crisântemos e antúrios. Na produção de bulbosas ornamentais, o cultivo destina-se tanto para o consumo de corte, como para vasos e paisagismo e as espécies que se destacam são: o lírio (*Lilium* spp.), gladiolo (*Gladiolus* spp.), amarílis (*Hippeastrum* spp.), caladium (*Caladium* spp.) (TOMBOLATO et al., 2010; IBRAFLOR, 2015).

Neste contexto, vem aumentando a produção do cultivo de bulbos, tubérculos e rizomas focados para o mercado internacional, e estes correspondem a cerca de 60% dos produtos para exportação, evoluindo de US\$ 749 milhões em 1999 para US\$ 1,862 bilhão em 2013 (NEVES; PINTO, 2015). As importações nacionais são, em essência, centradas em produtos para a propagação vegetativa, pois tem por objetivo a reprodução e reexportação de matrizes, especialmente para empresas holandesas (SEBRAE, 2014).

## **2. *Hippeastrum* sp.**

A família Amaryllidaceae tem seu centro de origem na região sul da África e na América do Sul, e é amplamente distribuída em regiões tropicais e subtropicais (DAHLGRE; CLIFFORD, 1982); compreende cerca de 72 gêneros e 1.450 espécies (DUTILH et al., 2005). Possui gêneros de grande importância econômica, como o *Allium*, que integra o alho, a cebola, alho-poró, etc; além da importância alimentar, a família abrange plantas de interesse ornamental, tais como as do gênero *Hippeastrum*, objetivo deste estudo.

Comumente podemos encontrar o gênero *Amaryllis* citado como *Hippeastrum*, isso ocorre porque com o vasto número de espécies, as diferenças taxonômicas entre os dois gêneros não foram claramente delimitadas (DUTILH, 1986). Para Herbert (1821), *Amaryllis* é um gênero africano, portanto criou o gênero *Hippeastrum*



para referenciar espécies de origem americana. De acordo com Amaral (2007), o primeiro híbrido comercial foi obtido na Holanda em 1799, a partir de duas espécies brasileiras *Hippeastrum reginae* e *Hippeastrum vitattum*.

Popularmente conhecidas como açucena, flor-da-imperatriz ou amarílis, são plantas, normalmente alógamas, as quais são polinizadas por beija-flores ou insetos, tais como borboletas e mamangavas (DUTILH, 1996). Este gênero tem como características flores grandes e de coloração variada. Atualmente existem diversos híbridos disponíveis no mercado e sua comercialização destina-se para o mercado de flores em vasos (SILBERBUSH et al., 2003).

Pode ser propagado de quatro maneiras diferentes: sementes, brotações laterais, pela técnica denominada 'escamas duplas' (twin scales, inglês) e cultura de tecidos (KHARRAZI et al., 2017). As sementes são geralmente usadas para desenvolver novos materiais devido à grande variação nas características do tipo de planta e tempo de floração (ZHANG et al., 2013). A propagação por brotações laterais de híbridos é um processo lento, sazonal e variável e, geralmente, uma planta produz de 2-3 bulbos em um ano de crescimento (DOHARE, 1989).

Os híbridos podem ser propagados através da escamação dos bulbos ('escamas duplas') onde se separa as secções ainda ligadas a uma parte da placa basal e, posteriormente, colocados em substrato dando origem aos bulbinhos (EPHRATH et al., 2001). Essa técnica ainda é muito utilizada em países produtores de amarílis, entretanto há grande entraves fitossanitários, como o ataque de fungos que promovem a deterioração das escamas, além de problemas com as viroses do tipo mosaico, afetando o desenvolvimento das plantas e a qualidade dos bulbos (TOMBOLATO, 2001).

Como uma alternativa provável para a propagação e multiplicação rápida dos bulbilhos, o uso de ferramentas da biotecnologia para o melhoramento genético e produção se tornam cada vez mais viáveis. A biotecnologia é composta por um complexo conjunto de técnicas como processos enzimáticos, clonagem, transgenia, métodos de fecundação, cultura de tecidos, entre outros (CARVALHO et al., 2012).

### **3. Melhoramento genético de flores**

Ao longo dos anos, o melhoramento genético se concentrava apenas em culturas de interesse econômico alimentar, buscando alta produtividade; com os avanços da biotecnologia e a crescente demanda do mercado de flores, a indústria

passou a dar maior atenção aos atributos comerciais exigidos desse setor (NOMAN et al., 2017; PARISI; VIGANI, RODRÍGUEZ-CEREZO, 2015).

Com o crescente consumo da floricultura no mundo, a indústria de plantas ornamentais requer novas variedades de plantas com características florais aprimoradas, tais como cor floral, resistência à pragas e doenças (BIRKETT, PICKETT, 2014; VIEIRA et al., 2015; JIANG et al., 2016; BYRNE et al., 2018;), fragrância (SAXENA et al., 2007; DUDAREVA, PICHERSKY, 2008; ZVI et al., 2012; OLIVA et al., 2015;) e maior durabilidade pós-colheita (NOMAN et al., 2017). Esses atributos podem ser alcançados com o apoio do melhoramento e manipulação genética.

Para alcançar essas qualidades, a indústria buscou na biotecnologia ferramentas que pudessem produzir plantas com características genéticas inovadoras e que não são normalmente encontradas na natureza (NOMAN et al., 2017); isto porque com as técnicas tradicionais do melhoramento genético convencional podem levar cerca de 8 a 10 anos se para conseguir um novo cultivar comercial (AZADI et al., 2016).

Dentre essas ferramentas estão a transformação genética por meio de *Agrobacterium*, cultura de tecidos, engenharia genética (HOSSAIN et al., 2013). O uso de transformação genética por meio de *Agrobacterium* já foi descrito na literatura para diversos tipos de flores, como em rosa (FIROOZABADY et al., 1994), visando características na mudança de coloração (KATSUMOTO et al., 2007), tolerância ao frio (CHEN et al., 2014). Em crisântemo, foi utilizada para aumentar o tempo de prateleira (NARUMI et al., 2005), mudança de coloração (OHMIYA et al., 2006), resistência à salinidade (LI et al., 2015), dentre outras. Para o lírio, foi utilizada para indução de resistência ao *Cucumber mosaic virus* (CMV) (AZADI et al., 2011) e ao *Botrytis cinerea* (DE CÁCERES GONZÁLEZ et al., 2015). O emprego de técnicas da engenharia genética possibilitou a mudança de coloração em algumas espécies ornamentais como lírios (KAMIISHI et al., 2012), petúnia (TSUDA et al., 2004) e gérbera (LAITINEN et al., 2008).

#### **4. Cultura de tecidos e propagação *in vitro***

A cultura de tecidos baseia-se no cultivo de uma parte da planta, seja órgão, tecido ou células inseridas em um meio de cultivo com nutrientes apropriados e um

ambiente estéril, com condições controladas de temperatura, fotoperíodo, umidade e densidade de fluxo de fótons (FUZITANI; NOMURA, 2004).

As técnicas de cultura de tecidos vegetais são possíveis devido ao processo conhecido como totipotência celular. De acordo com Teixeira (1983), qualquer célula do organismo vegetal é capaz de dentro do seu núcleo, processar toda a informação genética para promover a regeneração de uma planta, e assim, dar origem a uma nova planta quando exposta as condições ideais. Esta técnica proporciona vários benefícios para a produção, como a geração de plantas saudáveis, livres de patógenos, o emprego em escala comercial e com espaço moderadamente limitado (SILVA et al., 2009).

Dentro das técnicas de cultura de tecidos vegetais, a micropropagação permite a partir de um único explante inicial se obter várias plantas em escala comercial, utilizando-se condições climáticas controladas. Tem como vantagens a redução do tempo e do espaço necessário para a produção de mudas, bem como a reprodução de um genótipo da planta matriz, normalmente, com fidelidade durante toda a multiplicação e, também, como uma alternativa de propagação vegetativa de espécies difíceis de serem propagadas por outras técnicas convencionais (ERIG; SCHUCH, 2005).

O primeiro relato de sucesso utilizando a micropropagação comercial foi feita por Morel em 1960 com a multiplicação de orquídeas, utilizando o ápice caulinar como explante. Desde então, vem sendo realizada com outras culturas agrícolas, como no caso da batata (SALEM; HASSANEIN, 2017) e da cana-de-açúcar (LEE, 1987), de espécies frutíferas como banana (KAÇAR; FABER, 2012) e abacaxi (SONEJI; RAO; MHATRE, 2002); e de ampla aplicação em espécies ornamentais, como gérberas (CARDOSO, SILVA; 2013), orquídeas (YAM; ARDITTI, 2018), antúrios (THOKCHOM et al., 2017), entre outras de importância comercial.

## **5. Utilização da biotecnologia na floricultura**

### *5.1. Embriogênese somática*

Existem diferentes técnicas de micropropagação, como a embriogênese somática, a qual é uma via de formação de embriões que ocorre a partir de células somáticas, e pode ser de forma direta, sem o desenvolvimento de calos, ou indireta, com a formação dos calos, sendo necessário um determinado tempo para a diferenciação (MANTELL et al., 1994).

A embriogênese somática é considerada uma forma de grande potencial para a multiplicação clonal (ROUT; MOHAPATRA; JAIN, 2006) e pode ser descrita como crescimento de estruturas similares a embriões formados a partir de tecidos somáticos e desenvolvidos em uma planta inteira, ou seja, é a capacidade de uma célula somática se desdiferenciar e reprogramar o seu material genético para se tornar uma nova planta (GERMANA; LAMBARDI, 2016).

Com condições controladas, os embriões somáticos germinam de forma similar a planta matriz e apresentam diversas vantagens sobre a micropropagação convencional, pois permite um grande número de embriões capazes de serem regenerados, concomitante com crescimento de raízes e brotos, eliminando a fase de indução de sistema radicular e, encurtando o tempo de desenvolvimento (BHATIA, 2015).

Do ponto de vista das limitações, os embriões somáticos tendem a não estarem todos no mesmo estágio de desenvolvimento; outro fator limitante é o período de tempo em que as células entram ou completam a embriogênese, diminuindo com o tempo a regeneração. Tais fatores limitantes da regeneração tendem a favorecer mutações (BHATIA, 2015).

Em plantas ornamentais, existem diversos relatos de sucesso tais como em crisântemo (*Chrysanthemum* cv. Marigold) (GHOSH et al., 2018), cíclame (*Cyclamen persicum*) (TAGIPUR et al., 2016), rosa (*Rosa hybrid*) (SILVA et al., 2016), begônia (*Begonia gracilis*) (KAVIANI et al., 2015).

Outra rota da embriogênese bastante estudada é a embriogênese gamética, que consiste na capacidade dos gametófitos, sejam eles masculinos (androgênese) ou femininos (ginogênese), mudarem sua via gametofítica para uma via de desenvolvimento esporofítica, resultando em plantas haploides (MORRISON; EVANS, 1987).

## 5.2. Embriogênese gamética

A embriogênese gamética quando comparada a outras formas de se obter linhagens homozigóticas, se torna muito vantajosa já que permite produzir tais linhagens em um espaço de tempo reduzido e permitindo o desenvolvimento em uma única etapa de linhas completamente homozigóticas oriunda de progênies originalmente heterozigótica, sendo de grande valor em especial para espécies com endogamia intensificada (GERMANÀ, 2011).

Diferentemente, a ginogênese é uma técnica que utiliza óvulos, ovários ou botões florais não polinizados como fonte de explante, para a indução de plantas haploides. Apesar de sua baixa eficiência, ainda é muito utilizada em determinadas culturas de interesse agrônômico e que não respondem de forma efetiva a outros métodos (FORSTER et al., 2007), como cebola (BOHANEK et al., 2003) e abobrinha (SHALABY, 2007).

Outro método que se utiliza de gametas femininos é a partenogênese, a qual para sua obtenção, não necessita da fertilização dos óvulos ou após a fertilização, os cromossomos de origem paterna são eliminados (ZIMMERMAN, 1993). Na ginogênese, esse processo indutivo é normalmente realizado pela polinização dos pistilos com grãos de pólen de espécies distantes (BERZONSKY et al., 2003), grãos de pólen irradiados (NITSCH; NITSCH, 1969) ou utilizando uma linhagem indutora de haploides (SILVA et al., 2009).

A microesporogênese, também chamada de androgênese, de acordo com Reynolds (1997) é considerada um dos exemplos mais importantes de totipotência celular, pois indivíduos completos podem ser obtidos de um único micrósporo (origem unicelular). Muitas vezes utilizada para a produção de haploides e duplo haploides devido a sua simplicidade de execução, além do uso em larga escala em uma maior gama de espécies e genótipos (SOPORY; MUNSHI, 1996).

O primeiro relato de obtenção de embriões a partir de micrósporos ocorreu quando Guha e Maheshwari (1964) inocularam anteras da espécie *Datura innoxia* em meio de cultura, verificaram que alguns dos micrósporos sofreram, de forma sucessiva, divisões mitóticas e tornaram-se multicelulares. Observaram ainda, que houve a ruptura da camada externa do grão de pólen, e a liberação de massa celular, gerando o que chamaram de embrióide. Uma análise citológica foi realizada e constatou-se o número haploide de cromossomos ( $n=12$ ) nesse embrióide. A esse processo atribui-se o nome de “embriogênese do pólen”, “androgênese” ou “embriogênese haploide” (RAGHAVAN, 1987).

As divisões sofridas pelo grão de pólen podem seguir por dois caminhos diferentes: a formação do embrião do tipo globular, o qual passará pelas fases normais da embriogênese pós-globular ou, se proliferar formando um calo, o qual mais tardiamente irá se diferenciar em novas plântulas, via organogênese ou embriogênese (BHOJWANI; RAZDAN, 1983).

Apesar das rotas de divisão assimétrica terem sido descritas, existem relatos que comprovam a divisão simétrica; os primeiros estudos comprovaram dentro uma amostra de grãos de pólen de uma antera, que um pequeno número possuía dois núcleos idênticos, resultado da divisão simétrica, possivelmente embriogênico (NORREEL, 1970). Desde então, tem se observado a relação entre a divisão simétrica e o desenvolvimento de embriões haploides, sugerindo que estas divisões seriam um sinal para as células reativarem o programa esporofítico (GRANDO; MORAES-FERNANDES, 1997).

A regeneração dos gametas masculinos já foi relatada anteriormente em mais de 200 espécies pertencentes as famílias Cruciferae, Gramineae, Solanaceae, (DUNWELL 1986; HU; YANG, 1986). Ainda assim, existem diversos fatores internos e externos que podem influenciar na resposta embriogênica na cultura de anteras, dentre eles: efeito do genótipo, a fisiologia e as condições de crescimento das plantas matrizes, o estágio de desenvolvimento dos micrósporos, o pré-tratamento das flores ou anteras, bem como o meio e as condições de cultura *in vitro* (GERMANÀ, 2010).

O genótipo tem um papel fundamental na embriogênese dos micrósporos, isto porque diferentes cultivares de uma única espécie podem apresentar respostas variadas; Cardoso et al. (2012) mostraram esse comportamento em *Citrus*, no qual foi possível a obtenção de calos homozigotos, somente no genótipo contendo genes de *Citrus clementina*.

De acordo com Heberle-Bors (1985), a formação dos micrósporos passíveis de sofrerem embriogênese, é uma característica resultante da interação entre genes nucleares e citoplasmáticos, modificados pelo meio ambiente; e Dunwell (2010), afirmou que a porcentagem de anteras capazes de produzir embriões de micrósporos e o número de embriões regenerados por antera, são determinados de forma independentes.

A fisiologia da planta matriz pode afetar o sucesso da técnica, alguns dos efeitos negativos podem ser reflexo dos níveis de hormônios, estado nutricional, variações sazonais, fotoperíodo e intensidade de luz em que se encontram (SUNDERLAND et al., 1980).

Alguns tipos de pré-tratamento utilizados podem favorecer a indução da via esporofítica, impedindo o desenvolvimento do micrósporo fértil. Esses tratamentos podem ser com altas temperaturas, alta umidade, estresse hídrico, condições

anaeróbicas, efeito do pH, entre outros. O tratamento descrito como mais eficaz para a indução da embriogênese a partir de micrósporos, é o choque de temperatura, sendo sua escala e duração de exposição variáveis entre genótipos (GERMANÀ, 2011).

O estágio de desenvolvimento do micrósporo e a sua viabilidade embriogênica varia de acordo com as espécies, porém normalmente o período próximo a primeira mitose é o mais sensível e responsivo aos tratamentos; esse período se encontra entre o micrósporo vacuolado e o pólen precoce (TOURAEV et al., 2001), isto porque este momento é o de transição entre a fase ainda proliferativa e a não totalmente diferenciada (MALIK et al., 2007). Após o início da formação de reservas de armazenamento, como o amido, eles geralmente perdem a capacidade embriogênica (HEBERLE-BORS, 1989; RAGHAVAN, 1990).

Apesar de relatos anteriores do uso das técnicas descritas em outras culturas, em amarílis o uso de ferramentas da biotecnologia teve seu início com Bell (1972), o qual cultivou embriões imaturos de híbridos. A partir deste ponto, várias partes da planta de *Hippeastrum* foram testadas como explantes, a exemplo MII et al. (1974) que retiraram tecidos das escamas dos bulbos e conseguiram o desenvolvimento de raízes, cultivados em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com diferentes concentrações de ácido naftaleno acético (ANA) e cinetina (KIN).

O desenvolvimento de um protocolo utilizando segmentos de escamas e da região basal e raízes foi elaborado por Castro e Matthes (1987), em meio MS suplementado com ANA e 6-benzilaminopurina (BAP). Os segmentos de raízes utilizados foram descartados, uma vez que os autores constataram altas taxas de contaminação; já os explantes da região basal e as escamas se mostraram mais adequados à micropropagação. Em 1992, De Bruyn e colaboradores, a partir de *Amaryllis beladonna*, desenvolveram uma técnica de propagação *in vitro* intitulada de “escamas gêmeas”, no qual a obtenção do explante é a partir do corte do bulbo e a aplicação de ANA e BAP.

## LITERATURA CITADA

ALEXANDRE, M. A. V. et al. Hippeastrum mosaic virus diagnosed in *Hippeastrum* and *Eucharis* in Brazil. **Journal of Plant Pathology**, p. 643 - 649, 2011.

AMARAL, L. et al. Conservação *in vitro* de germoplasma indexado de três cultivares de amarílis (*Hippeastrum* Herb.). **Ornamental Horticulture**, v. 13, n. 2, p. 113 – 120, 2007.

AZADI, P. et al. Current status and biotechnological advances in genetic engineering of ornamental plants. **Biotechnology advances**, v. 34, n. 6, p. 1073 - 1090, 2016.

AZADI, Pejman et al. Increased resistance to *cucumber mosaic virus* (CMV) in *Lilium* transformed with a defective CMV replicase gene. **Biotechnology Letters**, v. 33, n. 6, p. 1249 - 1255, 2011.

BAH, A. A. et al. *In vitro* plant regeneration from unpollinated ovaries of *Allium chinense*. **Scientia Horticulturae**, v. 147, p. 105 - 110, 2012.

BERZONSKY, W.A. et al. The effects of parthenogenesis on wheat embryo formation and haploid production with and without maize pollination. **Euphytica**, v. 113, p. 285-290, 2003.

BHATIA, S.; BERA, T. Somatic Embryogenesis and Organogenesis. In **Modern Applications of Plants Biotechnology in Pharmaceutical Sciences**. Academic Press, 2015. p. 209 – 230.

BHOJWANI, S.S.; RAZDAN, M.K. **Plant tissue culture: theory and practice**. 1 ed. Elsevier Science, 1996. 766 p.



BIRKETT, M., PICKETT, J. Prospects of genetic engineering for robust insect resistance. **Current Opinion. Plant Biology**, v. 19, p. 59 - 67, 2014.

BOHANEK, B. Doubled Haploids via Gynogenesis. In: TOURAEV, A.; FORSTER, B.P.; JAIN, S.M. (eds). **Advances in Haploid Production in Higher Plants**. Dordrecht: Springer, 2009. p. 35-46.

BOHANEK, B. JAKSE, M., HARVEY, M.J. Genetic analyses of gynogenetic haploid production in onion. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 128, n. 4, p. 571 - 574, 2003.

BYAMUKAMA, R. et al. Anthocyanins from flowers of *Hippeastrum* cultivars. **Scientia horticultrae**, v. 109, n. 3, p. 262 - 266, 2006.

BYRNE, D. H. et al. Challenges of breeding rose rosette-resistant roses. **Horticultural Science**, v. 53, n. 5, p. 604-608, 2018.

CARDOSO, J. C. **Cultura de anteras e partenogênese *in situ* e *in vitro* de genótipos de laranja doce (*Citrus sinensis* Osbeck.)**. 2012. 135 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Ciências - Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

CARDOSO, J.C.; SILVA, J.A.T. Gerbera micropropagation. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 8, p. 1344 - 1357, 2013.

CARVALHO, J. M. F. C.; SILVA, M. M. de A. Plantas matrizes na propagação vegetativa. **Embrapa Algodão – Documentos (INFOTECA-E)**, 2012. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/928494>>. Acesso em abril de 2019.

CASTRO, C.E.F.; MATTHES, L.A.F. Propagação vegetativa *in vitro* de *Hippeastrum* spp I. Fontes de explantes e esterilização eficientes. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 6., Campinas, 1987. **Anais...** Campinas: SBFPO, 1987. p 128 - 139.

CHEN, L. J. et al. An overview of cold resistance in plants. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 200, n. 4, p. 237 - 245, 2014.

DA SILVA, J. A. T. et al. *Dendrobium* micropropagation: a review. **Plant Cell Reports**, v.34, n. 5, p. 671 - 704, 2015.

DA SILVA, J. A. T. Ornamental chrysanthemums: improvement by biotechnology. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 79, n. 1, p. 1 - 18, 2004.

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

DE BRUYN, M. H. et al. *In vitro* propagation of *Amaryllis belladonna*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 31, n. 3, p. 179 - 184, 1992.

DE CÁCERES GONZÁLEZ, F. F. N. et al. Conferred resistance to *Botrytis cinerea* in *Lilium* by overexpression of the RCH10 chitinase gene. **Plant cell reports**, v. 34, n. 7, p. 1201 - 1209, 2015.

DOHARE, S.R., *Amaryllis* and *Hippeastrum*. In: BOSE, T. K.; MAITI, R.G.; DHVA, R. S. (eds.). **Commercial Flowers**. Calcutta: Naya prokash, 1989, pp. 573-593.

DUDAREVA, N., PICHERSKY, E. Metabolic engineering of plant volatiles. **Current Opinion Biotechnology**, v. 19, p. 181 - 189, 2008.

DUNWELL, J. M. Haploids in flowering plants: origins and exploitation. **Plant Biotechnology Journal**, v. 8, n. 4, p.377 - 424, 2010.

DUNWELL, J. M. Pollen, ovule and embryo culture, as tools in plant breeding. **Plant tissue culture and its agricultural applications**, p. 375-404, 1986.

DUTILH, J. H. A. **Biossistema tica de quatro espécies de *Hippeastrum* Herb. (*Amaryllidaceae*)**. 1996. 153 f. Tese. Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996.

DUTILH, J.H.A. (coord.). *Lilliaceae* s.l. 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: 237-260. 2005. Parte integrante da *Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo*, vol. 4. ISBN 85-7523-055-7 (online).

EPHRATH, J. E. et al. Various cutting methods for the propagation of *hippeastrum* bulbs. **Biotronics**, v. 30, p. 75 - 83, 2001.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural. **Ciência Rural**, v. 35, n. 4, p. 961 - 965, 2005.

ESILVA, F.A.S.; AZEVEDO, C.A.V. A new version of the assistant-statistical assistance software. **Computers in Agriculture and Natural Resources**, 23-25 July 2006, Orlando Florida. American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2006. p. 393.

FAVA, F. L. C.; CAMILI, C. E., Produção de cultivares de *Anthurium andraeanum* nas condições de Acorizal - MT. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 20, n. 2, p 179 - 184, 2014.

FERRIE, A. M. R.; CASWELL, K. L. Isolated microspore culture techniques and recent progress for haploid and doubled haploid plant production. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 104, n. 3, p. 301 - 309, 2011.

FIROOZABADY, Ebrahim et al. Regeneration of transgenic rose (*Rosa hybrida*) plants from embryogenic tissue. **Biotechnology**, v. 12, n. 6, p. 609 - 613, 1994.

- FORSTER, B. P. et al. The resurgence of haploids in higher plants. **Trends in Plant Science**, v.12, n.8, p.368 - 375, 2007.
- FUZITANI, E. J.; NOMURA, E. S. Produção de mudas in vitro. **Ornamental Horticulture**, v. 10, n. 1/2, p. 15 - 19, 2004.
- FUZITANI, E. J.; NOMURA, E. S. Produção de mudas *in vitro*. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 10, n. 1/2, p. 15 - 19, 2004.
- GAMBINO, G. et al. Somatic embryogenesis from whole flowers, anthers and ovaries of grapevine (*Vitis* spp.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 90, n. 1, p. 79-83, 2007.
- GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G.J. Micropropagation: uses and methods. **Plant Propagation by Tissue Culture**. p. 29 - 64, 2008.
- GERMANÀ, M. A. Anther culture for haploid and doubled haploid production. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 104, n. 3, p. 283 - 300, 2011.
- GERMANA, M. A.; LAMBARDI, M. **In vitro embryogenesis in higher plants**. ed Humana Press, 2016, 558 p.
- GHOSH, S. et al. Studies on somatic embryogenesis in *Chrysanthemum* cv. marigold using root and leaf as explants. **Internacional Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 7, n. 8, p. 3965 - 3971, 2018.
- GRANDO, M.F.; MORAES-FERNANDES, M.I. Two point deterministic model of acquisition of in vitro pollen grain androgenetic capacity based on wheat studies. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 20, n. 3, p. 467 - 476, 1997.
- GUHA, S.; MAHESHWARI, S. C. *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura*. **Nature**, v. 204, n. 4957, p. 497 - 497, 1964.
- HAN, D. S.; NIIMI, Y.; NAKANO, M. Formation of calli from isolated microspore cultures of Asiatic hybrid lily 'Connecticut King'. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, v. 69, n. 1, p. 52 - 56, 2000.
- HEBERLE-BORS, E. *In vitro* haploid formation from pollen: a critical review. **Theoretical and applied genetics**, v. 71, n. 3, p. 361 - 374, 1985.
- HEBERLE-BORS, E. Isolated pollen culture in tobacco: plant reproductive development in a nutshell. **Sexual Plant Reproduction**, v. 2, n. 1, p. 1 - 10, 1989.
- HEBERLE-BORS, E. In vitro haploid formation from pollen: a critical review. **Theoretical and applied genetics**, v. 71, n. 3, p. 361 - 374, 1985.
- HERBERT, W.H. *Hippeastrum* stylosum: Long-styled Knight's-star Lily. *Botanical Magazine*. v. 49, 1821.
- HOSSAIN, M. M. et al. The application of biotechnology to orchids. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 32, n. 2, p. 69-139, 2013.

- HU, H.; HONGYUAN, Y. **Haploids of higher plants in vitro**. Springer-Verlag, 1986.
- JIANG, P. et al. Identification and mutagenesis of disease susceptibility genes of *Petunia hybrida*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 126, n. 1, p. 117 - 125, 2016.
- KIYUNA, I. et al. Floricultura brasileira no início do século XXI: o perfil do produtor. **Informações econômicas**, v. 34, n. 4, p. 14 - 31, 2004.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE FLORICULTURA**. Boletim IBRAFLO 06.2016. Holambra, 2016.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE FLORICULTURA**. Padrão Ibraflor de qualidade. Holambra, 2015
- JINPING, F. A. N. et al. Preliminary study on anther *in vitro* culture of lily "Prato". **Journal of Northeast Agricultural University (English Edition)**, v. 18, n. 1, p. 6 - 11, 2011.
- JUNG, C.; MÜLLER, A. E. Flowering time control and applications in plant breeding. **Trends in Plant Science**, v. 14, n. 10, p. 563 - 573, 2009.
- 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.
- JUNQUEIRA, A.H.; PEETZ, M. S. **Exportações de flores e plantas ornamentais superam US\$ 35 milhões em 2007**: recorde e novos desafios para o Brasil - Análise conjuntural da evolução das exportações de flores e plantas ornamentais do Brasil no período de janeiro a dezembro de 2007. São Paulo, p. 1 – 8, 2008.
- JUNQUEIRA, A.H.; PEETZ, M.S. Mercado interno para os produtos da floricultura brasileira: características, tendências e importância socioeconômica recente. **Ornamental Horticulture**, v. 14, n. 1, p. 37 - 52, 2014.
- KAÇAR, Y.; FABER, B. Micropropagation of banana. **Plant Cell Culture Protocols**, v. 877, p. 143 - 151, 2012.
- KAMIISHI, Y. et al. Flower color alteration in the liliaceous ornamental *Tricyrtis* sp. by RNA interference-mediated suppression of the chalcone synthase gene. **Molecular breeding**, v. 30, n. 2, p. 671 - 680, 2012.
- KATSUMOTO, Y. et al. Engineering of the rose flavonoid biosynthetic pathway successfully generated blue-hued flowers accumulating delphinidin. **Plant and Cell Physiology**, v. 48, n. 11, p. 1589 - 1600, 2007.
- KAVIANI, Behzad et al. Micropropagation of *Begonia rex* Putz. by 6-benzyladenine and  $\alpha$ -naphthalene acetic acid. **International Journal of Biosciences (IJB)**, v. 6, n. 5, p. 8-15, 2015.

KHARRAZI, M. et al. Vegetative Propagation of Amaryllis (*Hippeastrum* × *johnsonii*) by Different Cutting Methods. **Horticultural Science and Technology**, v. 35, n. 3, p. 373 - 380, 2017.

KIYUNA, I. et al. Floricultura brasileira no início do século XXI: o perfil do produtor. **Informações econômicas**, v. 34, n. 4, p. 14-31, 2004.

LAITINEN, R. A.E. et al. Identification of target genes for a MYB-type anthocyanin regulator in *Gerbera hybrida*. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, n. 13, p. 3691 - 3703, 2008.

LEE, T. S. G. Micropropagation of sugar cane (*Saccharum* spp.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 10, n. 1, p. 47 - 55, 1987.

LI, P. et al. Chrysanthemum WRKY gene CmWRKY17 negatively regulates salt stress tolerance in transgenic chrysanthemum and Arabidopsis plants. **Plant cell reports**, v. 34, n. 8, p. 1365 - 1378, 2015.

MACHADO, M.A. et al. Genetic relationship of Mediterranean mandarins (*Citrus deliciosa* Tenore) using RAPD markers. **Euphytica**, v. 92, p. 321 - 326, 1996.

MALIK, M.R. et al. Transcript profiling and identification of molecular markers for early microspore embryogenesis in *Brassica napus*. **Plant Physiology**, v. 144, n. 1, p. 134 - 154, 2007.

MANTELL, S. H.; MATTHEWS, J. A.; MCKEE, R. A. **Princípios de biotecnologia em plantas: uma introdução à engenharia genética em plantas**. Sociedade Brasileira de Genética, 1994. 344p.

MAY, R. A.; TRIGIANO, R. N. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaves of *Dendranthema grandiflora*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 116, n. 2, p. 366 - 371, 1991.

MII, M.; MORI, T.; WASE, N. Organ formation from the excised bulb scales of *Hippeastrum hybridum in vitro*. **Journal of Horticultural Science**, v. 49, n. 3, p. 241 - 244, 1974.

MORRISON, R. A.; EVANS, D. A. Gametoclonal variation. **Plant Breeding Reviews**, v.5, p. 359 - 391, 1987.

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

NARUMI, T. et al. Transformation of chrysanthemum with mutated ethylene receptor genes: mDG-ERS1 transgenes conferring reduced ethylene sensitivity and characterization of the transformants. **Postharvest Biology And Technology**, v. 37, n. 2, p. 101-110, 2005.

NEVES, M. F.; PINTO, M. J. A. Mapeamento e quantificação da cadeia de flores e plantas ornamentais do Brasil. **São Paulo: OCESP**, 2015.

- NITSCH, J. P.; NITSCH, C. Haploid plants from pollen grains. **Science**, v. 163, p. 85 - 87, 1969.
- NOMAN, A. et al. Biotechnological advancements for improving floral attributes in ornamental plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. 530, p. 1 - 15, 2017.
- NORREEL, B. Étude citologique de l'androgenese experimentale chez *Nicotiniana tabacum* e *Datura innoxia*. **Bulletin de la Société Botanique de France**, v. 177, p. 461 - 478, 1970.
- OHMIYA, A. et al. Carotenoid cleavage dioxygenase (CmCCD4a) contributes to white color formation in chrysanthemum petals. **Plant Physiology**, v. 142, n. 3, p. 1193 - 1201, 2006.
- OLIVA, M. et al. Phenylpyruvate contributes to the synthesis of fragrant benzenoid–phenylpropanoids in *Petunia x hybrida* flowers. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. 769, p. 1 – 13, 2017.
- PARISI, C.; VIGANI, M.; RODRÍGUEZ-CEREZO, E. Agricultural nanotechnologies: what are the current possibilities? **Nano Today**, v. 10, n. 2, p. 124-127, 2015.
- PIERIK, R. L. M.; STEEGMANS, H. H. M.; VAN DER MEYS, J. A. J. Plantlet formation in callus tissues of *Anthurium andraeanum* Lind. **Scientia Horticulturae**, v. 2, n. 2, p. 193 - 198, 1974.
- RAGHAVAN, V. Developmental strategies of the angiosperm pollen: a biochemical perspective. **Cell differentiation**, v. 21, n. 4, p. 213 - 226, 1987.
- RAGHAVAN, V. From microspore to embryoid: faces of the angiosperm pollen grain. **Progress in Plant Cellular and Molecular Biology**. p. 213 - 221, 1990.
- REYNOLDS, T. L. Pollen embryogenesis. **Plant Molecular Biology**, v.33, n.1, p.1-10,1997.
- ROUT, G.R.; MOHAPATRA, A.; JAIN, S. M. Tissue culture of ornamental pot plant: A critical review on present scenario and future prospects. **Biotechnology Advances**, v. 24, n. 6, p.531 - 560, 2006.
- SALEM, J.; HASSANEIN, A. M. In vitro propagation, microtuberization, and molecular characterization of three potato cultivars. **Biologia Plantarum**, v. 61; n. 3, p. 427 - 437, 2017.
- SAXENA, G. et al. Rose-scented geranium (*Pelargonium* sp.) generated by *Agrobacterium rhizogenes* mediated Ri-insertion for improved essential oil quality. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 90, p. 215 - 223, 2007.
- SEABROOK, J.E.A.; CUMMING, B. G. The in vitro propagation of *Amaryllis* (*Hippeastrum* sp. hybrids). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 13, n. 12, p. 831 - 836, 1977.

SEGUÍ-SIMARRO, J. M.; NUEZ, F. Pathways to doubled haploidy: chromosome doubling during androgenesis. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 120, n. 3 - 4, p. 358- 369, 2008.

SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS - SEBRAE. **Flores e plantas ornamentais do Brasil**: volume 1 - O mercado brasileiro de flores e plantas ornamentais. 2015, 44 p.

SHALABY, T. A. Factors affecting haploid induction through *in vitro* gynogenesis in summer squash (*Cucurbita pepo* L.). **Scientia Horticulturae**, v. 115, n. 1, p. 1 - 6, 2007.

SILBERBUSH, M. et al. Nitrogen and potassium fertilization interactions with carbon dioxide enrichment in *Hippeastrum* bulb growth. **Scientia horticulturae**, v. 98, n. 1, p. 85 - 90, 2003.

SILVA, G. J. S. et al. Produção de haplóides androgenéticos em milho. **Embrapa Milho e Sorgo-Documentos (INFOTECA-E)**, 2009.

SILVA, J. P. et al. Efeito da citocinina 6-benzilaminopurina (bap) sobre o estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de *Rosa* sp. **Revista Agroecossistemas**, v. 9, n. 2, p. 370 - 380, 2018.

SONEJI, J.; RAO, P.; MHATRE, M. Germination of synthetic seeds of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.). **Plant Cell Reports**, v. 20, n. 10, p. 891 - 894, 2002.

SOPORY, Sudhir K.; MUNSHI, Meenakshi. Anther culture. In: **In vitro haploid production in higher plants**. Springer, Dordrecht, 1996. p. 145-176.

SUNDERLAND, N. Anther and pollen culture. Proceedings of the Fourth John Innes Symposium. The Plant Genome and Second International Haploid Conference (Book). **Plant, Cell & Environment**, v. 4, n. 6, p. 413-413, 1981.

SUNDERLAND, N.; DUNWELL, J. M. Pathways in pollen embryogenesis. **Tissue Culture and Plant Science**, p. 141 - 167, 1974.

TAGIPUR, E. M. et al. Somatic embryogenesis, cryopreservation, and *in vitro* mutagenesis in Cyclamen. In: TAGIPUR, E. M.; SEKER, G.; SILVA, J. A. T.; MENDI, Y. Y. **Somatic Embryogenesis in Ornamentals and Its Applications**. New Delhi: Springer, 2016. p. 155 - 167.

TANAKA, K. et al. Somatic embryogenesis and plant regeneration in chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitamura). **Plant Cell Reports**, v. 19, n. 10, p. 946 - 953, 2000.

TEIXEIRA, S.L. Técnicas de culturas de tecidos aplicáveis às espécies florestais. In: SIMPÓSIO UFRO FLORESTAS PLANTADAS NOS NEOTRÓPICOS COMO FONTE DE ENERGIA, Viçosa, **Anais...** Viçosa, 1983. p. 69 - 78.

THOKCHOM, R. et al. Micropropagation of *Anthurium andreaeanum* cv. Jewel from leaf explants. **Journal of Crop and Weed**, v. 13, n. 1, p. 23 - 27, 2017.

TOMBOLATO, A. F. C. Melhoramento genético de plantas exóticas no Brasil. **Biológico**, v.63, p. 49 - 50, 2001.

TOMBOLATO, A. F.C.; COSTA, A.M. M.; EGLIT, A. C. Micropropagação de *Hippeastrum hybridum* 'Apple blossom', mediante escamas duplas. **Ornamental Horticulture**, v. 7, n. 1, p. 35 - 40, 2010.

TOMBOLATO, A. F. C. et al. Bulbosas ornamentais no Brasil. **Ornamental Horticulture**, v. 16, n. 2, p. 127 – 138, 2010.

TOURAEV, A.; PFOSSER, M.; HEBERLE-BORS, E. The microspore: a haploid multipurpose cell. **Advances in Botanical Research**, v. 35, p. 53 - 109, 2001.

TSUDA, S. et al. Flower color modification of *Petunia hybrida* commercial varieties by metabolic engineering. **Plant Biotechnology**, v. 21, n. 5, p. 377 - 386, 2004.

VEIGA, R.F.A. et al. Intercâmbio de germoplasma vegetal. **O Agrônomo**, v. 55, n. 1, p.18 - 19, 2003.

VIEIRA, P. et al. Expression of a cystatin transgene can confer resistance to root lesion nematodes in *Lilium longiflorum* cv. 'Nellie White'. **Transgenic research**, v. 24, n. 3, p. 421-432, 2015.

YAM, T. W.; ARDITTI, J. Orchid Micropropagation: An Overview of Approaches and Methodologies. In: LEE, Y.; YEUNG, E. T. (eds). **Orchid Propagation: From Laboratories to Greenhouses—Methods and Protocols**. Humana Press, New York, NY, 2018. p. 151-178.

ZHANG, W. et al. Effects of temperature, plant growth regulators and substrates and changes in carbohydrate content during bulblet formation by twin scale propagation in *Hippeastrum vittatum* 'Red lion'. **Scientia Horticulturae**, v. 160, p. 230-237, 2013.

ZIMMERMAN, J.L. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. **Plant Cell**, v. 5, p. 1411 - 1423, 1993.

ZVI, M.M.B. et al. Transcription factor enhances production of phenylpropanoid and terpenoid scent compounds in rose flowers. **New Phytologist**, v. 195, p. 335 - 345, 2012.



## **CAPÍTULO 1. Caracterização de cultivares e armazenamento de grãos de pólen de cultivares de amarílis (*Hippeastrum* sp.)**

### **1. Resumo**

A floricultura representa um setor de alto valor agregado com a busca por novidades comerciais, como novas colorações de flores obtidas pelo melhoramento genético. A determinação da viabilidade polínica e a conservação de grãos de pólen são ferramentas úteis para trabalhos de melhoramento genético, em especial, quando a sincronização do florescimento não ocorre de forma natural entre plantas que se deseja realizar o cruzamento. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi caracterizar morfológicamente a floração e avaliar a conservação e manutenção da viabilidade de grãos de pólen em cultivares de amarílis (*Hippeastrum* sp.) sob três temperaturas de armazenamento. Para tanto, foram coletadas anteras de flores com 12 a 24 horas após a antese, provenientes de cinco cultivares de amarílis: 'Bolero', 'Red Bull', 'Intokazie', 'Olaf' e 'Pink Panther'. Uma parte das anteras foi imediatamente utilizada para as avaliações de viabilidade dos grãos de pólen por meio da germinação *in vitro* e a outra parte foi armazenada nas temperaturas de 25, 8 e -20 °C. A germinação *in vitro* dos grãos de pólen em meio de cultura foi avaliada aos 0, 20, 75, 125, 165, 205 e 245 dias após o armazenamento. Foram considerados germinados os grãos de pólen que apresentaram emissão do tubo polínico, e que apresentavam

diâmetro maior ou igual ao próprio grão de pólen. Foram contabilizados 90 grãos de pólen por repetição, sendo utilizadas quatro repetições. Todas as cultivares de amarílis demonstraram acelerada perda da viabilidade na temperatura de 25°C. A cultivar 'Red Bull' demonstrou maior recalcitrância ao armazenamento em todas as temperaturas testadas, enquanto as cultivares 'Intokazie' e 'Pink Panther' apresentaram maior capacidade de conservação. A temperatura de -20°C apresentou as melhores respostas para a manutenção da integridade e conservação da viabilidade dos grãos de pólen de diferentes cultivares de amarílis.

Palavras-chave: viabilidade polínica, conservação, baixa temperatura

## 2. Introdução

A conservação de um pólen pode ser entendida como a manutenção da sua viabilidade após longos períodos de armazenamento (VAKNIN; EISIKOWITCH, 2000) e este é um procedimento muito importante para os programas de melhoramento de plantas, pois facilita o intercâmbio de germoplasma e a conservação de recursos genéticos, além de permitir o cruzamento entre espécies ou cultivares com diferentes sincronias de floração, possibilitando a exploração de novas combinações genéticas e desenvolvimento de novas cultivares (CONNOR; TOWILL, 1993), com características distintas daquelas existentes. Na literatura, o uso dessa ferramenta de conservação visando o melhoramento genético foi descrita em muitas culturas de interesse econômico como no tomateiro (SACKS; ST CLAIR, 1996), mamoeiro (JUNIOR, 2015), milho (DAVIDE, 2009), bromélia (PARTON et al., 2002), rosa (GIOVANNINI et al., 2017).

A conservação eficiente da viabilidade dos grãos de pólen depende de muitos fatores intrínsecos e extrínsecos, como o estado fisiológico da planta doadora, a umidade relativa do ar, o teor de umidade do pólen e a temperatura de armazenamento, em especial porque a sua longevidade é reduzida rapidamente quando mantida em temperatura ambiente (STANLEY, LINSKENS; 1974, GIOVANNINI et al., 2017; MACOVEI et al., 2016).

Essa ferramenta de conservação pode ser utilizada em diferentes aplicações, sendo que a sua aplicação no melhoramento genético de plantas cultivadas é de

grande relevância na obtenção de características mistas provenientes da hibridação entre dois genótipos e/ou espécies, do qual a floração natural seja de difícil sincronização. Na floricultura isso é especialmente interessante, pelos seguintes motivos: a obtenção de novas cultivares é baseada no uso de técnicas de hibridação, com cruzamentos entre genótipos superiores, seguido de avaliação das progênes (CARDOSO, 2012; CARDOSO et al., 2017) e a realização de cruzamentos entre espécies com épocas de floração distintas, pode resultar em híbridos F1 com produção de natural de flores em mais de uma época por ano, ou mesmo, fora da época de florescimento de seus parentais (GOMES et al., 2003, GIOVANINNI et al., 2013).

Existem diferentes formas de armazenamento para a conservação da viabilidade polínica, diminuindo a possibilidade de perdas significativas na germinação como, por exemplo, a criopreservação em nitrogênio líquido (-196°C) descrito por Partonet al. (2002), no qual os autores armazenaram grãos de pólen de diferentes espécies de bromélias (*Aechmea* spp. e *Pitcairnia* spp.). Outra forma de armazenamento é pela utilização de ultrafreezer (-80°C), onde Wang et al. (2015), conseguiram uma taxa de conservação dos grãos de pólen de 70% em lichia (*Litchi chinensis* Sonn) após dois anos de armazenamento.

Esses métodos visam principalmente a conservação de grãos de pólen por longos períodos de armazenamento e em geral possuem maior custo, em especial para aquisição dos equipamentos e materiais de conservação (FAGUNDES, 2017).

Outros métodos de aplicação simplificada, porém com potencial de uso para conservação dos grãos de pólen por curtos períodos de armazenamento (dias, semanas, meses) incluem a conservação em freezer (-10°C) e refrigerador (8°C), já relatados em laranjas-doces (PIO et al., 2007), mamona (VARGAS et al., 2009), oliveiras (ZAMBON et al., 2018), rosas (GIOVANNINI et al., 2015), kiwi (BORGHEZAN et al., 2011).

É importante frisar que em muitos programas de melhoramento genético, o principal objetivo é o cruzamento entre espécies com florações em épocas distintas, no qual as técnicas de armazenamento em refrigerador ou freezer, atendem as demandas dos melhoristas (ZAMBOM et al., 2018), pois nesse caso ambos os parentais têm ao menos um florescimento ao longo do ano.

A verificação da viabilidade polínica pode ser determinada com o uso de técnicas de coloração, nas quais corantes nucleares tais como carmim acético

colorem os grãos de pólen viáveis (COLAS, MERCIER, 2000). Ainda que de fácil aplicação e baixo custo, pode não refletir na capacidade real de germinação, como em grãos de pólen que se colorem mesmo incapazes de germinação, devido a problemas no tubo polínico (GALLETA, 1983). Outra forma de verificação é por meio da germinação *in vitro* (PIO et al., 2007) onde as condições do estigma são simuladas, induzindo a germinação do tubo polínico. Esta consiste em germinar uma pequena amostra em um meio de cultura apropriado, com visualização em microscópio óptico (ALMEIDA et al., 2011).

A germinação *in vitro* de grãos de pólen é o método mais conveniente e seguro usado para se testar a viabilidade dos grãos de pólen (FRAZON; RASEIRA; JÚNIOR, 2015). Para Marcellán e Camadro (1996) esse método revela o verdadeiro estado das reservas, a condição das membranas e a conversão das reservas para o grão de pólen germinar. A germinação *in vitro* de grãos de pólen é influenciada por diferentes fatores, dentre eles a espécie, o meio de cultura, a temperatura e o tempo de incubação, o estágio de desenvolvimento da flor quando na coleta do pólen, além das condições de armazenamento (STANLEY; LINSKENS, 1974; SHARAFI, 2011).

Em amarílis (*Hippeastrum* sp.), uma espécie ornamental e da qual o Brasil produz bulbos visando a exportação, uma das dificuldades no melhoramento genético tem sido sincronizar o florescimento de duas variedades para a realização de cruzamentos, pois embora o florescimento seja obtido após a bulbificação, a baixa durabilidade das flores e os diferentes tempos para emissão das flores de cada cultivar, dificultam a realização de alguns cruzamentos específicos.

No amarílis o registro de trabalhos de viabilidade polínica, bem como de conservação de grãos de pólen é praticamente inexistente, o que dificulta a compreensão sobre a taxa de sucesso em cruzamentos entre diferentes híbridos ou espécies, bem como a melhor técnica de armazenamento dos grãos de pólen, visando a sua utilização em cruzamentos interespecíficos. No presente trabalho, os objetivos foram caracterizar a floração de cinco cultivares de amarílis e avaliar a viabilidade e o armazenamento em diferentes temperaturas de grãos de pólen coletados dessas cultivares.

### 3. Material e Métodos

Bulbos previamente induzidos a floração e provenientes de diferentes cultivares de amarílis foram fornecidos pela empresa Terra Viva (Holambra, SP). Os mesmos foram plantados em potes plásticos número 15 (1,4 L capacidade) contendo substrato a base de turfa (Pindstrup, Danmark) 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 nas laterais com tela anti-afídeo branca, 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 anteras foram coletadas e utilizadas para o experimento. Foi realizada uma única adubação no momento do plantio com o fertilizante comercial PlantProd® 20-20-20 na quantidade de 1,0 g L<sup>-1</sup>.

#### *3.1 Características das flores e inflorescências das cultivares utilizadas na conservação dos grãos de pólen*

Foi realizada a caracterização morfológica das flores e inflorescências de cada uma das cultivares utilizadas, devido ao seu uso ornamental.

As descrições dos órgãos florais foram realizadas nas cultivares 'Bolero', 'Red Bull', 'Intokazie' 'Olaf' e 'Pink Panther'. Foram mensurados o diâmetro de abertura horizontal e vertical das flores, altura da primeira inflorescência emitida e número de botões florais por inflorescência.

Para as medições foram utilizadas fita métrica e paquímetro, sendo mensuradas aleatoriamente quatro flores por cultivar (repetições), provenientes de quatro plantas de cada cultivar. Foi também feita uma descrição morfológica das inflorescências e das flores desse grupo ornamental.

#### *3.2 Experimento de conservação da viabilidade de grãos de pólen armazenados em diferentes temperaturas*

Para o experimento foram utilizadas anteras coletadas de flores com idade de 12 a 24 horas após a antese, das mesmas cinco cultivares de amarílis (*Hippeastrum* sp.): 'Bolero', 'Red Bull', 'Intokazie' 'Olaf' e 'Pink Panther'. As anteras foram coletadas e identificadas de acordo com a cultivar e, posteriormente, distribuídas em placas de Petri contendo papel filtro e mantidas

em temperatura ambiente ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ) por 24 horas com o objetivo de diminuir a umidade da antera, o que promove a abertura e liberação dos grãos de pólen das anteras.

Antes de iniciar o armazenamento em diferentes temperaturas, a viabilidade dos grãos de pólen de cada cultivar foi testada utilizando-se a metodologia de germinação *in vitro* dos grãos de pólen em meio de cultura contendo  $800 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ,  $200 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 10% de sacarose e  $3 \text{ g L}^{-1}$  de gelrite, sendo o pH ajustado para 6,5 antes da adição do gelrite (BREWBAKER; KWACK, 1963). Após a dissolução do gelrite, o meio de cultura foi vertido em placas de Petri plásticas descartáveis e mantido em temperatura ambiente até adquirir a consistência semi-sólida.

Os grãos de pólen foram então distribuídos sobre o meio de cultura com o auxílio de uma pinça. As placas contendo o meio de cultura e os grãos de pólen foram tampadas e colocadas em ambiente com temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  por um período de quatro horas.

Outra parte dos grãos de pólen foram acondicionados em Eppendorf® de 1,5 mL e armazenados nas seguintes temperaturas:  $25^\circ\text{C}$  (sala de crescimento),  $8^\circ\text{C}$  (refrigerador) e  $-20^\circ\text{C}$  (freezer), sendo que cada temperatura foi considerada um tratamento.

A germinação *in vitro* dos grãos de pólen em meio de cultura foi avaliada em diferentes períodos de armazenamento, aos 0 (viabilidade inicial), 20, 75, 125, 165, 205 e 245 dias.

Para avaliação da germinação *in vitro*, correspondente a viabilidade dos grãos de pólen, foram contabilizados ao total 90 grãos de pólen por repetição, utilizando múltiplos campos de visão. Foram consideradas quatro repetições totalizando a contagem de 360 grãos de pólen por tratamento.

Todas as visualizações foram feitas com o auxílio de um microscópio óptico Nikon Eclipse 201, no aumento 40X, realizada após quatro horas de inoculação. Foram considerados para a contabilização os grãos de pólen germinados que apresentaram emissão do tubo polínico de comprimento maior ou igual ao diâmetro do próprio grão de pólen (DAFNI; FIRMAGE et al., 2000). Os grãos de pólen sem a presença de tubos polínicos foram contabilizados como não viáveis.

Os valores obtidos da contagem de grãos de pólen viáveis, em cada

repetição, foram transformados em porcentagem, sendo obtido a porcentagem de grãos de pólen germinados de cada cultivar em diferentes temperaturas de armazenamento.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, constituído em fatorial 5 x 3, com cinco cultivares e três temperaturas de armazenamento.

Os dados, expressos em porcentagem de germinação dos grãos de pólen, foram transformados em arco seno da raiz quadrada de  $X/100$ , previamente a realização da análise de variância e do teste de comparação de médias de Tukey, a 5% de probabilidade. Para as análises estatísticas foi utilizado o software AgroEstat (BARBOSA; JUNIOR, 2009). Para a contabilização da germinação de grãos de pólen sob diferentes temperaturas, avaliados no tempo, foi utilizada a regressão exponencial com representação gráfica.

#### **4. Resultados e Discussão**

##### *4.1 Características das flores e inflorescências das cultivares utilizadas na conservação dos grãos de pólen*

As cultivares apresentaram diferenças visuais pelas características de suas flores e inflorescências, com medidas da haste principal variando entre 12,5 cm a 39,9 cm, sendo as menores observadas na cultivar 'Red Bull' e as maiores na cultivar 'Pink Panther' (Tabela 1).

Todas as cultivares apresentaram botões florais protegidos durante o desenvolvimento inicial por brácteas grandes de coloração verde clara. Ao final do desenvolvimento das inflorescências e com o aumento de tamanho dos botões florais, esses são emitidos para fora das brácteas, consistindo de quatro a cinco flores grandes alocadas na porção terminal das inflorescências (Tabela 1). Dessas, uma das flores permanece com desenvolvimento limitado, enquanto as demais têm alongamento mais rápido e que culminam na antese. A flor com desenvolvimento mais limitado é a última a apresentar a antese, sendo algumas vezes notada a senescência das flores mais desenvolvidas no momento em que essa flor ainda se encontra ativa na inflorescência.



**Figura 1.** Características morfológicas das flores de cinco cultivares de *Hippeastrum* sp.



As flores são consistidas de seis tépalas, com três sépalas e três pétalas muito similares em formato, tamanho e coloração, ovários ínferos, e apresentam seis estames contendo cada um uma antera, sendo todas viáveis e com produção de grãos de pólen. A abertura das anteras, inicialmente grandes e vistosas, se inicia nas primeiras horas logo após a antese, expondo uma grande quantidade de grãos de pólen de coloração amarelo clara. A medida que as anteras abrem, elas murçam, reduzindo seu tamanho consideravelmente e expondo cada vez mais os grãos de pólen, que começam a se desprender, por vezes 'sujando' as tépalas inferiores da flor (Figura 2). Essa característica por vezes é considerada ruim para a comercialização desse tipo de flor, devido ao impacto visual. O estilete é normalmente mais alongado que os estames e, o estigma trífido, apresenta maturação mais tardia que os grãos de pólen, tornando-se aberto e mucilaginoso 3-4 dias após a antese dos botões florais.

As flores, órgão de maior impacto visual para sua utilização como ornamental, principalmente pela sua coloração e tamanho (Figura 1), são semi-tubulares, com grau de abertura das flores que permite a exposição parcial das tépalas, mantendo uma parte aberta (porção distal) e uma parte tubular com exposição parcial (porção proximal). Para todas as cultivares, a porcentagem de abertura da porção das flores foi próxima a 50% do comprimento total das pétalas, não apresentando variações entre as cultivares (Tabela 1). Outra característica das flores é que as mesmas adquirem aproximadamente 90-110° de inclinação em relação a direção vertical de crescimento da inflorescência, mantendo as flores com melhor impacto visual para sua comercialização.

Para o tamanho das flores foram mensurados os diâmetros verticais e horizontais, sendo que a cultivar "Red Bull" apresentou as menores médias, com botões florais de medidas de diâmetro equatorial de 9,8 cm e diâmetro polar de 8,7 cm. As maiores médias foram observadas na cultivar 'Bolero' (11,7 cm e 13,0 cm, equatorial e polar, respectivamente). Em média as cultivares apresentaram de quatro a cinco botões florais por inflorescência (Tabela 1).



**Figura 2.** Abertura das anteras na cultivar ‘Red Bull’. **A:** Anteras ainda fechadas. **B:** Posição do pistilo em relação as anteras. **C:** Antera totalmente aberta com 24 horas após antese.

**Tabela 1-** Características morfológicas de cultivares de amarílis (*Hippeastrum* sp.) quanto ao florescimento.

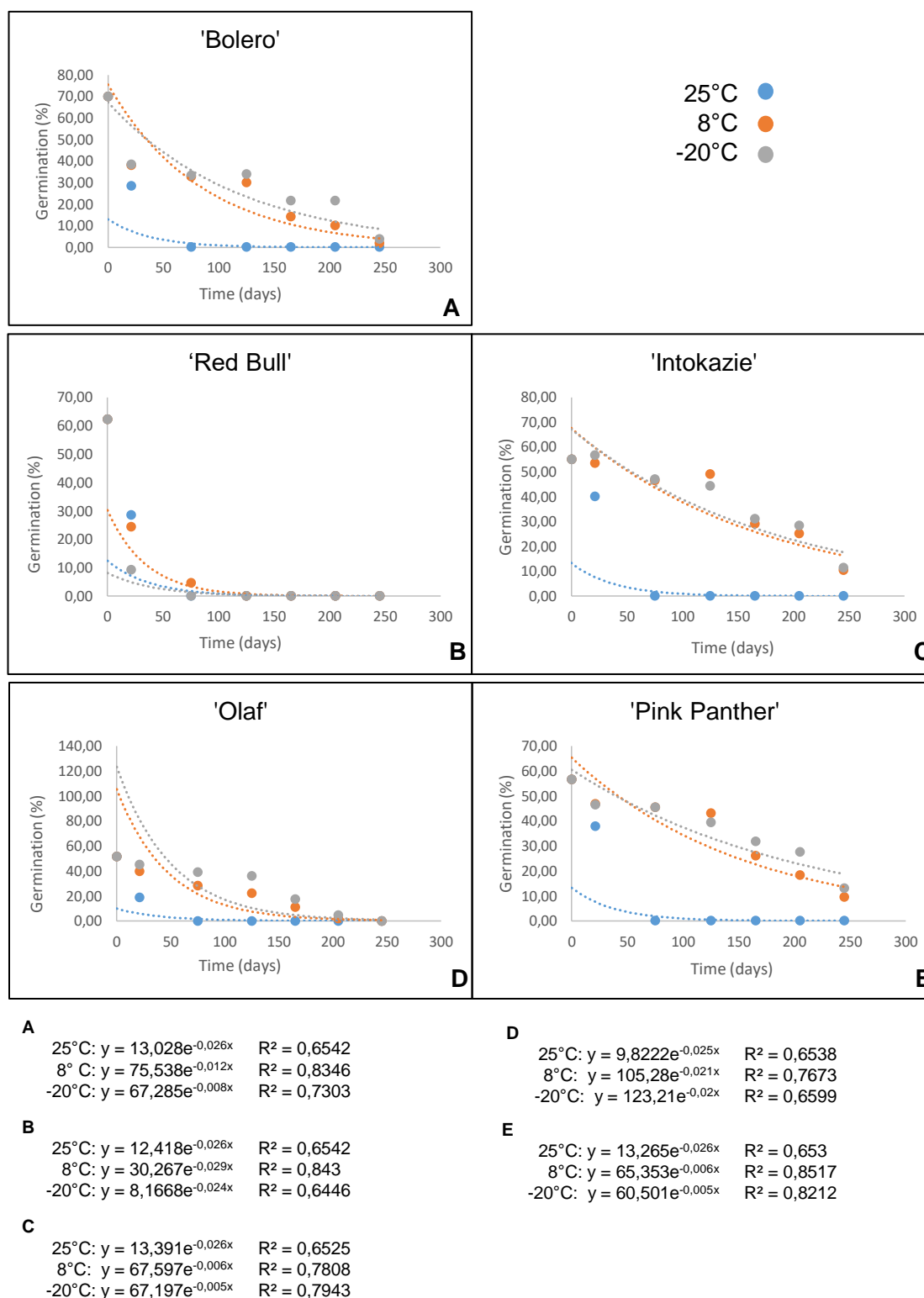
Cultivar	Comprimento Da inflorescência (cm)	Número de botões florais/ inflorescência	Diâmetro da flor		Cor
			Polar	Equatorial	
Bolero	33.3	4	12.9	11.7	Rosa claro
Red Bull	12.5	4	9.8	8.7	Vermelho escuro
Intokazie	38.7	4	11.1	11.1	Branco
Olaf	36.5	4	12.7	10.1	Vermelho
Pink Panther	39.9	5	11.4	10.7	Rosa
CV (%)	11.2	-	1.8	1.4	

#### 4.2 Experimento de conservação da viabilidade de grãos de pólen armazenados em diferentes temperaturas

O meio de cultura utilizado para a germinação *in vitro* mostrou-se viável para os grãos de pólen de diferentes cultivares de *Hippeastrum*. Isso pode ser demonstrado pela alta porcentagem de grãos de pólen germinados nessas condições, sendo em média, quantificada uma porcentagem de germinação de 50 a 70% dos grãos de pólen, dependendo da cultivar utilizada, logo após a coleta e cultivo *in vitro* nesse meio de cultura (Figura 3). Em protocolo para otimização da germinação de grãos de pólen de lírio oriental, Jin-Ping e Jin-Gang (2003) obtiveram o meio de cultura com 13% de sacarose, acrescido de 143 mg de ácido bórico e solidificado com 1% de Agar, sendo que o trabalho atual com cultivares de *Hippeastrum* utilizou o meio de cultura contendo 10% de sacarose, 200 mg L<sup>-1</sup> de ácido bórico, com o acréscimo de 800 mg L<sup>-1</sup> de nitrato de cálcio.

As avaliações periódicas demonstraram perda de viabilidade dos grãos de pólen ao longo do tempo de armazenamento, com redução da porcentagem de germinação *in vitro* em todas as cultivares avaliadas. A maior e mais rápida perda da viabilidade ocorreu na temperatura de 25°C.

A cultivar 'Red Bull' apresentou perda total da viabilidade dos grãos de pólen de forma acelerada, aos 75 dias de armazenamento, mesmo quando armazenada a baixas temperaturas, enquanto a cultivar 'Intokazie' manteve viabilidade de 46-47% no mesmo período de armazenamento, utilizando baixas temperaturas (8 ou -20°C) (Figura 1). As cultivares 'Pink Panther', 'Olaf' e 'Bolero' apresentaram perda acentuada da viabilidade no intervalo entre 75 e 125 dias de armazenamento a baixas temperaturas.



**Figura 3.** Análise de regressão para o período de armazenamento e germinação *in vitro* de grãos de pólen de diferentes cultivares de amarílis submetidas a diferentes temperaturas para preservação da viabilidade.

#### *4.2.1 Efeitos da temperatura de armazenamento*

As melhores temperaturas de armazenamento foram de 8°C (refrigerador) e -20°C (freezer) para todas as cultivares de amarílis (Figura 3). A temperatura de 25°C afetou consideravelmente a capacidade de armazenamento dos grãos de pólen de *Hippeastrum*, sendo ineficiente para o armazenamento de diferentes cultivares de *Hippeastrum* sp. testadas.

Resultados similares foram obtidos por YUNWEI et al. (2007) no qual a utilização de baixas temperaturas (-20 e -80°C) resultaram em conservação da viabilidade dos grãos de pólen acima de 40% de lírios asiáticos cv. Prato e Polyana, enquanto a temperatura de 25°C resultou em rápida perda da viabilidade. Rhee et al. (2005) também observaram que a temperatura de -20°C foi aquela que proporcionou efetivamente a manutenção da viabilidade polínica durante o armazenamento.

De acordo com Almeida et al. (2011) e Pio et al. (2007), altas temperaturas levam à desidratação e aceleram o metabolismo do grão de pólen, bem como o aumento da taxa de respiração e conversão dos açúcares em ácidos orgânicos, e o acúmulo de produtos metabólicos secundários ocasionam a perda da viabilidade polínica mais rapidamente (LINSKENS, STANLEY, 1974).

O efeito das baixas temperaturas na conservação da viabilidade polínica está ligado à redução do metabolismo celular, resultando em uma maior longevidade (CUCHIARA et al., 2015; ALOISI et al., 2016).

#### *4.2.2 Efeitos da interação entre a cultivar e a temperatura de armazenamento*

Pode-se verificar que em todas as temperaturas de armazenamento, a viabilidade polínica sofreu reduções com o tempo. No entanto, foram observadas reduções distintas conforme a cultivar avaliada (Tabela 2). Nos períodos de armazenamento de 75 a 125 dias foi possível observar interação para os fatores cultivar x temperatura de armazenamento dos grãos de pólen (Figura 3).

**Tabela 2.** Germinação *in vitro* de grãos de pólen (viabilidade) de diferentes cultivares de *Hippeastrum* sp., aos 0, 75 e 125 dias, em diferentes temperaturas de armazenamento.

<i>Hippeastrum</i> Cultivar	0 dia	75 dias			125 dias		
		25°C	8°C	-20°C	25°C	8°C	-20°C
Bolero	69,9 a	0 aB	32,7 bA	38,3 bA	0 aB	29,9 bA	33,9 bA
Red Bull	62,1 b	0 aA	4,6 dA	0,0 cA	0 aA	0,0 dA	0,0 cA
Intokazie	55,0 d	0 aB	46,4 aA	47,0 aA	0 aB	49,0 aA	44,2 aA
Olaf	51,5 e	0 aC	28,3 cB	39,9 bA	0 aC	22,2 cB	36,0 bA
Pink Panther	56,1 c	0 aB	45,4 abA	45,4 bA	0 aB	43,1 aA	39,4 abA
F cultivar			118,25			133,01	
F temperatura	ns		451,57			452,49	
F interação	ns		31,27			47,52	
CV (%)	7,79		18,24			18,23	

Médias seguidas por letras iguais entre colunas e linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. Letras minúsculas referem-se a comparações entre genótipos e letras maiúsculas referem-se a comparações entre temperatura.

A cultivar ‘Bolero’ foi aquela com maior porcentagem de grãos de pólen viáveis (69.9%), seguido pela cultivar ‘Red Bull’ (62.1%), ‘Pink Panther’ (56.1%), ‘Intokazie’ (55%) e ‘Olaf’ (51.5%). No entanto não foi possível observar uma correlação entre a viabilidade inicial e a capacidade de armazenamento dos grãos de pólen. Como exemplo, pode-se citar a cultivar ‘Bolero’ a qual sofreu redução para 46.8% e 54,8% da sua capacidade germinativa inicial aos 75 dias de armazenamento nas temperaturas de 8 e -20°C.

Já a cultivar ‘Olaf’, que apresentou a menor viabilidade inicial, mostrou redução para 55 e 77.5% da sua capacidade germinativa inicial aos 75 dias de armazenamento nas temperaturas de 8 e -20°C, ou seja, perdas menores que aquelas com capacidade germinativa inicial mais alta. Da mesma forma, a cultivar ‘Red Bull’ que apresentou a segunda maior porcentagem de germinação inicial teve sua viabilidade comprometida em todas as temperaturas, perdendo a viabilidade por completo nos primeiros 75 dias de armazenamento (Tabela 2, Figura 3).

As cultivares com maior longevidade dos grãos de pólen e menor recalcitrância para o armazenamento foram ‘Bolero’, ‘Pink Panther’ e ‘Intokazie’, sendo as duas primeiras com flores de coloração rosa e a última com flores brancas. Similar a cultivar ‘Red Bull’, a cultivar ‘Olaf’, ambas com flores vermelhas, foram aquelas com menor longevidade e mais recalcitrantes para o armazenamento (Tabela 2, Figura 3).

No atual trabalho observou-se que algumas cultivares de amarílis apresentam capacidade de conservação de pólen limitada, como é o caso da cv. 'Red Bull'. Em um único trabalho sobre conservação de grãos de pólen de *Hippeastrum Jirakiattikul* (1999) avaliou três acessos de *Hippeastrum* sp. e verificou uma alta viabilidade polínica *in vitro* em dois acessos, durante 104 semanas quando foram armazenadas nas temperaturas de -18 e -80°C com porcentagem de viabilidade acima de 50%, porém em um dos acessos ocorreu a diminuição drástica da viabilidade logo após 64 semanas na temperatura de 2°C, e as 104 semanas havia perdido total capacidade germinação.

Em tomateiro (*Lycopersicon esculentum*), o armazenamento de grãos de pólen por longos períodos resultou em perda da capacidade desses pólenes para sintetizar proteínas, enzimas biossintéticas de poliaminas e teores de poliaminas em grãos de pólen, resultando em baixas taxas de germinação. As adições de 1mM de poliaminas putreschine, espermina ou espermidina restauraram a capacidade de germinação e capacidade de fertilização (SONG; TACHIBANA, 2007). No entanto, não encontramos nenhum artigo relacionado, as diferenças de longevidade para armazenamento de pólen em baixas temperaturas e que podem ser uma consequência da variedade dos grãos de pólen para produzir naturalmente estas poliaminas, após o armazenamento a baixa temperatura.

O armazenamento a baixas temperaturas de grãos de pólen é uma estratégia importante e que auxilia melhoristas a desenvolverem novas cultivares por meio da hibridação, em especial naquelas espécies na qual a durabilidade das flores é reduzida e a sincronização do florescimento é difícil (GIOVANNINI et al., 2017, ZAMBON et al., 2018).

Esse é o caso das cultivares de amarílis avaliadas, no qual a durabilidade das flores é relativamente curta, ao redor de 5-10 dias da antese ao início da senescência das flores, bem como o início do desenvolvimento da haste floral é afetado por diferentes fatores de cultivo, como a presença de doenças no bulbo, o tamanho do bulbo e as condições e tempo de armazenamento. Esses fatores dificultam a sincronização exata da floração visando a realização dos cruzamentos controlados.

Nessa direção, avaliar a capacidade de armazenamento de grãos de pólen a baixas temperaturas é uma solução viável e barata para aplicação no melhoramento genético desse grupo ornamental, visando a utilização de cruzamentos controlados

no qual a sincronização da floração é bastante difícil. A manutenção de boa capacidade germinativa por 125 dias das cultivares ‘Intokazie’ e ‘Pink Panther’ (43-49% germinação) e ‘Olaf’ e ‘Bolero’ (34-39%) são um período suficiente para permitir a realização de cruzamentos com espécies ou mesmo entre outras cultivares, considerando o uso de bulbos pré-induzidos a floração, o principal método comercialmente utilizado para indução de flores visando a comercialização e a realização de cruzamentos controlados.

Dessas, a cultivar ‘Red Bull’ requer estudos sobre a acelerada e intensa perda da viabilidade polínica durante o armazenamento, bem como devem ser priorizados estudos para entender a maior perda de viabilidade em cultivares de flores vermelhas, como observado em nosso estudo.

## 5. Conclusões

- As diferentes cultivares demonstram diferenças no florescimento, especialmente em relação a coloração e tamanho das flores e inflorescências,
- A conservação dos grãos de pólen de amarílis em baixas temperaturas prolongou a vida útil dos grãos de pólen,
- O armazenamento a baixas temperaturas pode ser utilizado como ferramenta em programas de melhoramento genético dessa importante espécie ornamental.

## 6. Literatura Citada

ALOISI, I.; CAI, G.; SERAFINI-FRACASSINI, D.; DEL DUCA, S. Polyamines in pollen: from microsporogenesis to fertilization. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. 155, p. 1 - 7, 2016.

ALBUQUERQUE, N.; GARCÍA-MONTIEL, F.; BURGOS, L. Influence of storage temperature on the viability of sweet cherry pollen. **Spanish Journal of Agricultural Research**, n. 1, p. 86 - 90, 2007.

ALMEIDA, C.; AMARAL, A.L.; NETO, J.F.B.; SERENO, M.J.C.M. Conservação e germinação *in vitro* de pólen de milho (*Zea mays* subsp. *mays*). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 34, n. 4, p. 493 - 497, 2011.

BARBOSA, J. C.; MALDONADO JÚNIOR, W. **Software AgroEstat: Sistema de análises estatísticas de ensaios agronômicos**. Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal, Brasil, 2009.



BREWBAKER, J. L.; KWACK, B. H. The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. **American Journal of Botany**, v. 50, n. 9, p. 859 - 865, 1963.

BORGHEZAN, M.; CLAUMAN, A.D.; STEINMACHER, D.A.; GUERRA, M.P.; ORTH, A. I. In vitro viability and preservation of pollen grain of kiwi (*Actinidia chinensis* var. *deliciosa* (A. Chev.) A. Chev). **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.11, n. 4, p. 338 - 344, 2011.

CARDOSO, J. C.; MARTINELLI, A. P.; TEIXEIRA DA SILVA, J. A. A novel approach for the selection of *Cattleya* hybrids for precocious and season-independent flowering. **Euphytica**, v. 210, p. 143 - 150, 2016.

COLAS, F., MERCIER, S. Evaluating and maintaining the viability of pollen used in a tree improvement programme. **Evaluating and maintaining the viability of pollen used in a tree improvement programme**, n. 135, v. 9, p. 78, 2000.

CONNOR, K. F.; TOWILL, L. E. Pollen-handling protocol and hydration/dehydration characteristics of pollen for application to long-term storage. **Euphytica**, v. 68, n. 1-2, p. 77 - 84, 1993.

CUCHIARA, C. C.; SILVA, S. D. A.; BOBROWSKI, V. L. Conservação de grãos de pólen de mamoneira a baixas temperaturas. **Ceres**, v. 59, n. 1, p. 81 - 87 2015.

DAFNI, A.; FIRMAGE, D. Pollen viability and longevity: practical, ecological and evolutionary implications. **Pollen and pollination**, Vienna: Springer Vienna, 2000, 339 p.

DAVIDE, L. M.; PEREIRA, R.C.; ABREU, G. B.; SOUZA, J. C.; PINHO, E. V. R. V. Viabilidade de pólen de milho em diferentes períodos de armazenamento em baixa temperatura. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 8, n. 02, 2009.

KULUS, D.; ZALEWSKA, M. Cryopreservation as a tool used in long-term storage of ornamental species—a review. **Scientia Horticulturae**, v. 168, p. 88 - 107, 2014.

FRANZON, R. C.; RASEIRA, M. C. B.; JÚNIOR, A.W. Germination of *Campomanesia anthocarpa* Berg pollen in vitro. **Ceres**, v. 53, n. 305, p. 129 - 134, 2015.

GALLETTA, G.J. Pollen and seed management. In: MOORE, J.N.; JANICK, J. (eds.). **Methods in fruits breeding**. Indiana: Purdue University Press, 1983. p.23-47.

GIOVANNINI, A. et al. A. Pollen grain preservation and fertility in valuable commercial rose cultivars. **Plants**, v. 6, n. 2, p. 1 - 8, 2017.

GIOVANNINI, A. et al. Pollen grain preservation at low temperature in valuable commercial rose cultivar. **Acta-Horticulturae** 1064, p. 63 - 66, 2015.

GOMES, P. R. et al. Armazenamento do grão de pólen de cebola (*Allium cepa* L.). **Revista Brasileira de sementes**, v. 25, n. 1, p. 14 - 17, 2003.

JIN-PING, C. D. F.; JIN-GANG, W. A. N. G. STUDY ON OPTIMIZATION OF THE CULTURE MEDIUM FOR ORIENTAL HYBRIDS POLLEN GERMINATION. **Bulletin of Botanical Research**, v. 2, 2003.

JIRAKIATTIKUL, Y. **Study of intergeneric hybridization in *Hippeastrum***. 1999. Tese de Doutorado. University of Tasmania.

JUNIOR, P. C. D.; VIANA, A. P.; PEREIRA, M. G. Comportamento floral de híbridos de mamoeiro (*Carica papaya* L.) avaliados no verão e na primavera. **Ceres**, v. 55, n. 4, 2015.

YUNWEI, D.; TINGTING, J.; SHUANGLIN, D. Stress responses to rapid temperature changes of the juvenile sea cucumber (*Apostichopus japonicus* Selenka). **Journal of Ocean University of China**, v. 6, n. 3, p. 275 - 280, 2007.

MACOVEI, A. et al. Prolonged cold storage affects pollen viability and germination along with hydrogen peroxide and nitric oxide content in *Rosa hybrida*. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v. 44, n. 1, p. 6 - 10, 2016.

MARCELLÁN, O. N.; CAMADRO, E. L. The viability of asparagus pollen after storage at low temperatures. **Scientia Horticulturae**, v. 67, n. 1-2, p. 101-104, 1996.

PARTON, E.; et al. Viability and storage of bromeliad pollen. **Euphytica**, v. 125, n. 2, p. 155-161, 2002.

PIO, L. A. S. et al. M. Viabilidade do pólen de laranjas doces em diferentes condições de armazenamento. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 1, p. 147-153, 2007.

RHEE, H. K.; LIM, J. H.; VAN TUYL, J. M. Improvement of breeding efficiency for interspecific hybridization of lilies in Korea. **Acta Horticulturae**, v. 673, p. 107-112, 2005.

SACKS, E.J.; St. CLAIR, DA. Cryogenic storage of tomato pollen: effect on fecundity. **Horticultural Science**, v. 31, n. 3, p. 447-448, 1996.

SHARAFI, Y. An investigation on the pollen germination and tube growth in some *Prunus persica* genotypes and cultivars. **African Journal of Microbiology Research**, v. 5, n. 14, p. 2003-2007, 2011.

SONG, J.; TACHIBANA, S. Loss of viability of tomato pollen during long-term dry storage is associated with reduced capacity for translating polyamine biosynthetic enzyme genes after rehydration. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 15-16, p. 4235-4244, 2007.

STANLEY, R. G. LISKENS, HF: Pollen. Biology, Biochemistry. New York: Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1974.

VARGAS, D. P. et al. Análise dos grãos de pólen de diferentes cultivares de mamona (*Ricinus communis* L., Euphorbiaceae): conservação e viabilidade. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 76, n. 1, p. 115-120, 2009.

VAKNIN, Y.; EISIKOWITCH, D. Effects of short-term storage on germinability of pistachio pollen. **Plant Breeding**, v. 119, n. 4, p. 347-350, 2000.

WANG, L.; WU, L.; CHEN, J.; FU, D.; ZHANG, C.; CAI, C.; OU, L. A simple pollen collection, dehydration, and long-term storage method for litchi (*Litchi chinensis* Sonn.). **Scientia Horticulturae**, v. 188, p. 78 - 83, 2015.

ZAMBON, C. R.; SILVA, L. F. O.; PIO, R.; BIANCHINI, F. G.; OLIVEIRA, A. F. Storage of pollen and properties of olive stigma for breeding purposes. **Revista Ciência Agronômica**, v. 49, n. 2, p. 291 - 297, 2018.

## **CAPÍTULO 2. Embriogênese gamética em cultivares de *Hippeastrum* sp.**

### **1. Resumo**

O amarílis (*Hippeastrum* sp.) é uma espécie de importância econômica na floricultura, do qual a maior parte do desenvolvimento de novas cultivares é obtido por cruzamentos controlados utilizando técnicas convencionais. No entanto, a floricultura atual requer a utilização de ferramentas biotecnológicas no melhoramento genético de plantas, visando atender as demandas tecnológicas atuais. Essas ferramentas são importantes tanto em conjunto ao melhoramento convencional, como na geração direta de novas cultivares. Entre essas técnicas está a embriogênese gamética a qual é utilizada como uma ferramenta para muitas espécies visando a obtenção de homozigotas. O objetivo desse estudo foi desenvolver protocolos de cultivo *in vitro* para a obtenção de embriões de origem gamética visando avaliar sua aplicação no melhoramento genético de amarílis. A cultura de anteras foi testada em cinco cultivares de amarílis ('Apple Blossom', 'Bull', 'Olaf', 'Super Star' e 'Tosca') e para a cultura de ovários quatro cultivares ('Intokazie', 'Olaf', 'Orange Sovereign' e 'Super Star'). Visando a ginogênese *in situ* foram utilizadas diferentes doses de irradiação aplicadas em anteras (0, 40, 80, 120, 160 e

200 Grays) em cinco cultivares ('Intokazie', 'Apple Blossom', 'Pink Panther', 'Orange Sovereign' e 'Red Knight'). Para a cultura de anteras e de ovários, verificou-se 100% do material sem resposta a formação de calos ou embriões. Na ginogênese *in situ* foram testadas diferentes doses de irradiação (0, 40, 80, 120, 160 e 200 Grays) visando a indução de homozigose. As plântulas obtidas foram avaliadas por meio da citometria de fluxo. Verificou-se que a doses de irradiação a 40 e 80 Grays foram as que apresentaram indução de homozigose.

Palavras-chave: cultura de anteras, cultura de ovários, pólen irradiado

## 2. Introdução

A busca pelo desenvolvimento de cultivares novas e atraentes é necessária para um maior crescimento do mercado de flores e plantas ornamentais (JUNQUEIRA; PEETZ, 2017). Os programas de melhoramento genético de plantas ornamentais buscam aprimorar cada vez mais as características como a cor e tamanho da flor, rápido florescimento, durabilidade da flor, facilidade de cultivo e propagação, além da resistência a doenças e pragas (CARDOSO, 2010).

Contudo, apesar dos avanços do melhoramento clássico para o desenvolvimento de novas cultivares que atendam estas demandas, estes apresentam limitações e desvantagens como o tempo necessário para se obter um novo material vegetal (DA SILVA et al., 2011). Em um programa de melhoramento convencional, linhas puras são desenvolvidas após várias gerações de autofecundação e ainda podem não ser 100% homozigotas. Logo, os avanços na biotecnologia representam uma ferramenta valiosa para aumentar a eficiência e encurtar esse tempo necessários para desenvolver novos materiais (GERMANÀ, 2011).

O desenvolvimento e a adaptação de novos métodos de melhoramento genético, apoiados nos avanços da biotecnologia representam uma ferramenta valiosa para aumentar a eficiência e encurtar o tempo necessário para atingir os objetivos de um programa de melhoramento (GERMANÀ, 2011).

Dentre esses métodos, a cultura de tecidos e, particularmente, a tecnologia de haploides e duplo-haploides, através da embriogênese gamética, representam

um método biotecnológico particularmente atraente para acelerar o melhoramento de plantas (ABDIN, 2017).

Esta técnica tem sido bastante estudada e permite obter plantas haploides e/ou duplo-haploides em um único ciclo de cultivo, sendo essa uma vantagem quando comparada ao melhoramento convencional, que pode levar cerca de 10 anos para a obtenção de linhagens homozigóticas (ARCHIPIANO et al., 2015; ETIENNE et al., 2016).

A embriogênese gamética consiste na capacidade dos gametófitos, sejam eles masculinos (androgênese) ou femininos (ginogênese), mudarem sua via gametofítica para uma via de desenvolvimento esporofítica, resultando em plantas haploides (MORRISON, EVANS, 1988; SEGUÍ-SIMARRO; NUEZ, 2008). A androgênese é o processo pelo qual a regeneração de uma planta haploide ocorre através da cultura de anteras ou micrósporos, enquanto a ginogênese refere-se ao uso de gametófitos femininos não fecundados, como ovários ou óvulos, para o desenvolvimento haploide (KHAR et al., 2018).

Entretanto, diversos fatores podem afetar o sucesso dessas técnicas tais como a utilização de genótipos mais responsivos (CARDOSO et al., 2014), o estado fisiológico das plantas e dos órgãos utilizados no início do cultivo, o meio de cultura, as condições do cultivo *in vitro* (GILLES et al., 2017), a dose da irradiação escolhida, a fase de desenvolvimento dos embriões no momento do desenvolvimento da cultura, o meio de cultura (GERMANÀ, 2011).

O genótipo tem sido o fator de maior influência para a obtenção da embriogênese gamética, sendo que as diferentes respostas à embriogênese podem ser observadas entre espécies similares, ou mesmo entre cultivares de uma mesma espécie (KARASAWA et al., 2016) sendo algumas espécies fortemente recalcitrantes a determinadas técnicas como a cultura de anteras (CARDOSO et al., 2014).

Contudo algumas dificuldades são encontradas, como a busca à técnica mais adequada para determinada cultura (ARCHIPIANO et al., 2015). Podemos citar como exemplo, a cultura de anteras a qual não teve sucesso em cebola, apesar de várias tentativas descritas na literatura (KELLER; KORZUN, 1996; CAMPION, 1984; KELLER, 1990). No entanto a obtenção de haploides em cebola foi possível através da cultura de ovários, a qual é bastante utilizada em diversos programas de melhoramento (KHAR et al., 2019; IBRAHIM et al., 2016).

A obtenção de plantas haploides pode auxiliar na floricultura uma vez que os híbridos F1 são obtidos a partir de cruzamentos entre duas linhagens puras (POEHLMAN; SLEPER, 1995). Apesar desse interesse, poucos tem sido os trabalhos com indução de linhagens homozigotas a partir de técnicas de embriogênese gamética *in vitro*. As técnicas biotecnológicas como a embriogênese gamética podem resultar em linhagens, mas também em outros tipos de materiais genéticos de interesse para a floricultura.

Nesse contexto, encontra-se o gênero *Hippeastrum* sp., que tem atraído grande atenção do mercado de plantas ornamentais devido a sua variação no tamanho e coloração das flores, e são reconhecidas centenas de cultivares (JAMIL et al., 2016) obtidas em quase sua totalidade pelo uso do melhoramento convencional com uso de cruzamentos e seleção de progênies de interesse. Dessa forma, em espécies com pouca tradição e registros sobre a embriogênese gamética e somática, como é o caso do gênero *Hippeastrum*, torna-se necessário testes visando o desenvolvimento de protocolos baseados em diferentes genótipos, na busca de genótipos mais responsivos a embriogênese *in vitro*, bem como do uso de diferentes técnicas visando a obtenção de sucesso na indução e regeneração de plantas de origem gamética.

O objetivo do trabalho foi testar diferentes técnicas, visando o desenvolvimento de um protocolo de cultivo *in vitro*, para a obtenção de plantas haploides/ duplo haploides visando a sua aplicação no melhoramento genético de amarílis, através das técnicas de embriogênese gamética.

### **3. Material e Métodos**

O experimento foi conduzido no Laboratório de Fisiologia Vegetal e Cultura de Tecidos, do Departamento de Biotecnologia e Produção Vegetal e Animal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de São Carlos, campus Araras, SP. Bulbos previamente induzidos a floração e provenientes de diferentes cultivares de amarílis foram fornecidos pela empresa Terra Viva (Holambra, SP). Os mesmos foram plantados em potes plásticos número 15 (1,4 L capacidade) contendo substrato a base de turfa (Pindstrup, Danmark) 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 nas laterais com tela anti-afídeo branca, e irrigados por microaspersão, com quantidade de água aplicada de aproximadamente 5 mm/dia. Foi realizada uma única adubação no momento do plantio com o fertilizante comercial PlantProd® 20-20-20 na quantidade de 1,0 g L<sup>-1</sup>.

### 3.1 Cultura de anteras

As cultivares utilizadas de amarílis utilizadas para a cultura de anteras foram: 'Apple Blossom', 'Bull', 'Olaf', 'Super Star' e 'Tosca'. Suas flores consistem em seis tépalas, três sépalas e três pétalas, com tamanho, formato e coloração similares, ovários íferos e apresentam seis estames contendo cada um uma antera, sendo todas viáveis e com produção de grãos de pólen. As cultivares diferem na coloração, sendo a 'Apple Blossom' predominantemente branca com nuances rosa claro, as demais variam em tons de vermelho: a 'Bull' apresenta um tom de vermelho mais escuro, enquanto a 'Olaf', 'Tosca' e 'Super Star' são vermelhos carmesim.

Foram realizados pré-testes visando a determinação do estágio uninucleado dos micrósporos, sendo esse aquele com maiores respostas a embriogênese gamética em diferentes espécies vegetais (SAENSEE et al., 2018; AHMADI, et al., 2018; ATA, et al., 2019) (Figura 1). Para tanto foram feitas observações em cinco anteras da cultivar 'Olaf' oriundas de botões florais com tamanhos diferentes, levemente maceradas sobre lâminas de vidro acrescido de aproximadamente 50 µL de carmim acético e cobertas com lamínulas de vidro, seguida das observações em microscópio óptico.



**Figura 1.** Micrósporos no estágio uninucleado de *Hippeastrum* sp. cultivar 'Olaf'.

As anteras foram coletadas de botões florais entre 3 a 6 cm de comprimento, entre os meses de maio a agosto, e levados ao laboratório, onde a assepsia foi



realizada pela imersão dos botões florais em álcool 70% por 30 segundos, seguido por imersão em solução de hipoclorito de sódio (NaClO) comercial (2% de cloro ativo) contendo cinco gotas de detergente neutro, e mantidas por 10 minutos. Em seguida, os botões florais foram lavados em água destilada autoclavada por dois minutos, por três vezes consecutivas.

Após a assepsia dos botões florais, as pétalas foram removidas com auxílio de uma pinça e bisturi. As anteras foram expostas e seccionadas em três partes visando colocar em contato os micrósporos (células haploides) com o meio de cultura, e em seguida inoculadas em placas de Petri descartáveis contendo diferentes meios de cultura, utilizados como tratamentos:

T1: Meio de cultura B5 (GAMBORG et al., 1968) suplementado com 80 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 0,5 mg L<sup>-1</sup> de Ácido 2,4-Diclorofenoxiácético (2,4-D) e 1,0 mg L<sup>-1</sup> de cinetina (KIN) (FAN et al., 2011; ZHANG et al., 2011).

T2: Meio de cultura contendo sais de N6 (CHU et al., 1978) e vitaminas de NN (NITSCH; NITSCH, 1969), acrescido de 36 g L<sup>-1</sup> de lactose. Suplementado com os seguintes reguladores vegetais: 0,5 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; 0,5 mg L<sup>-1</sup> de cinetina; 0,5 mg L<sup>-1</sup> de 6-benzilaminopurina (BAP), 0,1 mg L<sup>-1</sup> de thidiazuron (TDZ) e 0,5 mg L<sup>-1</sup> de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) (adaptado de CARDOSO, 2012).

O pH foi ajustado para 5,8 e os meios solidificados com 6,4 g L<sup>-1</sup> ágar e autoclavado a 120°C, 1 kgf/cm<sup>2</sup>, por 20 minutos. Após a inoculação das anteras seccionadas, as placas de Petri foram mantidas em sala de crescimento em condições de escuro por 30 dias e após foram transferidas para a iluminação artificial composta por lâmpadas fluorescentes brancas, com um fotoperíodo de 16 horas e temperatura controlada de 25 ± 2 °C por mais noventa dias.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e cada tratamento foi composto por seis repetições (placas de Petri) contendo cada uma, 4 anteras seccionadas, totalizando 12 explantes inoculados por placa. O experimento foi conduzido em esquema fatorial 5 x 2 (cultivares x meios de cultura), sendo repetido três vezes. Foram observadas a porcentagem de anteras intumescidas e com escurecimento dos tecidos, e com produção de calos.

### 3.2 Cultura de ovários

Os botões florais das cultivares 'Intokazie', 'Olaf', 'Orange Sovereign' e

'Super Star' foram coletados em diferentes estádios: da pré-antese até 12 horas após a antese, momento ao qual as anteras ainda não estavam abertas, evitando contaminação do estigma com grãos de pólen não desejados.

Os botões florais foram levados ao laboratório, onde os ovários foram isolados do restante da flor e submetidos à assepsia com lavagem em água corrente e detergente, e posteriormente em imersão em álcool 70% por três minutos, seguido pela imersão em solução de hipoclorito de sódio (NaClO) comercial (2% de cloro ativo) por 20 minutos e lavado por três vezes em água destilada autoclavada.

Após a assepsia, os ovários contendo os óvulos foram seccionados transversalmente, originando seis pequenos segmentos que serviram de explantes para inoculação no meio de cultura. As segmentações dos ovários tiveram como finalidade a exposição dos óvulos para melhor contato com o meio de cultura, visando a indução da divisão celular dos óvulos, sem a ocorrência da polinização ou qualquer outro tipo de estímulo reprodutivo. Os ovários seccionados foram inoculados em frascos de vidro de 250 mL contendo 30 mL de cada meio de cultura.

Os tratamentos foram compostos por dois meios de cultura, sendo eles: T1: Meio de cultura com sais de B5 (GAMBORG et al., 1968) e T2: Meio de cultura contendo sais de N6 (CHU et al., 1978) e vitaminas de NN (NITSCH; NITSCH, 1969). Ambos os meios foram acrescidos de 36 g L<sup>-1</sup> de lactose e suplementados com os seguintes reguladores vegetais: 0,5 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; 0,5 mg L<sup>-1</sup> de cinetina; 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP, 0,1 mg L<sup>-1</sup> de TDZ e 0,5 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> (adaptado de CARDOSO, 2012). O pH foi ajustado para 5,8 e os meios solidificados com 6,4 g L<sup>-1</sup> ágar e autoclavado a 120°C, 1 kgf/cm<sup>2</sup>, por 20 minutos.

Após a inoculação dos ovários, os frascos foram mantidos em sala de crescimento em condições de escuro por 30 dias e após, foram passados para a iluminação artificial composta por lâmpadas fluorescentes brancas com fotoperíodo de 16 horas e temperatura controlada em 25 ± 2° C, por aproximadamente mais quatro meses.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado e cada tratamento foi composto por seis repetições (frascos), contendo cada um seis segmentos de ovários, em esquema fatorial 4 x 2 (genótipos x meios de cultura), sendo este experimento repetido em três oportunidades. Foi avaliado o número de ovários intumescidos e com escurecimento dos tecidos.

### 3.3 *Ginogênese in situ* utilizando pólenes tratados com diferentes doses de irradiação

Os botões florais recém-abertos das cultivares: 'Intokazie', 'Apple Blossom', 'Pink Panther', 'Orange Sovereign', 'Red Knight' foram coletados e as anteras contendo os grãos de pólen foram retiradas e secas a temperatura ambiente por 24 horas em papel filtro. Posteriormente foram mantidas em tubos Eppendorf e divididas em cinco porções, as quais foram submetidas a diferentes doses de irradiação: 0 (controle), 40, 80, 120, 160 e 200 Grays. Foi utilizado o irradiador Gamma-Cell® (Cobalto 60), CENA – USP, localizado em Piracicaba, SP.

Os grãos de pólen tratados com as diferentes doses de irradiação e o controle (pólen não irradiado) foram utilizados para a polinização das flores, que foram emasculadas em fase pré-antese, para evitar possíveis contaminações com grãos de pólen indesejados.

Para verificar o efeito da radiação nos grãos de pólen foram realizados testes de germinação *in vitro* em meio de cultura contendo 800 mg L<sup>-1</sup> de nitrato de cálcio, 200 mg L<sup>-1</sup> de ácido bórico, 10 % de sacarose e 3 g L<sup>-1</sup> de gelrite (PIO et al., 2007). Esse meio foi previamente utilizado em diferentes cultivares de amarílis, provando sua eficiência para germinação dos grãos de pólen desse gênero (Capítulo 1).

Trinta dias após a polinização, os frutos obtidos foram colhidos, as sementes retiradas e separadas por dose de irradiação e cruzamentos realizados. As sementes foram colocadas para germinar em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com metade da concentração dos macronutrientes (MS<sub>1/2</sub>) contendo 0,1 g L<sup>-1</sup> de inositol, 1 g L<sup>-1</sup> de peptona e 6,4 g L<sup>-1</sup> de ágar. O pH foi ajustado para 5,7 ± 0,05 e autoclavado a 120 kgf/cm<sup>2</sup> por 20 minutos. Foram utilizados tubos de ensaio de vidro contendo 12 mL de meio.

As sementes foram mantidas no escuro por 30 dias e, posteriormente, transportadas para iluminação artificial de com lâmpadas fluorescentes em fotoperíodo de 16 horas com temperatura controlada de 25 ± 2 °C por mais 60 dias.

Cada dose de irradiação foi considerada um tratamento, sendo avaliada a porcentagem de frutos pegos e o número de sementes obtidas. Este experimento foi conduzido em esquema fatorial 6 x 5 (doses de irradiação x cultivares), com quatro repetições cada (número de flores polinizadas). Posteriormente, para avaliar a

porcentagem de germinação, foram realizadas 10 repetições (tubos) com uma semente cada, e contabilizados o número de plântulas obtidas.

### 3.3.1 Análises de citometria

A origem da ploidia das plantas regeneradas foi estimada através da avaliação das plantas por citometria de fluxo utilizando o equipamento BD Accuri™ C5. Cada amostra foi composta por suspensões nucleares isoladas de folhas frescas oriundas de plantas *in vitro* a partir de segmentos de folha com tamanho aproximado de 0,25 cm<sup>2</sup>.

Os núcleos das células foram expostos com o auxílio do tampão de extração *Sysmex CyStain® PI absolute P* e maceradas com lâmina de bisturi, filtradas através de filtros de 40 µm e coradas com solução de iodeto de propídio (*BD Pharmigen™*), de acordo com as recomendações do fabricante. Os histogramas obtidos foram analisados pelo Software BD Accuri C6 e a ploidia de cada amostra foi comparada com amostras das folhas da planta matriz.

### 3.3.2 Análises moleculares

Visando a determinação da origem das plantas regeneradas, foram extraídos o DNA da planta matriz e das plântulas DNA. Para tanto, foram coletados segmentos de folhas frescas pesando aproximadamente 50 mg e a extração foi baseada no uso do tampão de extração CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio). Posteriormente a quantificação do DNA foi verificada por Nanodrop®.

Foram testados diferentes *primers* de microssatélites, descritos por Wang et al. (2018). As reações de amplificação foram preparadas para o volume de 15 µL, contendo 3,0 µL de DNA, 0,3 µL de Taq DNA polimerase, 0,3 µL de primer forward e primer reverse, 1,2 µL de dNTP, 1,5 µL de buffer e 8,4 µL de água Mili-Q autoclavada. A reação de polimerização em cadeia (PCR) foi realizada em termociclador Eppendorf e a o programa utilizado foi específico para os primers descritos por Wang et al. (2018). Foi realizada a eletroforese em gel de agarose a 3%, corados com brometo de etídio e fotografados sob luz ultravioleta.

### 3.3.3 Análises estatísticas

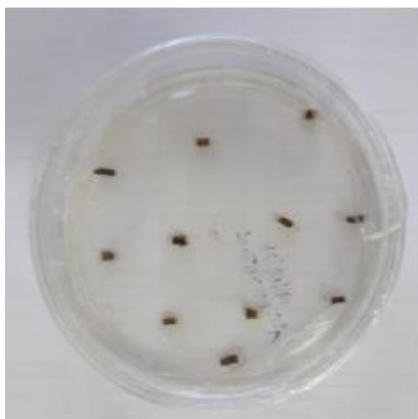
Os dados expressos em porcentagem foram transformados pela equação arcseno da raiz quadrada de  $X/100$ , previamente a realização da análise de variância e do teste de comparação de médias de Tukey, a 5% de probabilidade. Para as análises estatísticas foi utilizado o software AgroEstat (BARBOSA; JUNIOR, 2009). Para a contabilização da porcentagem de frutos pegos, número de sementes obtidas e germinação das sementes, avaliados em função das doses de irradiação, foi utilizada análise de regressão com representação gráfica.

## 4. Resultados e Discussão

### 4.1 Cultura de anteras

A partir dos pré-testes realizados, determinou-se que o estágio uninucleado do micrósporo ocorre quando os botões florais se encontram com tamanhos entre 3-6 cm de comprimento. Na literatura, a relação do tamanho dos botões florais e o estágio uninucleado do micrósporo é descrito como um fator de grande importância para o sucesso da técnica de indução de embriogênese gamética. Em plantas de lírio, Arzate-Fernández et al. (1997) verificaram que o estágio uninucleado dos micrósporos ocorreu entre 2,5 e 5,5 cm.

Para os dois meios de cultura, B5 (GAMBORG et al., 1968) e o contendo sais de N6 (CHU, 1978) e vitaminas de NN (NITSCH; NITSCH, 1969) observou-se 100% das anteras escurecidas e ressecadas e, posteriormente, gerou um escurecimento do meio de cultura e morte do material vegetal (Figura 2). Para Pan e Staden (1998), esse escurecimento do explante em estágios iniciais e eventual morte, é frequente e pode ser decorrente à produção excessiva de polifenóis. Embora muitas espécies respondam à técnica, de forma positiva, alta taxa de oxidação é um problema frequente e pode estar ligada diretamente ao efeito de genótipos mais responsivos (FOSTER et al., 2007).



**Figura 2.** Segmento de anteras de *Hippeastrum* oxidado após 30 dias no escuro.

No presente trabalho foram avaliados cinco cultivares de amarílis, no entanto nenhum apresentou formação de calos. QU et al. (1988) também utilizaram a técnica de cultura de anteras em *Lillium longiflorum*, testando 108 cultivares em meio de cultura N6 (CHU, 1978), e desses apenas 28 apresentaram a formação de calo. Diversos fatores podem interferir diretamente na resposta embriogênica, tais como condições de crescimento da planta doadora, meio de cultura e o genótipo (KURTAR, 2017).

Dentre esses fatores, o genótipo é considerado um dos mais importantes. Neste sentido, diferentes cultivares dentro de uma mesma espécie podem requerer condições específicas para o desenvolvimento (GERMANÀ, 2010).

#### 4.2 Cultura de ovários

Para todos os tratamentos utilizados verificou-se intumescimento do ovário após 30 dias no escuro e quando transferidos para a luz por mais 30 dias, apresentou 100% de explantes oxidados (Figura 3). Essa oxidação dos explantes apresentada posteriormente à transferência para a luz, pode ser devido a atividade de enzimas no que diz respeito à biossíntese de fenóis, a qual é aumentada na presença de luz (ALAN et al., 2016). O intumescimento dos ovários observado no presente trabalho foi descrito em outras culturas bulbosas, como por exemplo, a cebola, onde resposta semelhante foi verificada em diferentes cultivares estudados por Longo (2009). Esse intumescimento é decorrente da proliferação celular dos tecidos somáticos em volta do gametófito feminino, mas não há resposta do saco embrionário.



**Figura 3.** Inoculação dos ovários de *Hippeastrum* sp. cultivar 'Olaf'. **A:** No momento da inoculação. **B:** Intumescimento dos ovários após 30 dias no escuro. **C.** Oxidação dos ovários após 30 dias na luz.

Apesar de ser uma técnica eficiente para outras culturas como em crisântemo (MILER; MUSZCZYK, 2013), hibisco (IBRAHIM, 2015), para Chen et al. (2011) são diversos os fatores podem afetar a regeneração bem-sucedida haploides e duplo-haploides por cultura de ovários, como o genótipo, o estágio de desenvolvimento do gametófito feminino e o meio de cultura.

O genótipo é o principal deles. Em estudos realizados por Fayos et al. (2015) demonstraram diferentes respostas em três cultivares de cebola espanhola com taxas de regeneração variando entre 0,25% a 2,09% quando submetidas as mesmas condições de cultivo, demonstrando o efeito do genótipo em resposta à cultura de ovários. No trabalho atual, não foram verificadas diferenças entre os genótipos quanto ao intumescimento ou a indução de calos; todos apresentaram 100 % de oxidação.

#### 4.3 Ginogênese *in situ* utilizando grãos de pólen tratados com diferentes doses de irradiação

Foram realizados três experimentos ao longo de um ano nos meses de janeiro, maio e junho com diferentes cruzamentos entre as cultivares: 'Intokazie', 'Pink Panther', 'Orange Sovereign' e 'Olaf', variando estas entre os experimentos. Após os grãos de pólen receberem as doses de irradiação, a germinação *in vitro* foi avaliada para cada tratamento utilizado. Em todos os experimentos realizados, após os grãos de pólen receberem as doses de irradiação, foram testadas a sua germinação *in vitro*. Na verificação da germinação *in vitro*, foi possível observar que todos os tratamentos utilizados apresentaram acima de 60% (Tabela 1).

**Tabela1.** Germinação *in vitro* dos grãos de pólen de cultivares de *Hippeastrum* em função das doses de irradiação em diferentes períodos do ano.

Tratamento (Grays)	0	40	80	120	160	200
<b>Janeiro (Pink Panther)</b>	86,4	73,2	75,6	74,4	65,6	64,8
<b>Maio (Pink Panther)</b>	78,7	-	88,7	58,5	67,5	85
<b>Junho (Intokazie)</b>	55	64	55	86,5	82	86

Diversos são os fatores que podem influenciar na viabilidade do grão de pólen, sendo dependente apenas do fator genótipo. Fatores ambientais, teores de umidade e as condições internas do grão de pólen podem reduzir sua viabilidade. A exposição dos grãos de pólen a diferentes doses de irradiação pode influenciar na redução dos teores de água, o que reduz a capacidade desses pólenes de converter as reservas de carboidratos e, por consequência, uma redução na sua viabilidade polínica (KUNDU et al., 2016).

Em janeiro foram realizadas polinizações nas cultivares ‘Intokazie’ e ‘Orange Sovereign’, as quais serviram de planta mãe, utilizando pólen irradiado da cultivar ‘Pink Panther’ (pai) nas doses de 0, 40, 80, 120, 160 e 200 Grays.

Verificou-se que na polinização entre ‘Orange Sovereign’ e ‘Pink Panther’, independente da dose utilizada nos tratamentos, todos os frutos foram abortados (Figura 4). Nessa polinização não houve o efeito da irradiação, e sim uma possível incompatibilidade genética entre as cultivares avaliadas, isto porque mesmo no tratamento com o pólen sem irradiação, as plantas foram abortadas.

Diferentemente, na polinização entre ‘Intokazie’ e ‘Pink Panther’, no tratamento controle (sem irradiação) houve 50% de pegamento dos frutos, com dois frutos obtidos, e no tratamento na dose de 80 Grays, apresentou 25% de pegamento dos frutos e 1 fruto obtido. A redução da porcentagem de pegamento dos frutos na polinização ‘Intokazie’ e ‘Pink Panther’ quando comparado o tratamento controle com as demais doses de irradiação aplicadas, indica que o efeito da irradiação induziu um aborto dos embriões nas doses de 40, 120, 160 e 200 Grays.

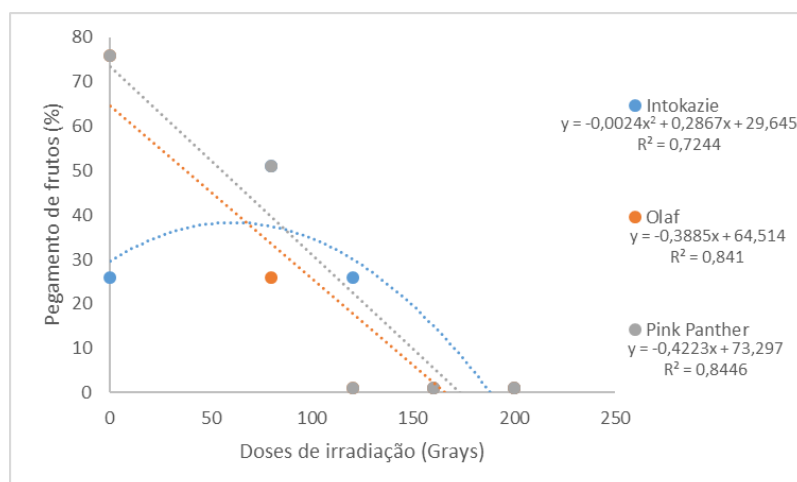
As sementes dos frutos obtidos foram contabilizadas, totalizando 156 sementes do fruto oriundo do tratamento controle e 114 do tratamento na dose de 80 Grays e verificou-se que a porcentagem de germinação das sementes foi de 50%



para ambos os tratamentos, ou seja, foram obtidas cinco plântulas por tratamento.

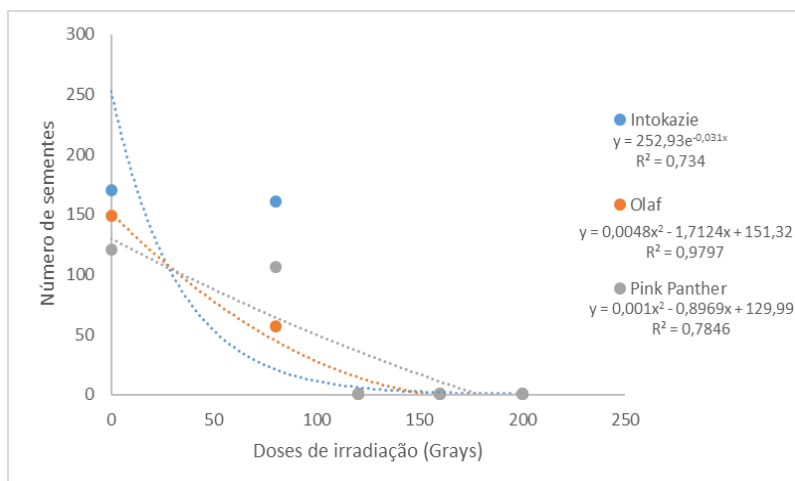
Nos experimentos realizados em maio, foram utilizadas as cultivares 'Intokazie', 'Olaf' e 'Pink Panther' (mãe) e a cultivar 'Pink Panther' (pai). As doses de irradiação utilizadas foram: 0 (controle), 80, 120, 160 e 200 Grays.

Para a porcentagem de frutos pegos, utilizando como progenitor materno 'Intokazie' apresentou 25% no tratamento controle, e 50% e 25% nas doses de irradiação 80 e 120 Grays, respectivamente. Utilizando o progenitor materno 'Olaf', a porcentagem de pegamento de frutos foi de 75% no tratamento controle e 25% na dose de 80 Grays. Já no caso da autofecundação cruzamento de 'Pink Panther', a porcentagem de frutos pegos foi de 75% no tratamento controle e 50% na dose de 80 Grays (Figura 7).



**Figura 4.** Porcentagem de pegamento de frutos nas cultivares 'Intokazie', 'Olaf' e 'Pink Panther' em função das doses de irradiação.

Verificou-se o efeito das doses de irradiação no número de sementes obtidas, sendo que na polinização com 'Olaf' apresentou 149 sementes no tratamento controle, enquanto na dose de 80 Grays, foram obtidas apenas 57 sementes. Já na polinização com 'Intokazie' e 'Pink Panther', no tratamento controle obteve-se 170 e 121 sementes, e 160 e 106 sementes na dose de 80 Grays, respectivamente (Figura 5).



**Figura 5.** Número de sementes obtidas em diferentes cultivares de *Hippeastrum* sp. em função das doses de irradiação.

Na germinação das sementes, a polinização com a cultivar ‘Intokazie’ apresentou 30% de germinação no tratamento controle e 40% na dose de 80 Grays. Enquanto a polinização com as cultivares ‘Olaf’ e ‘Pink Panther’, no tratamento controle apenas 10% das sementes germinaram, ao passo que na dose de 80 Grays, apenas a cultivar ‘Pink Panther’ apresentou 30% de germinação (Tabela 2).

**Tabela 2.** Germinação de sementes, em porcentagem, nas cultivares ‘Intokazie’, ‘Olaf’ e ‘Pink Panther’ de acordo com as doses de irradiação.

Tratamento (Grays)	0	80
Intokazie	30	40
Olaf	10	0
Pink Panther	10	30

Nos experimentos realizados em junho, também foram utilizadas as cultivares ‘Intokazie’, ‘Olaf’ e ‘Pink Panther’ como plantas genitoras mãe e a planta genitora pai utilizada foi a cultivar ‘Intokazie’. As doses de irradiação utilizadas foram: 0 (controle), 40, 80, 120, 160 e 200 Grays. Após receber as doses de irradiação, na verificação da germinação *in vitro*, os tratamentos nas doses de 120 e 200 Grays apresentaram as maiores porcentagens de germinação (Tabela 1).

O pegamento de frutos obtidos foi de 100% na polinização com a cultivar ‘Intokazie’ no tratamento controle e na dose de 80 Grays. Nas doses de 40, 120 e 160 Grays, verificou-se 50, 75 e 25% de pegamento dos frutos, respectivamente. Na

dose de 200 Grays nenhum fruto foi obtido. Já a cultivar ‘Olaf’ apresentou 75% de pegamento de frutos nos tratamentos controle e na dose de 120 Grays. Nas doses de 40 e 80 Grays houve 50% de pegamento. Verificou-se o efeito da irradiação na dose de 200 Grays para esta cultivar também, pois não foi obtido nenhum fruto. Na polinização com a cultivar ‘Pink Panther’, foi obtido 25% de pegamento dos frutos dose de 80 Grays, enquanto todas as demais polinizações foram abortadas (Tabela 3).

**Tabela 3.** Porcentagem de pegamento de frutos nas cultivares ‘Intokazie’, ‘Olaf’, ‘Pink Panther’ de acordo com as doses de irradiação.

Tratamentos (Grays)	0	40	80	120	160	200
Intokazie	100	50	100	75	25	0
Olaf	75	50	50	75	25	0
Pink Panther	0	0	25	0	0	0

Os números de sementes variaram de acordo com os tratamentos, sendo que a polinização com a cultivar ‘Intokazie’ apresentou um incremento no número de sementes na dose de 80 Grays, com 261 sementes. O tratamento controle e a dose de 40 Grays apresentaram um alto número de sementes também, com 251 e 255 sementes, respectivamente. Já nas doses de 120 e 160 Grays verificou-se um declínio, com 121 e 104 sementes (Tabela 4).

O cruzamento com a cultivar ‘Olaf’ apresentou 144 sementes no tratamento controle; este foi o maior número de sementes obtidas nesta cultivar. Nos tratamentos 40, 80, 120 e 160 Grays verificou-se 43, 59, 52 e 41 sementes, respectivamente (Tabela 4).

**Tabela 4.** Número de sementes obtidas em função das doses de irradiação com as cultivares ‘Intokazie’, ‘Olaf’, ‘Pink Panther’ e em função das doses de irradiação.

Tratamento (Grays)	0	40	80	120	160	200
Intokazie	251	255	261	121	104	0
Olaf	144	43	59	52	41	0
Pink Panther	0	0	32	0	0	0

Na germinação das sementes, verificou-se que para a cultivar ‘Intokazie’ a dose 40 Grays apresentou as melhores porcentagens de germinação com 60%,

seguido de 50% na dose 160 Grays, 41 e 21% nos tratamentos a 80 Grays e controle, respectivamente. Contudo, na dose de 120 Grays, nenhuma semente germinou (Tabela 5).

**Tabela 5.** Germinação das sementes das cultivares 'Intokazie', 'Olaf', 'Pink Panther' de acordo com cada tratamento.

Tratamento (Grays)	0	40	80	120	160	200
Intokazie	20	60	40	0	0	0
Olaf	70	60	80	30	40	0
Pink Panther	0	0	50	0	0	0

A polinização com pólen irradiado afetou tanto o pegamento dos frutos, o número de sementes e teores de sementes em todos em todas as cultivares testadas; a extensão das influências foi geralmente acentuada com o aumento da dosagem de irradiação.

Em nosso trabalho, observou-se que quanto maior a dose de irradiação utilizada, menor o número de frutos obtidos e, conseqüentemente, menor o número de sementes; os menores números de sementes foram nas doses de 120 e 160 Grays. A irradiação provoca a diminuição do número de sementes, principalmente devido às sementes abortadas, pois correspondem às sementes vazias, ou seja, sem o embrião (BLASCO et al., 2016). Em algumas culturas, como o caso da abóbora, realizados com abóbora, doses acima de 200 Gy não apresentaram a formação de sementes (KURTAR, BALKAYA; 2010).

Essa diminuição no número de sementes e na sua germinação demonstram uma sensibilidade do *Hippeastrum* quanto à radiação; essa sensibilidade também foi verificada pelos autores Grouth et al. (2015) em plantas de íris, as quais se mostraram sensíveis a doses mais altas de irradiação na dose de 400 Grays com cerca de 27% de germinação quando comparadas ao tratamento de 100 Grays, onde obtiveram 65% de germinação.

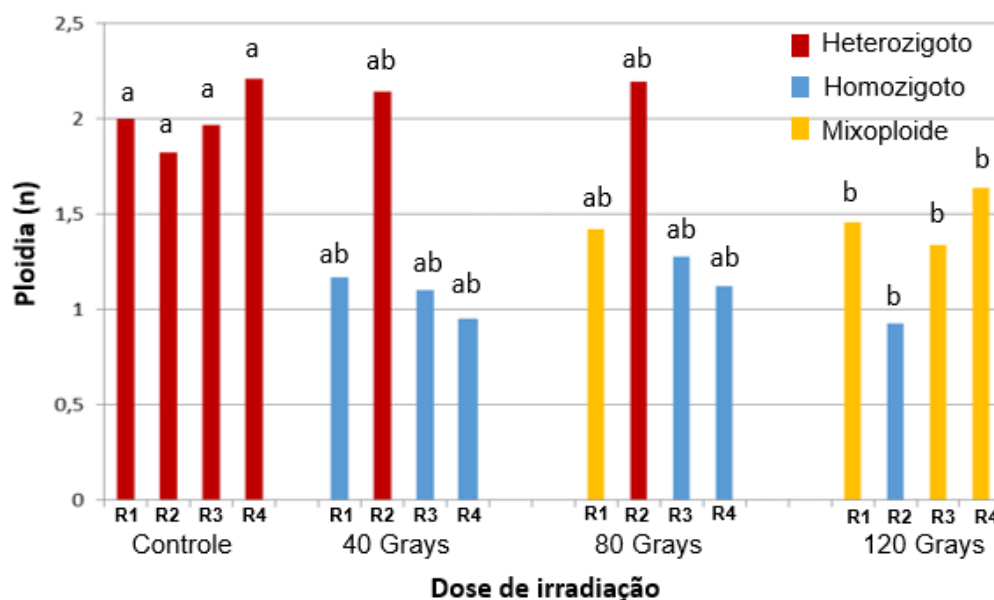
Os resultados também mostraram no progenitor masculino, na capacidade de induzir a partenogênese, sendo que a cultivar 'Intokazie' foi a mais eficiente e compatível entre os cruzamentos realizados. De acordo com Todorova et al. (1997), a influência do pólen da cultivar doadora é um importante fator sobre a eficácia do

método, sendo afetado pela interação com as doses de irradiação e o genótipo da planta pai.

#### 4.3.1 Análises de citometria

O nível de ploidia das plantas foi estimado através de citometria de fluxo e foram realizadas nas plantas oriundas das polinizações com as cultivares 'Olaf' e 'Intokazie'. As análises de citometria de fluxo evidenciaram diferentes concentrações de DNA em função das doses de irradiação utilizada.

As principais variações na ploidia das plantas foram observadas nas plântulas oriundas de pólen que receberam as doses de irradiação de 40 e 80 Grays. Nestes tratamentos verificamos que três plântulas no tratamento de 40 Grays e duas plântulas no tratamento de 80 Grays apresentaram ploidia reduzida pela metade (1x) quando comparadas com as plantas controles (2x) e ao parental materno (Figura 6).



**Figura 6.** Representação gráfica de haploidia de *Hippeastrum* em função da dose de irradiação utilizada. (R = repetição). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Contudo, houve uma variação na indução entre as amostras dentro da mesma dose, e essa discrepância entre o tamanho dos genomas pode ser atribuída a escalas evolutivas dessas espécies, principalmente as que apresentam os maiores e menores valores de DNA. Entretanto, outras variações podem não estar relacionadas apenas com a aparente complexidade dos genomas, mas sim com a existência de sequências repetitivas de DNA (CECCARELLI et al., 1995).

A dose de irradiação no grão de pólen que pode induzir a homozigose é variável entre as espécies, sendo que em trabalhos realizados com a planta *Iris pseudacorus* determinaram que a melhor dose foi de 300 ou 400 Grays (GROUH et al., 2015) ao passo que Sato et al. (2000) relataram que em cravo a melhor dose foi de 200 Grays.

#### 4.3.2 Análises moleculares

Foram extraídos o DNA das plantas oriundas dos cruzamentos 'Olaf' com 'Intokazie' nas doses 0, 40, 80 e 120 Gy. Os pares de primers testados foram 'PF 259', 'FP220' e 'FP116' descritos na literatura por Wang et al. (2018) para *Hippeastrum* sp., contudo estes não se mostraram eficientes para as análises de microssatélites, não sendo possível observar a amplificação das bandas.

## 5. Conclusões

- Não foi possível a obtenção de calos ou plântulas das cultivares de amarílis avaliadas, por meio da técnica de cultura de anteras e cultura de ovários;
- O uso de grãos de pólen irradiados para a polinização pode ser utilizado como uma ferramenta visando a indução de plântulas homozigotas nas cultivares de amarílis oriundas da polinização entre 'Olaf' e 'Intokazie';

## 6. Literatura Citada

ABDIN, M.Z. et al. **Plant Biotechnology**: principles and applications. Springer, 2017. 392 p.

AHMADI, B.; AHMADI, M.; DA SILVA, J. A. T. Microspore embryogenesis in Brassica: calcium signaling, epigenetic modification, and programmed cell death. **Planta**, v. 248, n. 6, p. 1339-1350, 2018.

AIDA, R. et al. Current researches in ornamental plant breeding. **Breeding Science**, v. 68, n. 1, p. 1-1, 2018.

ALAN, A. R. et al. Production and evaluation of gynogenic leek (*Allium ampeloprasum* L.) plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 125, n. 2, p. 249-259, 2016.

ARCHIPIANO, M. et al. **Method for producing haploid, doubled haploid and/or dihaploid plants by gynogenesis**. U.S. Patent n. 8,969,658, 3 mar. 2015.

ATA, A. et al. Effects of season, genotype, and nutrient medium on pepper anther culture and microspore development. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, v. 43, n. 2, p. 123-137, 2019.

AZADI, P. et al. Current status and biotechnological advances in genetic engineering of ornamental plants. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 6, p. 1073-1090, 2016.

BLASCO, M. et al. Induced parthenogenesis by gamma-irradiated pollen in loquat for haploid production. **Breeding Science**, v.16021, p. 1 - 7, 2016.

BOTELHO, F. B. S. et al. Ornamental plant breeding. **Ornamental Horticulture**, v. 21, n. 1, p. 9-16, 2015.

CAMPION, B.; SCHIAVI, M. Production of doubled haploid lines of onion (*Allium cepa* L.): Progress report and problems. In: **International Colloquium on Impact of Plant Biotechnology on Agriculture, Rogla (Slovenia), 5-7 Jun 1994**. 1994.

CARDOSO, J. C. Laeliocattleya 'Brazilian Girl Rosa': cultivar de orquídea para cultivo em vaso. **Horticultura Brasileira**, v. 28, n. 3, p. 378-381, 2010.

CHEN, J. F. et al. In vitro haploid and dihaploid production via unfertilized ovule culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 104, n. 3, p. 311-319, 2011.

DA SILVA, J.A.T et al. Transgenic orchids. **Scientia Horticulturae**, v. 130, n. 4, p. 673-680, 2011.

EECKHAUT, T. et al. Overcoming interspecific barriers in ornamental plant breeding. **Floriculture, ornamental and plant biotechnology**: advances and topical issues, 1. ed. London: Global Science Books, 2006. p. 540-551.

- ETIENNE, H. et al. Plant fidelity in somatic embryogenesis-regenerated plants. In: LOYOLA-VARGAS, V. M.; OCHOA-ALEJO, N. (eds.). **Somatic embryogenesis: fundamental aspects and applications**, 1. ed. Springer International Publishing, 2016. p. 121-150, 2016.
- FAYOS, O. et al. Doubled haploid production from Spanish onion (*Allium cepa* L.) germplasm: embryogenesis induction, plant regeneration and chromosome doubling. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 384, 2015.
- GERMANÀ, M.A. Anther culture for haploid and doubled haploid production. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 104, p. 283–300, 2011.
- GERMANÀ, M.A. Doubled haploid production in fruit crops. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 86, p. 131–146, 2006.
- GILLES, L. M. et al. Haploid induction in plants. **Current Biology**, v. 27, n. 20, p. R1095-R1097, 2017.
- GROUH, M. S. H et al. Induction of haploid plants in iris (*Iris pseudacorus*) by pollen irradiation. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, v. 39, n. 4, p. 596-600, 2015.
- IBRAHIM, A. M. et al. Callus induction from ovules of kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.). **Biotechnology**, v. 14, n. 2, p. 72-78, 2015.
- IBRAHIM, A. M. et al. Haploid induction in spring onion (*Allium fistulosum* L.) via gynogenesis. **Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 10-16, 2016.
- JAMIL, M.K. et al. Influence of sucrose and aluminium sulphate vase life of cut *Hippeastrum* flower (*Hippeastrum hybridum* Hort.) as influenced. **Bangladesh Journal of Agricultural Research**, v.41, p. 221–234, 2016.
- JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, M. Brazilian consumption of flowers and ornamental plants: habits, practices and trends. **Ornamental Horticulture**, v. 23, n. 2, p. 178-184, 2017.
- KARASAWA, M. M. G. et al. Gametic embryogenesis through isolated microspore culture in *Corylus avellana* L. **PlantCell, Tissue and Organ Culture**, v. 124, n. 3, p. 635-647, 2016.
- KELLER E. R. J., KORZUN, L. Haploidy in onion (*Allium cepa* L.) and other *Allium* species. In: Jain S M, Sopory S K and Veilleux R E (eds.). **In vitro Haploid Production in Higher Plants**, 1. ed. Kluwer Academic Publishers, vol. 3, 1996. p 51-75.
- KELLER, J. Results of anther and ovule culture in some species and hybrids in the genus *Allium* L. **Archiv für. Züchtungsforsch**, v. 20, n. 3, p. 189–97, 1990.
- KHAR, A. et al. Present status of haploidy research in onion (*Allium cepa*) - A review. **Indian Journal of Agricultural Sciences**, v. 89, n. 3, p. 396-405, 2019.



KUNDU, Manoj; DUBEY, Anil; MALLIK, S. K. Effect of gamma ray irradiation doses on pollen viability and in vitro germination in *Citrus*. **Indian Journal Agriculture Science**, v. 86, p. 106-109, 2016.

KURTAR, E. S. Anther culture in red cabbage (*Brassica oleraceae* L. var. capitata subvar. rubra): embryogenesis and plantlet initiation. **Ekin Journal of Crop Breeding and Genetics**, v. 3, n. 2, p. 82-87, 2017.

KURTAR, E. S.; BALKAYA, A. Production of in vitro haploid plants from in situ induced haploid embryos in winter squash (*Cucurbita maxima* Duchesne ex Lam.) via irradiated pollen. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 102, n. 3, p. 267-277, 2010.

MILER, N.; MUSZCZYK, P. Regeneration of callus and shoots from the ovules and ovaries of chrysanthemum in vitro. **Anais VIII International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding 1083**, p. 103-106. 2013.

MORRISON, R. A.; EVANS, D. A. Haploid plants from tissue culture: new plant varieties in a shortened time frame. **Nature Biotechnology**, v. 6, n. 6, p. 684, 1988.

SAENSEE, K. et al. Relationship between floret size and anther culture response in an ornamental sunflower. **Asia-Pacific Journal of Science and Technology**, v. 23, n. 2, p. 1-9, 2018.

SATO, S. et al. Production of doubled haploid plants of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) by pseudofertilized ovule culture. **Scientia horticultrae**, v. 83, n. 3-4, p. 301-310, 2000.

SEGUÍ-SIMARRO, J. M.; NUEZ, F. How microspores transform into haploid embryos: changes associated with embryogenesis induction and microspore-derived embryogenesis. **Physiologia Plantarum**, v. 134, n. 1, p. 1-12, 2008.

SHAHZAD, A. et al. Historical perspective and basic principles of plant tissue culture. **Plant Biotechnology: principles and applications**. Singapore: Springer, 2017. p. 1-36.

TODOROVA, M. et al. Doubled haploid production of sunflower (*Helianthus annuus* L.) through irradiated pollen-induced parthenogenesis. **Euphytica**, v. 97, n. 3, p. 249-254, 1997.

WANG, Y. et al. Revealing the complex genetic structure of cultivated amaryllis (*Hippeastrum hybridum*) using transcriptome-derived microsatellite markers. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 10645, 2018.

### **CAPÍTULO 3. Embriogênese somática em segmentos de pétalas de cultivares de *Hippeastrum* sp.**

#### **1. Resumo**

O gênero *Hippeastrum* sp. é popularmente conhecido como amarílis e suas cultivares destinam-se ao mercado de plantas ornamentais, devido a intensidade e diversidade de cores de suas flores. Sua propagação pode ser feita por meio de brotações laterais do bulbo e pela técnica de 'escamas duplas'. No entanto, essas práticas são lentas e sujeitas a problemas fitossanitários, em especial as viroses do tipo mosaico, as quais comprometem a qualidade do bulbo. Neste sentido, a técnica de embriogênese somática (ES) permite, a partir de células somáticas, produzir grande quantidade de indivíduos idênticos à planta mãe e livres de doenças. O presente trabalho teve como objetivo desenvolver um protocolo de ES e avaliar o efeito dos reguladores vegetais 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e thidiazuron (TDZ) na indução de brotações de segmentos de pétalas de amarílis nas cultivares 'Bingo', 'Ferrari', 'Minerva', 'Orange Souverign' e 'Red Knight'. Pétalas provenientes de botões florais em pré-antese foram seccionadas em segmentos de 1 cm<sup>2</sup>, os quais serviram de explantes para indução da ES. Estes foram inoculados em meio de cultura MS ½ contendo 2,4-D e TDZ nas concentrações de 0; 0,5; 1,0 e 2,0 mg L<sup>-1</sup> e suas combinações. Após 30 dias no escuro, os tratamentos que mostraram maiores porcentagens de calos foram transferidos para a luz e em um novo meio de

cultura MS  $\frac{1}{2}$  contendo  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de 6-benzilaminopurina (BAP). Os resultados obtidos demonstraram que o regulador 2,4-D foi o principal responsável pela indução de embriões somáticos. A cultivar 'Bin' apresentou as maiores taxas de indução da ES (48%) na concentração  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de 2,4-D e  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de TDZ. Para as cultivares 'Ferrari', 'Minerva', 'Orange Souverign' e 'Red Knight', a melhor concentração utilizada foi de  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de 2,4-D e TDZ, com taxas de ES de 7,25 % para 'Ferrari' e 'Minerva' e 19,25 % para 'Orange Souverign' e 'Red Knight'.

Palavras-chave: 2,4-D, TDZ, ES

## 2. Introdução

O amarílis (*Hippeastrum* sp.) é uma planta perene, com uma fase de desenvolvimento intermediária entre a vegetação e a floração, no qual há a formação do bulbo. É explorada comercialmente como ornamental e suas cultivares híbridas tem ganhado cada vez mais o mercado de flores, principalmente em épocas natalinas e para importações, devido principalmente a suas flores grandes e coloridas, variando entre o branco, vermelho, vinho, rosa e outras conforme a cultivar (TOMBOLATO; MATTHES; 1996; SUTLANA et al., 2011).

As cultivares híbridas dominam o mercado de flores de amarílis, normalmente duas hastes, em especial pelo colorido mais intenso e maior tamanho das flores, essa última ocorrida provavelmente pela poliploidização (BRANDHAM; LINEBERGER, 1991; POGGIO et al., 2014), comum no gênero *Hippeastrum*, levando ao aumento do tamanho de diferentes órgãos da planta, incluindo as suas flores. Por esse motivo, as cultivares híbridas, obtidas de cruzamentos interespecíficos e mesmo entre híbridos, seguido pela seleção massal, é a técnica atualmente utilizada na obtenção de novas cultivares (MEEROW, 2009).

A propagação dessas cultivares híbridas pode ser feita por meio de sementes, brotações laterais e pela técnica denominada 'escamas duplas' (no inglês, 'twin scales'). No entanto, estas práticas apresentam alguns entraves à produção como, por exemplo, a propagação através de sementes, que resulta em grandes variações entre as progênes, como coloração e tamanho das flores,

altura de planta e tempo de floração. As sementes têm sido limitadas ao uso em programas de melhoramento genético para o desenvolvimento de novas cultivares (EPHRATH et al., 2001a).

A multiplicação por meio das brotações laterais, embora resulte na produção de plantas clonais, é um processo lento e sazonal, uma vez que a planta produz 2-3 bulbos por ano (DOHARE, 1989; SMITH; BURROW; KURTEN, 1999). Outra técnica de propagação vegetativa, denominada 'escama dupla', ainda é muito utilizada e baseia-se na separação de secções das escamas do bulbo unidas ainda a uma parte da placa basal (prato do bulbo) e colocadas em substrato comercial para o desenvolvimento de novos pequenos bulbinhos (TOMBOLATO et al., 2001), permitindo a obtenção de 60 a 70 bulbinhos a partir de apenas um bulbo.

A exposição dos tecidos devido ao corte no bulbo, associados às condições de cultivo com altas temperaturas e umidade proporcionam condições favoráveis para o ataque de fungos, os quais levam à podridão das escamas; outro problema fitossanitário bastante enfrentado é o aparecimento de viroses do tipo mosaico, que geralmente não matam a planta, porém reduzem o seu valor de mercado já que afetam a qualidade das folhas e florescimento (ALEXANDRE, 2011). Já foram descritos na literatura mais de sete viroses diferentes que afetam o desenvolvimento da cultura, dentre essas viroses podemos citar como as principais causadores de perdas: vírus nerine (*Nerine latente vírus*), vira-cabeça do tomate, causado pelos tospovirus (*Tomato spotted wilt vírus – TSWV*).

Esses métodos tradicionais de propagação nem sempre suprem mais às crescentes demandas tecnológicas do mercado de flores. Em muitas espécies utilizadas na floricultura, a micropropagação, baseada no cultivo *in vitro* e em técnicas de cultura de tecidos é considerada um método mais eficiente de propagação de plantas (MUJIB, 2016), em especial naquelas plantas de propagação vegetativa com limitações reprodutivas, doenças de grande impacto econômico na cultura principal, e do qual a propagação vegetativa convencional não é capaz de suprir a demanda (CARDOSO et al., 2018).

Para tanto, a propagação de amarílis (*Hippeastrum* sp.), utilizando ferramentas da cultura de tecidos vegetais pode ser uma alternativa viável para a multiplicação clonal de híbridos elite, por meio de técnicas de cultura de tecidos vegetais, como a micropropagação ou a embriogênese somática já utilizadas em culturas similares como é o caso do lírio (MIR et al., 2012).

Das técnicas de cultura de tecidos aplicadas a propagação de plantas, a embriogênese somática é uma técnica *in vitro*, similar a micropropagação, em que células somáticas passam por diferentes estádios embriogênicos até se desenvolver em uma planta idêntica à planta mãe (GUERRA et al., 1999; PINHEIRO et al., 2014) e uma das suas vantagens é a reprodução em massa de plantas superiores geneticamente uniformes, em um tempo relativamente curto e a um preço competitivo (MAXIMOVA et al., 2002; KULUS, 2014). Contudo, levando-se em consideração a necessidade de produção de plantas saudáveis, o desenvolvimento *in vitro* de células e tecidos depende da combinação de fatores como o genótipo, o tipo de explante, reguladores vegetais, entre outros (PINHEIRO et al., 2014) que afetam a capacidade de indução e obtenção dos embriões somáticos.

Desses fatores, os reguladores vegetais desempenham um importante papel na embriogênese somática; os principais grupos são as auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico e etileno. As auxinas e as citocininas são consideradas fatores importantes na determinação da resposta embriogênica, isto porque participam na regulação do ciclo e divisão celular. Dentro da classe das auxinas, os mais utilizados são 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoacético), ANA (ácido naftaleno acético), Picloram e Dicamba (FEHÉR et al., 2003). E das citocininas, as mais utilizadas na cultura de tecidos são a 6-benzilaminopurina (BAP) e o Thidiazuron (TDZ) (LAKSHMANAN; TAJI, 2000).

O uso da técnica de embriogênese somática para a reprodução de plantas ornamentais já foi relatado em outras culturas como em antúrio (*Anthurium* sp.) (BHATTACHARYA et al., 2016), cíclamen (*Cyclamen* sp.) (TAGIPUR et al., 2016), orquídea *Phalaenopsis amabilis* (MOSE et al., 2017) e crisântemo (*Chrysanthemum* sp.) (MITIOUCHKNA et al., 2018).

Em amarílis já foram descritos trabalhos com o uso da técnica de embriogênese somática. No entanto, os explantes utilizados foram segmentos de escamas do bulbo os quais apresentam uma taxa de regeneração mais lenta e

que pela nossa experiência é um tecido de difícil assepsia visando a obtenção de segmentos livres de microrganismos. Dessa forma, a utilização de tecidos mais jovens pode ser uma alternativa viável, na obtenção de menores taxas de contaminação, regeneração mais rápida, maior número de embriões obtidos e menor instabilidade genética.

Sendo assim, no presente trabalho o objetivo foi avaliar o efeito dos reguladores vegetais ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e Thidiazuron (TDZ) na indução de embriogênese somática a partir de segmentos de pétalas de cinco cultivares de amarílis.

### 3. Material e Métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Fisiologia Vegetal e Cultura de Tecidos, do Departamento de Biotecnologia e Produção Vegetal e Animal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de São Carlos, campus Araras, SP.

Bulbos previamente induzidos a floração e provenientes de diferentes cultivares de amarílis foram fornecidos pela empresa Terra Viva (Holambra, SP). Os mesmos foram plantados em potes plásticos número 15 (1,4 L capacidade) contendo substrato a base de turfa (Pindstrup®, Danmark) 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 nas laterais com tela anti-afídeo branca, e irrigados por microaspersão, com quantidade de água aplicada de aproximadamente 5 mm/dia. As plantas foram cultivadas até o momento da floração, quando os botões florais em pré-antese foram coletados e utilizados para o experimento. Foi realizada uma única adubação no momento do plantio com o fertilizante comercial PlantProd® 20-20-20 na concentração de 1,0 g L<sup>-1</sup>.

Ao total foram realizados dois experimentos. O primeiro teve como objetivo testar os efeitos de reguladores vegetais Thidiazuron (TDZ) e Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) em diferentes combinações e concentrações na embriogênese somática de *Hippeastrum* cv. Bingo. Foram totalizados 16 tratamentos com reguladores vegetais 2,4-D e TDZ à 0; 0,5; 1,0 e 2,0 mg L<sup>-1</sup>.

O segundo experimento foi realizado posteriormente e utilizou os dados coletados do primeiro, sendo que as combinações de reguladores vegetais que apresentaram as melhores porcentagens de segmentos com embriões foram utilizadas, sendo essas 0,5 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D combinado com 0,5, 1,0 e 2,0 mg L<sup>-1</sup> de TDZ.

No segundo experimento o objetivo foi avaliar o efeito do genótipo na embriogênese somática de amarílis. Para tanto foram utilizadas quatro cultivares 'Ferrari', 'Minerva', 'Red Knight' e 'Orange Sovereign'. Todas as plantas foram selecionadas a partir de plantas com sintomas característicos de mosaico, causado por viroses, de forma que outro objetivo desse experimento foi obter embriões somáticos, para futuros testes de limpeza clonal a partir da ES.

Para ambos os experimentos foram utilizados para a assepsia botões florais em fase de pré-antese e submetidos à assepsia por imersão em álcool 70% por 30 segundos, seguido de imersão em solução de hipoclorito de sódio comercial a 2,0-2,5% por 15 minutos; após assepsia esses foram lavados por três vezes em água destilada autoclavada.

Após a assepsia, as três pétalas mais internas da flor foram retiradas e seccionadas em segmentos de 1cm<sup>2</sup> cada, os quais serviram de explantes para inoculação no meio de cultura e indução da ES. Estes foram inoculados em frascos de vidro de 250 mL contendo 30 mL meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com metade da concentração dos macronutrientes (MS<sup>1/2</sup>), suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 0,1 g L<sup>-1</sup> de inositol. O pH foi ajustado para 5,7 e o meio solidificado com 6,4 g L<sup>-1</sup> de Agar, antes de ser autoclavado a 120°C e 1 Kgf cm<sup>-2</sup> durante 20 minutos.

Após a inoculação dos segmentos de pétalas, os frascos foram mantidos em sala de crescimento em condições de escuro por 30 dias e após foram transferidos para a iluminação artificial composta por lâmpadas fluorescentes brancas, fotoperíodo de 16 horas e temperatura controlada em 25 ± 2° C por mais 30 dias. Após os 30 dias na luz, os segmentos que apresentaram formação de embriões foram transferidos para o meio de cultura MS <sup>1</sup>/<sub>2</sub> contendo 1 mg L<sup>-1</sup> de 6-benzilaminopurina (BAP), 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 0,1 g L<sup>-1</sup> de inositol.

Para ambos os experimentos, o delineamento foi inteiramente casualizado e cada tratamento foi composto por quatro repetições (frascos) contendo cada um,

quatro segmentos de pétalas. Os experimentos foram conduzidos em esquema fatorial, sendo o primeiro com concentrações dos reguladores 4 x 4 (2,4-D x TDZ), e o segundo 4 x 4 (cultivares x meios de cultura).

Dados expressos em porcentagem foram transformados em arcseno da raiz quadrada de  $X+1/100$ , previamente a realização da ANOVA e do teste de comparação de médias de Tukey, a 5% de probabilidade. Para as análises estatísticas foi utilizado o software AgroEstat (BARBOSA; JUNIOR, 2009).

#### 4. Resultados e Discussão

##### *Experimentos com segmentos de pétalas de amarílis na cultivar 'Bingo'*

Para a indução de embriões de amarílis na cultivar 'Bingo' os tratamentos com maior porcentagem de segmentos de pétalas induzidos a ES foram obtidos em meio de cultura contendo  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de 2,4-D acrescido das combinações de 0; 0,5; 1,0; ou  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  de TDZ (Tabela 1) (Figura 1). A adição do regulador vegetal 2,4-D foi essencial para a indução de calogênese e obtenção da ES, sendo que os embriões somáticos foram induzidos pela via indireta de regeneração, a qual envolveu a produção prévia de calos. A utilização de concentrações maiores de 2,4-D resultaram em redução da porcentagem de segmentos de pétalas induzidos a ES ( $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ ) ou mesmo não indução da ES ( $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ ).

A utilização isolada do TDZ no meio de cultura, até a concentração de  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ , não resultou na indução da ES em explantes de segmento de pétalas de amarílis (Tabela 1). Segundo Kanwar e Kumar (2010), o TDZ pode induzir a embriogênese somática em algumas espécies quando utilizado isoladamente. Contudo, no presente estudo com amarílis verificou-se que quando acrescido somente o TDZ, em todas as concentrações testadas, não houve a indução de embriões somáticos em amarílis, resultando em escurecimento e morte dos tecidos do segmento de pétalas.

Chung et al. (2007) estudando ES em *Dendrobium* na condição de uso isolado de TDZ na concentração de  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  verificou que a presença de luz nos 30 dias iniciais resultou em uma maior porcentagem (10%) de indução de embriões quando comparado na mesma concentração de TDZ, mas em condição de escuro



(0%). Em nosso trabalho com amarílis, os segmentos de pétalas foram mantidos por 30 dias no escuro antes de serem submetidos a luz.

É possível que a não resposta dos segmentos de pétalas ao TDZ esteja relacionada a ausência de luz, pois é conhecido que a presença de luz ativa a sinalização a citocininas em plantas (DOBISOVA et al., 2017), sendo necessários estudos que demonstrem o efeito do TDZ em explantes mantidos na presença de luz desde o início do cultivo *in vitro*. Diferentemente, as auxinas como o Ácido Naftalenoacético e o 2,4-D, parecem não ter uma resposta luz-dependente, resultando em calos e ES tanto na presença quanto na ausência de luz (PELKONEN; KAUPPI, 1999).

**Tabela 1.** Porcentagem de segmentos de pétalas de amarílis cv. 'Bingo' induzidas a embriogênese somática em diferentes concentrações e combinações de 2,4-D e TDZ no meio de cultura.

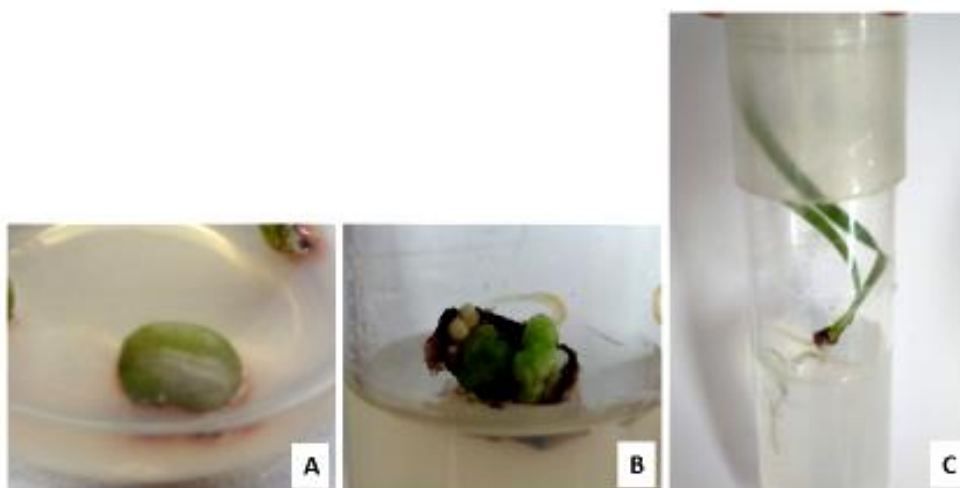
Tratamento (mg L <sup>-1</sup> )		Embriogênese somática (%)	Número de embriões somáticos por segmento	Número de plantas germinadas por segmento
2,4-D	TDZ			
0	0	0 c	0 b	0
0	0,5	0 c	0 b	0
0	1,0	0 c	0 b	0
0	2,0	0 c	0 b	0
0,5	0	32 a	7 a	2
0,5	0,5	36 a	8 a	2
0,5	1,0	48 a	12 a	4
0,5	2,0	40 a	10 a	2
1,0	0	20 b	5 b	1
1,0	0,5	32 b	5 b	1
1,0	1,0	36 b	6 b	0
1,0	2,0	0 c	0 b	0
2,0	0	0 c	0 b	0
2,0	0,5	0 c	0 b	0
2,0	1,0	0 c	0 b	0
2,0	2,0	0 c	0 b	0
CV (%)		80,95	23,96	-
2,4-D (F1)		22,47*	13,13*	-
TDZ (F2)		1,49 ns	1,10 ns	-
F1 x F2		1,01 ns	0,80 ns	-

Medias seguidas pelas mesmas letras na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. \*Significativo a 5% de probabilidade. NS – não significativo.

A combinação do 2,4-D a 0,5 mg L<sup>-1</sup> e do TDZ a 1,0 ou 2,0 mg L<sup>-1</sup> proporcionou incrementos na porcentagem de ES (até 48% ES), comparado ao uso isolado do 2,4-D na mesma concentração (32% ES), embora estatisticamente não tenha sido observado efeito do TDZ ou da interação 2,4-D x TDZ (Tabela 1). Apesar de existirem relatos de que

o uso de uma auxina juntamente com uma citocinina podem ser mais eficazes na indução de SE (JIMÉNEZ, 2005), em lírio (*Lilium regale*), foi observada indução da ES independentemente da adição de citocininas (PELKONEN; KAUPPI, 1999), similar aos resultados obtidos em nosso estudo com o amarílis. No entanto, Nhut et al. (2002) verificou que em lírio (*Lilium longiflorum*) a utilização de baixas concentrações ( $0,06 \text{ mg L}^{-1}$ ) de TDZ favoreceu maiores porcentagens (60%) na indução de SE, quando combinado com a auxina ANA ( $0,9 \text{ mg L}^{-1}$ ) do que quando utilizado apenas ANA no meio de cultura (40%).

A concentração de 2,4-D a  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  foi aquela que apresentou as maiores porcentagens de segmentos de pétalas contendo ES e número de embriões, sendo que concentrações maiores diminuiriam ( $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ ) ou inibiram completamente ( $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ ) a ES em amarílis. Contudo, o uso de concentrações mais altas foi descrita por Huang et al. (2005), no qual observaram que a melhor concentração para a indução de explantes de segmento de bulbo à ES (100%) em amarílis 'Hermitage' foi de  $5 \text{ mg L}^{-1}$  de 2,4-D e  $2 \text{ mg L}^{-1}$  de TDZ. Também, em *Narcissus pseudonarcissus* cvs. Golden (Amaryllidaceae), Sage et al. (2000) verificou que a adição de 2,4-D a 0,5, 5 ou  $10 \text{ mg L}^{-1}$  foi fundamental para a indução de SE em explantes oriundos das escamas de bulbo e folhas.



**Figura 1.** Embriogênese somática a partir de segmentos de pétalas de *Hippeastrum* cv. Bingo. **A:** segmentos verdes com 30 dias de cultivo no escuro. **B:** Embriões somáticos nos segmentos após 30 dias de exposição a luz. **C:** Germinação e desenvolvimento da plântula.

Estudos comprovam a evidência de que os reguladores vegetais atuam como sinais centrais para reprogramar as células para rotas da ES, sendo as auxinas, em especial o 2,4-D, associadas à indução e as citocininas ao desenvolvimento dos

embriões (FEHÉR, 2003). Além dos reguladores vegetais, vários outros fatores afetam diretamente a embriogênese somática em plantas como o tipo de explante, a idade e a qualidade fitossanitária da planta matriz (MUJIB et al., 2016).

#### *Efeito de diferentes genótipos e meios de cultura na indução da ES*

Nesse experimento foram utilizados os meios de cultura com melhores respostas em relação à indução da ES na cultivar 'Bingo', realizado anteriormente.

Para a indução da ES em amarílis nas quatro cultivares avaliadas: 'Ferrari'; 'Minerva', 'Orange Sovereign' e 'Red Knight', houve diferença estatística entre as cultivares avaliadas, sendo que o tratamento com maior porcentagem de segmento de pétalas induzidas a ES foram os que continham as concentrações de 0,5 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D e 0,5 mg L<sup>-1</sup> de TDZ (Tabela 2). Neste experimento, também foi observada a indução de calogênese e obtenção da ES a partir dos calos inicialmente obtidos. Não foram observados efeitos de interação entre os genótipos avaliados e os reguladores vegetais utilizados.

O desenvolvimento de um protocolo visando a ES, como o obtido nesse estudo com amarílis, pode também ser testada como uma ferramenta na obtenção de plantas livres de vírus. Embora estudos sobre a eficiência da ES na eliminação de viroses em amarílis ainda não tenha sido realizada, relatos sobre a eficiência da técnica de ES na obtenção de plantas livres de vírus já foram obtidos com videiras (GAMBINO et al., 2006), em três espécies de citros (D'ONGHIA et al., 2001), em cacau (QUAINOO et al., 2008) e cana-de-açúcar (PARMESSUR et al., 2002).

No entanto, a regeneração de embriões saudáveis está relacionada ao tipo de vírus e envolve mecanismos do movimento do vírus nos tecidos. Vírus limitados ao floema possuem menores chances de infecção aos embriões, isto porque não há ligação vascular entre os embriões somáticos (NEWTON; GOUSSARD, 1990). Em amarílis, as viroses mais relatadas na literatura são do tipo mosaico, causadas por vírus do tipo Y (potyvirus) (TOMBOLATO et al., 2001). Tais vírus caracterizam-se por movimentos do tipo célula a célula (URCUQUI-INCHIMA, 2001), o que pode implicar

em maiores chances de se obter embriões somáticos não infectados ou com menores concentrações virais.

**Tabela 2.** Porcentagem de segmentos de pétalas de amarílis de diferentes cultivares induzidas a embriogênese somática em diferentes concentrações e combinações de 2,4-D e TDZ no meio de cultura.

Meio de cultura 2,4-D + TDZ (mg L <sup>-1</sup> )	'Ferrari'			'Minerva'			'Orange Sovereign'			'Red Knight'		
	Embriogênese somática (%)	Nº de embriões somáticos/segmento	Nº de plantas/segmento	Embriogênese somática (%)	Nº de embriões somáticos/segmento	Nº de plantas/segmento	Embriogênese somática (%)	Nº de embriões somáticos/segmento	Nº de plantas/segmento	Embriogênese somática (%)	Nº de embriões somáticos/segmento	Nº de plantas/segmento
0,5 + 0,0	0 b	0 b	0	0 b	0b	0	7,25 b	3a	0	0 b	0b	0
0,5 + 0,5	7,25 a	3 a	0	7,25 a	2 a	1	19,25 a	3 a	2	19,75 a	3 a	2
0,5 + 1,0	13,50 b	2 b	0	7,25 b	3 b	2	0b	0b	0	19,75 b	3b	0
0,5 + 2,0	0 b	0 b	0	13,25 b	2 a	0	7,25 b	1b	0	13,50 b	2b	0
CV (%)	96,01	54,42	-	96,01	54,42	-	96,01	54,42	-	96,01	54,42	-
Meio de Cultura (F1)	2,68*	7,96*	-	2,68*	7,96*	-	2,68*	7,96*	-	2,68*	7,96*	-
Cultivar (F2)	0,79 ns	1,41 ns		0,79 ns	1,41 ns		0,79 ns	1,41 ns		0,79 ns	1,41 ns	
F1 x F2	0,90 ns	1,78 ns		0,90 ns	1,78 ns		0,90 ns	1,78 ns		0,90 ns	1,78 ns	

Médias seguidas por letras iguais entre coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. \*Significativo a 5% de probabilidade. NS – não significativo.

## 5. Conclusões

- Foi possível estabelecer um protocolo para obtenção de embriões somáticos provenientes de segmentos de pétalas em amarílis
- O 2,4-D na concentração de 0,5 mg L<sup>-1</sup> foi essencial para a indução de embriões somáticos em diferentes cultivares de *Hippeastrum* sp.
- O TDZ, combinado ao 2,4-D, aumentou a frequência de segmentos de pétalas induzidos a embriogênese somática das cultivares 'Ferrari', 'Minerva', 'Orange Sovereign' e 'Red Knight'.
- São necessárias análises de estabilidade genética e avaliação de eliminação de viroses das plântulas provenientes da ES.

## 6. Literatura Citada

ALEXANDRE, M. A. V. et al. Hippeastrum mosaic virus diagnosed in *Hippeastrum* and *Eucharis* in Brazil. **Journal of Plant Pathology**, p. 643 - 649, 2011.

BHATTACHARYA, C. et al. Direct somatic embryogenesis and genetic homogeneity assessment of regenerated plants of *Anthurium andraeanum* Linden cv. Fantasia. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 52, n. 5, p. 512 - 519, 2016.

BRAND, Mark H.; LINEBERGER, R. Daniel. The effect of leaf source and developmental stage on shoot organogenic potential of sweetgum (*Liquidambar styraciflua* L.) leaf explants. **Plant cell, tissue and organ culture**, v. 24, n. 1, p. 1-7, 1991.

CARDOSO, J.C et al. Micropropagation in the Twenty-First Century. In: LOYOLA-VARGAS V., OCHOA-ALEJO N.(eds.). **Plant Cell Culture Protocols: Methods in Molecular Biology**, 4. ed. Humana Press, New York, 2018, p. 17 - 46.

CHUNG, H. H. et al. Plant regeneration through direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Dendrobium*. **Biologia plantarum**, v. 51, n. 2, p. 346 - 350, 2007.

DOBISOVA, T. et al. Light controls cytokinin signaling via transcriptional regulation of constitutively active sensor histidine kinase CKI1. **Plant physiology**, v. 174, n. 1, p. 387-404, 2017.

DOHARE S.R. *Amaryllis* and *Hippeastrum*. In: **Commercial Flowers**. BOSE, T. K.; MAITI, R.G.; DHVA, R. S. (eds.). Naya Prokash, Calcutta, 1989. p. 573-593.

D'ONGHIA, A. M. et al. Elimination of Citrus psorosis virus by somatic embryogenesis from stigma and style cultures. **Plant Pathology**, v. 50, n. 2, p. 266-269, 2001.

- EPHRATH, J. E. et al. Various cutting methods for the propagation of *Hippeastrum* bulbs. **Biotronics**, v. 30, p. 75-83, 2001a.
- EPHRATH, J. E. et al. The effect of temperature on the development of *Hippeastrum*: A phytotron study. **Biotronics**, v. 30, p. 51 - 62, 2001b.
- FEHER, A. et al. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant cell, tissue and organ culture**, v. 74, n. 3, p. 201 - 228, 2003.
- GAMBINO, G. et al. Detection and elimination of viruses in callus, somatic embryos and regenerated plantlets of grapevine. **European Journal of Plant Pathology**, v. 114, n. 4, p. 397 - 404, 2006.
- GUERRA, M. P. et al. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES. A.; C.; CALDAS. L. S. (Eds.). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: EMBRAPA, v. 2, p. 533 - 568, 1999.
- HUANG, C. L. et al. In vitro morphogenesis from pedicels of *Hippeastrum x hybridum*. **Journal of the Faculty Agriculture**, v. 50, p. 27 - 33, 2005.
- 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.
- KANWAR, J. K.; KUMAR, S. Influence of growth regulators and explants on shoot regeneration in carnation. **Horticultural Science**, v. 36, n. 4, p. 140-146, 2010.
- KARALIJA, E. et al. Somatic embryogenesis and in vitro plantlet regeneration of *Lilium martagon* L. var. *cattaniae* Vis. **Biologica Nyssana**, v. 1, n. 1 - 2, 2010.
- KULUS, D. Biotechnological methods of ornamental plants reproduction. In: Mucha-Szajek, E. (ed) **Jakość życia w badaniach młodych naukowców**. Maiuscula, 2014, pp 87 – 104.
- LAKSHMANAN, P.; TAJI, A. Somatic embryogenesis in leguminous plants. **Plant Biology**, v. 2, n. 2, p. 136-148, 2000.
- LI, X. et al. Somatic embryogenesis, secondary somatic embryogenesis, and shoot organogenesis in *Rosa*. **Journal of plant physiology**, v. 159, n. 3, p. 313 - 319, 2002.
- MAXIMOVA, S. N. et al. Efficiency, genotypic variability, and cellular origin of primary and secondary somatic embryogenesis of *Theobroma cacao* L. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 38, n. 3, p. 252 - 259, 2002.
- MEEROW, A. W. The florida series of hybrid amaryllis: five new *Hippeastrum* cultivars. **Horticultural Science**, v. 49, n. 8, p. 1102 - 1107, 2014.
- MIR, J. I. et al. *In vitro* propagation of *Lilium* (*Lilium longiflorum*). **Indian Journal of Agricultural Sciences**, v. 82, n. 5, p. 455, 2012.

MITIOUCHKNA, T. et al. Genetic transformation of different *Chrysanthemum* cultivars via somatic embryogenesis. **Acta horticulturae**, n. 1201, p. 577 - 582, 2018.

MOSE, W. et al. The influence of thidiazuron on direct somatic embryo formation from various types of explant in *Phalaenopsis amabilis* (L.) blumeorchid. **HAYATI Journal of Biosciences**, v. 24, n. 4, p. 201 - 205, 2017.

MUJIB, A. et al. Callus induction, somatic embryogenesis and chromosomal instability in tissue culture raised Hippeastrum (*Hippeastrum hybridum* cv. United Nations). **Propagation Ornamental Plants**, v. 7, p. 169 - 174, 2007.

MUJIB, Abdul (Ed.). **Somatic embryogenesis in ornamentals and its applications**. New York: Springer, 2016.

NEWTON, D. J.; GOUSSARD, P. G. The ontogeny of somatic embryos from in vitro cultured grapevine anthers. **South African Journal of Enology & Viticulture**, v. 11, n. 2, p. 70 - 75, 1990.

NHUT, D. T. et al. The changes in shoot regeneration potential of protocorm-like bodies derived from *Lilium longiflorum* young stem explants exposed to medium volume, pH, light intensity and sucrose concentration pretreatment. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 77, n. 1, p. 79-82, 2002.

PANATTONI, A. et al. Elimination of viruses in plants: twenty years of progress. **Spanish Journal of Agricultural Research**, n. 1, p. 173 - 188, 2013.

PAREEK, A.; KOTHARI, S. L. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf cultures of ornamental species of *Dianthus*. **Scientia Horticulturae**, v. 98, n. 4, p. 449 - 459, 2003.

PARMESSUR, Y. et al. Sugarcane yellow leaf virus and sugarcane yellows phytoplasma: elimination by tissue culture. **Plant Pathology**, v. 51, n. 5, p. 561 - 566, 2002.

PELKONEN, VK.; KAUPPI, A. The effect of light and auxins on the regeneration of lily (*Lilium regale* Wil.) cells by somatic embryogenesis and organogenesis. **International journal of plant sciences**, v. 160, n. 3, p. 483 - 490, 1999.

PEREIRA, R. et al. Produção de mudas de açucena (*Hippeastrum elegans* (Spreng.) HE Moore). **Embrapa Agroindústria Tropical-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2018.

PINHEIRO, M. V. M. et al. Somatic embryogenesis in anthurium (*Anthurium andraeanum* cv. Eidibel) as affected by different explants. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 36, n. 1, p. 87-98, 2014.

POGGIO, L. et al. Genome downsizing and karyotype constancy in diploid and polyploid congeners: a model of genome size variation. **AoB Plants**, v. 6, p. 1 - 11, 2014.



- QUAINOO, A. K. et al. The effectiveness of somatic embryogenesis in eliminating the cocoa swollen shoot virus from infected cocoa trees. **Journal of Virological Methods**, v. 149, n. 1, p. 91 - 96, 2008.
- SAGE, D. O. et al. Somatic embryogenesis in *Narcissus pseudonarcissus* cvs. Golden Harvest and St. Keverne. **Plant Science**, v. 150, n. 2, p. 209-216, 2000.
- SAN JOSÉ, M. C. et al. Somatic embryogenesis in *Camellia japonica* L.: challenges and future prospects. **Somatic Embryogenesis in Ornamentals and Its Applications**, p. 91-105. 2016.
- SILVA, T. E. R. et al. Somatic embryogenesis and plant regeneration in elite clones of *Theobroma cacao*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 10, p. 1433 -1436, 2008.
- SMITH, R. H.; BURROWS, J.; KURTEN, K. Challenges associated with micropropagation of *Zephyranthes* and *Hippeastrum* sp. (Amaryllidaceae). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 35, n. 4, p. 281 - 282, 1999.
- SUTLANA, J. et al. In vitro bulb production in *Hippeastrum* (*Hippeastrum hybridum*). **Journal of Central European Agriculture**, v. 11, n. 4, p. 469 - 474, 2011.
- TAGIPUR, E. M. et al. Somatic embryogenesis, cryopreservation, and in vitro mutagenesis in Cyclamen. In MUJIB, A (ed). **Somatic Embryogenesis in Ornamentals and Its Applications**. Springer, 2016. p. 155 - 167.
- TOMBOLATO, A. F. C. et al. Micropropagação de *Hippeastrum hybridum* 'Apple blossom', mediante escamas duplas. **Ornamental Horticulture**, v. 7, n. 1, p. 35 - 40, 2001.
- TOMBOLATO, A.; MATTHES, L. Collection of *Hippeastrum* spp., *Alstroemeria* spp. and other Brazilian bulbous species. **Anais III International Symposium on New Floricultural Crops 454**, 1996. p. 91 - 98.
- TRIBULATO, A.; BRANCA, F. Somatic embryogenesis from flower pedicels of oriental lilies. **Anais II International Symposium on the Genus Lilium 900**, 2010. p. 369 – 376.
- URCUQUI-INCHIMA, S. Potyvirus proteins: a wealth of functions. **Virus Research**, v. 74, p. 157-175, 2001.
- WANG, Yi et al. Revealing the complex genetic structure of cultivated amaryllis (*Hippeastrum hybridum*) using transcriptome-derived microsatellite markers. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 10645, 2018.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando que a técnica para a conservação de grãos de pólen ainda não foi relatada na literatura para *Hippeastrum* sp., os resultados obtidos foram satisfatórios.

A temperatura de -20°C foi eficiente por até 125 dias na manutenção da integridade e viabilidade polínica das cultivares 'Intokazie' e 'Pink Panther'. As cultivares 'Bolero' e 'Olaf' apresentaram declínio aos 125 dias, e a cultivar 'Bull' apresentou maior recalcitrância e sensibilidade ao armazenamento, perdendo sua viabilidade aos 75 dias.

Como ferramenta para o melhoramento genético, a embriogênese gamética pode ser utilizada para a indução de plantas homozigóticas, contudo por meio da cultura de anteras e ovários não foi possível a obtenção de embriões nas cultivares avaliadas. No entanto, a ginogênese *in situ* se mostrou eficiente para a indução de homozigose quando utilizadas as doses de irradiação de 40 e 80 Grays na polinização entre 'Olaf' e 'Intokazie'.

A embriogênese somática se apresenta como uma alternativa para a propagação de *Hippeastrum* sp., sendo neste trabalho obtido um protocolo a partir de segmentos de pétalas para as cultivares avaliadas. Contudo, é necessário o uso conjunto de 2,4-D e TDZ, pois quando avaliados de forma independente, não houve

indução de embriões somáticos. Para a cultivar 'Bingo' foi possível obter até quatro plântulas por segmento de pétala.