

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
CURSO DE DOUTORADO EM AGRONOMIA**

CAMILA AUDREY DOS REIS

PERSPECTIVAS NO CULTIVO *in vitro* DE *Clivia miniata* (AMARYLLIDACEAE)

PONTA GROSSA

2024

CAMILA AUDREY DOS REIS

PERSPECTIVAS NO CULTIVO *in vitro* DE *Clivia miniata* (AMARYLLIDACEAE)

Tese de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Área de Concentração: Fitotecnia e Fitossanidade. Linha de Pesquisa: Fisiologia, Melhoramento e Manejo de Culturas.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Antonio Ayub

PONTA GROSSA

2024

R374 Reis, Camila Audrey dos
 Perspectivas no cultivo *in vitro* de *Clivia miniata* (Amaryllidaceae) / Camila
 Audrey dos Reis. Ponta Grossa, 2024.
 67 f.

 Tese (Doutorado em Agronomia - Área de Concentração: Fitotecnia e
 Fitossanidade), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

 Orientador: Prof. Dr. Ricardo Antônio Ayub.

 1. Calogênese. 2. Clívia. 3. Cultura tecidos. 4. Germinação in vitro. 5.
 Reguladores crescimento vegetal. I. Ayub, Ricardo Antônio. II. Universidade
 Estadual de Ponta Grossa. Fitotecnia e Fitossanidade. III.T.

CDD: 634



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
Av. General Carlos Cavalcanti, 4748 - Bairro Uvaranas - CEP 84030-900 - Ponta Grossa - PR - <https://uepg.br>

TERMO

CAMILA AUDREY DOS REIS

Cultivo in vitro de *Clivia miniata* (AMARYLLIDACEAE).

Dissertação apresentada para obtenção do
título de doutor em Agronomia na Estadual
de Ponta Grossa, área de Agricultura.

Ponta Grossa, 05 de fevereiro de 2024.

Prof. Dr. Ricardo Antonio Ayub - Orientador
Doutor em Biologia Celular e Molecular
Universidade Estadual de Ponta Grossa

Prof. Dr. Miguel Pedro Guerra
Doutor em Botânica
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Dra. Cleusa Bona
Doutor em Ciências Biológicas - Botânica
Universidade Federal do Paraná

Profa. Dra. Alessandra Ferreira Ribas
Doutor em Biologia Integrada de Plantas
Universidade Federal do Paraná

Profa. Dra. Juliana Degenhardt-Goldbach
Doutor em Ciências da Horticultura
EMBRAPA



Documento assinado eletronicamente por **juliana degenhardt goldbach, Usuário Externo**, em 17/05/2024, às 09:36, conforme Resolução UEPG CA 114/2018 e art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **CLEUSA BONA, Usuário Externo**, em 17/05/2024, às 09:46, conforme Resolução UEPG CA 114/2018 e art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **ALESSANDRA FERREIRA RIBAS, Usuário Externo**, em 17/05/2024, às 09:54, conforme Resolução UEPG CA 114/2018 e art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **Ricardo Antonio Ayub, Professor(a)**, em 17/05/2024, às 14:07, conforme Resolução UEPG CA 114/2018 e art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **Miguel Pedro Guerra, Usuário Externo**, em 28/05/2024, às 14:58, conforme Resolução UEPG CA 114/2018 e art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida no site <https://sei.uepg.br/autenticidade> informando o código verificador **2008850** e o código CRC **392318D8**.

Aos meus pais, Rosália e Mauro,
alicerces da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos a Deus, por estar comigo em todos os momentos e não permitir que eu desistisse, mesmo quando pensei ser a única saída.

À minha família, por todo o apoio e compreensão, e por me ensinarem a ter determinação em tudo o que propuser-me a fazer.

Aos meus amigos, que deixaram os fardos mais leves de carregar. Em especial agradeço Helyemari, que além de colega de laboratório foi uma verdadeira amiga, com a qual sei que posso contar por toda a vida.

Às professoras Cristina Ayub, Cleusa Bona e Rosangela Tardivo, por todo o apoio em minhas análises.

Colegas de laboratório que em muitos momentos auxiliaram nos experimentos.

Aos alunos, técnicos e professores de outros laboratórios por disponibilizarem equipamentos ou recursos essenciais para essa pesquisa.

À UEPG e CAPES, por fornecerem estrutura e suporte financeiro para o desenvolvimento da pesquisa. Ao Viveiro Porto Amazonas, por fornecer todo o material vegetal e utilizado nesta pesquisa.

E principalmente agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Ricardo Antônio Ayub, por toda a paciência e apoio.

A todos àqueles que de alguma forma contribuíram para que esse trabalho fosse possível, muito obrigada!

RESUMO

A crescente preocupação com a redução de danos ambientais e a busca por maior sustentabilidade na produção agrícola têm colocado pressão sobre produtores, que buscam simultaneamente novas tecnologias para aumentar o rendimento e a qualidade dos produtos. A biotecnologia vegetal emerge como uma ferramenta complementar à agricultura tradicional em larga escala, oferecendo benefícios como propagação clonal massiva, obtenção de plantas livres de doenças, variação somaclonal, gestão de ploidia, conservação de germoplasmas e transformação genética. Dentro desse contexto, a *Clivia miniata*, uma planta herbácea perene, destaca-se como uma espécie de interesse devido ao seu valor ornamental e potencial farmacológico, graças à produção de alcaloides como a licorina, que apresenta benefícios antivirais, antidiabéticos e antimicrobianos. No entanto, o cultivo comercial *in vitro* dessa planta enfrenta desafios, como o tempo necessário para propagação e taxas de multiplicação relativamente baixas. O estudo busca superar essas barreiras por meio da aplicação de técnicas de cultura de tecidos vegetais e biotecnologia. A pesquisa se concentra em otimizar a indução de calos em *C. miniata* por meio de experimentos utilizando diferentes reguladores de crescimento. No capítulo 2, a pesquisa examina os efeitos da concentração de sacarose e da maturidade dos frutos na germinação *in vitro* de sementes de *Clivia miniata* e na subsequente indução de calos. O teste de viabilidade revelou que até 70% das sementes eram viáveis. Foram testadas cinco concentrações de sacarose (0, 10, 20, 30 e 40 g.L⁻¹) no meio de cultivo MS. Durante a germinação *in vitro*, a concentração de sacarose afetou a velocidade de germinação, sendo que concentrações mais baixas resultaram em maior germinação para sementes de frutos maduros. A indução de calos a partir das plântulas germinadas *in vitro* teve resultados variáveis, com altas concentrações de reguladores de crescimento levando a mortalidade significativa dos explantes. No entanto, combinações específicas de reguladores de crescimento mostraram altas taxas de sobrevivência e indução de calos. Os resultados indicam que a concentração ideal de sacarose para a germinação *in vitro* é 5,1 g.L⁻¹, e a escolha apropriada de reguladores de crescimento, especialmente a citocinina BAP, é crucial para a eficácia na indução de calos. O terceiro capítulo da tese consistiu de dois experimentos. No Experimento I, sementes de *Clivia miniata* foram testadas para viabilidade e, após desinfecção, os embriões foram transferidos para tubos de vidro contendo meio de cultivo MS e diferentes reguladores de crescimento. O experimento durou 120 dias em condições específicas de temperatura e ausência de luz. Os explantes foram avaliados visualmente a cada 30 dias, e a regeneração dos calos foi realizada em meio suplementado com cinetina e ácido naftalenoacético. A análise histológica dos calos revelou a ausência de embriogênese somática. No Experimento II, os calos foram cultivados em biorreatores de imersão temporária com diferentes combinações de reguladores de crescimento, sendo que o tratamento com 4 BAP + 4 ANA destacou-se pela maior massa fresca após 60 dias. A análise da indução de calos mostrou resultados notáveis, especialmente na combinação 4 BAP + 4 2,4-D, com aumento constante na porcentagem de calos induzidos e sobrevivência dos explantes acima de 75%. Tratamentos contendo ácido naftalenoacético resultaram em maior produção de massa fresca. A citocinina BAP é identificada como essencial para a calogênese, independentemente da auxina utilizada. Em resumo, o estudo oferece insights valiosos para otimizar as condições de indução de calos em *Clivia miniata*, contribuindo não apenas para o avanço do cultivo *in vitro* desta espécie, mas também para a exploração de seu potencial farmacêutico.

Palavras-chave: calogênese, clívia, cultura de tecidos vegetais, germinação *in vitro* de sementes, reguladores de crescimento vegetal.

ABSTRACT

The growing concern for reducing environmental damage and the pursuit of greater sustainability in agricultural production have placed pressure on producers who are simultaneously seeking new technologies to increase yield and product quality. Plant biotechnology emerges as a complementary tool to traditional large-scale agriculture, offering benefits such as massive clonal propagation, obtaining disease-free plants, somaclonal variation, ploidy management, germplasm conservation, and genetic transformation. Within this context, *Clivia miniata*, a perennial herbaceous plant, stands out as a species of interest due to its ornamental value and pharmacological potential, attributed to the production of alkaloids like licorine, which has antiviral, antidiabetic, and antimicrobial benefits. However, the commercial *in vitro* cultivation of this plant faces challenges such as the time required for propagation and relatively low multiplication rates. The study aims to overcome these barriers through the application of tissue culture and biotechnology techniques, focusing on optimizing callus induction in *C. miniata* through experiments using different growth regulators. In Chapter 2, the research examines the effects of sucrose concentration and fruit maturity on the *in vitro* germination of *Clivia miniata* seeds and subsequent callus induction. Viability testing revealed that up to 70% of the seeds were viable. Five sucrose concentrations (0, 10, 20, 30, and 40 g.L⁻¹) were tested in the MS culture medium. During *in vitro* germination, sucrose concentration affected the germination speed, with lower concentrations resulting in higher germination for seeds from mature fruits. Callus induction from *in vitro* germinated seedlings yielded variable results, with high concentrations of growth regulators leading to significant explant mortality. However, specific combinations of growth regulators showed high survival rates and callus induction. The results indicate that the optimal sucrose concentration for *in vitro* germination is 5.1 g.L⁻¹, and the appropriate choice of growth regulators, especially the cytokinin BAP, is crucial for effective callus induction. The third chapter of the thesis consisted of two experiments. In Experiment I, *clivia* seeds were tested for viability, and after disinfection, embryos were transferred to glass tubes containing MS culture medium and different growth regulators. The experiment lasted 120 days under specific temperature and light absence conditions. Explants were visually evaluated every 30 days, and callus regeneration was performed in medium supplemented with kinetin and naphthaleneacetic acid. Histological analysis of the callus revealed the absence of somatic embryogenesis. In Experiment II, callus was cultivated in temporary immersion bioreactors with different combinations of growth regulators, and the treatment with 4 BAP + 4 NAA stood out for higher fresh mass after 60 days. Callus induction analysis showed notable results, especially in the combination 4 BAP + 4 2,4-D, with a constant increase in the percentage of induced callus and explant survival above 75%. Treatments containing naphthaleneacetic acid resulted in higher fresh mass production. Cytokinin BAP is identified as essential for callogenesis, regardless of the auxin used. In summary, the study provides valuable insights to optimize callus induction conditions in *Clivia miniata*, contributing not only to the advancement of *in vitro* cultivation of this species but also to the exploration of its pharmaceutical potential.

Keywords: callogenesis, *clivia*, *in vitro* seed germination, growth regulators, plant tissue culture.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Morfologia de *Clivia miniata*. A) Planta inteira; B) Rizoma com raízes e brotos adventícios; C) Inflorescência do tipo pseudo-umbelada; D) Frutos em fase inicial de desenvolvimento.....15
- Figura 2 – A) Frutos de *Clivia miniata*. À esquerda: fruto maduro; à direita: fruto imaturo; B) Fruto maduro aberto de *C. miniata*; C) Semente de *C. miniata* seccionada longitudinalmente expondo o embrião. m – mesocarpo, s – semente, ec – endocarpo, eb – embrião, ed – endosperma, t – tegumento.....32
- Figura 3 – Embriões *C. miniata* corados por cloreto de tetrazólio.....33
- Figura 4 – Caules e bases foliares seccionados de *C. miniata* germinadas in vitro utilizados como fonte de explantes para indução de calos.....34
- Figura 5 – Germinação de *C. miniata* in vitro em meio semissólido (A); B) Plântulas de clívia com diferentes idades.....36
- Figura 6 – Germinação in vitro de sementes de *Clivia miniata* providas de frutos maduros e imaturos em função da concentração de sacarose no meio de cultivo.....37
- Figura 7 – Sistemas componentes do biorreator de imersão temporária. a) módulos lógico e físico; b) sistema de duplo recipiente.....52
- Figura 8 – Calos de *Clivia miniata*. a) calo compacto; b) calo organogênico com raízes adventícias e estrutura globular em formação na sua superfície; c) calo embriogênico embrião somático na fase globular. es = embrião somático; r = raiz; b = broto adventício.....57
- Figura 9 – Calos de *Clivia miniata* após 120 dias de cultivo em meio de regeneração. a) calo compacto; b) calo organogênico com raízes adventícias e estrutura globular em formação na sua superfície; c) calo apresentando broto. eg = estrutura globular; r = raiz; b = broto.....58
- Figura 10 – Calos de *Clivia miniata* após 60 dias sendo cultivados em biorreator. a) calo oxidado com embrião somático; b) calo com broto adventício. es = embrião somático, seta = broto adventício.....58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tratamentos empregados na indução de calos a partir de caules e bases foliares de clívias com 90 dias germinadas <i>in vitro</i>	35
Tabela 2 – Viabilidade de embriões zigóticos de <i>Clivia miniata</i> corados por 2,3,5 trifenil brometo de tetrazólio. 0% correspondem a embriões mortos; embriões 100% corados foram considerados viáveis.....	32
Tabela 3 – Sementes de <i>Clivia miniata</i> germinadas <i>in vitro</i> em função da concentração de sacarose e do grau de maturação das mesmas.....	36
Tabela 4 – Porcentagem de germinação de sementes de <i>Clivia miniata</i> em função da concentração de sacarose e do grau de maturação dos frutos após 60 dias de cultivo <i>in vitro</i>	37
Tabela 5 – Sobrevivência e porcentagem de indução de calos a partir de caules e bases foliares de <i>Clivia miniata</i> com 90 dias germinadas <i>in vitro</i> , após 3 meses de cultivo em meio de cultura com reguladores de crescimento.....	38
Tabela 6 – Tratamentos empregados na indução de calos a partir de embriões zigóticos <i>in vitro</i>	58
Tabela 7 – Sobrevivência dos explantes de embriões zigóticos de <i>Clivia miniata</i> após 120 dias de cultivo em meio de cultivo com diferentes reguladores de crescimento.	53
Tabela 8 – Porcentagem de indução de calos em embriões zigóticos de <i>Clivia miniata</i> após 30, 60, 90 e 120 dias em meio cultivo com diferentes combinações de reguladores de crescimento.....	54
Tabela 9 - Massa fresca dos calos obtidos a partir de embriões zigóticos de <i>Clivia miniata</i> após 120 dias de cultivo em meio de indução de calos.	56
Tabela 10 – Ganho de massa fresca em calos de <i>Clivia miniata</i> cultivados por 60 dias em biorreator de imersão temporária.....	59

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	12
CAPÍTULO 1 - REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
1.1 O GÊNERO CLIVIA.....	14
1.1.1 <i>Clivia miniata</i>	14
1.2 CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS.....	16
1.2.1 Cultura de Calos.....	18
1.2.2 Embriogênese Somática.....	19
1.2.3 Biorreatores de Imersão Temporária.....	20
1.3 CULTURA DE TECIDOS DE <i>C. miniata in vitro</i>	21
REFERÊNCIAS.....	23
 CAPÍTULO 2 - PLÂNTULAS DE <i>Clivia miniata</i> GERMINADAS <i>in vitro</i> SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE UTILIZADAS COMO EXPLANTES PARA INDUÇÃO DE CALOS	 28
2.1 INTRODUÇÃO.....	29
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
2.2.1 Experimento I - Germinação <i>in vitro</i>	31
2.2.1.1 Material vegetal.....	31
2.2.1.2 Teste de viabilidade das sementes.....	32
2.2.1.3 Introdução <i>in vitro</i>	33
2.2.1.4 Análise estatística.....	33
2.2.2 Experimento II - Indução de Calos.....	34
2.2.2.1 Obtenção dos explantes.....	34
2.2.2.2 Meio de cultivo.....	34
2.3 RESULTADOS.....	35
2.3.1 Experimento I - Germinação de Sementes <i>in vitro</i>	35
2.3.2 Experimento II - Indução de Calos.....	37
2.4 DISCUSSÃO.....	39
2.5 CONCLUSÃO.....	41
REFERÊNCIAS.....	41
 CAPÍTULO 3 - INDUÇÃO E CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE CALOS A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE <i>Clivia miniata</i>.....	 45
3.1 INTRODUÇÃO.....	46
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	49
3.2.1 Experimento I – Indução de Calos.....	49
3.2.1.1 Material vegetal.....	49
3.2.1.2 Assepsia e introdução <i>in vitro</i>	50
3.2.1.3 Condução do experimento.....	50
3.2.1.4 Análise estatística.....	51

3.2.1.5 Regeneração.....	51
3.2.1.6 Avaliação histológica.....	51
3.2.2 Experimento II – Cultura de Calos de <i>C. miniata</i> em Biorreator de Imersão Temporária.	51
3.2.2.1 Material vegetal.....	51
3.2.2.2 Sistema de biorreator.....	52
3.2.2.3 Meio de cultivo.....	53
3.3 RESULTADOS.....	53
3.3.1 Indução de Calos.....	53
3.3.2 Massa Fresca.....	55
3.3.3 Avaliação Anatômica.....	56
3.3.4 Cultivo em Meio de Regeneração.....	57
3.3.5 Cultivo em Biorreator.....	58
3.4 DISCUSSÃO.....	59
3.5 CONCLUSÃO.....	63
REFERÊNCIAS.....	63

INTRODUÇÃO GERAL

As mudanças climáticas são uma realidade. Seus impactos já podem ser sentidos, por meio de eventos meteorológicos extremos ao redor do planeta, causando impactos adversos generalizados e a perdas e danos relacionados à natureza e às pessoas (IPCC, 2023). Dentre estes impactos, destaca-se o aumento da frequência e intensidade dos eventos climáticos extremos (ECE), por exemplo: extremos de calor e precipitação, com ocorrência de inundações, alagamentos, deslizamentos, movimentos de massa (solo, rochas ou lama) e seca para algumas regiões (Marengo, 2016). Os danos econômicos decorrentes das alterações climáticas foram detectados em setores particularmente vulneráveis ao clima, como: agricultura, silvicultura, pesca, geração de energia e turismo.

A agricultura, atividade altamente dependente de fatores climáticos, é grandemente afetada pelas alterações que já estão ocorrendo. Estas mudanças podem afetar a produtividade e o manejo das culturas. Uma preocupação crescente com a redução de danos ambientais e maior sustentabilidade na produção agrícola, tem provocado uma pressão cada vez maior sobre os produtores que, paralelamente, aumentam suas exigências por novas tecnologias que permitam maior rendimento e melhor qualidade de seus produtos (Christou; Twyman, 2004). Assim, a biotecnologia vegetal pode complementar a agricultura tradicional em escala industrial (Rao; Ravishankar, 2002).

Dentre estas tecnologias estão as técnicas de cultura de tecidos vegetais, que trouxeram contribuições imensuráveis para o avanço das ciências agrícolas nos últimos tempos, e hoje constituem uma ferramenta indispensável na agricultura moderna. Seus benefícios, contudo, já deixaram de ser considerados apenas parte da produção agrícola. Além de proporcionar a propagação clonal massiva de genótipos de interesse que possam ser introduzidos nos sistemas de produção, é possível ainda a propagação de plantas livres de doenças, geração de variação somaclonal, gestão e modificação nos níveis de ploidia, conservação de germoplasmas de plantas com interesse agrícola ou ameaçadas de extinção e transformação genética (García-Gonzáles *et al.*, 2010).

Uma espécie de grande interesse e valor agregado nesse nicho é a *Clivia miniata*, uma planta herbácea perene, pertencente à família Amaryllidaceae, nativa da África e que produz belas inflorescências pseudo-umbeladas (Ran; Simpson 2005; Duncan, 2008). É bastante cultivada em países como EUA, Japão, China, Austrália, Nova Zelândia e mais expressivamente em diversos países da Europa (Wang *et al.*, 2011). Além de seu valor ornamental, *C. miniata* também foi relatada como tendo importância medicinal. A planta

contém inúmeros alcaloides, com destaque para a licorina, substância que estimula as contrações uterinas, facilitando o trabalho de parto. Além disso, possui propriedades antivirais, antidiabéticas e antimicrobianas. Suas folhas, raízes, bulbos e rizomas são usados para tratar várias doenças, como febre, artrite, problemas de pele e tuberculose. Também é usado como antídoto para picadas de cobra e para purificação do sangue. Mais pesquisas são necessárias para melhor elucidação de seus compostos ativos e propriedades farmacológicas, bem como sua toxicidade, ainda pouco explorada, levando ao desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos (Musara *et al.*, 2021).

Finnie e Van Staden (1999) relataram que muitos tecidos, incluindo meristemas, frutos, embriões, ovários e pedicelos de *C. miniata* poderiam ser usados como explantes. Ran e Simpson (2005) demonstraram que pouquíssimos brotos poderiam ser regenerados a partir de cada explante de diferentes linhas híbridas. Wang *et al.*, (2011) estabeleceram um sistema de propagação *in vitro* para *C. miniata* utilizando bases de pétalas e folhas como explantes. Todos esses autores, porém, relatam que apesar do fácil enraizamento e da alta taxa de sobrevivência *ex vitro*, o período de tempo necessário para a propagação e as taxas de multiplicação relativamente baixas comparadas às de outras plantas ainda são uma barreira para a propagação *in vitro* comercial de *Clivia miniata*.

Com este trabalho, busca-se investigar alternativas para a multiplicação dessa espécie visando uma produção mais significativa dentro do mercado de plantas ornamentais e, futuramente, alcançar maior representatividade na indústria farmacêutica com a produção de metabólitos.

CAPÍTULO 1 - REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 O GÊNERO CLÍVIA

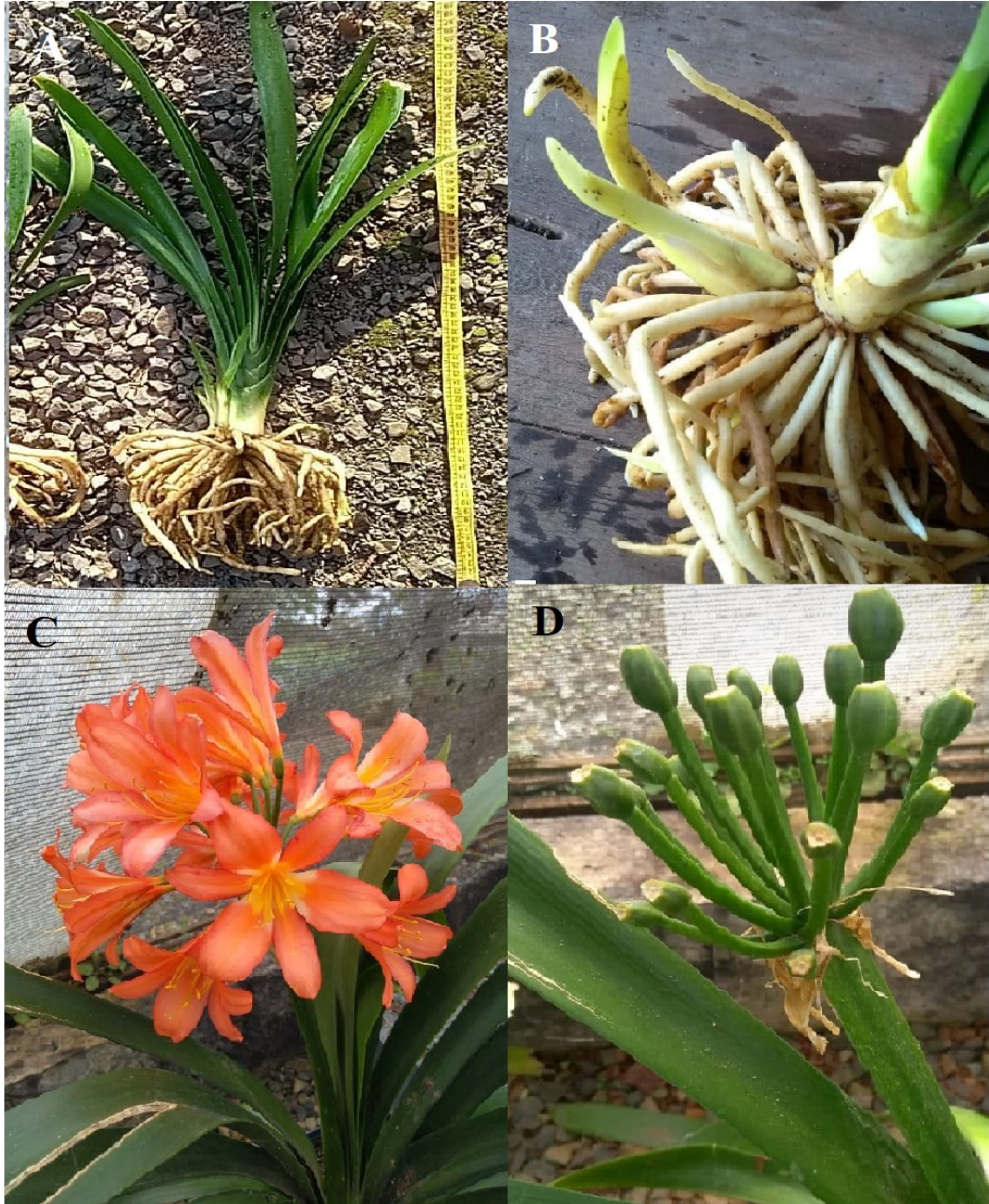
Clivia é um dos 59 gêneros pertencentes à família Amaryllidaceae, ordem Asparagales. Dentro dessa família, seis espécies de clívia já foram descritas: *C. caulescens*, *C. gardenii*, *C. miniata*, *C. mirabilis*, *C. nobilis* e *C. robusta*. Em 1899, Watson identificou plantas de *C. miniata* com flores amarelas, as quais foram classificadas como uma nova variedade (*C. miniata* var. *Citrina* Watson). Embora a hibridização natural possa ocorrer livremente entre as espécies de clívia, apenas um híbrido natural, cruzamento entre *C. caulescens* e *C. miniata*, é reconhecido oficialmente (Swanevelder *et al.*, 2006). Todas as seis espécies têm um número cromossômico somático de $2n = 22$. Esse número cromossômico é plesiomórfico para a família Amaryllidaceae (Spies, *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2012).

A maioria das espécies de clívia tem uma distribuição geográfica limitada e são principalmente restritas a florestas ou manchas com vegetação densa porque crescem melhor em áreas sombreadas. O gênero é caracterizado por plantas herbáceas perenes, rizomatosas, com folhas distintas, firmes e sempre-verdes e lineares. As inflorescências são pseudo-umbeladas, com flores variando entre a coloração vermelha e laranja claro (amarelo para algumas formas de *C. miniata* e *C. caulescens*). Os frutos são do tipo bagas subglobosas com sementes grandes e arredondadas envoltas por um mesocarpo amarelo (Ran *et al.*, 2001; Swanevelder, 2003; Duncan, 2008).

1.1.1 *Clivia miniata*

A distribuição da espécie *C. miniata* abrange áreas ao longo de três províncias e dois países, Cabo Oriental, KwaZulu-Natal e Mpumalanga na África do Sul e Suazilândia (Swanevelder; Fisher, 2009; Spies; Spies, 2018). *C. miniata* (figura 1) é geralmente propagada por meio da germinação de sementes e divisão de touceiras; no entanto, ambos os métodos são bastante lentos, levando cerca de 2,5 a 7 anos para amadurecerem a partir das sementes (Finnie; Van Staden, 1999).

Figura 1 – Morfologia de *Clivia miniata*. A) Planta inteira; B) Rizoma com raízes e brotos adventícios; C) Inflorescência do tipo pseudo-umbelada; D) Frutos em fase inicial de desenvolvimento.



Fonte: a autora.

Ao comparar haplótipos de *C. miniata* com outras espécies do gênero *Clivia*, observam-se diferenças claras com algumas espécies. *C. robusta* e *C. nobilis* são espécies com flores pendentes da província do Cabo Oriental e estão geograficamente separadas de *C.*

miniata, que é conhecida por suas flores eretas e em formato de trompete e de colorações que variam do laranja ao amarelo claro (Spies; Spies, 2018).

1.2 CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS

Os primeiros relatos sobre a cultura de tecidos datam do início do século XX, com experimentos para manter as células do mesofilo em cultura, baseados na totipotencialidade das células vegetais (García-González *et al.*, 2010). A cultura de tecidos pode ser definida como a cultura asséptica de células, tecidos, órgãos ou plantas inteiras sob condições nutricionais e ambientais altamente controladas (Thorpe, 2007). O sistema fornece todos os fatores necessários para o crescimento da planta ou do explante, como nutrientes, energia e água através do meio basal. Além disso, as condições de ambientais controladas fornecem configurações otimizadas de luz e temperatura para promover o crescimento. O desenvolvimento da planta pode então ser manipulado pela adição de reguladores de crescimento de plantas (sejam naturais ou sintéticos) em estágios específicos de crescimento ou maturação (Phillips; Garda, 2019).

Esse conjunto de técnicas baseia-se em duas propriedades das células vegetais essenciais para o sucesso da técnica: a totipotência celular (Vasil; Hildebrandt, 1965) e a plasticidade celular (Thorpe, 2007). A totipotencialidade celular é a capacidade geneticamente retida que todas as células vivas possuem para originar uma nova célula geneticamente idêntica e, após processos de divisão e diferenciação celular, ser capaz de formar tecidos, órgãos, sistemas e indivíduos completos (Takebe *et al.*, 1971). A plasticidade celular é a característica que marca a diferença entre células vegetais e animais em sua capacidade de multiplicação, divisão, diferenciação e formação de um novo indivíduo. Ao contrário dos animais, as plantas são organismos sésseis, muitas vezes com ciclos de vida longos, o que significa que foram forçados a desenvolver mecanismos de defesa e sobrevivência para enfrentar diferentes fatores bióticos e abióticos negativos (García-González *et al.*, 2010).

Técnicas de cultura de tecidos para micropropagação de plantas, transformação genética, seleção assistida por biotecnologia, mutagênese, etc., baseiam-se em dois processos fundamentais de morfogênese: organogênese e embriogênese somática. A organogênese é a formação de órgãos vegetais a partir de um tecido determinado, onde apenas um órgão ou raiz aérea é emitido e a partir dele uma nova planta completa é regenerada. Já a embriogênese somática é a produção de embriões a partir de células vegetais somáticas (qualquer célula não sexual) para obter uma planta completa. Ambos os processos podem ter duas vias: uma direta,

quando a planta é originada de explantes e outra indireta, por indução de calos (Vijaya; Giri, 2003; García-González *et al.*, 2010).

Admite-se que a cultura de tecidos é composta de quatro estágios (Thorpe, 2007), mas esse conceito limita o uso dessa técnica à multiplicação maciça e hoje sabe-se que a cultura de tecidos é uma tecnologia de alcance muito mais ampla. Entretanto, García-González e colaboradores (2010) consideram que a micropropagação de plantas através da cultura *in vitro* possui cinco estágios fundamentais:

- Preparação da planta doadora: etapa fundamental, pois as condições fisiológicas e fitossanitárias da planta matriz é que vai garantir o sucesso do estabelecimento da cultura.
- Introdução e estabelecimento: esta é a etapa mais árdua de um sistema de propagação *in vitro*, pois as etapas posteriores dependem do sistema fitossanitário, estágio fenológico e qualidade dos explantes estabelecidos.
- Propagação de plantas: o objetivo desta fase é aumentar exponencialmente o número de unidades no sistema de cultura de tecidos até que o número desejado seja obtido o mais rápido possível.
- Enraizamento e preparação de explantes para as condições *ex vitro*: é nesta fase que os clones gerados passam por um processo de enraizamento, que será importante para a sobrevivência das plantas durante a fase de aclimatização.
- Adaptação *ex vitro* ou aclimação de plantas: a última etapa consiste em adaptar gradativamente a planta que estava em um ambiente altamente controlado, com alta umidade e fornecimento de todos os nutrientes necessários para outro com condições adversas.

A propagação maciça de plantas tem sido tradicionalmente realizada em meio semissólido (Debnath, 2007), no entanto, durante os últimos anos, culturas em meio líquido com o objetivo de propagação maciça de plantas têm surgido como uma alternativa, o que permite custos reduzidos em relação ao número de subculturas e perdas associadas à manipulação e contaminação, mas também devido à redução do espaço (García-González *et al.*, 2010).

Independentemente do método empregado, reguladores de crescimento são largamente utilizados para conduzir o desenvolvimento de estruturas na cultura, sendo as citocininas e auxinas os mais comuns. Os fitormônios alcançam os seus efeitos através da transdução de sinal e ativação transcricional mediada inicialmente por ligação a receptores específicos. Pesquisas recentes já identificaram múltiplos receptores por classe de hormônio vegetal, e não apenas um único, como acreditava-se anteriormente (Mockaitis; Estelle 2008).

Muitos pesquisadores observaram que o mesmo tratamento com regulador de crescimento aplicado a diferentes explantes (tipos de tecido) da mesma espécie ou genótipo pode resultar em respostas diferentes, sugerindo uma possível especificidade tecidual de receptores ou efetores de fitormônios (Phillips, 1988). Um único fitormônio pode desencadear respostas múltiplas devido à compartimentação subcelular (Spartz; Gray 2008). A compartimentação explica como um único fitormônio pode ter mais do que um efeito fisiológico. Enquanto que as hormônios animais e os seus receptores tendem a ser compartimentados discretamente por tipo de órgão ou tecido, a atividade de hormônios vegetais parece ser compartimentada por receptores subcelulares com vias de transdução de sinal distintas (Phillips; Garda, 2019).

Usando uma experiência fatorial, Skoog e Miller (1957) notaram que se formaram rebentos quando a citocinina era alta e a auxina baixa, enquanto que as raízes se formaram e proliferaram quando a auxina era moderada a alta e a citocinina estava ausente. O calo (massa indiferenciada de células) proliferou quando quantidades moderadas de citocinina foram combinadas com auxina elevada (Phillips; Garda, 2019).

A indução e o desenvolvimento do órgão podem ocorrer no mesmo meio. É de salientar que os rebentos são induzidos e desenvolvidos num tratamento de meio, enquanto que as raízes são induzidas e desenvolvidas noutro tratamento de meio (dentro de intervalos típicos de subcultura), de modo que são necessárias pelo menos duas etapas de cultura para obter uma planta inteira: pelo menos um tratamento de indução/desenvolvimento para cada órgão (rebento, raiz). Algumas plantas são induzidas para enraizamento num meio contendo auxinas, depois transferidas para um meio sem regulador de crescimento para desenvolvimento (Gamborg; Phillips 1995), adicionando assim uma etapa de cultura extra (Phillips; Garda, 2019).

1.2.1 Cultura de Calos

Em todas as principais famílias de plantas terrestres, o tecido ferido é recuperado por células calosas não diferenciadas. Quase qualquer parte da planta pode ser usada para gerar culturas de calos, e esses podem ser cultivados *in vitro* para aplicações biotecnológicas. O calo é o resultado da reprogramação celular/tecidual devido a condições que se sobrepõem às restrições de diferenciação celular/tecidual (gradientes hormonais, regulação da cromatina, bloqueio da divisão celular, etc.) (Efferth, 2019).

Explantes retirados de tecidos vegetais crescem lentamente *in vitro* em uma massa celular que varia de amorfa e incolor a marrom-pálida, se forem obtidos em condições estéreis

evitando infecção microbiana e cultivados em meio de gelificado suplementado com hormônios de crescimento (auxinas e citocininas em sua maioria). Subdividindo as células regularmente em novos meios de cultivo, as culturas de calos podem ser indefinidamente mantidas *in vitro* (Fehér, 2019; Efferth, 2019).

Células vegetais diferenciadas e células de calo cultivadas diferem consideravelmente. As células do calo são semelhantes às células meristemáticas não diferenciadas; eles revelam apenas pequenos vacúolos e carecem de cloroplastos para fotossíntese, entre outras características. As culturas de calos podem se diferenciar em plantas inteiras, se mantidas em meios de crescimento apropriados que diferem dos meios de cultura padrão. Enquanto algumas culturas de calos precisam de condições de crescimento escuras, outras crescem sob condições específicas de dia e noite (por exemplo, 16 h de luz, 8 h de escuridão). As culturas de calos geralmente crescem a 25 – 2°C. Eles podem ser distinguidos entre culturas que crescem de forma bastante compacta e aquelas que são friáveis. Culturas de calos friáveis podem ser usadas para gerar culturas unicelulares que são mantidas em meio líquido agitado lentamente (Efferth, 2019).

1.2.2 Embriogênese Somática

A embriogênese somática indireta consiste em quatro etapas fundamentais: A) Indução de calo; B) Formação e proliferação de embriões; C) Maturação do embrião; e D) germinação de embriões. Durante o processo os embriões podem passar por quatro estágios em seu desenvolvimento, a forma globular, a forma cordiforme, o torpedo e as formas cotiledonares (Ammirato, 1983).

Os embriões somáticos são induzidos por auxinas elevadas, e o 2,4-D parece ter uma capacidade quase única para estimular a embriogênese somática em muitas espécies vegetais. Os embriões somáticos em desenvolvimento são estruturas bipolares, contendo tanto os geradores de rebentos como os geradores de raízes. Tipicamente, a indução de auxina elevada (geralmente 2,4-D) é seguida pelo desenvolvimento e maturação sem fitormônios dos embriões somáticos, sendo assim, são necessárias pelo menos duas etapas de cultura para obter a planta inteira: uma etapa de indução para o embrião bipolar, e ao menos uma etapa de desenvolvimento (maturação) (Phillips; Garda, 2019).

Os sistemas de organogênese adventícia e *de novo* organogênese e *de novo* embriogênese somática tendem a acumular mais mutações espontâneas, em comparação com a ramificação axilar melhorada e a embriogênese somática adventícia (Chu, 1992). Rebentos adventícios, raízes, ou embriões somáticos surgem de tecidos organizados, mas não de

meristemas pré-formados (Gamborg; Phillips 1995). Muitas vezes a presença de tecidos vasculares ou dérmicos é necessária para a formação de novas estruturas adventícias, e as respostas adventícias são tipicamente de vida mais curta, persistindo talvez para 30-60 dias de cultura. Em contraste, brotos, raízes, ou embriões somáticos formados de tecidos proliferantes não organizados, tais como calos, e de novas respostas tipicamente persistem durante meses ou mesmo alguns anos em cultura (Phillips; Garda, 2019).

1.2.3 Biorreatores de Imersão Temporária

Biorreatores são sistemas semi-automatizados desenvolvidos originalmente para o cultivo de células e microrganismos, visando à fermentação e à produção de metabólitos secundários para fins industriais. No contexto da micropropagação de plantas, relatos iniciais sobre o uso desses sistemas foram feitos por Takayama e Misawa (1981) ao propagar begônias ornamentais *in vitro*. Desde então, a utilização de biorreatores na multiplicação *in vitro* de diversas espécies vegetais tem sido observada (Takayama; Akita, 1994; Ziv *et al.*, 1998; Etienne *et al.*, 2006; Tarmizi *et al.*, 2008; Debnath, 2011).

Atualmente, a tecnologia proporcionada por esses sistemas de cultivo tem permitido a produção em larga escala de mudas de forma mais rápida e eficiente em comparação com os métodos tradicionais de cultivo, além de reduzir os custos das mudas micropropagadas (Rizvi ; Kukreja, 2014).

O uso de biorreatores apresenta várias vantagens, como a renovação do ambiente das culturas, a redução do número de recipientes utilizados e do espaço laboratorial necessário, a facilidade de manipulação dos propágulos, diminuindo os riscos de contaminação microbiana. Além disso, melhora a capacidade dos cultivos em absorver nutrientes e reguladores de crescimento devido ao contato contínuo do explante com o meio nutritivo. Os biorreatores também permitem a quebra da dominância apical, estimulando o crescimento das gemas laterais e o desenvolvimento de brotos, além da possibilidade de adaptação do meio de cultura de acordo com o estágio de desenvolvimento do explante (Paek *et al.*, 2001; Choi *et al.*, 2008).

Existem diversos tipos de biorreatores disponíveis no mercado, como aerador agitador, tambor rotatório, filtro rotatório, borbulhamento, levantamento de ar, fase gasosa, aeração por membrana porosa e sobreaeração. No entanto, na maioria desses sistemas, os explantes são cultivados completamente submersos no meio de cultura líquido, limitando a troca de gases, o que pode resultar em hiperidricidade dos tecidos em cultivo, uma desordem fisiológica severa causada pelo acúmulo de água no apoplasto (Gogoi; Borua, 2014).

Para superar esse problema, foram desenvolvidos novos sistemas de biorreatores, incluindo os biorreatores de imersão temporária, que ganharam popularidade devido à sua simplicidade e eficiência na produção de mudas, com poucas ocorrências de desordens fisiológicas (Teisson *et al.*, 1995; Escalona *et al.*, 1999; Teixeira, 2002).

Os biorreatores de imersão temporária permitem a transferência periódica e automatizada do meio de cultura líquido, cobrindo os explantes por um período determinado, proporcionando um melhor aproveitamento do meio nutritivo líquido e melhorias no ambiente gasoso dentro dos frascos de cultivo. Isso resulta na redução da hiperidricidade, controle do crescimento e desenvolvimento das culturas pela manipulação da frequência e duração das imersões de meio líquido, além da diminuição do estresse mecânico causado pela ausência de agitação (Etienne; Berthouly, 2002; Teixeira, 2002; Martin; Vermette, 2005).

No Brasil, também foram desenvolvidos sistemas de biorreatores de imersão temporária, como o sistema de biorreator de frascos gêmeos BIT, desenvolvido pela Embrapa

Recursos Genéticos e Biotecnologia. Este sistema oferece flexibilidade ao utilizar diferentes tipos de frascos e regimes de imersão, bem como a capacidade de cultivo de células, embriões, gemas, brotos e raízes. Estudos experimentais demonstram que a micropropagação em biorreatores de imersão temporária pode ser um método eficiente para a produção em larga escala de mudas (Espinosa *et al.*, 2002; Roels *et al.*, 2005; Niemenak *et al.*, 2008; Debnath, 2011; Steinmacher *et al.*, 2011; Heringer *et al.*, 2014).

1.3 CULTURA DE TECIDOS DE *C. miniata* *in vitro*

A micropropagação de *Clivia miniata*, uma planta ornamental de grande valor devido à beleza de suas flores e folhagem, tem sido um desafio devido à lenta regeneração de plântulas e a baixa viabilidade comercial. Vários estudos foram conduzidos para melhorar as técnicas de micropropagação, cada um com suas abordagens e resultados.

Finnie e Van Staden (1999) exploraram a utilização de diferentes explantes, incluindo meristemas, frutas, embriões, ovários e pedicelos, para a regeneração *in vitro* de *C. miniata*. No entanto, eles enfrentaram desafios, pois a regeneração de plântulas era lenta, tornando o processo ineficiente comercialmente. Ran e Simpson (2005) observaram que a regeneração de brotos a partir de explantes era limitada, dependendo do genótipo da planta e do estágio de desenvolvimento da inflorescência de onde os explantes foram retirados. Esses estudos mostraram as dificuldades enfrentadas na micropropagação de *Clivia miniata*.

Outro estudo, realizado por Wang e colaboradores (2011), relatou a utilização de pétalas e folhas como explantes para estabelecer um sistema de micropropagação. Embora

essa abordagem tenha mostrado algum sucesso, o tempo necessário para a conclusão do ciclo de micropropagação ainda era um fator limitante.

Em relação ao meio de cultura, o meio MS (Murashige; Skoog, 1962) suplementado com diferentes fitorreguladores, como BA, NAA e KT, mostrou ser eficaz para a micropropagação de *Clivia miniata* (Wang *et al.*, 2012; Guan, 2013). No entanto, a escolha dos explantes também desempenhou um papel crucial no sucesso do processo. Comparativamente, explantes de folhas e ramos demonstraram tempos de regeneração mais curtos e menor necessidade de suplementação de aminoácidos. Isso pode ser atribuído à capacidade das plantas de clívia de produzirem os aminoácidos necessários para a síntese de proteínas. Essa capacidade pode ser uma vantagem ao usar explantes de folhas e ramos.

Os estudos de Ran e Simpson (2005), Wang *et al.* (2011), Wang *et al.* (2012) e os resultados mais recentes de Li *et al.* (2022) oferecem insights adicionais sobre a regeneração de *Clivia miniata* em meio de cultura. Os estudos mais recentes de Li *et al.* (2022) descrevem a formação de calos a partir de diferentes tipos de explantes, incluindo embriões, folhas jovens, ovários, pétalas e tecido de pericarpo jovem. No entanto, eles observaram variações genotípicas na resposta dos explantes e destacaram a importância da luz, reguladores de crescimento e a escolha do meio de cultura na indução de calos e embriogênese somática.

Além disso, a pesquisa mais recente de Li *et al.* (2022) mostrou que a técnica de clonagem de tecido (TCL) permitiu a formação de embriões globulares em um curto período de tempo. Esses embriões somáticos, originados a partir de células únicas, são preferíveis para transformação genética e pesquisa genômica. Portanto, a embriogênese somática e a técnica de TCL têm o potencial de acelerar a pesquisa genética e a engenharia molecular em *C. miniata*.

Em resumo, a micropropagação de *Clivia miniata* tem sido um desafio, devido à lenta regeneração de plântulas e à dependência do genótipo da planta. No entanto, estudos recentes têm explorado diferentes abordagens, incluindo a escolha de explantes, meios de cultura e a técnica de clonagem de tecido, oferecendo perspectivas promissoras para melhorar a eficiência da micropropagação e facilitar futuras pesquisas genéticas e de engenharia molecular relacionadas a esta planta ornamental valorizada.

REFERÊNCIAS

- AMMIRATO, P.V. (1983). The regulation of somatic embryo development in plant cell culture: Suspension culture techniques and hormones requirement. **Biotechnology** 1: 68-74.
- BARBOZA, S. B. S. C.; GRACIANO-RIBEIRO. D.; TEIXEIRA. J. B.; PORTES, T. A.; SOUZA, L. A. C. Anatomia foliar de plantas micropropagadas de abacaxi. *Pesq. agropec. bras.* vol.41 no.2, 2006.
- CHIA, G. S. Caracterização morfofisiológica e anatômica de folhas de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.), de caiaué (*E. oleifera* (Kunth) Cortés) e híbrido interespecífico (*E. guineensis* x *E. oleifera*) nas condições da Amazônia Central. 85 f. Tese (Doutorado em Agronomia Tropical) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2012.
- CHOI, D. S.; ANDRADE, M. H. C.; WILLIS, L. B.; CHO, C. W.; SCHOENHEIT, J.; BOCCAZZI, P.; SAMBANTHANMURTHI, R.; SINSKEY, A. J.; RHA, C. K. Effect of agitation and aeration of yield optimization of oil palm suspension culture. **Journal of Palm Oil Research** , v.1, p.23-34, 2008.
- CHRISTOU, P., AND R.M. TWYMAN. The potential of genetically enhanced plants to ardes food insecurity. **Nutrition Research Reviews** 17:23–42, 2004.
- DEBNATH, S.C. Strategies to propagate *Vaccinium* nuclear stocks for the Canadian berry industry. **Canadian Journal of Plant Science** 87(4):911-922, 2007.
- DEBNATH, S. C. Adventitious shoots regeneration in a bioreactor system and EST-PCR based clonal fidelity in lowbush blueberry (*Vaccinium angustifolium* Ait.). **Scientia Horticulturae**, v.128, p.457-464, 2011.
- DUNCAN, G. **Grow Clivias**. National Botanical Institute; 2nd Revised edition, Kirstenbosch, South Africa. 194Pp, 2008.
- EFFERTH, T. Biotechnology applications of plant callus cultures. **Engineering**, 5(1), 50-59, 2019.
- ESCALONA, M.; LORENZO, J. C.; GONZÁLES, B.; DAQUINTA, M.; GONZÁLES, J. L.; DESJARDINS, Y.; BORROTO, C. G.; Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary imersion systems. **Plant Cell Reports**, v.18, p.743-748, 1999.
- ESPINOSA, P.; LORENZO, J. C.; INGLESIAS, A.; YABOR, L.; MENÉNDEZ, E.; BORROTO, J.; HERMÁNDEZ, L.; ARENCIBIA, A. D. prodution of pineapple transgenic plants assisted by temporary immersion bioreactors. **Plant Cell Reports**, v.21, p.136-140, 2002.
- ETIENNE, H.; Y.M. BERTHOULY. Temporary immersion systems in plant micropropagation. **Plant Cell Tissue and Organ Culture** 69:215–231, 2002.
- ETIENNE, H.; DECHAMP, E.; BARRY-ETIENNE, D.; BERTRAND, B. Bioreactors in coffee micropropagation. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.18, p.45-54, 2006.

FEHÉR, A. Callus, dedifferentiation, totipotency, somatic embryogenesis: what these terms mean in the era of molecular plant biology?. **Frontiers in plant science**, 10, 536, 2019.

FERREIRA JÚNIOR, M. U. Utilização de biorreatores de imersão temporária na micropropagação de batata-doce. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, 2015.

FINNIE JF, VAN STADEN J. *in vitro* culture of *Clivia miniata*. Clivia Yearbook 1 (1998). The Clivia Society, South Africa, pp 7–11, 1999.

GAO W1, ZHAO H, LIU Y, LI MR, NURMAMAT E, LI LF, REN YY, XIAO HX. Isolation and identification of fourteen microsatellite markers in *Clivia miniata* and *Clivia nobilis* (Amaryllidaceae). **Int J Mol Sci.**; 13(8):9609-14, 2012.

GARCIA-GONZALES, R; QUIROZ, K; CARRASCO, B e CALIGARI, P. Plant tissue culture: Current status, opportunities and challenges. **Cienc. Inv. Agr.** [online], vol.37, n.3, pp.5-30, 2010.

GOGOI, G.; BORUA, P. K. Standardization parameters for critical problems encountered in plant *in vitro* culture technique. **International Journal of Current Research**, v.6, p.10964-10973, 2014.

GUAN LI-XIA. Study on Factors Influencing Plant Regeneration of *Clivia miniata* Leaf[J].**Northern Horticulture**, 37(23):114, 2013.

GUERRA, M. P.; FRAGA, H. P. F.; NODARI, R. O.; VIEIRA, L. N.; FRITSCHÉ, Y. Apostila Biotecnologia - Cultura de Tecidos. Vol. 2016.1. Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, 2016.

HERINGER, A.S.; STEINMACHER, D.A.; FRAGA, H.P.F.; VIEIRA, L.N.; MONTAGNA, T.; QUINGA, L.A.P.; QUOIRIN, M.G.G.; JIMÉNEZ, V.M.; GUERRA, M.P. Improved high-efficiency protocol for somatic embryogenesis in Peach Palm (*Bactris gasipaes* Kunth) using RITA® temporary immersion system. **Scientia Horticulturae**, v.179, p.284-292, 2014.

IEVEN M, VLIETINCK AJ, VANDEN BERGHE DA *et al.* Plant antiviral agents. III. Isolation of alkaloids from *Clivia miniata* Regel (Amaryllidaceae). **J Nat Prod** 45:564–573, 1982.

MARTIN, Y. VERMETTE, P. Bioreactors for tissue mass culture: Design, characterization, and recent advances. **Biomaterials**, v.29, P.7481-7503, 2005.

MONTEIRO, T. R. Embriogênese somática e regeneração de plantas de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) a partir do uso de meios de consistência líquida e de cultivos em suspensão. 104 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Botânica, Departamento de Botânica, Universidade de Brasília - Instituto de Ciências Biológicas, Brasília, Df, 2013.

MURASHIGE T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol Plant** 15:473–497, 1962.

NIEMENAK, N.; SAARE-SURMINSKI, K.; ROHSIUS, C.; NDOUMOU, D. O.; LIEBEREI, R. Regeneration of somatic embryos in *Theobroma cacao* L. in temporary immersion bioreactor and analyses of free amino acids in different tissues. **Plant Cell Reports.**, v.27, p.667-676, 2008.

PAEK, K. Y.; HAHN, E. J.; SON, S. Application of bioreactors for large-scale micropropagation systems of plants. ***in vitro Cellular and Developmental Biology - Plant***, v.37, p.149-157, 2001.

PAIVA, R.; PAIVA, P. D. O. Cultura de Tecidos. 98 f. Monografia (Especialização) - Curso de Curso de Pós-graduação "lato Sensu" Especialização A Distância: Biotecnologia: Fundamentos Técnicos, Aplicações e Perspectivas., Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras, 2001.

PHILLIPS, GREGORY C.; GARDA, MARTINA. Plant tissue culture media and practices: an overview. ***in vitro Cellular & Developmental Biology-Plant***, v. 55, n. 3, p. 242-257, 2019.

RAN Y, HAMMETT KRW, MURRAY BG. Hybrid Identification in *Clivia* (Amaryllidaceae) using Chromosome Banding and Genomic In Situ Hybridization. **Ann Bot** 87:823–830, 2001^a.

RAN Y, SIMPSON S. *in vitro* propagation of the genus *Clivia*. **Plant Cell Tiss Org Cult** 81:239–242, 2005.

REINERT, J., BAJAJ, Y. P. S. **Applied and fundamental aspects of plant cell tissue and organ culture**. Berlin: Springer Verlag, p. 179-248, 1977.

RIZVI, M. Z.; KUKREJA, A. K. Micropropagation of an endangered medicinal herb *Chlorophytum borivillianum* Sant. et Fernand. in bioreactor. **African Journal of Biotechnology**, v.13, p.1772-1778, 2014.

ROELS, S.; ESCALONA, M.; CEJAS, I.; NOCEDA, C.; RODRIGUEZ, R.; CANAL, M. J.; SANDOVAL, J.; DEBERGH, P. Optimization of plantain (*Musa AAB*) micropropagation by immersion system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.82, p.57-66, 2005.

ROUT, G.R.; MOHAPATRA, A.; JAIN, S. MOHAN. Tissue culture of ornamental pot plant: a critical review on present scenario and future prospects. **Biotechnology Advances**, Volume 24 (6), 2006.

SENGBUSCH PV. Biosyntheses-amino acids. KEGG database-metabolic pathways. 2003.

SIMPSON, M.G. **Plant systematics**. Elsevier Inc, UK. 752Pp, 2010.

SPIES, P., GROBLER, J.P., AND SPIES, J.J. A review of phylogenetic relationships in the genus *Clivia*. **Phil. Trans. Genet.** 1, 168–207, 2011.

SPIES, P. and SPIES, J.J. *Clivia* taxonomy revisited, using DNA barcode regions. **Acta Hort.** 1201, 2018.

- SWANEVELDER, Z. H. Diversity and population structure of *Clivia miniata* Lindl. (Amaryllidaceae): Evidence from molecular genetics and ecology. M.Sc. Dissertation, University of Pretoria, Pretoria, 2003.
- SWANEVELDER, Z. H., TRUTER, J. T. and VAN WYK, A. E. A natural hybrid in the genus *Clivia*. **Bothalia** 36: 77-80, 2006.
- SWANEVELDER, D., and FISHER, R.C. **Clivia: Nature and Nurture** (Pretoria, Briza, South Africa: International Publishers Marketing, Inc.), 2009.
- TAKAYAMA, S.; AKITA, M. The types of bioreactors used for shoots and embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.39, p.147-156, 1994.
- TAKAYAMA, S.; MISAWA, M. Mass propagation of *Begonia hiemalis* plantlets by shaken culture. **Plant Cell Physiology**, v.22, p.461-468, 1981.
- TAKEBE, I., C. LABIB, AND G. MELCHERS. Regeneration of whole plants from isolated mesophyll protoplasts of tobacco. **Naturwissenschaften** 58:318–320, 1971.
- TARMIZI, A. H.; SAMSAUL, K. R.; ZAITON, R.; ROSLI, M. Y. Multiplication of oil palm liquid cultures in bioreactors. **Journal of Oil Palm Research** Special Issue on Malaysia-MIT Biotechnology Partnership Programme, v.1, p.44- 50, 2008.
- TEISSON, C.; ALVARD, D.; BERTHOULY, M.; COTE, F.; ESCALANT, J.V. & ETIENNE, H. *in vitro* culture by temporary immersion: a new device. **Plantations**, v.2, p.32-33, 1995.
- TEIXEIRA, J. B. **Biorreatores**. *Biotechnologia Ciência & Desenvolvimento*, v.24, p.36-41, 2002.
- THORPE, T. History of plant tissue culture. **Molecular Biotechnology** 37:169-180, 2007.
- UDOMDEE, W., WEN, P.J., LEE, C.Y. *et al.* Effect of sucrose concentration and seed maturity on *in vitro* germination of *Dendrobium nobile* hybrids. **Plant Growth Regul** 72, 249–255, 2014. <https://doi.org/10.1007/s10725-013-9856-x>
- Van der WESTHUIZEN, H. M. Genetic variation in the most primitive *Clivia* species. Dissertation. University of the Free State, Bloemfontein. 2010.
- VASIL V, HILDEBRANDT AC. Differentiation of Tobacco Plants from Single, Isolated Cells in Microcultures. **Science**. Nov 12;150(3698):889-92, 1965.
- VEALE DJH, OLIVER DW, ARANGIES NS, FURMAN KI. Preliminary isolated organ studies using an aqueous extract of *Clivia miniata* leaves. **J Ethnopharmacol** 27:341–346, 1989.
- VIJAYA, G.L., AND GIRI, C.C. Plant regeneration via organogenesis from shoot base-derived callus of *Arachis stenosperra* and *A. villosa*. **Current Science** 85(11):1624-1629, 2003.

WANG, Q-M.; GAO; F-Z.; GAO, X.; ZOU; F-Y.; SUI, X.; WANG, M.; HUI, Y-J; WANG, L. Regeneration of *Clivia miniata* and assessment of clonal fidelity of plantlets. **Plant Cell Tiss Org Cult**, 2011. doi: 10.1007/s11240-011-0085-6

WANG, Q. M.; WANG Y. Z.; SUN L. L.; GAO F. Z.; SUN, W, H. E. J.; GAO, X.; WANG, L. Direct and indirect organogenesis of *Clivia miniata* and assessment of DNA methylation changes in various regenerated plantlets. **Plant Cell Rep.** 31: 1283, 2012.

ZIV, M.; RAVIV, M. Proliferation of meristematic clusters in disposable presterilized plastic bioreactors for the large-scale micropropagation of plants. *in vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, v.34, p.152-158, 1998.

CAPÍTULO 2 – PLÂNTULAS DE *Clivia miniata* GERMINADAS *IN VITRO* SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE E UTILIZADAS COMO EXPLANTES PARA INDUÇÃO DE CALOS.

RESUMO

O cultivo de plantas com potencial farmacêutico, como a *Clivia miniata* em campo é um processo oneroso, impulsionando a busca por métodos alternativos, como a cultura de células, tecidos e órgãos vegetais *in vitro* visando a produção de compostos fenólicos. A formação de calos se destaca como uma abordagem ideal para a produção de metabólitos de interesse comercial. As vantagens dos sistemas de cultura de células incluem a produção independente de fatores externos como: clima, doenças causadas por microorganismos e ataque de insetos. Plantas germinadas *in vitro* são fontes ideais de explantes para técnicas de cultura de tecidos, sendo a germinação influenciada por vários fatores. Neste trabalho investigamos os efeitos da concentração de sacarose e da maturidade dos frutos na germinação *in vitro* de sementes de *Clivia miniata* e posterior indução de calos. Inicialmente teste de viabilidade revelou que a porcentagem de sementes viáveis não ultrapassa os 70%. Cinco concentrações de sacarose foram adicionadas ao meio de cultivo MS, 0, 10, 20, 30 e 40 g.L⁻¹. Durante a germinação *in vitro*, a concentração de sacarose afetou a velocidade de germinação, sendo que em baixa concentração (0 e 10 g.L⁻¹), sementes de frutos maduros obtiveram maior porcentagem de germinação (63 e 67%, respectivamente). Sementes maduras apresentaram porcentagens significativamente superiores em comparação com as imaturas. A indução de calos a partir das plântulas germinadas *in vitro* apresentou resultados variáveis. Tratamentos com alta concentração de reguladores de crescimento resultaram em mortalidade significativa dos explantes. No entanto, combinações específicas de reguladores de crescimento, como 2,4-D + 0.52 PIC + 2 BAP e 4 BAP + 4 ANA, mostraram altas taxas de sobrevivência e indução de calos. Os resultados sugerem que a concentração de sacarose influencia a germinação *in vitro* de *Clivia miniata*, sobretudo em sementes de frutos maduros, sendo 5,1 g.L⁻¹ a concentração ideal. Além disso, a escolha adequada dos reguladores de crescimento é crucial para a indução eficaz de calos. A citocinina BAP mostrou-se essencial para a calogênese, independentemente da auxina utilizada.

Palavras-chave: calogênese, agente osmótico, cultura de tecidos vegetais, germinação *in vitro*.

ABSTRACT

The cultivation of plants with pharmaceutical potential, such as *Clivia miniata* in the field, is a costly process, driving the search for alternative methods such as *in vitro* culture of plant cells, tissues, and organs aiming at the production of phenolic compounds. Callus formation stands out as an ideal approach for the production of commercially relevant metabolites. The advantages of cell culture systems include the production independent of external factors such as climate, diseases caused by microorganisms, and insect attacks. *In vitro* germinated plants are ideal sources of explants for tissue culture techniques, with germination influenced by various factors. In this study, we investigated the effects of sucrose concentration and fruit maturity on the *in vitro* germination of *Clivia miniata* seeds and subsequent callus induction. Initial viability tests revealed that the percentage of viable seeds did not exceed 70%. Five concentrations of sucrose were added to the MS culture medium: 0, 10, 20, 30, and 40 g.L⁻¹. During *in vitro* germination, sucrose concentration affected the germination rate, with low concentrations (0 and 10 g.L⁻¹) resulting in higher germination percentages for seeds from mature fruits (63% and 67%, respectively). Mature seeds showed significantly higher percentages compared to immature ones. Callus induction from *in vitro* germinated seedlings yielded variable results. Treatments with high concentrations of growth regulators resulted in significant explant mortality. However, specific combinations of growth regulators, such as 2,4-D + 0.52 PIC + 2 BAP and 4 BAP + 4 ANA, showed high survival rates and callus induction. The results suggest that sucrose concentration influences the *in vitro* germination of *Clivia miniata*, especially in seeds from mature fruits, with 5.1 g.L⁻¹ being the ideal concentration. Additionally, the proper choice of growth regulators is crucial for effective callus induction. The cytokinin BAP proved essential for callogenesis, regardless of the auxin used.

Keywords: Callogenesis, osmotic concentration, plant tissue culture, *in vitro* germination.

2.1 INTRODUÇÃO

O cultivo de plantas com potencial farmacêutico em campo, como a *Clivia miniata*, é um processo laborioso e demorado, o que impulsiona a busca por métodos alternativos para a produção de metabólitos secundários, compostos fenólicos e flavonoides que desempenham um papel central na defesa das plantas (Qiu *et al.*, 2013). O uso de cultura de células, tecidos e órgãos tem sido destacado como uma abordagem valiosa para essa finalidade (Zhou; Wu, 2006; Zaker *et al.*, 2015). Inúmeros estudos destacam a produção bem-sucedida de compostos fenólicos em condições *in vitro* (Cui *et al.*, 2011; Yildirim; Turker, 2014; Attaran Dowom *et al.*, 2017). Considerada econômica e adequada para a produção de compostos naturais em ambientes laboratoriais (Anand, 2010), a cultura de material vegetal inclui a formação de calos, que tem recebido atenção significativa tanto para pesquisa quanto para aplicações industriais. Por isso, a cultura de calos emerge como ideal para a produção de metabólitos de interesse comercial (Matkowski, 2008; Sagharyan *et al.*, 2020).

As principais vantagens dos sistemas de cultura de células, em comparação com o cultivo convencional de plantas inteiras, incluem o seguinte: os compostos vegetais desejados podem ser gerados independentemente de fatores externos (por exemplo, composição do solo ou clima); as células cultivadas não estão sujeitas aos ataques de microorganismos ou insetos; células de qualquer planta, inclusive aquelas raras ou ameaçadas, podem ser facilmente mantidas para produzir seus metabólitos secundários; e a regulação impulsionada por robôs da produção de metabólitos secundários reduz os custos e melhora a produtividade (Efferth, 2019).

Plantas de sementes germinadas *in vitro* já desenvolvem-se livres de contaminações, sendo portanto ótimas fontes de explantes para outras técnicas da cultura de tecidos. A germinação *in vitro* depende de diversos fatores, como tempo de coleta da semente, localização do habitat, estação do ano, estágio de crescimento, dormência e composição do tegumento, parâmetros físicos e nutricionais, o meio de cultivo escolhido, luminosidade, temperatura, fitorreguladores, carboidratos, aditivos orgânicos, vitaminas e outros componentes (George; Hall; De Klerk, 2008; Deng *et al.*, 2012; Huh *et al.*, 2016). As plantas cultivadas *in vitro* podem perder parcialmente a autotrofia e requerer suplementação de fonte externa de carbono. Glicose, frutose, sacarose ou uma mistura destes são usados como fonte de carbono na cultura de tecidos (Murthy *et al.*, 2014). Atualmente, a sacarose é a opção preferida (Xiao *et al.*, 2011). É fonte de carbono e energia, por ser um carboidrato comum na seiva do floema e estar envolvido no controle dos processos de desenvolvimento (Gibson, 2000), regular diretamente o metabolismo secundário da planta (Modarres *et al.*, 2018; Mukherjee *et al.*, 2019; Fortini *et al.*, 2021). Este açúcar fornece fonte de carbono equilibrada ao crescimento celular com as hexoses liberadas participando diretamente das vias glicolíticas e das pentoses fosfato (Zha *et al.*, 2007), estando associado a maior crescimento, expansão foliar e ganho de biomassa (Badr *et al.*, 2015; Zahara *et al.*, 2016).

Durante o processo de germinação das sementes *in vitro*, as soluções de sais e açúcares que compõem o meio de cultivo não têm efeito puramente nutritivo, mas atuam também na regulação osmótica do estresse hídrico da cultura celular vegetal e afetam significativamente a germinação e o desenvolvimento do embrião (George, 1996; Hilae; Te-Chato, 2005). Segundo Zeng *et al.* (2013), sementes de determinadas espécies são capazes de germinar na ausência de açúcares no meio de cultivo, outras, contudo, requerem de 2 à 3% de açúcar na composição do meio.

Neste estudo buscamos investigar os efeitos da concentração de sacarose e da maturidade da semente na germinação *in vitro* de *Clivia miniata* e posteriormente utilizar as plântulas obtidas como explantes para a indução de calos.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Experimento I - Germinação *in vitro*

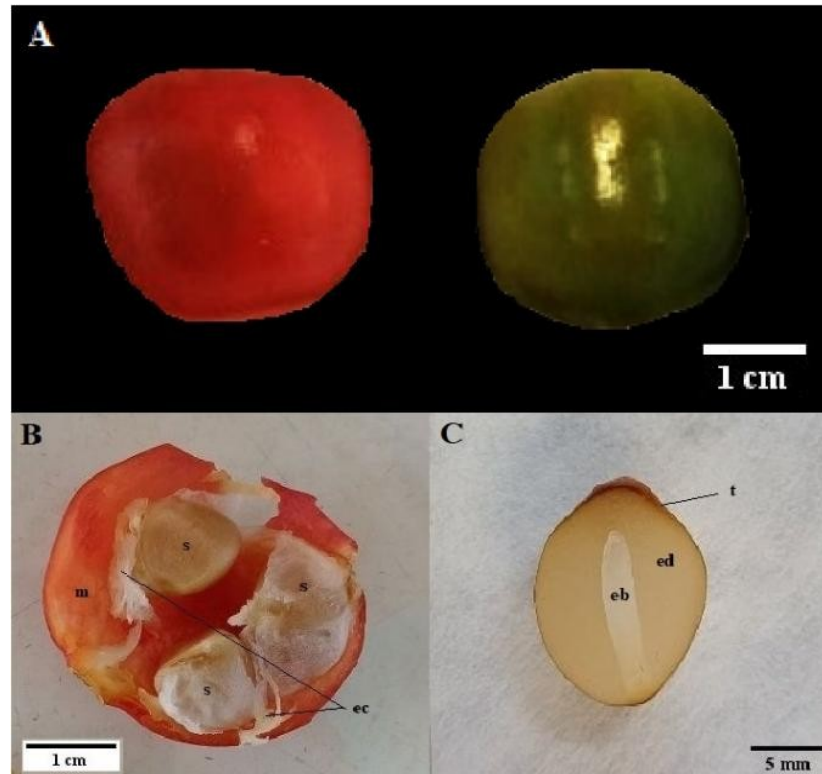
2.2.1.1 Material vegetal

Frutos de *Clivia miniata* colhidos aleatoriamente de plantas adultas localizadas no município de Porto Amazonas, Paraná (25° 32' 42" S 49° 53' 24" O).

Para determinação da cor da casca, os frutos foram analisados com o colorímetro da marca Colorímetro Konica Minolta, modelo Cr 400. Este equipamento fornece, para cada fruto analisado, o valor de luminosidade (L), que varia de 0 a 100 (sendo 0 equivalente ao preto e 100 ao branco), eixo a (a), que representa a variação das cores opostas verde e vermelho, sendo que valores negativos se aproximam do verde e valores positivos se aproximam do vermelho e, por fim, o eixo b (b), representando a variação das cores opostas azul e amarelo, com os valores negativos sendo mais próximos do azul e os valores positivos mais próximos do amarelo. Para determinar a cor, é realizada a seguinte equação: $\text{Hue} = \text{tg}^{-1} b/a$.

Para os testes de germinação *in vitro*, frutos com a casca inteiramente vermelho vivo foram classificados como maduros ($a = 32.45$, $b = 19.82$, $h = 31.43^\circ$), e frutos apresentando tons variando de verde ao amarelo em sua extensão foram designados como imaturos ($a = -6.73$, $b = 27.26$, $h = 166.12^\circ$) (Figura 2).

Figura 2 – A) Frutos de *Clivia miniata*. À esquerda: fruto maduro; à direita: fruto imaturo; B) Fruto maduro aberto de *C. miniata*; C) Semente de *C. miniata* seccionada longitudinalmente expondo o embrião. m – mesocarpo, s – semente, ec – endocarpo, eb – embrião, ed – endosperma, t – tegumento.



Fonte: a autora.

2.2.1.2 Teste de viabilidade das sementes

A viabilidade de sementes de clívia foi avaliada por “teste de tetrazólio”. Para a realização do teste foram utilizadas 4 repetições de 25 sementes, totalizando 100 sementes por grau de maturação. As mesmas foram umedecidas por imersão em água por 24 horas e partidas ao meio para a exposição dos tecidos ao tetrazólio. Após esse período as sementes foram imersas em solução 2,3,5 trifenil brometo de tetrazólio 1% por 3 horas a 30°C e depois permaneceram 21 horas em temperatura ambiente, em condição de escuro completo (Hernández *et al.*, 2009). Depois de imersas, as sementes foram lavadas com água corrente e os embriões foram secos em papel absorvente para avaliação e registro fotográfico. Os íons H⁺ liberados durante a respiração dos tecidos vivos interagem com o tetrazólio, o qual é reduzido a um composto vermelho. Como esta reação se processa no interior das células vivas e o composto não se difunde, há nítida separação dos tecidos vivos e coloridos que respiram, daqueles mortos e que não colorem (figura 3). Foi avaliado a viabilidade através da

porcentagem de cor do embrião (0, 50 e 100%). Apenas sementes com embriões 100% corados foram consideradas viáveis.

Figura 3 – Embriões *C. miniata* corados por cloreto de tetrazólio.



Fonte: a autora.

2.2.1.3 Introdução *in vitro*

As sementes coletadas foram lavadas em água corrente e desinfetadas com álcool a 70% (v/v) por 60 segundos, sendo posteriormente imersas em uma solução de hipoclorito de sódio a 2 – 2,5% (v/v) por 20 minutos sob agitação. Após a assepsia as sementes foram levadas para fluxo laminar onde foram enxaguadas por três vezes com água destilada autoclavada por 20 minutos à 120°C e pressão de 1 atm. Enxaguadas as sementes foram introduzidas em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio basal MS (Murashige; Skoog, 1962) com concentrações crescentes de sacarose (0, 10, 20, 30 e 40 g.L⁻¹).

2.2.1.4 Análise estatística

Os dados referentes à coloração das sementes por tetrazólio não foram submetidos à análise estatística. Para avaliar a qualidade fisiológica *in vitro* das sementes, o experimento foi montado em delineamento estatístico inteiramente casualizado com cinco repetições. Cada repetição consistiu em cinco tubos de ensaio com uma semente. Os tratamentos foram arranjados em esquema fatorial 2x5: 2 graus de maturação e 5 concentrações de sacarose. Os dados relativos à maturação foram submetidos à análise de variância pelo teste F, e os valores médios foram comparados pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Os dados referentes às concentrações de sacarose foram submetidos à análise de regressão polinomial, testando as equações lineares e quadráticas, sendo aceitas as equações significativas até 5% de probabilidade pelo teste F, com o maior coeficiente de determinação (R²) e quando houve interação, os respectivos desdobramentos foram realizados.

2.2.2 Experimento II - Indução de Calos

2.2.2.1 Obtenção dos explantes

Raízes e folhas de plântulas com 90 dias após germinação *in vitro* foram retiradas e os caules contendo o meristema apical foram seccionados longitudinalmente ao longo das bases foliares, dividindo-as ao meio, conforme figura 4. Os explantes obtidos foram divididos em porções menores de 0.5 ± 0.2 cm e inoculados em frascos com 30 mL de meio de cultivo para indução de calo.

Figura 4 – Segmento caulinar e bases foliares seccionados de *C. miniata* germinadas *in vitro* utilizados como fonte de explantes para indução de calos.



Fonte: a autora.

2.2.2.2 Meio de cultivo

MS acrescido com reguladores de crescimento. Os meios de cultura de todos os tratamentos (Tabela 1) foram suplementados com 10 mg. L^{-1} de mio-inositol, 40 g. L^{-1} de sacarose e gelificados com 6 g. L^{-1} de ágar. O pH foi ajustado para 5,8 antes da adição do ágar e, posteriormente, autoclavado à 120°C e 1 atm por 20 minutos.

Tabela 1 – Tratamentos empregados na indução de calos a partir de caules e bases foliares de clívias com 90 dias germinadas *in vitro*.

Tratamento	Regulador de crescimento (mg.L ⁻¹)			
	Picloram	2,4-D	BAP	ANA
T1	0	0	0	0
T2	0.52	2	0	0
T3	1.05	4	0	0
T4	2.1	8	0	0
T5	0.52	2	2	0
T6	1.05	4	2	0
T7	2.1	8	2	0
T8	0	2	2	2
T9	0	4	4	4
T10	0	0	4	4

Fonte: a autora.

Os frascos foram mantidos em câmara de crescimento com temperatura de $25 \pm 2^\circ \text{C}$ na ausência de luz até o aparecimento dos calos.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Experimento I - Germinação de Sementes *in vitro*

O teste de viabilidade com tetrazólio revelou que para ambos os graus de maturação, a porcentagem de sementes viáveis não ultrapassa os 70% (Tabela 2).

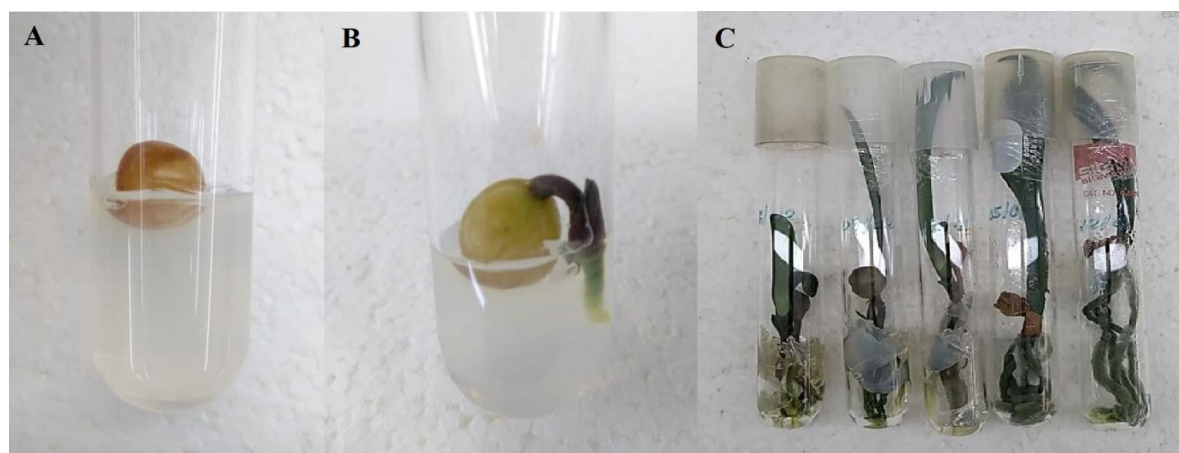
Tabela 2 – Viabilidade de embriões zigóticos de *Clivia miniata* corados por 2,3,5 trifetil brometo de tetrazólio. 0% correspondem a embriões mortos; embriões 100% corados foram considerados viáveis.

Coloração do embrião (%)	Maturação do fruto (%)	
	Imaturo	Maduro
0	18	12
50	26	23
100	55	65
Total	100	100

Fonte: a autora.

Após a instalação do experimento, as sementes foram acompanhadas diariamente durante 60 dias (Figura 5). Nos primeiros 7 dias poucas germinações foram observadas. As menores e maiores médias foram respectivamente 27.5 dias para frutos maduros em 30 g.L⁻¹ de sacarose e 41.4 para imaturo com 0 g.L⁻¹ de sacarose (Tabela 3). Apesar dessa amplitude de 13.9 dias, o teste estatístico de Tukey a 5% de probabilidade não revelou diferença significativa para dias até a germinação entre as doses de açúcar.

Figura 5 – Germinação de *C. miniata in vitro* em meio semissólido (A); B) Plantulas de clívia com diferentes idades.



Fonte: a autora.

Tabela 3 – Tempo decorrido em dias até a germinação de sementes de *Clivia miniata in vitro* em função da concentração de sacarose e do grau de maturação das mesmas.

Sacarose (g.L ⁻¹)	Dias até a germinação	
	Imaturo	Maduro
0	41.40 ^a	30.93 ^b
10	35.83 ^a	31.86 ^a
20	37.37 ^a	30.36 ^a
30	35.87 ^a	27.55 ^a
40	35.81 ^a	33.70 ^a
CV (%) =	38.55	

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

Fonte: a autora.

Independentemente grau de maturação, nenhum tratamento resultou numa porcentagem de germinação superior à 70%, com uma média máxima de 66.6% no tratamento de fruto maduro com 0 g.L⁻¹ de sacarose, e a menor correspondendo à 33.3% nos tratamentos com 20 e 30 g.L⁻¹ de sacarose, ambos imaturos (Tabela 4). Sementes de frutos maduros tiveram porcentagens de germinação significativamente superiores quando comparadas às provenientes de frutos imaturos.

Tabela 4 – Porcentagem de germinação de sementes de *Clivia miniata* em função da concentração de sacarose e do grau de maturação dos frutos após 60 dias de cultivo *in vitro*.

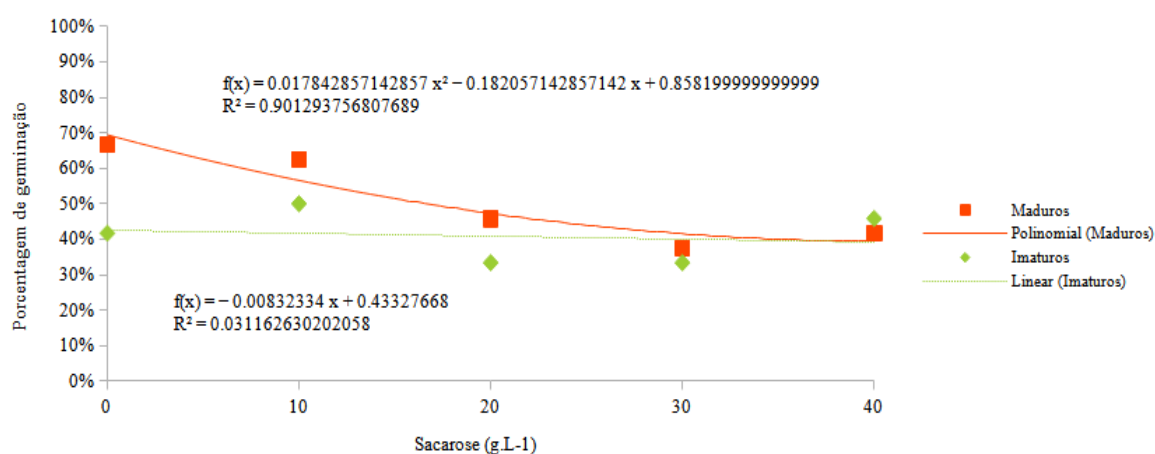
Sacarose (g.L ⁻¹)	Maturação (%)	
	Imaturo	Maduro
0	42 ^{ABb}	67 ^{Aa}
10	50 ^{Ab}	63 ^{Aa}
20	33 ^{Bb}	46 ^{Ba}
30	33 ^{Ba}	38 ^{Ba}
40	46 ^{ABa}	42 ^{Ba}

Letras iguais maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

Fonte: a autora.

Na figura 6 observa-se que em baixa concentração de sacarose obteve-se maior porcentagem de germinação em sementes de frutos maduros, sendo que a mesma reduz a partir de 5,1 g.L⁻¹. Já para os frutos imaturos, a concentração do açúcar foi não significativa.

Figura 6 – Germinação *in vitro* de sementes de *Clivia miniata* providas de frutos maduros e imaturos em função da concentração de sacarose no meio de cultivo.



Fonte: a autora.

2.3.2 Experimento II - Indução de Calos

Após 3 meses sendo cultivados *in vitro* em meio para indução de calos, os explantes apresentavam condições bastante variáveis, sendo a amplitude de sobrevivência destes variando de 0 à 90% (Tabela 5). Quanto à porcentagem de indução dos calos, observou-se uma variação de até 80% entre dois tratamentos.

Tabela 5 – Sobrevivência e porcentagem de indução de calos a partir de caules e bases foliares de *Clivia miniata* com 90 dias germinadas *in vitro*, após 3 meses de cultivo em meio de cultura com reguladores de crescimento.

Reguladores de crescimento (mg.L ⁻¹)	Variáveis	
	Sobrevivência (%)	Indução de calos (%)
Controle (sem regulador)	25 ^{bc}	33 ^{ns}
2 2,4-D + 0.52 PIC	75 ^{ab}	35
4 2,4-D + 1.05 PIC	70 ^{ab}	31
8 2,4-D + 2.1 PIC	5 ^c	0
2 2,4-D + 0.52 PIC + 2 BAP	80 ^{ab}	75
4 2,4-D + 1.05 PIC + 2 BAP	95 ^a	38
8 2,4-D + 2.1 PIC + 2 BAP	0 ^c	-
2 2,4-D + 2 BAP + 2 ANA	90 ^a	43
4 2,4-D + 4 BAP + 4 ANA	45 ^{abc}	62
4 BAP + 4 ANA	60 ^{abc}	80
CV (%) =	47.26	79.78

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. ns = não significativo.

Fonte: a autora.

Na ausência de reguladores de crescimento, a taxa de sobrevivência foi de apenas 25% e indução de calos de 33%, valores esperados para essas condições de cultivo. Já com a adição de 2 mg.L⁻¹ de 2,4-D + 0.52 PIC ao meio tivemos um expressivo aumento na proporção de explantes vivos (75%), a indução de calos ficou em 35%. Dobrando a concentração de reguladores não foram observadas grandes alterações (70% de sobrevivência e indução de calos de 31%). Contudo, o meio contendo 8 mg.L⁻¹ de 2,4-D + 2.1 de PIC mostrou-se prejudicial, com decréscimo na sobrevivência para 5% e ausência de formação de calos.

O tratamento com 2 mg.L⁻¹ de 2,4-D + 0.52 PIC + 2 BAP resultou em uma alta sobrevivência (80%) e indução de calos (75%), indicando uma resposta positiva a essa combinação de reguladores. Já a concentração 4 mg.L⁻¹ de 2,4-D + 1.05 PIC + 2 BAP manteve uma alta sobrevivência (95%), porém a indução de calos caiu drasticamente (38%). A combinação de 8 mg.L⁻¹ 2,4-D + 2.1 PIC já havia resultado em alta mortalidade dos explantes, o que se confirmou no tratamento com o acréscimo de 2 mg.L⁻¹ BAP, onde todos os explantes morreram.

Os efeitos da concentração dos reguladores combinados: 2,4-D + BAP + ANA mostrou-se negativamente correlativa em relação à variáveis avaliadas, onde a sobrevivência passou de 90% para 45% e a indução de calos de 43% para 62% quando a quantidade de RGC

foi elevada. Intrigantemente, o meio de cultivo com apenas 4 mg.L⁻¹ BAP + 4 ANA foi o que apresentou os melhores resultados: sobrevivência de 60% e indução de calos de 80%.

2.4 DISCUSSÃO

Udomdee e colaboradores (2014) verificaram o efeito da concentração de sacarose e maturidade das sementes na germinação *in vitro* de híbridos de *Dendrobium nobile*, outra monocotiledônea, e contrariamente aos resultados para *Clivia*, a germinação de sementes em diferentes concentrações de sacarose não foi significativa e o número de embriões que chegaram à plântula diminuiu com o aumento da concentração de sacarose.

Açúcares solúveis são geralmente adicionados em concentrações entre 10 e 30 g.L⁻¹ na forma de glicose, frutose ou sacarose (Knudson, 1946; Rasmussen, 1995; Van Waes, 1984). No entanto, uma maior quantidade de sacarose pode retardar o desenvolvimento de células cultivadas, causando a interrupção do ciclo celular quando a limitação de nutrientes (Gould *et al.*, 1981; Wu *et al.*, 2006). Deb e Pogener (2011) relataram que diferentes concentrações de sacarose afetaram a germinação de sementes imaturas de *Cymbidium aloifolium*. Outros pesquisadores também afirmaram que a adição de alta concentração de sacarose no meio de cultura pode ter efeito inibitório na absorção de nutrientes, diminuindo o potencial hídrico do meio (Shim *et al.*, 2003) e induzindo o estresse osmótico (Shohael *et al.*, 2006) (Huh *et al.*, 2016). De acordo com Johnson *et al.* (2011), a diminuição da germinação e do desenvolvimento em alta concentração de sacarose sugere que as sementes de *Bletia purpurea* (Orchidaceae) sofrem estresse osmótico na maior molaridade ou que o crescimento e o desenvolvimento foram inibidos por produtos da hidrólise da sacarose durante a autoclavagem.

Sementes de *C. adamantium* e *C. pubescens* apresentam alta porcentagem inicial de germinação *in vitro* na ausência de sacarose (94%). A porcentagem de germinação diminuiu à medida que as sementes permaneceram expostas à concentrações crescentes de sacarose no meio de cultura. As sementes de *C. pubescens* apresentaram 64% de germinação a 20 g L⁻¹ de sacarose. Sementes inoculadas em meio de cultura suplementado com 40 g L⁻¹ de sacarose tiveram redução na emergência de 44% e 65% para *C. adamantium* e *C. pubescens*, respectivamente. Na concentração de 80 g L⁻¹ de sacarose, o percentual de germinação foi inferior a 10% para ambas as espécies. A presença de sacarose interferiu fortemente na regulação osmótica do meio de cultivo e, conseqüentemente, na disponibilidade de água. A

redução no teor de água pode gerar uma diminuição na qualidade fisiológica das sementes, reduzindo o vigor e a porcentagem de emergência (de Souza *et al.*, 2021).

Trabalhos relacionados à maturação das sementes são mais escassos. Lee *et al.* (2005) relatou em suas pesquisas que sementes imaturas de *Cypripedium formosanum* germinaram mais rápido e melhor do que sementes maduras.

A baixa germinação de sementes maduras em alguns estudos pode estar relacionada à restrição física da testa e à existência de inibidores de germinação, como o ácido abscísico (Lee, 2003, Lee *et al.*, 2005; Udomdee *et al.*, 2014). Já foi demonstrado que variações nos níveis de ácido abscísico (ABA) restringem a germinação durante o desenvolvimento do embrião (Hartmann *et al.*, 2002; Nambara *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2013). Contrariamente, as sementes de clívia provenientes de frutos maduros germinaram em maior porcentagem, sugerindo que a composição proteica e lipídica da semente e os possíveis hormônios envolvidos podem não exercer influência sobre estas. Estudos futuros que quantifiquem os teores hormonais da semente durante o desenvolvimento do fruto de clívia podem contribuir para uma melhor compreensão dos fatores que controlam a capacidade germinativa dos embriões durante sua maturação.

Embriões de frutos imaturos de *A. aculeata*, sem endosperma completamente desenvolvido, são capazes de produzir mudas com raízes e bainhas foliares completamente formadas, indicando precoce embriogênese nessa espécie, sendo possível utilizar frutos imaturos como fontes de embriões para cultivo *in vitro* (Silva *et al.*, 2013), como visto também nas palmeiras *Astrocaryum ulei* Mart. (Pereira *et al.*, 2006) e *B. capitata* (Neves *et al.*, 2010). Os resultados observados para *Clivia miniata* nesta pesquisa mostraram que sementes de frutos imaturos também podem ser utilizadas para germinação *in vitro* ou cultivo de embriões zigóticos, apesar de apresentarem germinação inferior quando comparadas às sementes providas de frutos maduros.

A segunda etapa da pesquisa, que consistiu em induzir calos a partir das plantas obtidas da germinação *in vitro*, teve resultados um tanto quanto controversos. Ambos os tratamentos que continham 8 mg.L⁻¹ de 2,4-D + 2.1 de PIC resultaram em morte de grande parte dos explantes (> 90%), possivelmente pela concentração elevada de reguladores. Tal conjectura corrobora com Pan *et al.* (2010), o qual ressalta que quando em concentrações elevadas (> 6 mg.L⁻¹) o 2,4-D inibe a embriogênese somática, provavelmente devido à despolarização das membranas celulares. Em contrapartida, já foi observada a formação de ES em concentrações de 2,4-D superiores à 100 mg.L⁻¹ em *Serenoa repens* (Gallo-Meagher; Gern 2002) e 72.42 mg.L⁻¹ de picloram no trabalho de Steinmacher *et al.* (2007) com palmito

pupunha (*Bactris gasipaes*). Ou trabalho utilizando 8 mg/L de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) para indução de calos em *Dactylis glomerata* L. apresentou ótimos resultados com essa concentração (Kodaz *et al.*, 2021).

A composição e concentração relativa dos fitorreguladores (RCVs) são fatores críticos que determinam a capacidade de resposta do explante/cultura, bem como o modo da reação morfogênica (Gaj, 2004). Especificamente, auxinas e citocininas, utilizadas isoladamente ou em combinações, exercem efeitos distintos no crescimento celular em culturas de tecidos vegetais. Esses efeitos são complexos e dificilmente previsíveis já que os mecanismos exatos pelos quais esses RCVs atuam no metabolismo das células ainda não foi completamente compreendido. Diante disso, torna-se essencial determinar experimentalmente o tipo e a concentração adequados de reguladores de crescimento para cada espécie e técnica de cultura empregada (Siatka, 2019).

2.5 CONCLUSÃO

A menor concentração de açúcar, ou mesmo a sua ausência promove maior porcentagem de germinação em sementes de *Clivia miniata*, 60%, até a concentração de 5.1 g. L⁻¹. Em sementes de frutos imaturos, contudo, a concentração de açúcar parece não exercer influência na porcentagem de germinação, que gira em torno de 40%. Quanto à velocidade de germinação, não houve diferença significativa entre as doses de sacarose ou grau de maturação da semente. Ao analisarmos os resultados de indução de calos, os tratamentos contendo 8 mg.L⁻¹ de 2,4-D + 2.1 de PIC foram prejudiciais para a sobrevivência dos explantes e multiplicação celular. Já as combinações 2 2,4-D + 0.52 PIC + 2 BAP e 4 BAP + 4 ANA resultaram em boas taxas de sobrevivência e indução de calos. Com base nos dados obtidos podemos inferir que a citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) é essencial para a calogênese, independente da auxina utilizada.

REFERÊNCIAS

- ABRISHAMCHI P, ATTARAN DOWOM S, RADJABIAN T, SALAMI SA. Enhanced phenolic acids production in regenerated shoot cultures of *Salvia virgata* Jacq. after elicitation with Ag⁺ ions, methyl jasmonate and yeast extract. **Ind Crops Prod.** 2017;103:81–88. doi: 10.1016/j.indcrop.2017.03.043.
- ANAND S. Various approaches for secondary metabolite production through plant tissue culture. **Pharmacia.** ;1(1):1–7, 2010.
- ATTARAN DOWOM S, ABRISHAMCHI P, RADJABIAN T, SALAMI SA. Enhanced phenolic acids production in regenerated shoot cultures of *Salvia virgata* Jacq. after elicitation

with Ag⁺ ions, methyl jasmonate and yeast extract. **Ind Crops Prod**;103:81–88 2017. doi: 10.1016/j.indcrop.2017.03.043.

BADR, ASHRAF; ANGERS, PAUL; DESJARDINS, YVES. Comprehensive analysis of in vitro to ex vitro transition of tissue cultured potato plantlets grown with or without sucrose using metabolic profiling technique. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 122, p. 491-508, 2015.

CUI XH, MURTHY HN, JIN YX, YIM YH, KIM JY, PAEK KY. Production of adventitious root biomass and secondary metabolites of *Hypericum perforatum* L. in a balloon-type airlift reactor. **Bioresour Technol.** 2011 ;102(21):10072–10079. doi: 10.1016/j.biortech.2011.08.044.

DENG L, ZHANG Y, WANG MM, ZHAO SW. Study on non-asymbiotic germination of *Cypripedium macranthos* seed. **Seed** 31:31-39, 2012.

EFFERTH, Thomas. Biotechnology applications of plant callus cultures. **Engineering**, v. 5, n. 1, p. 50-59, 2019.

FORTINI EA, BATISTA DS, MAMEDES-RODRIGUES TC, *ET AL.* Gas exchange rates and sucrose concentrations affect plant growth and production of flavonoids in *Vernonia condensata* grown *in vitro*. **Plant Cell Tissue Organ Culture**. 2021;144:593–605. doi:10.1007/s11240-020-01981-5.

GALLO-MEAGHER M, GERRN J. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of saw palmetto, an important landscape and medical plant. **Plant Cell Tissue Org. Culture**. 2002; 68:253–256.

GEORGE EF. Plant tissue culture procedure—Background. In: *Plant Propagation by Tissue Culture*, 3rd ed. **Springer**; 2008. p. 1–28. ISBN 9781402050046.

GIBSON, S. I. Plant sugar-response pathways. Part of a complex regulatory web. **Plant Physiology**, v. 124, n. 4, p. 1532-1539, 2000.

HERNÁNDEZ, MI P; LOBO, MA; MEDINA, CI C; CARTAGENA, JR V; DELGADO, OA P. Comportamiento de la germinación y categorización de la latencia en semillas de mortiño (*Vaccinium meridionale* Swartz). *Agronomía Colombiana*. ;27(1):15-23, 2009.

HILAE, A.; TE-CHATO, S. Effects of carbon sources and strength of MS medium on germination of somatic embryos of oil palm (*Elaeis quineensis* Jacq.). **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 27, n. 3, p. 629-635, 2005.

HUH YS, LEE JK, NAM SY, HONG EY, PAEK KY; Son, SW. Effects of altering medium strength and sucrose concentration on *in vitro* germination and seedling growth of *Cypripedium macranthos* Sw. **Journal of Plant Biotechnology**, 43(1), 132-137, 2016.

JOHNSON TR, KANE ME, PÉREZ HE. Examining the interaction of light, nutrients and carbohydrates on seed germination and early seedling development of *Bletia purpurea* (Orchidaceae). **Plant Growth Regulation**. 63:89-99, 2011.

KOOPOWITZ H. **Clivia**. Portland, OR, Cambridge, UK: Timber Press, 2002.

LEE YI, YEUNG EC, CHENG MC. Desenvolvimento embrionário de *Cypripedium formosanum* em relação à germinação de sementes *in vitro*. **J Am Soc Hortic Sci** 130:747–753, 2005.

MATKOWSKI A. Plant *in vitro* culture for the production of antioxidants — A review. **Biotechnol Adv.** 26(6):548–560, 2008. doi: 10.1016/j.biotechadv.2008.07.001.

MODARRES, Masoomah; ESMAEILZADEH BAHABADI, Sedigheh; TAGHAVIZADEH YAZDI, Mohammad Ehsan. Enhanced production of phenolic acids in cell suspension culture of *Salvia leriifolia* Benth. using growth regulators and sucrose. **Cytotechnology**, v. 70, n. 2, p. 741-750, 2018.

MUKHERJEE S, KUTTY NN, BERA P, MITRA A (2019) Impact of light and sucrose supplementation on cellular differentiation, metabolic shift and modulation of gene expression in hairy roots of *Daucus carota*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture** 136:383–397, 2019. <https://doi.org/10.1007/s11240-018-1523-5>.

MURASHIGE T, SKOOG F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol Plant** 15:473–497, 1962. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>.

MURTHY, HOSAKATTE NIRANJANA; LEE, EUN-JUNG; PAEK, KEE-YOEUP. Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (OCTODO)**, v. 118, p. 1-16, 2014.

PALACIO L, CANTERO JJ, CUSIDÓ RM, GOLENIOWSKI ME. Phenolic compound production in relation to differentiation in cell and tissue cultures of *Larrea divaricata* (Cav.) **Plant Sci.** 2012;193-194:1–7. doi: 10.1016/j.plantsci.2012.05.007.

PAN, Z.; ZHU, S.; GUAN, R.; DENG, X. Identification of 2, 4-D-responsive proteins in embryogenic callus of Valencia sweet orange (*Citrus sinensis* Osbeck) following osmotic stress. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, 103, 145-153. 2010.

QIU, J., GAO, F., SHEN, G., LI, C., HAN, X., ZHAO, Q., ... & PANG, Y. Metabolic engineering of the phenylpropanoid pathway enhances the antioxidant capacity of *Saussurea involucreata*. **PLoS One**, 8(8), e70665, 2013.

RASMUSSEN, Hanne N. **Terrestrial orchids: from seed to mycotrophic plant**. Cambridge University Press, 1995.

SAGHARYAN M, GANJEALI A, CHENIANY M, MOUSAVI KOUHI SM. Optimization of Callus Induction with Enhancing Production of Phenolic Compounds Production and Antioxidants Activity in Callus Cultures of *Nepeta binaloudensis* Jamzad (Lamiaceae). **Iran J Biotechnol.** Oct 1;18(4):e2621, 2020. doi: 10.30498/IJB.2020.2621. PMID: 34056026; PMCID: PMC8148645.

SILVA PO, RIBEIRO LM, SIMÕES MOM, LOPES PSN, FARIAS TM, GARCIA QS. Fruit maturation and *in vitro* germination of macaw palm embryos. **African Journal of Biotechnology**, 12(5), 2013.

UDOMDEE W, WEN PJ, LEE CY, CHIN SW, & CHEN FC. Effect of sucrose concentration and seed maturity on *in vitro* germination of *Dendrobium nobile* hybrids. **Plant Growth Regulation**, 72, 249-255, 2014.

WU, C. H.; DEWIR, Y. H.; HAHN, E. J.; PAEK, K. Y. Optimization of culturing conditions for the production of biomass and phenolics from adventitious roots of *Echinacea angustifolia*. **Journal of Plant Biology**, 49, 193-199, 2006.

XIAO, Yulan; NIU, Genhua; KOZAI, Toyoki. Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 105, p. 149-158, 2011.

YILDIRIM AB, TURKER AU. Effects of regeneration enhancers on micropropagation of *Fragaria vesca* L. and phenolic content comparison of field-grown and *in vitro*-grown plant materials by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS) **Sci Hort.** 2014;169:169–178. doi: 10.1016/j.scienta.2014.01.038.

ZAHARA M, DATTA A, BOONKORKAEW P (2016) Effects of sucrose, carrot juice and culture media on growth and net CO₂ exchange rate in *Phalaenopsis* hybrid “Pink.” **Sci Hort** 205:17–24. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.04.011>.

ZAKER A, SYKORA C, GÖSSNITZER F, ABRISHAMCHI P. Effects of some elicitors on tanshinone production in adventitious root cultures of *Perovskia abrotanoides* Karel. **Ind Crop Prod.** 2015;67:97–102. doi: 10.1016/j.indcrop.2015.01.015.

ZHA, X. Q., LUO, J. P., JIANG, S. T., & WANG, J. H. Enhancement of polysaccharide production in suspension cultures of protocorm-like bodies from *Dendrobium huoshanense* by optimization of medium compositions and feeding of sucrose. **Process Biochemistry**, 42(3), 344-351, 2007.

ZENG S, ZHANG Y, TEIXEIRA DA SILVA JA, WU K, ZHANG J, & DUAN J. (2013). Seed biology and *in vitro* seed germination of *Cypripedium*. **Critical Reviews in Biotechnology**, 34(4), 358–371. doi:10.3109/07388551.2013.841117.

ZHOU LG, WU JY. Development and application of medicinal plant tissue cultures for production of drugs and herbal medicinals in China. **Nat Prod Rep.** 2006;23(5):789–810. doi: 10.1039/b610767b.

CAPÍTULO 3 - INDUÇÃO E CULTIVO *IN VITRO* DE CALOS A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICO DE *Clivia miniata*

RESUMO

As plantas, ao enfrentarem estresses, geram metabólitos secundários com valor medicinal, sendo as culturas de células vegetais uma fonte escalável desses compostos, desempenhando um papel crucial na pesquisa e na indústria. O estudo utilizando técnicas de cultivo *in vitro* visa investigar os efeitos de diferentes reguladores de crescimento na indução de calos, seguidos pela cultura em biorreator de imersão temporária. No Experimento I, frutos de *Clivia miniata* foram coletados, e suas sementes foram testadas para viabilidade com cloreto de tetrazólio. Após desinfecção, as sementes foram seccionadas, os embriões retirados e transferidos para tubos de vidro com 10 ml de meio de cultivo MS e diferentes reguladores de crescimento. O experimento durou 120 dias em sala de crescimento a 25°C com ausência de luz. Os explantes foram avaliados visualmente quanto à resposta morfogênica a cada 30 dias e pesados ao final do período experimental. A regeneração dos calos foi realizada em meio suplementado com cinetina e ácido naftalenoacético. Análises histológicas foram realizadas com alguns dos calos obtidos, os quais foram fixados em formoldeído, desidratados, infiltrados em resina, cortados e corados com azul de toluidina. No Experimento II, calos foram cultivados em biorreator de imersão temporária usando um sistema de duplo recipiente. O meio de cultivo utilizado foi o MS com 3 combinações de reguladores de crescimento mais o tratamento controle sem regulador. Após 60 dias foi avaliada a massa fresca de calos. No Experimento I, a sobrevivência dos explantes de embriões zigóticos de *Clivia miniata* após 120 dias variou significativamente entre os tratamentos, destacando-se o grupo com 4 BAP + 4 2,4-D, alcançando 75%, enquanto o controle apresentou baixas taxas. A presença de AgNO₃ também influenciou a sobrevivência. Os calos induzidos exibiram variação na taxa ao longo do tempo, sendo 4 BAP + 4 2,4-D + 2 AgNO₃ o mais eficaz. A análise histológica indicou a formação estruturas vasculares não conectadas ao tecido adjacente, ausência de protoderme e células não meristemáticas nas extremidades, descartando a hipótese de embriogênese somática. Na regeneração, diferentes resultados foram observados de acordo com o meio no qual o calo foi induzido. Já no cultivo em biorreator, o tratamento com 4 BAP + 4 ANA se destacou, apresentando o maior ganho de massa fresca. A análise da indução de calos revelou padrões notáveis, sobretudo na combinação 4 BAP + 4.0 2,4-D, com aumento constante na porcentagem de calos induzidos e sobrevivência dos explantes superior à 75%. Tratamentos contendo ácido naftalenoacético (ANA), por outro lado, resultaram em maior produção de massa fresca.

Palavras-chave: Indução de calos, cultura de tecidos, nitrato de prata, reguladores de crescimento vegetal.

ABSTRACT

Plants, when facing stress, produce secondary metabolites with medicinal value, and plant cell cultures serve as a scalable source of these compounds, playing a crucial role in research and industry. The study using *in vitro* cultivation techniques aims to investigate the effects of different growth regulators on callus induction, followed by culture in a temporary immersion bioreactor. In Experiment I, *Clivia miniata* fruits were collected, and their seeds were tested for viability with tetrazolium chloride. After disinfection, the seeds were sectioned, embryos removed, and transferred to glass tubes with 10 ml of MS culture medium and different growth regulators. The experiment lasted 120 days in a growth room at 25°C without light. Explants were visually evaluated for morphogenic response every 30 days and weighed at the end of the experimental period. Callus regeneration was performed in medium supplemented with kinetin and naphthaleneacetic acid. Histological analyses were conducted on some of the obtained calluses, which were fixed in formaldehyde, dehydrated, infiltrated with resin, sectioned, and stained with toluidine blue. In Experiment II, calluses were cultivated in a temporary immersion bioreactor using a double-container system. The culture medium used was MS with three combinations of growth regulators plus the control treatment without a regulator. After 60 days, the fresh mass of calluses was evaluated. In Experiment I, the survival of *Clivia miniata* zygotic embryo explants after 120 days varied significantly among treatments, with the group with 4 BAP + 4 2,4-D standing out, reaching 75%, while the control showed low rates. The presence of AgNO₃ also influenced survival. The induced calluses exhibited variation in the rate over time, with 4 BAP + 4 2,4-D + 2 AgNO₃ being the most effective. Histological analysis indicated the formation of vascular structures not connected to adjacent tissue, absence of protoderm, and non-meristematic cells at the ends, ruling out the somatic embryogenesis hypothesis. In regeneration, different results were observed depending on the medium in which the callus was induced. In bioreactor cultivation, the treatment with 4 BAP + 4 ANA stood out, showing the highest gain in fresh mass. The analysis of callus induction revealed notable patterns, especially in the combination 4 BAP + 4.0 2,4-D, with a constant increase in the percentage of induced calluses and explant survival exceeding 75%. Treatments containing naphthaleneacetic acid (ANA), on the other hand, resulted in higher fresh mass production.

Keywords: Callus induction, tissue culture, silver nitrate, plant growth regulators.

3.1 INTRODUÇÃO

Desde tempos imemoriais, os seres humanos utilizam produtos vegetais como fontes para fármacos, agroquímicos e nutrição. Nos tempos recentes, a biotecnologia oferece oportunidades atrativas para a produção de sistemas *in vitro* baseados em plantas (por exemplo, culturas de calos, culturas de suspensão de células e culturas de órgãos) e para manipulação genética, facilitando a geração de plantas e produtos vegetais desejados. Além de seu importante papel comercial, técnicas biotecnológicas *in vitro* podem contribuir para contrariar a extinção de espécies ameaçadas (Efferth, 2019).

As plantas se adaptam a estresses abióticos e bióticos remodelando-se e gerando metabólitos secundários ativados por elicitores, liberados como respostas de defesa. Muitos desses metabólitos não apenas têm funções protetoras, mas também possuem valor medicinal para seres humanos. Portanto, as culturas de células vegetais representam fontes interessantes para a produção escalável de metabólitos secundários (Efferth, 2019).

Culturas de tecidos vegetais representam uma técnica importante na ciência básica e aplicação comercial. Em todas as principais famílias de plantas terrestres, tecidos lesionados são recuperados por células de calos não diferenciadas. Essas células de calos podem ser cultivadas *in vitro* para aplicações biotecnológicas, diferenciando-se das células vegetais diferenciadas. As culturas de calos, cultivadas em condições adequadas, podem se re-diferenciar em plantas completas. As vantagens dos sistemas de cultura de células, em comparação com o cultivo convencional de plantas inteiras, incluem a geração independente de compostos de plantas, resistência a microorganismos e insetos, manutenção fácil de plantas raras e regulação robótica da produção de metabólitos secundários para reduzir custos e aumentar a produtividade (Efferth; Thomas, 2019).

A embriogênese somática indireta, investigada nessa pesquisa, requer a redeterminação de células diferenciadas, a proliferação de calos e a indução de células embriogênicas determinadas (Williams; Maheswaran, 1986). Diversos fitorreguladores tem sido utilizados eficientemente com o objetivo de se induzir a formação de calos embriogênicos e posterior regeneração de plantas. Dentre os mais comuns estão algumas auxinas sintéticas como o 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico (picloram - PIC) e ácido naftalenoacético (ANA); e citocininas como a 6-benzilaminopurina (BAP) (Efferth, 2019). Outra substância empregada na cultura de calos e embriogênese somática é o nitrato de prata (AgNO_3), utilizado em estudos de cultura de tecidos para inibir a ação do etileno devido à sua solubilidade em água e à falta de fitotoxicidade em concentrações adequadas (Kumar *et al.*, 2009). Os resultados encontrados com o uso do nitrato de prata, contudo, são bastante divergentes, sendo benéfico para algumas espécies (Zhang *et al.*, 2001; Vain *et al.*, 1989; Songstad *et al.*, 1991; Adkins *et al.*, 1993; Fei; Read; Riordan, 2000; Haque *et al.*, 2015) ou prejudicial para outras (Hatanaka *et al.*, 1995; Tsao; Reed, 2002).

Os biorreatores, originalmente desenvolvidos para a cultura de células e microorganismos com foco em fermentação e produção de metabólitos secundários para aplicações industriais, têm se mostrado surpreendentemente úteis. Os primeiros relatos do uso de biorreatores para essa finalidade remontam a 1981, quando Takayama e Misawa obtiveram sucesso na propagação *in vitro* de begônias ornamentais. Desde então, o uso de

biorreatores na multiplicação *in vitro* de diversas espécies vegetais tem sido documentado em pesquisas e aplicações (Takayama; Akita, 1994; Ziv *et al.*, 1998; Etienne *et al.*, 2006; Tarmizi *et al.*, 2008; Debnath, 2011). A tecnologia de cultura de tecidos *in vitro*, especialmente o Sistema de Imersão Temporária (TIS), oferece vantagens significativas na produção de plantas e metabólitos. O uso do TIS promete atender às crescentes demandas do mercado, garantir a sustentabilidade e melhorar a produção de biomassa e compostos bioativos a partir de plantas medicinais (De Carlo *et al.*, 2021).

Um dos benefícios notáveis é a renovação constante do ambiente de cultivo, reduzindo a necessidade de recipientes individuais e espaço de laboratório. Isso facilita a manipulação dos explantes e minimiza os riscos de contaminação microbiana. Além disso, os biorreatores melhoram a absorção de nutrientes e reguladores de crescimento. A composição do meio de cultura pode ser ajustada conforme o estágio de desenvolvimento do explante, permitindo um controle mais preciso do processo (Paek *et al.*, 2001; Choi *et al.*, 2008).

No entanto, a maioria dos biorreatores convencionais mantém os explantes completamente submersos no meio de cultura líquido, o que pode resultar em desafios fisiológicos devido à limitação na troca de gases, levando à hiperidricidade dos tecidos em cultivo. A hiperidricidade é uma desordem fisiológica séria causada pelo acúmulo excessivo de água no apoplasto, prejudicando o desenvolvimento das plantas (Gogoi; Borua, 2014). Para solucionar esse problema, os biorreatores de imersão temporária surgiram como uma alternativa eficaz e têm ganhado popularidade na micropropagação de plantas devido à sua simplicidade e eficiência. Eles permitem a transferência periódica e automatizada do meio de cultura líquido, cobrindo os explantes por um período determinado. Esse sistema oferece benefícios consideráveis, como a melhor utilização do meio nutritivo líquido, a melhoria das condições gasosas dentro dos frascos de cultivo e a redução da hiperidricidade. Além disso, a manipulação da frequência e duração das imersões em meio líquido oferece controle sobre o crescimento e desenvolvimento das culturas, minimizando o estresse mecânico causado pela ausência de agitação, proporcionando um ambiente mais favorável para a multiplicação de plantas (Etienne; Berthouly, 2002; Teixeira, 2002; Martin; Vermette, 2005).

No Brasil também foram desenvolvidos sistemas de biorreatores de imersão temporária, como o sistema de biorreator de frascos gêmeos BIT, desenvolvido pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Esse sistema oferece flexibilidade ao utilizar diferentes tipos de frascos e regimes de imersão, bem como a capacidade de cultivar diversos tipos de estruturas vegetais, incluindo células, embriões, gemas, brotos e raízes. Estudos experimentais demonstraram que a micropropagação em biorreatores de imersão temporária é um método

eficiente para a produção em larga escala de mudas de diferentes espécies vegetais (Espinosa *et al.*, 2002; Roels *et al.*, 2005; Niemenak *et al.*, 2008; Debnath, 2011; Steinmacher *et al.*, 2011; Heringer *et al.*, 2014).

Em resumo, o uso de biorreatores de imersão temporária representa uma inovação significativa na micropropagação de plantas, abordando desafios anteriores associados à hiperidricidade e proporcionando vantagens substanciais em termos de eficiência e custo na produção de mudas. Essa abordagem busca atender às crescentes demandas por mudas de forma mais eficiente e sustentável, contribuindo para a conservação e exploração responsável da biodiversidade vegetal. Ao aplicar essa tecnologia na micropropagação de espécies como a *Clivia miniata*, podemos promover a preservação das plantas como recursos naturais e explorar seu potencial ornamental e farmacológico de maneira mais eficaz.

Buscamos neste trabalho investigar os efeitos do 2,4-D, BAP, picloram, ANA e nitrato de prata na indução de calos e embriogênese somática e posterior cultura desses em biorreator de imersão temporária.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Experimento I – Indução de Calos

3.2.1.1 Material vegetal

Os frutos de *Clivia miniata* foram coletados em julho de 2022 em Porto Amazonas, PR e levados ao laboratório onde foram armazenados no escuro em temperatura ambiente até a realização dos testes. Observamos os níveis da viabilidade de sementes de clívia, através do teste de tetrazólio, nesse teste as sementes são embebidas em uma solução incolor de 2,3,5 trifenil cloreto de tetrazólio, indicadora do processo de respiração. Em seguida, as sementes foram lavadas com água corrente, espalhadas em papel toalha e secas à sombra em temperatura ambiente, por 3 dias. Para a realização do teste de tetrazólio foram utilizadas repetições de 50 sementes, 100 sementes no total passaram a serem pré-umedecidas por imersão em água por 24 horas. A exposição dos tecidos ao manchamento ocorreu por meio de uma secção longitudinal da semente. Logo após, as sementes foram imersas em solução incolor de brometo de 2,3,4- trifenil tetrazólio 0.1% por 3 horas a 30°C e então mantidas 21 horas em temperatura ambiente em condição de escuridão completa. Depois de imersas, as sementes foram lavadas com água corrente e corte com navalha para visualizar o embrião. Foi avaliado a viabilidade através da porcentagem de cor do embrião (0, 50 e 100%), sendo que

sementes que se apresentaram coradas com embrião acima de 50% foram consideradas viáveis.

3.2.1.2 Assepsia e introdução *in vitro*

As sementes coletadas após serem secas e descascadas foram lavadas em água corrente e desinfetadas com álcool a 70% (v/v) por 60 segundos, sendo posteriormente imersas em uma solução comercial de hipoclorito de sódio a 2 – 2,5% de cloro ativo (v/v) acrescido de 3 gotas de detergente Tween – 20 por 20 minutos sob agitação. Após a assepsia as sementes foram então levadas para fluxo laminar onde se realizou o enxágue três vezes com água destilada autoclavada por 20 minutos à 120°C e pressão de 1 atm. Depois de esterilizadas as sementes foram seccionadas longitudinalmente, dividindo os embriões ao meio, os quais tiveram seus ápices meristemáticos removidos para que não houvesse o desenvolvimento da planta *in vitro*. Os embriões zigóticos seccionados foram então introduzidos em tubos de vidro contendo 10 mL de meio de cultivo MS com diferentes concentrações de reguladores de crescimento (Tabela 6).

Tabela 6 – Tratamentos empregados na indução de calos a partir de embriões zigóticos *in vitro*.

Tratamento	Reguladores de crescimento (mg.L ⁻¹)				
	Picloram	2,4-D	BAP	ANA	AgNO ₃
T1	0	0	0	0	0
T2	0,52	2	2	0	0
T3	0	2	2	2	0
T4	0	0	4	4	0
T5	0	4	4	0	0
T6	0,52	2	2	0	2
T7	0	2	2	2	2
T8	0	0	4	4	2
T9	0	4	4	0	2
T10	0	0	0	0	2

Fonte: a autora.

3.2.1.3 Condução do experimento

Após a instalação do experimento, os embriões introduzidos foram levados para sala de crescimento a 25° C +- 2° no escuro e acompanhados diariamente para verificação de eventuais contaminações. Com 30, 60, 90 e 120 dias de cultivo os explantes foram avaliados visualmente e o número de embriões vivos e que apresentavam sinais de calogênese foram registrados.

3.2.1.4 Análise estatística

O experimento foi montado em delineamento estatístico inteiramente casualizado com quatro repetições. Cada repetição consistiu em 6 tubos de ensaio com um explante. Os tratamentos foram arranjados em esquema fatorial 2 x 5, sendo: 5 combinações de reguladores de crescimento e presença ou ausência de nitrato de prata, totalizando 10 tratamentos (Tabela 1). Os dados relativos à maturação foram submetidos à análise de variância pelo teste Kruskal-Wallis e os valores médios foram comparados pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade e nos testes em que houve interação, os respectivos desdobramentos foram realizados.

3.2.1.5 Regeneração

O calo amarelo friável das bases das pétalas e o calo compacto amarelo-verde dos fragmentos do ovário foram então transferidos para um meio de regeneração MS basal, suplementado com 0.5 mg.L⁻¹ de ANA e 2.0 mg.L⁻¹ de cinetina. As culturas foram incubadas sob uma luz de 40 µmol m⁻² s⁻¹ fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas frias com um fotoperíodo de 12 horas. Após 4 meses de cultura, a porcentagem de calos que produziram brotos foi avaliada.

3.2.1.6 Avaliação histológica

Calos obtidos após os 120 dias de cultivo *in vitro* foram seccionados e fixados em FAA70 (formol: ácido acético glacial: álcool etílico 50%, na proporção 1:1:18) por 24 horas. Na sequência as amostras foram desidratadas em série etílica crescente até álcool 70%, pré-infiltradas em resina (hidroxietilmetacrilato) e álcool 70% na proporção de 1:1 v/v e incluídas em resina pura com adição de ativador, conforme instruções do fabricante (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Todo o processo foi realizado sob vácuo. Cortes de 7 µm foram feitos em micrótomo de rotação (LEICA RM2145, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) e corados com azul de toluidina (0.5% em água destilada) por 8 minutos e secas à temperatura ambiente.

Os cortes foram fotografados em fotomicroscópio óptico da marca Nikon®, modelo Eclipse E200 com uma câmera The Imaging Source®, modelo DFK 23UX236 acoplada.

3.2.2 Experimento II – Cultura de Calos de *C. miniata* em Biorreator de Imersão Temporária

3.2.2.1 Material Vegetal

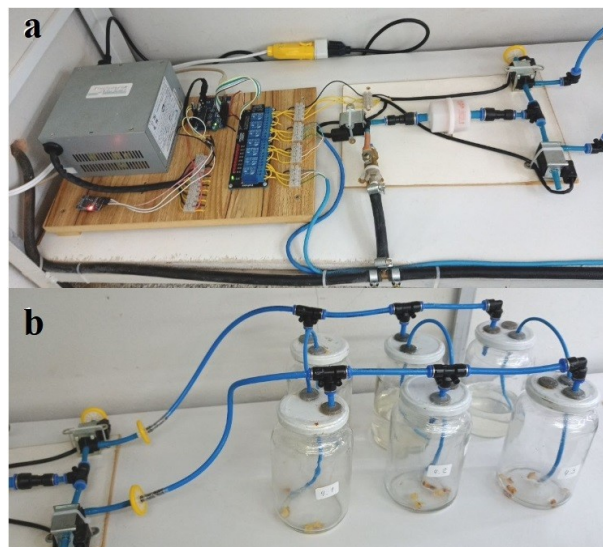
Calos embriogênicos de *Clivia miniata* foram anteriormente induzidos em meio

Murashige e Skoog (1962) semissólido (MS) suplementado com 0.1 g L⁻¹ de inositol, 4.0 mg L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP), 4.0 mg L⁻¹ de 2,4-D, 40 g L⁻¹ de sacarose e 6 g L⁻¹ de ágar durante 120 dias. O pH foi ajustado para 5,8. Após esse período, os calos foram segmentados em porções de 0.5 a 1 cm e utilizados como explantes.

3.2.2.2 Sistema de biorreator

O biorreator utilizado foi baseado em um sistema de linha e é dividido em dois módulos (lógico e físico) (Figura 7a). O módulo lógico é responsável pela configuração, gerenciamento e monitoramento do biorreator e consiste em dois níveis. O primeiro nível é executado por software, que se comunica com o segundo nível, composto por um microcontrolador. O segundo nível interage diretamente com o módulo físico, enviando instruções que são executadas pneumaticamente pelo biorreator. Essas instruções consistem na abertura e no fechamento de solenoides, e por meio dessas ações, o meio de cultura é transferido entre os recipientes (Zanlorenzi Junior *et al.*, 2017) (depósito de patente BR202017008054 - 0, 19 de abril de 2017). Um sistema de duplo recipiente (Figura 7b), um para os explantes e outro para o meio de cultura líquido, também foi usado. Após a adição do meio de cultura aos recipientes, eles eram autoclavados a 120 °C por 20 minutos antes da instalação experimental sob fluxo laminar. O meio de cultura era transferido a cada 2 horas entre os recipientes e permanecia no recipiente de explantes por 2 minutos antes de retornar ao frasco de meio.

Figura 7 – Sistemas componentes do biorreator de imersão temporária. a) módulos lógico e físico; b) sistema de duplo recipiente.



Fonte: a autora.

3.2.2.3 Meio de cultivo

No sistema do biorreator, foram utilizados 3 pares de recipientes (com capacidade total de 1 litro) com 200 mL de meio em cada frasco. O meio líquido era composto por MS suplementado com 0,1 g L⁻¹ de inositol, 40 g L⁻¹ de sacarose e reguladores de crescimento de acordo com os respectivos tratamentos. O pH foi ajustado para 5,8. Após 60 dias a massa fresca de calos foi avaliada e número de brotos contabilizados, quando presentes. A sala de crescimento foi mantida a 25 ± 2 °C, com fotoperíodo de 16 horas e uma densidade de fluxo de fótons de luz branca de 27 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Indução de Calos

Após 120 dias em meio de indução de calos foram registrados o número de explantes vivos e calculada a taxa de sobrevivência destes (Tabela 7). Apesar de não haver diferença estatística entre os tratamentos, verificou-se uma grande amplitude de sobrevivência de 66.7 %, variando entre 8.3% do tratamento controle (sem hormônios) e 75% para o tratamento contendo 4.0 mg.L⁻¹ de BAP, 4.0 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 2.0 mg.L⁻¹ de AgNO₃.

Tabela 7 – Sobrevivência dos explantes de embriões zigóticos de *Clivia miniata* após 120 dias de cultivo em meio de cultivo com diferentes reguladores de crescimento.

Reguladores de crescimento (mg/L)	Sobrevivência (%)	
	AgNO ₃ (mg.L ⁻¹)	
	0	2
Controle (sem regulador)	8.3 ^{ns}	11.1 ^{ns}
4 BAP + 4 2,4-D	64.6	75.0
4 BAP + 4 ANA	58.3	62.5
2 BAP + 2 2,4-D + 0.52 PIC	25.0	33.3
2 BAP + 2 2,4-D + 2 ANA	37.5	41.6
CV (%) = 78.62%		

O teste de média Tukey a 5% de probabilidade ($p < 0.05$) não revelou diferença significativa entre os tratamentos.

Fonte: a autora.

Os explantes no grupo de controle apresentam baixas taxas de sobrevivência, com valores de 8.3% e 11.1% para 0 mg/L e 2 mg/L de AgNO₃, respectivamente. O tratamento 4 BAP + 4 2,4-D mostra uma notável melhoria na sobrevivência dos explantes, atingindo 64.6% sem AgNO₃ e 75% com 2 mg/L de AgNO₃. A sobrevivência do explantes cultivados em meio com 4 BAP + 4 ANA varia de 58.3% (sem AgNO₃) a 62.5% (com 2 mg/L de AgNO₃). Os

valores são relativamente próximos entre os dois tratamentos com diferentes concentrações de AgNO_3 . O tratamento 2 BAP + 2 2,4-D + 0.52 PIC mostra as taxas mais baixas de sobrevivência, com 25% sem AgNO_3 e 33.3% com 2 mg/L de AgNO_3 . Dentro do tratamento 2 BAP + 2 2,4-D + 2 ANA a sobrevivência varia de 37.5% (sem AgNO_3) a 41.6% (com 2 mg/L de AgNO_3). O coeficiente de variação calculado é alto (78.62%), indicando uma considerável variabilidade nos dados.

Esses resultados sugerem que alguns dos tratamentos com reguladores de crescimento, especialmente 4 BAP + 4 2,4-D, proporcionam uma melhor sobrevivência dos explantes em comparação com os grupos de controle e demais tratamentos testados. A presença de AgNO_3 também parece influenciar a sobrevivência, com variações nos efeitos dependendo dos reguladores de crescimento utilizados.

Após a instalação do experimento, os embriões introduzidos foram acompanhados diariamente para verificação de eventuais contaminações juntamente com a fotografia destas no período de 30, 60, 90 e 120 dias após a instalação do experimento. O número de calos foi contabilizado e a taxa de indução de calos calculada (Tabela 8).

Tabela 8 – Porcentagem de indução de calos em embriões zigóticos de *Clivia miniata* após 30, 60, 90 e 120 dias em meio cultivo com diferentes combinações de reguladores de crescimento.

RGCs mg/L	Calos induzidos (%)			
	30 dias	60 dias	90 dias	120 dias
Controle	0 ^{ns}	0 ^{ns}	0 ^b	0 ^b
Controle prata	33	33	33 ^{ab}	33 ^{ab}
4 BAP + 4.0 2,4-D	79	91.7	91.7 ^{ab}	91.7 ^{ab}
4 BAP + 4.0 2,4-D + 2.0 AgNO_3	72.33	83.3	100 ^a	100 ^a
4 BAP + 4.0 ANA	45.7	75	87.5 ^{ab}	87.5 ^{ab}
4 BAP + 4.0 ANA + 2.0 AgNO_3	25	62.5	81.2 ^{ab}	81.2 ^{ab}
2 BAP + 2.0 2,4-D + 0.52 PIC	40	60	60 ^{ab}	60 ^{ab}
2 BAP + 2.0 2,4-D + 0.52 PIC + 2.0 AgNO_3	16.6	50	50 ^{ab}	50 ^{ab}
2 BAP + 2.0 2,4-D + 2.0 ANA	37.5	75	75 ^{ab}	75 ^{ab}
2 BAP + 2.0 2,4-D + 2.0 ANA + 2.0 AgNO_3	79.25	79.25	79.25 ^{ab}	79.25 ^{ab}
CV (%) =	76.06	67.84	57.76	56.03

Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste Tukey ($p < 0.05$).

Fonte: a autora.

Ambos os grupos de controle mostram uma taxa de calos induzidos de 0% ao longo de todos os períodos de tempo.

A combinação 4 BAP + 4.0 2,4-D mostra um aumento constante na porcentagem de calos induzidos ao longo do tempo, começando em 79% aos 30 dias e atingindo 91.7% aos 60 dias, mantendo essa taxa até os 120 dias. A adição de AgNO_3 a esse grupo aumentou ainda

mais a porcentagem de calos induzidos, atingindo 100% aos 90 dias e mantendo esse valor até os 120 dias.

O tratamento 4 BAP + 4.0 ANA mostra uma tendência de aumento na porcentagem de calos induzidos, começando em 45.7% aos 30 dias e atingindo 87.5% aos 90 dias, mantendo essa taxa até os 120 dias. Aqui o AgNO_3 também aumentou a porcentagem de calos induzidos, atingindo 81.2% aos 90 dias e mantendo esse valor até os 120 dias.

O cultivo em meio com 2 BAP + 2.0 2,4-D + 0.52 PIC mostra uma variação na taxa de calos induzidos ao longo do tempo, começando em 40% aos 30 dias, atinge 60% aos 60 dias e mantendo essa taxa até os 120 dias. Neste caso a presença de AgNO_3 parece não alterar significativamente a taxa de calos induzidos em comparação com o tratamento anterior.

2 BAP + 2.0 2,4-D + 2.0 ANA mostra uma variação nas taxas de calos induzidos, começando em 37.5% aos 30 dias e atingindo 75% aos 60 dias, mantendo essa taxa até os 120 dias. Ao adicionar o nitrato de prata temos uma porcentagem relativamente alta e constante de calos induzidos ao longo do tempo, começando em 79.25% e mantendo esse valor até os 120 dias.

A diminuição do coeficiente de variação dos dados ao longo do tempo sugere uma maior consistência nos resultados.

3.3.2 Massa Fresca

Ao final do experimento os calos obtidos foram pesados e a massa fresca entre os tratamentos comparada (Tabela 9). Independentemente da presença do nitrato de prata, os tratamentos com maior produção de massa fresca foram aqueles que contém ácido naftalenoacético (ANA) em sua composição (2.2 e 3.34 g para 4 mg.L^{-1} de BAP + 4 mg.L^{-1} de ANA). Além de resultar em baixa indução de calos, o picloram demonstrou ser prejudicial também na multiplicação celular, com os menores valores para massa fresca quando comparados com outros tratamentos contendo reguladores de crescimento (0.82 e 0.85 g).

Tabela 9 - Massa fresca dos calos obtidos a partir de embriões zigóticos de *Clivia miniata* após 120 dias de cultivo em meio de indução de calos.

Reguladores de crescimento (mg/L)	Massa fresca (g)	
	AgNO ₃ (mg.L ⁻¹)	
	0	2
Controle	-	0.62 ^{Aa}
4 BAP + 4 2,4-D	0.89 ^{Aa}	1,20 ^{Aa}
4 BAP + 4 ANA	2.20 ^{Ab}	3,34 ^{Bb}
2 BAP + 2 2,4-D + 0.52 PIC	0.82 ^{Aa}	0.85 ^{Aa}
2 BAP + 2 2,4-D + 2 ANA	1.35 ^{Aab}	0.91 ^{Aa}
CV (%) = 63.11		

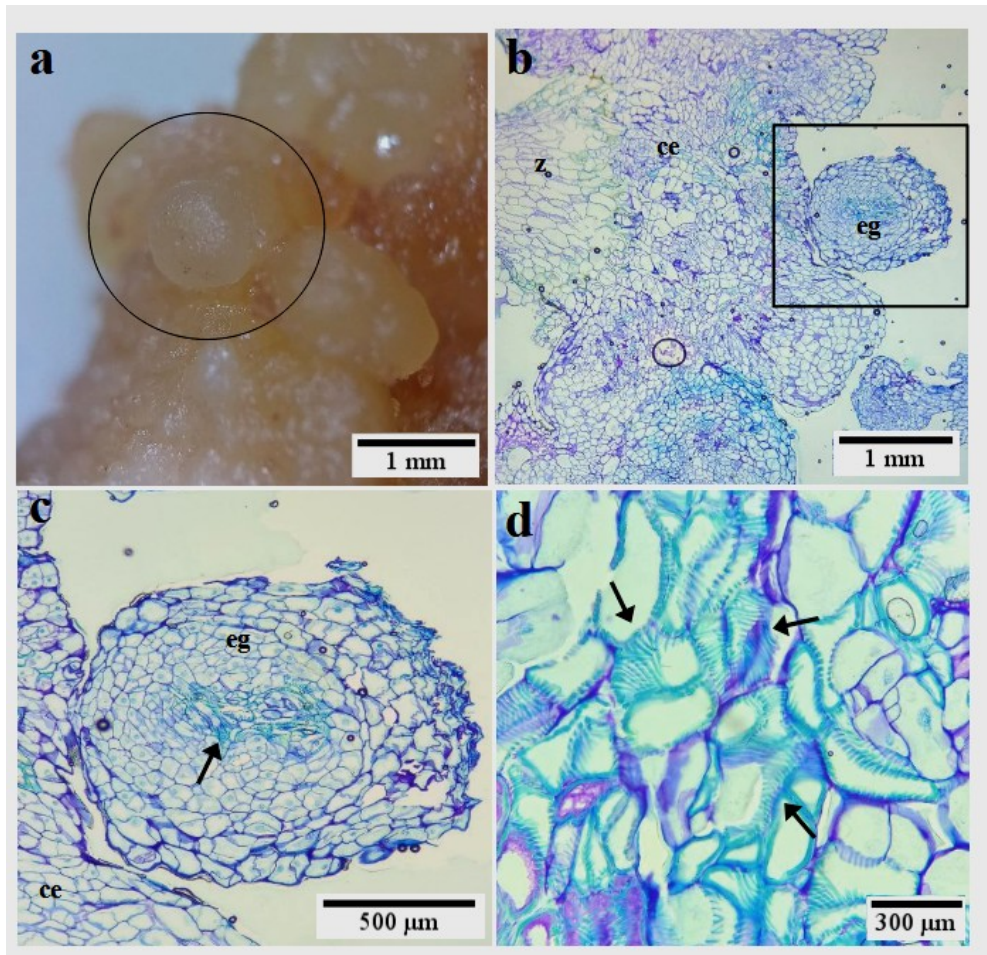
Médias seguidas de mesma letra maiúscula nas linhas e mesma letra minúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste Tukey (p<0.05).

Fonte: a autora.

3.3.3 Avaliação Anatômica

Calos friáveis com 120 dias de cultura e que apresentavam estruturas globulares, candidatas a embriões somáticos, foram fixados e processados de acordo com os métodos descritos anteriormente para avaliação anatômica (Figura 8a). No centro de algumas dessas estruturas é possível visualizar o espessamento típico das paredes celulares dos elementos de células traqueais (Figura 8c), indicando a formação de um sistema vascular não conectado ao calo adjacente. Na periferia da estrutura analisada não foi encontrada camada bem definida de células justapostas circundando-a, referente a uma protoderme. A ausência de tal estrutura invalida a suspeita de tratar-se de um embrião somático.

Figura 8 – Calo friável de *Clivia miniata*. a) calo friável com estruturas globulares em sua superfície; b) corte longitudinal de um calo evidenciando estrutura globular em formação na sua superfície; c) estrutura globular evidenciada; d) vasos condutores em formação no interior da estrutura globular. ce = calo, eg = estrutura globular, seta = vasos condutores em formação, z = porção remanescente do embrião zigótico.



Fonte: a autora.

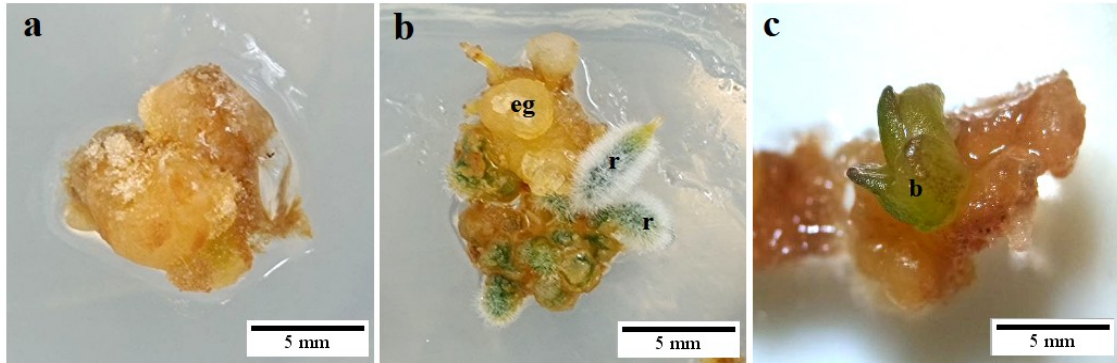
As análises histológicas evidenciaram a não conexão vascular entre estruturas globulares na superfície do calo, contudo, a protoderme, camada mais externa de um embrião somático encontra-se ausente.

3.3.4 Cultivo em Meio de Regeneração

4 meses após a transferência para o meio de regeneração, diferentes resultados foram observados de acordo com o meio no qual os calos foram induzidos. Os calos provindos de meio com 2 BAP + 2 2,4-D + 0.52 PIC não desenvolveram qualquer estrutura (Figura 9a); aqueles com ANA na composição resultaram em rizogênese (Figura 9b); por fim, calos originados de meio com 2 BAP + 2 2,4-D resultaram em brotos (Figura 9c). Infelizmente não

foi possível regenerar calos de todos os tratamentos, impossibilitando a análise estatística desta etapa da pesquisa.

Figura 9 – Calos de *Clivia miniata* após 120 dias de cultivo em meio de regeneração. a) calo compacto; b) calo organogênico com raízes adventícias e estrutura globular em formação na sua superfície; c) calo apresentando broto. eg = estrutura globular; r = raiz; b = broto.

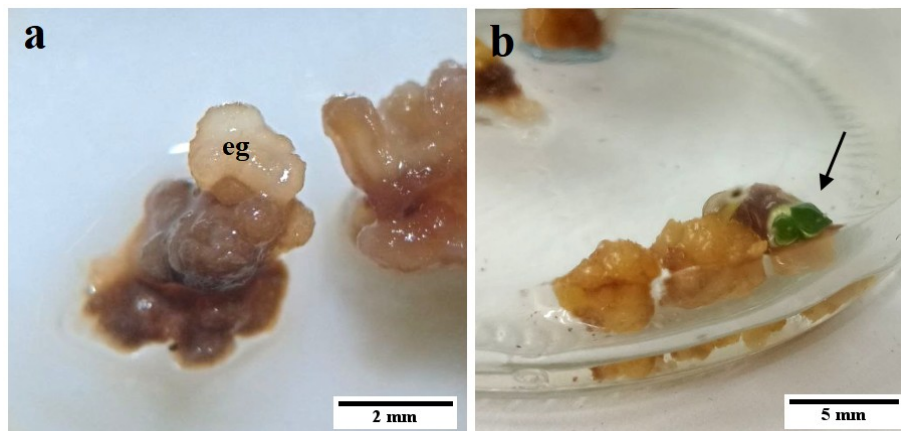


Fonte: a autora.

3.3.5 Cultivo em Biorreator

Durante as primeiras 4 semanas os calos dos tratamentos contendo 2.4-D apresentaram sinais de oxidação (Figura 10a), adquirindo uma coloração variando entre castanho e marrom que permaneceu até o 60º dia. O tratamento com 4.0 mg.L⁻¹ de BAP + 4.0 mg.L⁻¹ de ANA não oxidou nem apresentou alterações morfológicas visíveis. Os calos cultivados em meio sem reguladores, por sua vez, resultaram no desenvolvimento de brotos (Figura 10b).

Figura 10 – Calos de *Clivia miniata* após 60 dias sendo cultivados em biorreator. a) calo oxidado com estrutura globular; b) calo com broto adventício. eg = estrutura globular, seta = broto adventício.



Fonte: a autora.

Após o período experimental os calos foram pesados para verificar a massa fresca dos mesmos (Tabela 10). O crescimento mais expressivo foi observado no tratamento com 4.0

BAP + 4.0 ANA, com um ganho correspondente a 0.75 g. Em contrapartida, o menor ganho de massa foi observado no meio de cultivo com 2.0 BAP + 0.52 PIC + 2.0 2,4-D, 0.54 g. Os demais tratamentos, porém, tiveram resultados bem semelhantes, sem diferenças estatísticas significativas.

Tabela 10 – Ganho de massa fresca em calos de *Clivia miniata* cultivados por 60 dias em biorreator de imersão temporária.

Reguladores de crescimento vegetal (mg.L ⁻¹)	Ganho de massa fresca (g)
Controle (sem reguladores)	0.63 ^{ns}
4.0 BAP + 4.0 ANA	0.75
4.0 BAP + 4.0 2,4-D	0.74
2.0 BAP + 0.52 PIC + 2.0 2,4-D	0.54

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey (p<0.05). ns = não significativo.

Fonte: a autora.

3.4 DISCUSSÃO

Assim como em diversos trabalhos, a ausência de reguladores de crescimento no meio de cultivo limitou a formação de calos em nossos testes (Sellés *et al.*, 1999; Noormi, Murugaiyah; Subramaniam, 2012; Gantait; Mahanta, 2021). Por outro lado, quando na presença de reguladores, especialmente 2,4-D e BAP obtivemos calos granulares, indicativos de uma embriogênese somática (não confirmada por avaliação histológica).

A pesquisa de Chengalrayan, Abouzid e Gallo-Meacher (2005) investigou a influência de picloram e 2,4-D na indução de calos em sementes de cana-de-açúcar. Após 12 semanas, o picloram a 1 mg.L⁻¹ e 3 mg.L⁻¹ demonstrou maior eficácia na produção de calos em comparação com as concentrações de 2,4-D testadas. Na gérbera, Gantait e Mahanta (2021) observaram maior formação de calos em 2,4-D a 2,0 mg.L⁻¹ (93,33%), sendo o picloram e NAA menos eficazes. Concentrações de 1 mg/L de picloram foram consideradas mais eficazes na indução e proliferação de calos. Em ambas as pesquisas, observou-se que um aumento na concentração dos reguladores de crescimento teve efeito positivo na proliferação de calos, corroborando observações similares em outras espécies, como: *Tabernaemontana pandacaku* (Sierra *et al.*, 1991), *Miscanthus x ogiformis* Honda ‘Giganteus’ (Holme; Petersen, 1996), *Withania somnifera* (Manickam *et al.*, 2000), milho (Zacchini *et al.*, 2000) e plantas do gênero *Genista* (Luczkiewicz; Glod, 2003).

O tipo e a concentração da auxina desempenharam papéis cruciais na indução da embriogênese somática (ES). No trabalho de Steinmacher *et al.* com palmito pupunha (*Bactris gasipaes*), por exemplo, a aplicação de picloram a 24.14 mg.L⁻¹ resultou na maior

taxa de ES, enquanto que o 2,4-D não provocou uma resposta significativa. Embora a taxa de indução de ES tenha sido relativamente baixa, o número de embriões somáticos formados a partir de cada calo embriogênico após a transferência para o meio de maturação foi alto, com uma média de $25,8 \pm 1,6$ embriões somáticos. Os resultados promissores na presença de picloram para essa espécie corroboram com a tendência observada por outros pesquisadores (Valverde *et al.*, 1987; Barro *et al.*, 1999; Karun *et al.*, 2004), porém confrontam os resultados encontrados nesta pesquisa.

Em nossos ensaios a presença de 0.52 mg.L^{-1} de picloram associada a 2 mg.L^{-1} de 2,4-D e 2 mg.L^{-1} de BAP resultou em grande mortalidade dos explantes e baixa indução de calos nos sobreviventes (50%). Li *et al.* (2022) também trabalhando com indução de calos em clívias encontrou achados semelhantes aos apresentados aqui, com uma taxa de indução de calos de 43% no meio com 0.5 mg.L^{-1} de picloram, sendo o melhor resultado verificado na concentração de 1 mg.L^{-1} de picloram (69%). Por outro lado, o cultivo dos explantes em meio contendo apenas 2,4-D e BAP teve uma taxa de indução entre 75 e 100%.

Outro fator avaliado na indução de calos em embriões zigóticos de *C. miniata* neste estudo foi um antagonista do etileno, a AgNO_3 , que inibe a ação do etileno competindo pelos seus locais de ligação, sem entretanto reduzir a produção deste (Vain *et al.*, 1989; Roustan *et al.*, 1990; Chi *et al.*, 1991). Em alguns casos, o nitrato de prata mostrou ter um efeito adverso na produção de calos em híbridos de *Rubus* spp. (Tsao; Reed, 2002), e na embriogênese somática em *Coffea canephora* (Hatanaka *et al.*, 1995). Em outras situações, no entanto, o nitrato de prata mostrou exercer um efeito estimulante na proliferação de calos em *Manihot esculenta* (Zhang *et al.*, 2001), Poaceae como *Zea mays* (Vain *et al.*, 1989; Songstad *et al.*, 1991), *Oryza sativa* (Adkins *et al.*, 1993), *Bouteloua dactyloides* (Fei; Read; Riordan, 2000) e *Hordeum vulgare* (Haque *et al.*, 2015).

Na tamareira (*Phoenix dactylifera* L.), a proliferação de calos e subsequente embriogênese somática foram mostradas como estimuladas pelo nitrato de prata adicionado ao meio de regeneração na cultivar Barhee (Al-Khayri; Al-Bahrany, 2001). Assim como em clívia, a natureza recalcitrante da tamareira é uma limitação persistente na sua propagação comercial (Al-Khayri, 2001; Veramendi; Navarro, 1996). No geral, o crescimento dos calos aumentou gradualmente à medida que a concentração de AgNO_3 aumentou; concentração ideal dependeu da cultivar e variou de 8.5 a 10.62 mg/L. No entanto, quando incubados no escuro, ocorreu uma redução gradual no crescimento de calos em resposta ao aumento das concentrações de AgNO_3 de 1.7 mg/L a 17 mg/L (Al-Khayri, 2004). Em pesquisas mais recentes, como a de Abdollahi e Rashidi (2018) foi relatado que o nitrato de prata produziu o

maior número de embriões, e plantas regeneradas foram obtidas no cultivo de anteras de grão-de-bico (*Cicer arietinum*) quando 10 mg/l de 2,4-D foram combinados com 15 e 50 mg/l de nitrato de prata no meio de cultivo de anteras, respectivamente.

De acordo com a literatura, os efeitos do nitrato de prata na cultura de tecidos é bastante controverso, fato verificado em nossos achados, nos quais a prata não apresentou influência sobre a indução de calos e sua sobrevivência. Contudo, duas hipóteses não podem ser descartadas com este estudo: 1) a concentração de nitrato de prata foi baixa; 2) a quantidade de etileno produzida pelas células não é significativa a ponto de prejudicar a multiplicação. Portanto pesquisas avaliando esses pontos ainda precisam ser realizadas.

É amplamente aceito que a indução de embriogênese somática (ES) é promovida especialmente após a exposição das células a condições elevadas de estresse. Diferentes tipos de estresses, como choque osmótico, aplicação de temperaturas altas ou baixas, tratamentos de privação, entre outros, podem afetar o destino celular e iniciar a competência embrionária. Por exemplo, um forte estresse osmótico causado por sacarose promoveu a geração de numerosos embriões somáticos em *D. carota* (Kamada *et al.*, 1993). A exposição a íons de metais pesados, como o cádmio, também induziu a reprogramação celular e a aquisição de totipotência celular em cenoura, trigo ou *Arabidopsis*, mesmo na ausência de reguladores de crescimento (Ikeda-Iwai *et al.*, 2003; Kiyosue *et al.*, 1990; Patnaik *et al.*, 2005). Em outras espécies vegetais, a ES pode ser induzida por álcoois de açúcar (Holobiuc 2015) ou pela alteração da composição da fonte de nitrogênio (Leljak-Levanic *et al.*, 2004) através da substituição de alguns macronutrientes (Ogawa *et al.*, 1994), ou pela ausência de uma fonte de carbono (Veramendi; Navarro 1996) e, em alguns casos, de alguns microelementos (Mashayekhi *et al.*, 2008) no meio de cultura. Dessa forma, os tratamentos de estresse podem influenciar a reprogramação diferencial das células somáticas para reentrar no ciclo celular e recuperar a totipotência, aumentando a resposta embriogênica e melhorando o desenvolvimento de embriões somáticos. Portanto, a via totipotente pode ser alcançada em resposta a uma combinação única e complexa de sinais moleculares e metabólicos para iniciar uma nova janela de desenvolvimento (Chupeau *et al.*, 2013).

A análise do transcriptoma indica que a indução de ES é precedida pela transcrição de muitos genes relacionados ao estresse. Outro conjunto de genes altamente expressos está relacionado ao estresse oxidativo e à divisão celular, sugerindo um equilíbrio entre a proliferação celular e a morte celular (Thibaud-Nissen *et al.*, 2003). Por exemplo, vários estudos são consistentes com a detecção e acumulação de transcritos GSTs durante os primeiros dias de indução de SE (Peixoto, *et al.*, 2008; Salvo *et al.*, 2014; Vega-Bartol *et al.*,

2013). Embora esses genes sejam responsivos principalmente à auxina, os GSTs também podem ser induzidos por H₂O₂, ABA e ácido jasmônico associados ao estresse abiótico e biótico, sugerindo uma participação significativa dos GSTs para evitar os danos causados pelo estresse oxidativo (Jin *et al.*, 2014). O fato de que o desenvolvimento de SE exhibe uma sinalização mais intensa para o estresse do que o desenvolvimento zigótico pode ser interpretado como um processo de adaptação, talvez para compensar a ausência de endosperma e acelerar o desenvolvimento do embrião somático (Nic-Can *et al.*, 2016).

O 2,4-D, um composto análogo ao hormônio vegetal ácido indolacético-3 (IAA), pode atuar como um agente estressante, levando à regulação positiva de proteínas específicas relacionadas ao estresse oxidativo, divisão celular e estresse osmótico, e ajudam a planta a lidar com o estresse induzido pelo tratamento com esse regulador. Quando em concentrações muito elevadas ($> 6 \text{ mg.L}^{-1}$), contudo, o 2,4-D inibe a embriogênese somática, o que provavelmente ocorre devido à despolarização das membranas celulares (Pan, *et al.*, 2010).

Num estudo com a aplicação do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) foi investigado quanto ao seu efeito no crescimento e no metabolismo de ROS (espécies reativas de oxigênio) em folhas de ervilha (*Pisum sativum*). No nível estrutural, observaram-se danos nas células do mesófilo e o alargamento e dilatação dos tilacoides nas plantas tratadas com 2,4-D. O herbicida afetou notavelmente as atividades da xantina oxidase e da superóxido dismutase, bem como a atividade e os níveis de transcrição das enzimas do ciclo ascorbato-glutationa, como a ascorbato peroxidase, a monodesidroascorbato redutase e a glutatona redutase. Além disso, nas plantas tratadas com o herbicida, houve um aumento na produção de H₂O₂, níveis de peroxidação lipídica, atividade de endopeptidases e proteínas oxidativamente modificadas. Os resultados sugerem que a superprodução de radicais superóxido (O₂⁻) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) ocorre nas plantas tratadas com 2,4-D, levando ao estresse oxidativo e à degradação de proteínas (Romero-Puertas *et al.*, 2004).

Auxinas ou citocininas específicas, seja isoladamente ou em combinações, afetam o crescimento celular em culturas de tecidos vegetais de maneiras muito diferentes. Seus efeitos são dificilmente previsíveis, pois os mecanismos exatos que regulam o metabolismo primário e secundário pelas auxinas e citocininas ainda não são completamente conhecidos. Portanto, um tipo e concentração adequados de reguladores de crescimento devem ser determinados experimentalmente para cada espécie e técnica de cultura empregada (Siatka, 2019).

As divergências encontradas entre nossas pesquisas e trabalhos sobre indução de calos e embriogênese somática em clívia e outras monocotiledôneas reforçam a necessidade de repetição desses experimentos.

3.5 CONCLUSÃO

A análise da sobrevivência dos explantes após 120 dias de cultivo indicou uma notável variação nas taxas, variando de 8.3% a 75%, com o tratamento 4 BAP + 4 2,4-D destacando-se pela significativa melhoria na sobrevivência. A presença de AgNO₃ também influenciou os resultados, mostrando variações nos efeitos conforme os reguladores de crescimento utilizados. Além disso, a análise da indução de calos ao longo do tempo revelou padrões interessantes, com destaque para a combinação 4 BAP + 4.0 2,4-D, que apresentou um aumento constante na porcentagem de calos induzidos. A avaliação da massa fresca dos calos destacou a eficácia dos tratamentos contendo ácido naftalenoacético (ANA), que resultaram em uma maior produção de massa fresca. As observações histológicas, contudo, revelou que os calos avaliados não eram embriogênicos. Em suma, este estudo fornece insights valiosos para otimizar as condições de indução de calos em *Clivia miniata*, contribuindo para o avanço do cultivo *in vitro* desta espécie.

REFERÊNCIAS

- ABDOLLAHI, Mohammad Reza; RASHIDI, Shirin. Production and conversion of haploid embryos in chickpea (*Cicer arietinum* L.) anther cultures using high 2,4-D and silver nitrate containing media. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 133, p. 39-49, 2018.
- ALAMGIR ANM. Therapeutic Use of Medicinal Plants and Their Extracts: Volume 1, Pharmacognosy. In: RAINSFORD, K. D. (Ed.). **Progress in Drug Research**, Vol 73. Cham: Springer; pp. 403-426. Crossref, 2017.
- ALAMGIR ANM. Therapeutic Use of Medicinal Plants and Their Extracts: Volume 2, Phytochemistry and Bioactive Compounds. In: RAINSFORD, K. D. (Ed.). **Progress in Drug Research**, Vol 74. Cham: Springer; pp. 585-600. Crossref, 2017.
- ALMEIDA, Julieta Andrea Silva de *et al.* Embriogênese somática em genótipos de *Coffea arabica* L. 2008.
- AMMIRATO, P. V. The regulation of somatic embryo development in plant cell culture: Suspension culture techniques and hormones requirement. **Biotechnology**, 1, 68-74, 1983.
- BARBOZA, S. B. S. C.; GRACIANO-RIBEIRO. D.; TEIXEIRA. J. B.; PORTES, T. A.; SOUZA, L. A. C. Anatomia foliar de plantas micropropagadas de abacaxi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, vol. 41, no. 2, 2006.
- BARRUETO, C. L. P. (Ed.). Cultivo *in vitro* de plantas. 4. ed. ampl. Brasília, DF: Embrapa. 325 p. Il, 2015.
- CARVALHO, Julita Maria Frota Chagas *et al.* Embriogênese Somática. Embrapa Algodão, [s. l.], set. 2006.

CONRAD, A. C.; MATHABATHA, M. F. Elucidating variable traits of flower pigments in clivian plants' species. **Vegetos** 29: 4. doi: 10.4172/2229, v. 4473, 2016.

DOLUI, D., SAHA, I., & ADAK, M. K. 2, 4-D removal efficiency of *Salvinia natans* L. and its tolerance to oxidative stresses through glutathione metabolism under induction of light and darkness. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 208, 111708, 2021.

DUBLIN, P. Techniques de reproduction végétative "*in vitro*" et amélioration génétique chez les caféliers cultivés. **Café, Cacao, Thé, Paris**, v. 28, n. 4, p. 231-244, 1984.

EFFERTH, Thomas. Biotechnology applications of plant callus cultures. **Engineering**, v. 5, n. 1, p. 50-59, 2019.

FEHÉR, A. Why somatic plant cells start to form embryos? In: A. Mujib & J. Samaj (Eds.), Somatic embryogenesis, vol. 2, **Plant cell monographs** (p. 85-101). Heidelberg, GE: Springer, 2005.

FINNIE JF, van STADEN J (1999) **Cultura *in vitro* de *Clivia miniata***. Anuário Clivia 1. A Sociedade Clivia, África do Sul, pp 7-11, 1998.

FROTAS CHAGAS CARVALHO, Julita Maria; DE A. LIMA, Marleide Magalhães; RIBEIRO AIRES, Priscila Simone; SOARES VIDAL, Márcia; PIMENTEL, Nara Wanderley. Embriogênese Sômática. 152. ed. Embrapa Algodão: [s. n.], 2006.

GARCIA-GONZALES, R; QUIROZ, K; CARRASCO, B e CALIGARI, P. Plant tissue culture: Current status, opportunities and challenges. **Ciência e Investigação Agrárias**, vol. 37, n. 3, pp. 5-30, 2010.

GOMES, Hugo Teixeira. Análise morfoanatômica, bioquímica e molecular de dendezeiros (*Elaeis guineensis* Jacq.) regenerados por embriogênese somática em sistema de imersão temporária. 2016.

IPCC. "AR6 **Synthesis Report: Summary for Policymakers Headline Statements.**" [Www.ipcc.ch](http://www.ipcc.ch), 2023, www.ipcc.ch/report/ar6/syr/resources/spm-headline-statements/. Accessed 8 Mar. 2024.

KOOPOWITZ H. **Clivia**. Portland, OR, Cambridge, UK: Timber Press, 2002.

KUMAR, V.; PARVATAM, G.; RAVISHANKAR, Gokare Aswathanarayana. AgNO₃: a potential regulator of ethylene activity and plant growth modulator. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 12, n. 2, p. 8-9, 2009.

LAMEIRA, O.A.; LEMOS, O.F.; MENEZES, I.C. de; PINTO, J.E.B.P. Cultura de tecidos (manual). Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2000. 41p. (Embrapa Amazônia Oriental. Documentos, 66).

MAHENDRAN, Durai; GEETHA, Natesan; VENKATACHALAM, Perumal. Role of silver nitrate and silver nanoparticles on tissue culture medium and enhanced the plant growth and

development. **In vitro Plant Breeding towards Novel Agronomic Traits: Biotic and Abiotic Stress Tolerance**, p. 59-74, 2019.

MARENGO, J.A.O. Mudanças climáticas, Condições Meteorológicas Extremas e Eventos Climáticos no Brasil 2016. Disponível em http://www.fbds.org.br/cop15/FBDS_MudancasClimaticas.pdf, acesso em 03-03-2024,

MONTEIRO, T. R. Embriogênese somática e regeneração de plantas de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) a partir do uso de meios de consistência líquida e de cultivos em suspensão. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Botânica, Departamento de Botânica, Universidade de Brasília - Instituto de Ciências Biológicas, Brasília, DF, 2013.

MURASHIGE T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol Plant**, 15, 473–497, 1962.

NIC-CAN, G. I., AVILEZ-MONTALVO, J. R., AVILES-MONTALVO, R. N., MÁRQUEZ-LÓPEZ, R. E., MELLADO-MOJICA, E., GALAZ-ÁVALOS, R. M., LOYOLA-VARGAS, V. M. The Relationship Between Stress and Somatic Embryogenesis in **Somatic Embryogenesis**: Fundamental Aspects and Applications, 151–170, 2016. doi:10.1007/978-3-319-33705-0_9.

OSANI, Ojo Michael; PANDE, Veena; NAILWAL, Tapan Kumar. A review on plant tissue culture, a technique for propagation and conservation of endangered plant species. **International journal of current microbiology and applied sciences**, v. 7, n. 7, p. 3778-3786, 2018.

PAIVA, R.; PAIVA, P. D. O. (2001). Cultura de Tecidos. Monografia (Especialização) - Curso de Pós-graduação "lato Sensu" Especialização A Distância: Biotecnologia: Fundamentos Técnicos, Aplicações e Perspectivas., Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras.

PEIXOTO, F. P., GOMES-LARANJO, J., VICENTE, J. A., & MADEIRA, V. M. Comparative effects of the herbicides dicamba, 2, 4-D and paraquat on non-green potato tuber calli. **Journal of plant physiology**, 165(11), 1125-1133, 2008.

PHILLIPS, GREGORY C.; GARDA, MARTINA. Plant tissue culture media and practices: an overview. **in vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 55, n. 3, p. 242-257, 2019.

RAN Y, SIMPSON S. *in vitro* propagation of the genus *Clivia*. **Plant Cell Tiss Org Cult** 81:239–242, 2005.

REINTEN, E. Y.; COETZEE, J. H.; VAN WYK, B.-E. The potential of South African indigenous plants for the international cut flower trade. **South African Journal of Botany**, v. 77, n. 4, p. 934-946, 2011.

ROMERO-PUERTAS, M. C., MCCARTHY, I., GÓMEZ, M., SANDALIO, L. M., CORPAS, F. J., DEL RIO, L. A., PALMA, J. M. Reactive oxygen species-mediated enzymatic systems involved in the oxidative action of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid. **Plant, Cell & Environment**, 27(9), 1135-1148, 2004.

ROUT, G.R.; MOHAPATRA, A.; JAIN, S. MOHAN. Tissue culture of ornamental pot plant: a critical review on present scenario and future prospects. **Biotechnology Advances**, Volume 24 (6), 2006.

SENGBUSCH PV. Biosyntheses-amino acids. KEGG database-metabolic pathways, 2003.

SIATKA T. Effects of Growth Regulators on Production of Anthocyanins in Callus Cultures of *Angelica archangelica*. **Natural Product Communications**. ;14(6), 2019. doi:10.1177/1934578X19857344.

SIMPSON, M.G. Plant systematics. **Elsevier Inc**, UK. 752Pp, 2010.

SPIES, P., GROBLER, J.P., AND SPIES, J.J. A review of phylogenetic relationships in the genus *Clivia*. **Phil. Trans. Genet.** 1, 168–207, 2011.

SPIES, P. and SPIES, J.J. *Clivia* taxonomy revisited, using DNA barcode regions. **Acta Hort.** 1201, 2018.

STEINMACHER, D. A., CLEMENT, C. R., & GUERRA, M. P. Somatic embryogenesis from immature peach palm inflorescence explants: towards development of an efficient protocol. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 89, 15-22, 2007.

STEINMACHER, D. A., GUERRA, M. P., SAARE-SURMINSKI, K., LIEBEREI, R. A temporary immersion system improves *in vitro* regeneration of peach palm through secondary somatic embryogenesis. **Annals of Botany**, 108(8), 1463–1475, 2011. <https://doi.org/10.1093/aob/mcr033>.

SWANEVELDER, D., and FISHER, R.C. **Clivia: Nature and Nurture** (Pretoria, Briza, South Africa: International Publishers Marketing, Inc.), 2009.

SWANEVELDER, Z. H. Diversity and population structure of *Clivia miniata* Lindl. (Amaryllidaceae): Evidence from molecular genetics and ecology. M.Sc. Dissertation, University of Pretoria, Pretoria, 2003.

SWANEVELDER, Z. H., TRUTER, J. T. and VAN WYK, A. E. (2006). A natural hybrid in the genus *Clivia*. **Bothalia** 36: 77-80, 2006.

SWANEVELDER, D., and FISHER, R.C. **Clivia: Nature and Nurture** (Pretoria, Briza, South Africa: International Publishers Marketing, Inc.), 2009.

TAKEBE, I., C. LABIB, AND G. MELCHERS. Regeneration of whole plants from isolated mesophyll protoplasts of tobacco. **Naturwissenschaften**, 58, 318–320, 1971.

THORPE, T. History of plant tissue culture. **Molecular Biotechnology**, 37, 169-180, 2007.

UDOMDEE, W., WEN, P.J., LEE, C.Y. *et al.* Effect of sucrose concentration and seed maturity on *in vitro* germination of *Dendrobium nobile* hybrids. **Plant Growth Regul**, 72, 249–255, 2014. <https://doi.org/10.1007/s10725-013-9856-x>

Van der WESTHUIZEN, H. M. Genetic variation in the most primitive *Clivia* species. Dissertation. University of the Free State, Bloemfontein, 2010.

VASIL V, HILDEBRANDT AC. Differentiation of Tobacco Plants from Single, Isolated Cells in Microcultures. **Science**, Nov 12;150(3698):889-92, 1965.

VEALE DJH, OLIVER DW, ARANGIES NS, FURMAN KI. Preliminary isolated organ studies using an aqueous extract of *Clivia miniata* leaves. **J Ethnopharmacol**, 27, 341–346, 1989.

VIJAYA, G.L., AND GIRI, C.C. Plant regeneration via organogenesis from shoot base-derived callus of *Arachis stenoperma* and *A. villosa*. **Current Science**, 85, 2003.

WANG, Q. M.; GAO, F. Z.; GAO, X.; ZOU, F. Y.; SUI, X.; WANG, M.; HUI, Y.-J.; WANG, L. (2011). Regeneração de *Clivia miniata* e avaliação da fidelidade clonal de plântulas. **Plant Cell Tiss Org Cult**. DOI: 10.1007/s11240-011-0085-6.

WANG, Q. M.; WANG, Y. Z.; SUN, L. L.; GAO, F. Z.; SUN, W. H. E. J.; GAO, X.; WANG, L. Organogênese direta e indireta de *Clivia miniata* e avaliação das mudanças na metilação de DNA em várias plântulas regeneradas. **Plant Cell Rep**. 31: 1283, 2012.

WERNER, Elias; LIMA, Andreia; AMARAL, José Augusto. Expressão gênica na embriogênese somática vegetal. **Enciclopédia Bioesfera**, v. 8, n. 14, 2012.