

## Micropropagação de *Gerbera* através de capítulos florais.

Raquel D. L. Cardoso<sup>1</sup>; Lizete Augustin<sup>2</sup>; Marilei Suzin<sup>3</sup>; Magali Ferrari Grando<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (FAMV/UPF), BR285, Campus I, Bairro São José, C. Postal 611, 99001-070 Passo Fundo – RS. E-mail: raqueldlcardoso@bol.com.br;

<sup>2</sup> Professoras da FAMV/UPF, E-mails: augustin@upf.br, magali@upf.br; <sup>3</sup> Assistente de laboratório, FAMV/UPF, E-mail: suzin@upf.br.

A gérbera (*Gerbera* spp.) pertence à Família Asteraceae, cuja inflorescência típica é o capítulo. Nessa espécie, os capítulos são formados por flores vistosas, que variam quanto à forma da corola, sexualidade, simetria, fusão de órgãos e pigmentação.

A propagação da gérbera pode ser realizada por sementes. Porém, esse método proporciona uma grande variabilidade devido à segregação genética, provocando a perda de características de interesse comercial. Em decorrência do grande mercado para gérbera, a micropropagação surge como uma técnica eficiente de propagação, por permitir obter um maior número de plantas em um curto espaço de tempo, com um alto padrão genético e fitossanitário. Além disso, possibilita manipular e programar a cultura para o uso racional das estufas, uma vez que a produção independe da estação do ano. Essa técnica também contribui para a redução do número de plantas matrizes necessárias para a produção de novas plantas e facilita o intercâmbio de material entre países. Estudos sobre a micropropagação de gérbera vêm sendo realizados nos últimos anos buscando o estabelecimento de protocolos adequados. Para isto vários meios de cultura e diferentes explantes vêm sendo testados, como ápices (Huang & Chu, 1985), ápices de rizoma (Severin et al., 2000), capítulos jovens e pequenos explantes (Severin et al., 2000), folhas (Jerzy & Lubomski, 1991; Reynoird et al., 1993), inflorescência (Pierik et al., 1973; Preil et al., 1977; Severin et al., 2000) e óvulos (Miyoski & Asakura, 1996; Tosca et al., 1999). Porém, ainda não foram obtidos resultados muito satisfatórios. O trabalho objetivou avaliar a possibilidade de micropropagar gérbera através de capítulos jovens e primórdios de capítulo.

### MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Universidade de Passo Fundo (RS). Para este trabalho foram utilizadas como fonte doadoras de explante, capítulos jovens de gérbera para corte, das cultivares Solemio (GC1) (flores de cor amarela) e Pink Elegance (GC2) (flores de cor rosa), provenientes da Cooperativa Agrária Mista de Entre Rios/PR. Foram utilizados 12 capítulos de cada cultivar, os quais foram fotografados e classificados em três grupos, conforme seu diâmetro: DA= 2 à 2,5 cm; DB= 2,6 à 3,0 cm e DC= mais de 3cm de diâmetro. Após a classificação os capítulos foram submetidos a assepsia por imersão em álcool 70% (2 minutos) e em solução de hipoclorito de sódio (1,5% de cloro ativo) + 0,01ml.L<sup>-1</sup> de Tween-20 (20 minutos), seguindo-se de enxágües com água destilada e esterilizada. Após a assepsia, as brácteas involucrais mais externas foram retiradas e as mais internas apenas cortadas. Os capítulos foram seccionados em 10 pedaços e inoculados em dois meios de isolamento: MI1: 1/2 dos sais do meio MS com 1,5 vezes a concentração de FeEDTA (55,95 mg.L<sup>-1</sup>) + 80 mg.L<sup>-1</sup> de sulfato de adenina + 0,1 mg.L<sup>-1</sup> de AIA + 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP + 10 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e 7 g.L<sup>-1</sup> de ágar; MI2: Macroelementos e NaEDTA + FeSO<sub>4</sub>7H<sub>2</sub>O do meio MS + Microelementos de Heller (1953) (exceto FeCl<sub>3</sub>) + 25 mg.L<sup>-1</sup> de NaFeEDTA + 10 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e 7 g.L<sup>-1</sup> de ágar.

O experimento constituiu-se de um fatorial 2x3x2 (genótipo x diâmetro do capítulo x meio de cultura), com 10 repetições, dispostos em delineamento completamente casualizado. A unidade experimental foi constituída por um tubo de ensaio com dois explantes, os quais foram deixados no escuro, em câmara de crescimento, com temperatura de 25 ± 1°C por 15 dias e após expostos à luz com um fotoperíodo de 12 horas luz/escuro, sendo subcultivados a cada 30 dias para meio fresco. As variáveis analisadas foram: intensidade de oxidação aos 15 dias de cultivo, através de escala de notas, onde: 1=

ausência de oxidação; 2= coloração amarelada no meio de cultura; 3= coloração marrom claro no meio de cultura e 4= coloração marrom escura no meio de cultura. Também avaliou-se o número de explantes contaminados e oxidados após 15 e 30 dias de cultivo *in vitro*. O desenvolvimento dos explantes foi avaliado através de escala de notas aos 30, 60, 90 e 120 dias de cultivo, onde: 1= explante verde; 2= peças florais de tamanho aumentado (flores entumescidas); 3= formação de calos; 4= calos com embrióides e/ou meristemóides. Os dados referentes à nota de oxidação aos 15 dias e notas de desenvolvimento aos 30 e 60 dias foram submetidos à análise de variância sendo as médias comparadas por Tukey a 5%.

Quando se observou a formação de calos com embrióides e/ou meristemóides nos explantes, os mesmos foram transferidos para meio de multiplicação descrito por Radice & Marconi (1998) o qual consiste de : MM1= 1/2 dos sais do MS = 0,05 mg.L<sup>-1</sup> de IBA (ácido indobutírico) + 0,75 mg.L<sup>-1</sup> de BAP (benzilaminopurina) + 0,1 mg.L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> (ácido giberélico) + 100 mg.L<sup>-1</sup> de Myo inositol + 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de glicina + 0,4 mg.L<sup>-1</sup> de tiamina HCL + 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose + 7,0 g.L<sup>-1</sup> de ágar. Nesta fase a unidade experimental foi constituída por um frasco com 4 explantes, sendo avaliado o número de explantes contaminados e necrosados (expressos em percentagem) a cada 30 dias.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de variância dos dados referentes ao grau de oxidação (nota) atribuído aos explantes aos 15 dias de cultivo, mostrou que a interação entre os fatores genótipo x diâmetro do capítulo x meio de cultura teve efeito significativo ( $p=0,0085$ )(Tabela 1). No desmembramento desta interação, quando foi analisado a influência da interação dos fatores diâmetro de capítulos x meio de cultura, observou-se que: para o genótipo GC1 não houve diferenças entre as média do grau de oxidação, quando capítulos de diferentes diâmetros foram inoculados nos meios MI1 e MI2. No entanto, o grau de oxidação encontrado, para este genótipo (GC1), tanto no meio MI1 quanto no meio MI2, foi menor quando capítulos de menor diâmetro (DA) foram cultivados. Para o genótipo GC2, o grau de oxidação apresentado pelos capítulos de diâmetro DA foi maior no meio MI1. Já os capítulos com diâmetro DB e DC não variaram quanto ao grau de oxidação se cultivados nos meios MI1 e MI2. Em relação ao grau de oxidação expresso pelos meios de cultura, foi observado que, no meio MI1, o maior grau de oxidação foi observado quando capítulos de diâmetro DA e DC foram cultivados. No meio MI2 não foi observado diferença entre as médias do grau de oxidação entre os diferentes diâmetros de capítulo. Considerando o comportamento dos genótipos GC1 e GC2 nos diferentes meios de cultura, foi observado que o primeiro, quando comparado com o segundo, apresentou maior grau de oxidação em ambos os meios (MI1 e MI2).

**Tabela 1.** Médias de notas de oxidação observadas em capítulos de diferentes diâmetros (DA, DB, DC) de dois genótipos de gérbera (GC1 e GC2) cultivados em dois meios de cultura (MI1 e MI2)

DIÂMETRO DO CAPÍTULO	GENÓTIPO (GC1)		GENÓTIPO (GC2)	
	MI1	MI2	MI1	MI2
DA	1,70 A b	* 2,00 A b	1,80 A a	1,00 B a
DB	* 2,90 A a	* 2,33 A ab	1,00 A b	1,00 A a
DC	* 3,60 A a	* 3,18 A a	1,30 A ab	1,10 A a

Médias seguidas de mesma letra maiúscula e minúscula, não diferem na linha e coluna, respectivamente. O asterisco (\*) indica significância na comparação dos genótipos dentro do mesmo nível do fator meio e do fator diâmetro.

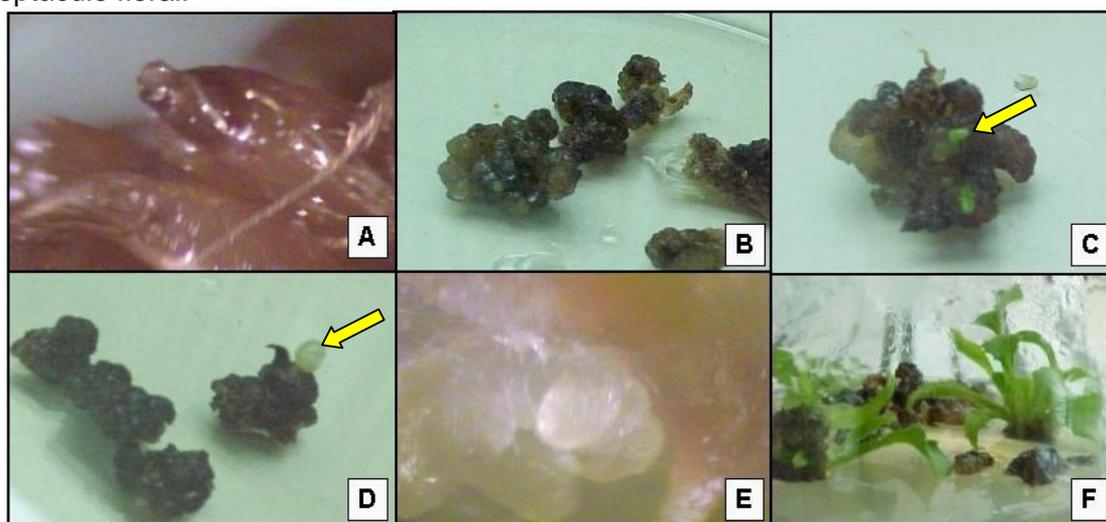
Aos 15 dias de cultivo a porcentagem de contaminação e oxidação observada no genótipo GC1 foi de zero e 83,3%, respectivamente. Já para o genótipo GC2 observou-se 8,3% de contaminação e 15% de oxidação. Estas taxas foram observadas sem levar em consideração o meio de cultura utilizado. As altas taxas de oxidação podem estar relacionadas com a liberação de certas substâncias pela planta no meio. Segundo George

(1993) muitos tecidos vegetais, quando seccionados, liberam certas substâncias como as fitoalexinas, fitoantipicinas e compostos fenólicos que tornam o meio oxidado, além destas substâncias apresentarem atividades antimicrobianas.

Aos 30 dias observou-se uma alta taxa de explantes necrosados em ambos os genótipos quando cultivados no meio de cultura MI2 (65% no genótipo GC1 e 57% no genótipo GC2), o que pode ter sido ocasionado pela falta de reguladores e inadequada absorção de nutrientes do meio de cultura. De acordo com George (1993) a necrose em cultivo de tecidos pode ocorrer por vários fatores como o acúmulo de substância fenólica, meio com ausência de reguladores, inadequada absorção dos nutrientes do meio pelo explante ou pela não translocação destes, devido a alta umidade que limita a transpiração e consequentemente a translocação via xilema.

Em todos os tratamentos, após os 30 dias, foi observado inicialmente o entumescimento dos explantes, principalmente da parte floral, o que também foi observado por Radice & Marconi (1998) e Arello *et al.* (1991) ao micropropagarem gérbera por capítulos florais. Tais flores entumescidas em poucos dias oxidavam e quando manipulados se soltavam. Ao mesmo tempo, os explantes provenientes dos capítulos de tamanho DA começaram a formar calos inicialmente escuros, oxidados que, com o tempo, tornaram-se verdes. Observou-se também uma diferença do tempo necessário para o desenvolvimento de estruturas nos genótipos utilizados, sendo que o GC1 teve um desenvolvimento mais rápido quando comparado ao GC2. Pierik *et al.* (1982) e Arello *et al.* (1991), relatam o efeito do genótipo no comportamento morfogenético *in vitro*, enfatizando a formação de vários tipos de calos conforme o genótipo utilizado. As estruturas descritas podem ser visualizadas na Figura 1.

Dentre as combinações de genótipo x meio de cultura x diâmetro do capítulo utilizadas, a combinação GC1, MI1 e DA foi a que proporcionou regeneração de brotação (Figura 1). Tal regeneração foi obtida aos 120 dias, e provavelmente originaram-se das zonas meristemáticas axiais das brácteas involucrais, fato que vem confirmar o que foi observado por Radice & Marconi (1998) ao micropropagarem gérberas através de capítulos florais. Estes observaram a existência de zonas meristemáticas nas axilas das brácteas involucrais, em cortes longitudinais realizados em capítulos de gérbera. Porém, segundo Arello *et al.* (1991) e Laliberté *et al.* (1985) tais brotações podem também ter se originado da reorganização tanto de tecidos meristemáticos das inflorescências como do tecido do receptáculo floral.



**Figura 1.** Diferentes estruturas formadas por explantes de gérbera dos genótipos GC1 e GC2: A) Flores entumescidas; B) Calos; C) Calo com meristemóide (seta); D) Calo com embrióide (seta); E) Calos embriogênicos; F) Brotações regeneradas do genótipo GC1 no meio MI1.

Os melhores resultados para a regeneração de gérbera através de capítulos jovens foram obtidos quando utilizou-se o genótipo de corte Solemio (GC1), capítulos com diâmetro entre 2,0 e 2,5 cm (DA) e meio MI1.

Os resultados encontrados neste trabalho reforçam que a micropropagação de gérbera a partir de capítulos florais é possível, porém é um processo lento e que oferece baixas taxas de regeneração sendo necessário realizar mais estudos para encontrar um protocolo que possibilite maior eficiência na micropropagação de gérbera.

#### LITERATURA CITADA

ARELLO, E. F.; PASQUAL, M.; PINTO, J. E. B. P.; BARBOSA, M. H. P. Estabelecimento *in vitro* de explantes e regeneração de plântulas de *Gerbera jamesonii* Bolus ex Hook em cultura de tecidos. **Pesq. agropec. Bras**, Brasília, v.26, n.2, p. 269-273, fev. 1991.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: in practice**. Part. II. England: Exegetics, 1993. 1361p.

HELLER, R. Recherche sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés *in vitro*. **Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. Veg.** 11<sup>th</sup> Ser., v.14, p. 1-223, 1953.

HUANG, M. C.; CHU, C. A scheme for commercial multiplication of Gerbera (*Gerbera* híbrida Hort.) through shoot tip culture. s.n.t., 1985.

JERZY, M.; LUBOMSKI, M. Adventitious shoot formation on ex vitro derived leaf explants of *Gerbera jamesonii*. **Scientia Horticulturae**, s.l., v. 47, p. 115-124, 1991.

MIYOSHI, K.; ASAKURA, N. Callus induction, regeneration of haploid plant and chromosome doubling in ovule cultures of gerbera (*Gerbera jamesonii*). **Plant Cell Report**, s.l., v. 16, p.1-5, 1996.

PIERIK, R. L. M.; STEGMANS, M.H.; MARELIS, J. J. Gerbera plantlets from in vitro cultivated capitulum explants. **Sci.Hort.**, s.l., v. 1, p. 117-119, 1973.

PREIL, W.; HUNKE, W.; ENGELHARDT, M.; HOFFMANN, M. Haploide bei *Gerbera jamesonii* aus in vitro-Kulturen von Blütenköpfchen. **Z. Pflanzenzüchtg**, s.l.,v. 79, p. 167-171, 1977.

RADICE, S., MARCONI, P. L. Clonación in vitro de diversos cultivares de *Gerbera jamesonii* a partir de capítulos florales. **Revista de la facultad de Agronomía**, La Plata, v. 103, n. 2, p.111-118, 1998.

REYNOIRD, J. P.; CHRIQUI, D.; NOIN, M.; BROWN, S. Plant regeneration from in vitro leaf culture of several Gerbera species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, s. l., v. 33, p.203-210, 1993.

SEVERIN, C.; GONZALEZ, M.; MURRAY, R. Micropropagación de *Gerbera* spp. a partir de diferentes explantes. **Revista FAVE**, Argentina, v. 14, n. 1, p. 67-71, 2000.

TOSCA, A., ARCARA, L.; FRANGI, P. Effects of genotype and season on gynogenesis efficiency in Gerbera. **Plant Cell, Tissue and Organ**, Italy, v. 59, n.1, p. 77-80, 1999. Resumo n. 262444 em Kluwer Academic Publishers. Disponível em: [www.kluweronline.com](http://www.kluweronline.com)

**Palavras-chave:** *Gerbera* sp, cultura de tecidos vegetais, propagação vegetativa.

**Agradecimento:** À Cooperativa Agrária Mista de Entre Rios (PR) pela doação dos genótipos de gérbera utilizados neste experimento.