

EFEITO DE CITOCININA E AUXINAS SOBRE O ESTABELECIMENTO IN VITRO DE *Gerbera jamesonii* Bolus ex Hook cv. Appelbloesem A PARTIR DE CAPITULOS JOVENS

EFFECT OF CYTOKININ AND AUXIN ON IN VITRO ESTABLISHMENT OF *Gerbera jamesonii* Bolus ex Hook cv. Appelbloesem FROM YOUNG CAPITULUM

Márcio Henrique Pereira Barbosa*
César Augusto Brasil Pereira Pinto***

José Eduardo Brasil Pereira Pinto**
Renato Innecco*

RESUMO

Na obtenção de plântulas *in vitro* da cv. Appelbloesem, foram utilizados capítulos jovens como explantes iniciais sendo culturados em meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) solidificado com 0,7% de ágar e suplementado com adenina (80mg/l), tirosina (100mg/l) e diferentes concentrações e combinações de BAP (6-benzilaminopurina) com AIA (ácido indole-3-acético) e AIA com 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético). A avaliação foi feita levando-se em consideração o número de brotos adventícios regenerados por explante, formação de calos e desenvolvimento dos capítulos estabelecidos *in vitro*. Conseguiu-se melhores resultados com os níveis de 3, 6 e 9mg/l de BAP, sendo que para o nível de 3mg/l de BAP regenerou-se em média, duas brotações por explante, para o nível de 6mg/l de BAP, três brotações e para o nível de 9mg/l, uma brotação. O uso do 2,4-D induz maior formação de calos para a fase de estabelecimento da cultura.

Palavras-chave: cultura de tecidos, reguladores de crescimento, *Gerbera jamesonii*.

SUMMARY

An *in vitro* method was developed for the establishment and regeneration of larger numbers of uniform plants from the basal parts of the flower of *Gerbera jamesonii*. The culture medium was MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) solidified with 0.7% agar and supplemented with adenine (80mg/l), tyrosine (100mg/l) and different concentrations and combinations of BAP (6-benzylaminopurine) with IAA (indoleacetic acid), and IAA with 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic). Multiple shoot buds formation is observed from capitulum on MS medium incorporate with 3, 6, and

9mg/l of BAP. At 3mg/l of BAP two shoot bud formation per explant are regenerate, at 6mg/l of BAP three shoots and at 9mg/l of BAP just one. 2,4-D is not necessary at this stage of culture establishment.

Key words: tissue culture, growth regulator, *Gerbera jamesonii*.

INTRODUÇÃO

Entre as plantas ornamentais de grande importância econômica, a gerbera (*Gerbera jamesonii* Bolus ex Hook) se destaca pela utilização de suas flores para corte. As gerberas cultivadas atualmente são híbridos procedentes da *Gerbera jamesonii*. Pertencem à família das compostas e são nativas da Ásia e África do Sul.

PIERIK & SEGERS (1973) foram pioneiros nos estudos dos fatores que afetam a formação de raízes adventícias de gerbera, utilizando como explante, nervuras de folhas jovens. Os resultados desse trabalho foram básicos para posteriores estudos do cultivo de gerbera *in vitro*. Diversos trabalhos mostraram que a gerbera pode ser propagada vegetativamente por cultivo *in vitro* de inflorescências (PAWLOWSKA, 1977), folhas (HEDTRICH, 1979), parte central do rizoma (SAWA, 1977), escapo ou talo floral (CHU & HUANG, 1983), meristemas (RUFFONI et al, 1987) e capítulos jovens (PIERIK et al, 1975 e LALIBERTÉ et al, 1985).

Uma objeção que se faz, em relação a utilização destas fontes de explantes, é a baixa percentagem de explantes com formação de brotos. De maneira geral, as brotações obtidas por qualquer um dos métodos, podem facilmente serem usadas como material estéril inicial para outras subculturas e experimentos onde se deseja brotações axilares.

Considera-se que o emprego de meristemas (RUFFONI et al, 1987) é o método mais indicado para uma propagação massal rápida. Ao passo que, quando

* Engenheiro Agrônomo, doutorando no Curso de Fitotecnia da Escola Superior de Agricultura de Lavras (ESAL), Bolsista do CNPq.

** Professor Titular, Departamento de Agricultura, Bolsista do CNPq. ESAL - Caixa Postal 37. 37200-000 - LAVRAS, MG.

*** Professor Adjunto, Departamento de Biologia. Bolsista do CNPq. ESAL.

não se dispõe de um grande número de plantas matrizes fornecedoras do explante primário, poderá ser utilizado como alternativa, o método dos capítulos jovens. A vantagem deste, é por ser um método não destrutivo, visto que apenas as inflorescências jovens são retiradas da planta matriz.

Devido à baixa taxa de multiplicação de brotações adventícias obtidas em pesquisas anteriores, este trabalho teve por objetivo identificar as melhores concentrações de citocinina e auxinas, para proliferação de brotos adventícios, à partir do cultivo *in vitro* de capítulos jovens de *Gerbera jamesonii* Bolus ex Hook cv. Appelbloesem.

MATERIAL E MÉTODOS

As plantas matrizes foram selecionadas segundo o vigor vegetativo e exuberância de flores em casa de vegetação, em Holambra-SP. Procedeu-se a coleta dos explantes iniciais, os quais, constituíram-se de capítulos (inflorescências jovens fechadas) com diâmetro variando de 0,5 a 0,8cm.

Inicialmente, os capítulos foram lavados em água corrente por 30 minutos e desinfestados com álcool 70%, durante dois minutos e, em seguida, com solução de hipoclorito de sódio a 1,5% por trinta minutos. Finalmente, foram lavados em água destilada autoclavada por três vezes.

Com auxílio de pinças e bisturis, em câmara asséptica, dividiu-se cada explante em, no máximo três pedaços menores (0,3 a 0,5cm), os quais foram inoculados em meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) solidificado com 0,7% de ágar e suplementado com adenina (80mg/l) e tirosina (100mg/l). Para o primeiro ensaio, os seguintes reguladores de crescimento foram acrescentados em esquema fatorial 4 x 4, nos níveis: 0, 3, 6 e 9mg/l de BAP e 0, 1, 2 e 3mg/l de AIA. O outro ensaio foi em esquema fatorial 3 x 3 utilizando o meio MS suplementado com adenina (80mg/l), tirosina (100mg/l) e BAP (6mg/l). Os níveis dos fatores foram: 0,1 e 2mg/l de AIA e 0,5 e 10mg/l de 2,4-D.

O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 antes do processo de autoclavagem (121°C, 15psi, 20min). A cultura foi colocada para desenvolver em sala de crescimento apropriada, nas seguintes condições: fotoperíodo de 16h sob luz branca fria (50µmol/s/m² e temperatura de 26±1°C.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado e cada tratamento foi repetido três vezes, sendo cada repetição representada pela média de quatro tubos de ensaio com um explante cada. Para análise estatística, os dados referentes à variável diâmetro médio dos capítulos desenvolvidos, foram transformados em $\sqrt{x+0,5}$.

A avaliação foi feita aos 40 dias após a inoculação levando-se em consideração o número de brotos adventícios regenerados por explante inicial, formação de calos e desenvolvimento dos capítulos estabelecidos *in vitro*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O processo de desenvolvimento dos capítulos estabelecidos *in vitro* ocorreu em todos os tratamentos (Tabelas 1 e 2) com exceção da testemunha (BAP ausente - Tabela 1). Esse desenvolvimento foi resultante da ocorrência de calos e do entumescimento e crescimento de partes florais do capítulo, tais como estames e pistilos.

Considerando-se o diâmetro médio dos capítulos desenvolvidos *in vitro*, a análise de variância para o experimento BAP x AIA (CV=7,8%), mostrou efeito significativo somente para o fator BAP, enquanto no experimento AIA x 2,4-D (CV=8,86%) houve significância apenas para 2,4-D.

Os maiores valores de diâmetro médio dos capítulos foram obtidos com o emprego de BAP na ausência de 2,4-D e independentemente do nível de AIA utilizado. A Figura 1 mostra o comportamento médio do diâmetro dos capítulos em função do nível de BAP. O nível ótimo de BAP obtido pela derivada da equação de regressão foi de 6,16mg/l. Estes resultados assemelham-se com as recomendações de PIERIK et al (1982), que sugerem o uso de 10mg/l de BAP e ausência total de auxina (AIA) para otimizar a produção de calos e desenvolvimento dos capítulos. Os tratamentos evidencia-

Tabela 1 - Representação qualitativa da resposta morfogênica observada no cultivo *in vitro* de capítulos jovens de *Gerbera jamesonii* cv. Appelbloesem, em diferentes concentrações de BAP e AIA.

AIA (mg.l ⁻¹) \ BAP (mg.l ⁻¹)	BAP (mg.l ⁻¹)			
	0	3	6	9
0	—	□ ○ ▲	□ ○	□ ○ ▲
1	□ ■	□ ○	□ ○	□ ○
2	□ ■	□ ○	□ ○	□ ○
3	□ ■	□ ○	□ ○	□ ○

- ausência de resposta
- coloração escura
- coloração clara
- ▲ regeneração de broto adventício
- desenvolvimento do capítulo (diâmetro maior que 1,5cm) = calo + entumescimento de partes florais

Tabela 2 - Representação qualitativa da resposta morfogênica observada no cultivo *in vitro* de capítulos jovens de *Gerbera jamesonii* cv. Appelbloesem, em meio MS suplementado com 6mg/l de BAP para as diferentes concentrações de 2,4-D e AIA.

		AIA (mg.l ⁻¹)		
		0	1	2
2,4-D (mg.l ⁻¹)	0	□ ◦ Δ	□ ◦	□ ◦
	5	□ ■	□ ■	□ ■
	10	□ ■	□ ■	□ ■

- desenvolvimento do capítulo = calo + entumescimento de partes florais
 ■ coloração escura, tecido friável, diâmetro menor que 1,5cm
 ◦ coloração clara, tecido firme, diâmetro maior que 1,5cm
 Δ regeneração de broto adventício.

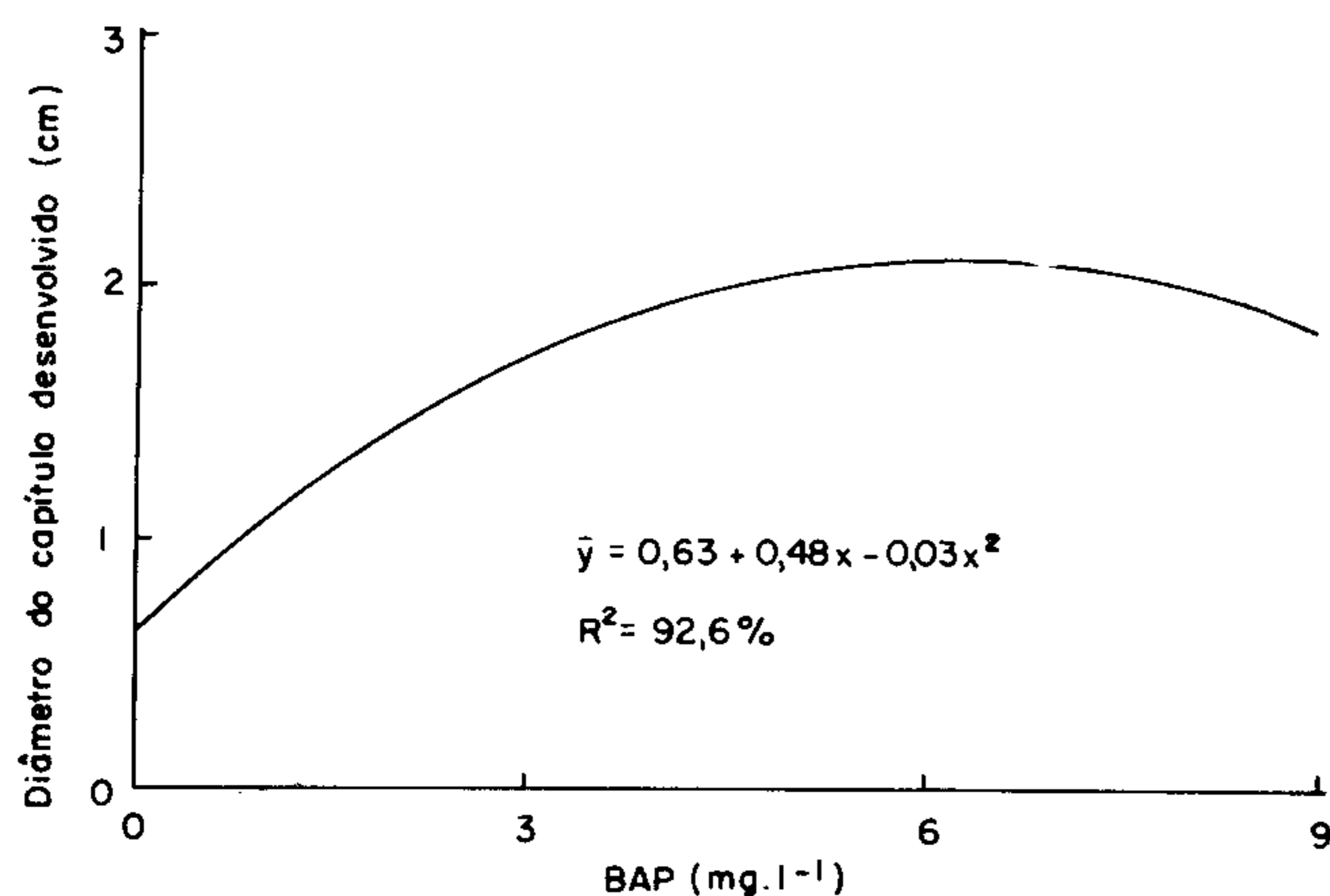


Figura 1 - Efeito do BAP sobre o diâmetro aos capítulos desenvolvidos *in vitro* de *Gerbera jamesonii* cv. Appelbloesem em meio MS.

ram a presença de calos, exceto na ausência de BAP (Tabelas 1 e 2).

A presença de 2,4-D proporcionou maior desenvolvimento de calos, enquanto em altas dosagens, 5 e 10mg/l, houve uma redução significativa para o desenvolvimento dos capítulos (Tabela 2 e Figura 2).

Houve regeneração de brotos adventícios somente nos tratamentos com 3 e 9mg/l de BAP (Tabela 1) e 6mg/l de BAP (Tabela 2), na ausência de AIA e 2,4-D, sendo que para o nível 3mg/l de BAP foram regeneradas em média, duas brotações por explante, para

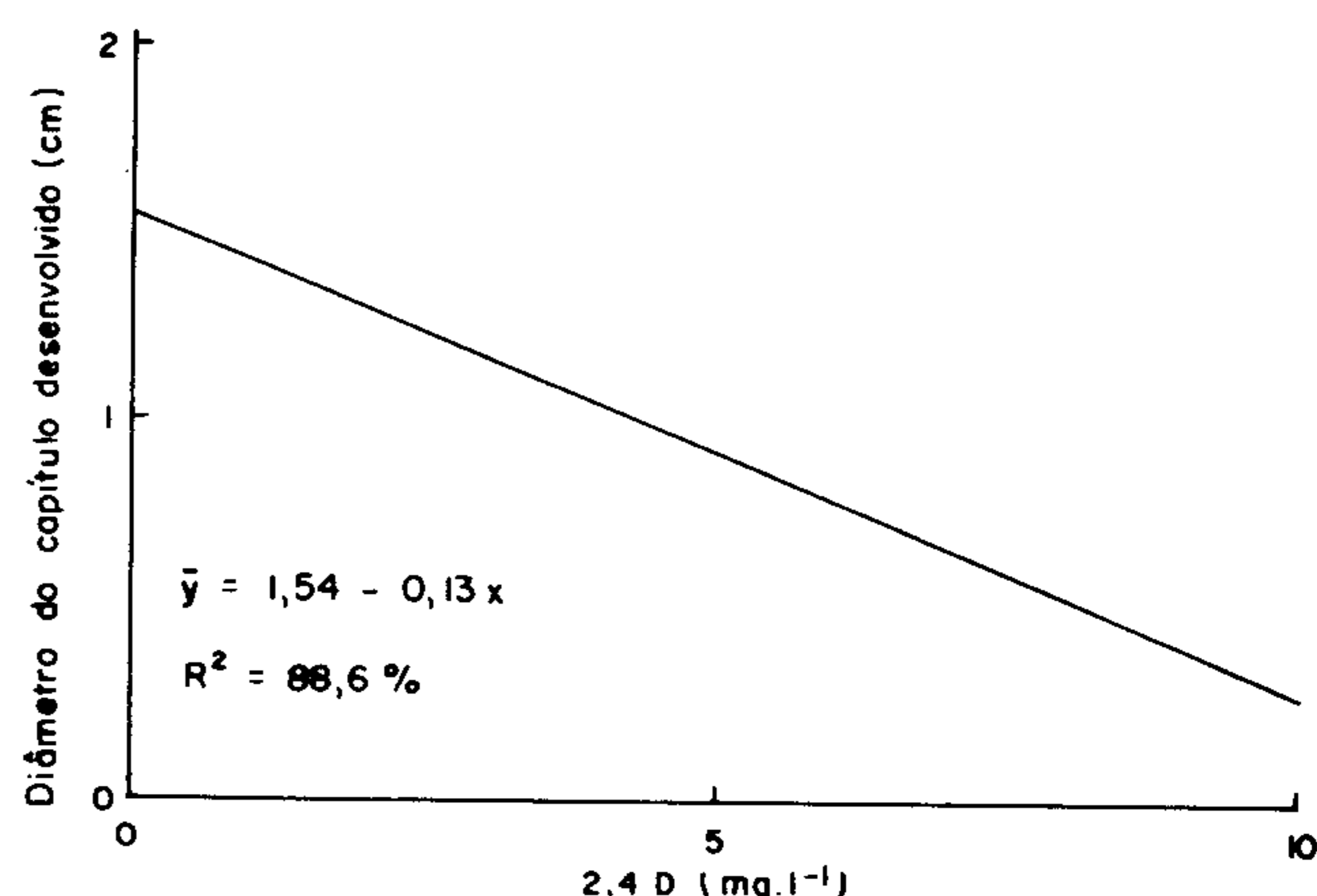


Figura 2 - Efeito do 2,4-D sobre o diâmetro dos capítulos desenvolvidos *in vitro* de *Gerbera jamesonii* cv. Appelbloesem em meio MS suplementado com 6mg/l de BAP.

o nível de 6mg/l de BAP, três brotações e para o nível de 9mg/l de BAP, uma brotação. Coincidentemente a regeneração de brotos adventícios ocorreu nos tratamentos que proporcionaram melhores resultados quanto ao desenvolvimento dos capítulos, considerando-se os aspectos qualitativos e quantitativos (Tabelas 1 e 2 e Figura 1). De maneira semelhante, PIERIK et al (1975) conseguiram obter um ou dois brotos por capítulo, utilizando também um quarto da inflorescência jovem como explante.

Segundo LALIBERTÉ et al (1985), não se pode afirmar com certeza, qual o local de origem dessas brotações adventícias. Elas tanto podem ter se originado por reorientação de tecidos meristemáticos das inflorescências, bem como do tecido do receptáculo floral. De outra forma, AHMIN & VIETH (1986), CAPPADOCIA et al (1987) e SITBON (1981) acreditam que em determinadas ocasiões, a regeneração dessas plântulas ocorre em calos que se formam à partir de óvulos imaturos e que, portanto, tais plântulas podem ser consideradas haplóides. Por outro lado, PIERIK et al (1982) concluíram que os altos níveis de citocinina, BAP (10 e 20mg/l) e cinetina (10mg/l), podem induzir a deformação de folhas e aumentar a formação de calos em certas cultivares. Esses autores também recomendam que a formação de calos e regeneração de brotações adventícias à partir desses mesmos calos deve ser evitada, pois estes são fontes potenciais de mutações.

Os resultados deste trabalho, confirmam afirmações anteriores de PIERIK et al (1975), que citam que é essencial a presença de citocinina no meio de cultura para a formação de brotos originados do capítulo. PIERIK et al (1975), empregaram níveis mais elevados das citocininas, 10mg/l de PBA (6-benzilamino-9-2-tetraidropiranyl-9-H-purina) e 5mg/l de BAP, sendo o PBA significativamente mais eficiente do

que o BAP para a regeneração dos brotos adventícios. De maneira semelhante, PIERIK et al (1982) trabalhando com quinze cultivares de gerbera, conseguiram melhores resultados no cultivo *in vitro* de capítulos para produção de brotos adventícios, utilizando o meio MS e concentrações mais elevadas de BAP (5; 10 e 20mg/l).

O AIA não apresentou efeito para o diâmetro médio dos capítulos desenvolvidos, ressaltando, também, que a regeneração de brotos adventícios ocorreu nos tratamentos onde esta auxina estava ausente (Tabelas 1 e 2). Esses resultados concordam em parte com afirmações de PIERIK et al (1975), onde estes autores citam que a auxina não é essencial para a produção de brotos, embora a utilização de baixas concentrações de AIA (0,1mg/l) ou AIB (ácido indolilbutírico) (0,05mg/l) tenham estimulado a produção dessas brotações em comparação com nenhuma auxina. Entretanto, quando esses níveis foram elevados para 0,5 e 0,1mg/l de AIA e AIB, respectivamente, a formação de brotos foi inibida. Por outro lado, LALIBERTÉ et al (1985), trabalhando com as culturas Pastourelle e Mardi Gras, conseguiram melhores resultados no cultivo *in vitro* de capítulos para produção de brotos, utilizando o meio MS suplementado com níveis mais baixos de BAP, 1 ou 2mg/l associados à 0,1mg/l de AIA. De maneira semelhante, ARELLO et al (1991) conseguiram para as cultivares Appelbloesem e Marleen, intenso desenvolvimento de calos com emissão de brotos à partir dos capítulos, em meio MS acrescido de 2mg/l de BAP e 0,5mg/l de AIA.

CONCLUSÕES

- A cultivar Appelbloesem apresenta boa capacidade para o desenvolvimento *in vitro* dos capítulos com o uso de 3, 6 ou 9mg/l de BAP.

- Essas mesmas concentrações de BAP, são capazes de regenerar plântulas pelo método do capítulo.

- O 2,4-D não apresenta efeito sobre a produção de brotos e desenvolvimento dos capítulos estabelecidos *in vitro*.

- O AIA não influencia na regeneração de brotos adventícios a partir do cultivo *in vitro* de capítulos jovens.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMIM, M., VIETH, J. Production de plantes haploides de *Gerbera jamesonii* par culture *in vitro* d'ovules. *Canadian Journal Botany*, Ottawa, v. 64, p. 2356-2357, 1986.
- ARELLO, E.F., PASQUAL, M., PINTO, J.E.B.P., et al. Estabelecimento *in vitro* de explantes e regeneração de plântulas de *Gerbera jamesonii* Bolus ex Hook em cultura de tecidos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 26, n. 2, p. 269-273, 1991.
- CAPADOCIA, M., CHRÉTIEEN, L., LAUBLIN, G. Production of haploids in *Gerbera jamesonii* via ovule culture: influence of fall versus spring sampling on callus formation and shoot regeneration. *Canadian Journal Botany*, Ottawa, v. 66, p. 1107-1110, 1987.
- CHU, C.Y., HUANG, M.C. *In vitro* formation of gerbera (*Gerbera hybrida* Hort.) plantlets through excised scape culture. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, Taiwan, v. 52, n. 2, p. 45-50, 1983.
- HEDTRICH, C.M. Production of shoots from leaves and production of *Gerbera jamesonii*. *Gartenbauwissenschaft*, Weihenstephan, v. 44, n. 1, p. 1-3, 1979.
- LALIBERTÉ, S., CHRÉTIEN, L., VIETH, J. *In vitro* plantlet production from young capitulum explants of *Gerbera jamesonii*. *Hort Science*, Riverside, v. 21, n. 1, p. 137-139, 1985.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, Madison, v. 15, p. 473-497, 1962.
- PAWLOWSKA, H. Trials on gerbera propagation *in vitro*. *Referativnyi Zhurnal*, Moskva, v. 21, n. 2, p. 177-181, 1977.
- PIERIK, R.L.M., JANSEN, J.L.M., MAASDAM, A., et al. Optimization of gerbera plantlet production from excised capitulum explants. *Scientia Horticulturae*, Wageningen, v. 3, n. 4, p. 3351-3357, 1975.
- PIERIK, R.L.M., SEGERS, T.A. *In vitro* culture of hybrid explants of gerbera: adventitious root formation and callus induction. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, Stuttgart, v. 69, p. 204-221, 1973.
- PIERIK, R.L.M., STEEGMANS, H.H.M., VERHAEGH, J.A.M., et al. Effect of cytokinin and cultivar on shoot formation of *Gerbera jamesonii* *in vitro*. *Netherlands Journal of Agricultural Science*, Wageningen, v. 30, n. 4, p. 341-346, 1982.
- RUFFONI, B., DAMIANO, C., SILVANO, G., et al. The sterilization and micropropagation of *Gerbera jamesonii* hybrid. *Annual dell'Istituto Sperimentale per la Floricoltura*, San Remo, v. 18, n. 1, p. 21-42, 1987.
- SAWA, K. The culture of pith from rhizome of gerbera *in vitro*. *Agriculture and Horticulture*, Seibundo Sinkoshia, v. 32, n. 3, p. 50-51, 1977.
- SITBON, M. Production of haploid *Gerbera jamesonii* plants by *in vitro* culture of unfertilized ovules. *Agronomie*, Angers, v. 1, n. 9, p. 807-812, 1981.