

ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE EXPLANTES E REGENERAÇÃO DE PLÂNTULAS DE *GERBERA JAMESONII* BOLUS EX HOOK EM CULTURA DE TECIDOS¹

EDUARDO FONSECA ARELLO², MOACIR PASQUAL, JOSÉ EDUARDO B.P. PINTO³ e MÁRCIO H.P. BARBOSA⁴

RESUMO - *Gerbera jamesonii* Bolus ex Hook é uma espécie ornamental cujas flores são utilizadas para corte e possuem grande valor comercial. O seu principal modo de propagação é o vegetativo, o que possibilita um aumento de doenças viróticas durante as várias gerações em que é propagada. Através das técnicas de cultura de tecidos pode-se obter, em curto prazo, um elevado número de plantas sadias e livres de doenças. Para a obtenção de plântulas "*in vitro*" de *G. jamesonii* foram utilizados capítulos jovens, como explantes iniciais, de quatro cultivares a saber: Appel Bloesen, Marleen, Clementine e Pimpernel. Os explantes foram cultivados em meio "MS" modificado e suplementado com todas as combinações possíveis de BAP-6-benzilaminopurina (0,0-1,0-2,0-3,0 e 5,0 mg/l); AIA - ácido indolacético (0,5 mg/l) e KIN - cinetina (0,0 e 2,0 mg/l). Os capítulos foram previamente esterilizados com álcool 70% (2 minutos) e solução de hipoclorito de sódio 1,5% (20 minutos). Melhores resultados foram conseguidos com o uso de MS + 2,0 mg/l BAP + 0,5 mg/l IAA, que promoveu intenso desenvolvimento de calo com emissão de brotos, principalmente para as variedades Appel Bloesen e Marleen.

Termos para indexação: micropropagação, ornamentação, flores, propagação vegetativa.

IN VITRO ESTABLISHMENT AND PLANTLET REGENERATION OF *GERBERA JAMESONII* BOLUS EX HOOK BY TISSUE CULTURE TECHNIQUE

ABSTRACT - *Gerbera jamesonii* Bolus ex Hook is an ornamental species used as cut flowers with great economic importance. It is generally propagated via vegetative process which increases the risk of viral disease problems. The tissue culture technique is an alternative method to obtain, in short period, a high number of healthy plants. This work was intended for obtaining *in vitro* *G. jamesonii* plantlets from capitulum of four cultivars: Appel Bloesen, Marleen, Clementine and Pimpernel. The explants were cultivated on "MS" modified medium supplemented with BAP-6-benzylaminopurine (0.0-1.0-2.0-3.0 and 5.0 mg/l); IAA - indole 3-acetic acid (0.5 mg/l) and KIN - kinetin (0.0 and 2.0 mg/l). The young capitula were previously sterilized in 70% alcohol (2 minutes) and 1.5% sodium hypochlorite (20 minutes). The best result was achieved on the medium supplemented with 2.0 mg/l BAP and 0.5 mg/l IAA, which promoted intensive callus development with shoot formation in Appel Bloesen and Marleen cultivars.

Index terms: micropropagation, ornamental plant, flowers, vegetative propagation.

INTRODUÇÃO

A gerbera, ou margarida do Transvaal, é uma espécie ornamental cujas flores são utilizadas para corte e vendidas no comércio com

importância econômica grande e crescente. É uma *Asteraceae* nativa da África do Sul e Ásia.

Sua propagação convencional é a vegetativa, muito embora possa ser propagada pelo plantio de sementes. Mas este modo de propagação é desinteressante, pois, em decorrência da grande heterozigose, as plantas são bastante desuniformes.

O emprego da cultura de tecidos tem sido crescente para esta herbácea, tornando-se uma alternativa bastante viável para sua propaga-

¹ Aceito para publicação em 4 de dezembro de 1990

² Eng. - Agr., em pós-graduação em Fitot. - ESAL. Bolsista da CAPES.

³ Eng. - Agr., Prof. - Adjunto. Esc. Sup. de Agric. de Lavras - ESAL, Caixa Postal 37, CEP 37200 Lavras, MG.

⁴ Em curso de Agronomia - ESAL.

ção assexual. As primeiras tentativas neste sentido foram feitas por Pierik & Segers (1973), na Holanda, que empregaram a técnica de indução de gemas adventícias. Um trabalho similar foi feito por Murashige et al. (1974), nos E.U.A., induzindo a formação de calo, que poderia ser cultivado por várias subculturas e com posterior ocorrência de organogênese. Todos estes autores atestam o fato de ser bastante esporádica a regeneração de plântulas. Pierik et al. (1982) cita em seu trabalho, que Hedtrich (1979) conseguiu a regeneração de gemas adventícias a partir de pedaços de folhas de gerbera cv. Vulcan cultivadas em meio com BAP (benziladenina) e GA₃ (ác. giberélico).

São citados, atualmente, dois promissores métodos para a propagação *in vitro* desta espécie ornamental: 1) a formação de brotações a partir de capítulos excisados (Pierik & Segers 1973, Pierik et al. 1975 e Laliberté et al. 1985) e 2) a propagação clonal através de ápices de brotos (Murashige et al. 1974). As vantagens do método que utiliza capítulos excisados surgem na medida em que a esterilização é mais fácil e menos prejudicial ao explante, quando comparado ao método que utiliza ápices de brotos. Outra vantagem a ser citada é que o primeiro método não destrói a planta para a obtenção dos explantes, visto que apenas as inflorescências são retiradas da planta mãe. Em contra partida, o segundo método é mais indicado para uma propagação massal mais rápida (Murashige et al. 1974), não obstante as vantagens citadas anteriormente. As brotações obtidas pelo método dos capítulos podem facilmente ser usadas como material estéril inicial para outras subculturas e experimentos onde se desejam brotações axilares.

Uma objeção contra o método dos capítulos é que a percentagem de explantes com formação de brotos é pequena e, algumas vezes, nula.

Ambos os métodos empregam concentrações adequadas de citocininas e auxinas buscando um melhor balanço hormonal, anterior-

mente estudado por Skoog & Miller (1957). Assim, dentre as citocininas, a BAP é a mais comumente empregada na fase de proliferação de brotos, podendo ser empregada juntamente com AIA, nesta mesma fase. Laliberté et al. (1985) utilizaram 1.0 ou 2.0 mg/l BAP associados com 0.1 mg/l, conseguindo resultados interessantes no cultivo *in vitro* via capítulos. De maneira semelhante, Murashige et al. (1974) usaram 1.0 mg/l KIN com 2.0 mg/l AIA, induzindo formação de brotos *in vitro* via ápice de brotações. Concentrações mais amplas e gerais de BAP foram empregadas por Pierik et al. (1982) ao trabalharem com quinze cultivares diferentes de gerbera, e que variaram de 5 a 20 mg/l. Estes mesmos autores ressaltam os efeitos do genótipo da cultivar considerada na produção de brotações *in vitro*, independentemente do modo de cultivo empregado.

O objetivo do presente trabalho foi estabelecer explantes e regenerar plântulas *in vitro*, através do método dos capítulos, de quatro cultivares comerciais de gerbera, adequando os níveis de reguladores do crescimento BAP, AIA e KIN.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas neste trabalho quatro variedades comerciais de gerbera, a saber: Appel Bloesen, Marleen, Clementine e Pimpernel. As plantas foram colhidas ao acaso, em casa de vegetação, e os explantes iniciais constituíram-se de inflorescências (capítulos) jovens com diâmetro variando de 0,5 a 0,7 cm. Todas estas inflorescências encontravam-se fechadas neste estágio.

Imediatamente após a coleta dos explantes, estes foram esterilizados em câmara asséptica com álcool 70% (durante 2 minutos), e em seguida, com solução de hipoclorito de sódio a 1,5% (durante 20 minutos). Depois, todos os capítulos foram lavados sucessivas vezes em água destilada e esterilizada.

Cada explante foi dividido em, no máximo, três pedaços menores, e estes pedaços foram transferidos para tubos de ensaio de 25 x 150 mm, com o seguinte meio de cultura, já estéril: metade das concentrações de sais do meio básico de Murashige & Skoog (1962); 100 mg/l de mio-inositol; 0,5 mg/l de

piridoxina; 0,5 mg/l de ácido nicotínico; 100 mg/l de tirosina; 80 mg/l de sulfato de adenina; 7,5 g/l de difco bacto ágar e 30 g/l de sacarose. Os hormônios de crescimento empregados foram BAP-6-benzilaminopurina (0,0 - 1,0 - 2,0 - 3,0 e 5,0 mg/l); AIA - ácido indolacético (0,5 mg/l) e KIN - cinetina (0,0 e 2,0 mg/l), em todas as combinações possíveis, num fatorial 5x1x2. O pH foi ajustado para 5,8 antes do processo de autoclavagem (120°C - 1 atm - 20 minutos). Cada tratamento foi composto de 25 repetições.

A cultura foi posta para desenvolver em sala apropriada, nas seguintes condições: fotoperíodo de 16 h de luz/8 h de escuro; intensidade luminosa de 2.500 lux e temperatura de 26°C ± 1°, durante aproximadamente 60 dias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O método de esterilização dos explantes empregado neste trabalho não foi muito eficiente, pois, de 40 a 50% dos explantes de cada cultivar foram perdidos por contaminações. Cerca de 45% deste material contaminado, tiveram bactérias como contaminantes, e o restante, por fungos exclusivamente da espécie *Rhizoctonia*. A proximidade dos capítulos jovens do solo, por ocasião da coleta, pode justificar este grande índice de contaminação microbiana. Testes mais rigorosos de descontaminação devem ser feitos para o material já

coletado, bem como, adaptar-se uma metodologia que garanta uma certa descontaminação do material ainda no campo, isto é, antes da coleta, quando as inflorescências estiverem na planta-mãe.

Em todos os tratamentos foi observado o desenvolvimento de calos, e ao mesmo tempo, o entumescimento e crescimento de algumas partes florais do capítulo, tais como estames, principalmente. A qualidade do calo, em termos de coloração, tamanho, friabilidade, presença ou não de vitrificação, no entanto, foi diferente para as quatro cultivares, confirmando as observações feitas por Pierik et al. (1982) quando ressaltam os efeitos do genótipo no comportamento das plantas *in vitro*. Assim, mostraram grande capacidade de produção de calo as cultivares Appel Bloesen e Marleen, com calos grandes, claros, não friáveis e não vitrificados. As outras duas cultivares, diferentemente, apresentaram calos pequenos, escuros, friáveis, vitrificados, pouco desenvolvidos, evidenciando para as condições do experimento, baixa capacidade para calogênese.

De um modo geral, na Tabela 1 verifica-se que melhores resultados quanto à calogênese foram conseguidos com o emprego de 2,0 mg/l de BAP + 0,5 mg/l de AIA na ausência de cinetina. Laliberté et al. (1985) che-

TABELA 1. Produção de calos pelas cultivares nos diferentes níveis de hormônios.

Tratamentos	Appel Bloesen	Marleen	Clementine	Pimpernel
0,0 mg/l BAP + 0,5 mg/l AIA	+ CNF	+ CNF	+ EVQ	+ EVQ
0,0 mg/l BAP + 0,5 mg/l AIA + 2,0 mg/l KIN	+ CNF	+ CNF	+ EVQ	+ EVQ
1,0 mg/l BAP + 0,5 mg/l AIA	+ CNF	+ CNF	+ EVQ	+ EVQ
1,0 mg/l BAP + 0,5 mg/l AIA + 2,0 mg/l KIN	+ CNF	+ CNF	+ EVQ	+ EVQ
2,0 mg/l BAP + 0,5 mg/l AIA	+ CGNF	+ CGNF	+ EGVQ	+ EGVQ
2,0 mg/l BAP + 0,5 mg/l AIA + 2,0 mg/l KIN	+ CNF	+ CNF	+ EVQ	+ EVQ
3,0 mg/l BAP + 0,5 mg/l AIA	+ EVQ	+ EVQ	+ EVQ	+ EVQ
3,0 mg/l BAP + 0,5 mg/l AIA + 2,0 mg/l KIN	+ EVQ	+ EVQ	+ EVQ	+ EVQ
5,0 mg/l BAP + 0,5 mg/l AIA	+ EVQ	+ EVQ	+ EVQ	+ EVQ
5,0 mg/l BAP + 0,5 mg/l AIA + 2,0 mg/l KIN	+ EVQ	+ EVQ	+ EVQ	+ EVQ

+, ocorrência de calo; C, calo claro; N, calo normal; F, calo firme ou não friável; Q, calo quebradiço ou friável; V, calo anormal ou vitrificado; E, calo escuro; G, calo grande c/ ± 2 cm.

garam a resultados muito semelhantes aos deste trabalho, embora, tenham trabalhado com duas cultivares diferentes das que aqui foram usadas. As concentrações de BAP e AIA citadas anteriormente, contestam, no entanto, as recomendações de Pierik et al. (1982) que sugerem o uso de 10 mg/l de BAP e ausência total de auxina AIA para otimizar a produção de calos. A presença da KIN não proporcionou resultados positivos, e em alguns casos, principalmente quando BAP aparecia nos dois níveis mais altos (3,0 e 5,0 mg/l), chegou mesmo a ter efeitos negativos (Tabela 1). Nestes casos, os calos cresciam demais, tornando-se extremamente escurecidos, friáveis e vitrificados. Cappadocia et al. (1987) também empregaram KIN para induzir a formação e o desenvolvimento de calos, mas apontam que a sua presença foi interessante e positiva para trabalhar com a cultivar Super Gerbera. Murashige et al. (1974) igualmente utilizaram KIN ao estabelecer, *in vitro*, ápices de brotações de *Gerbera* sp, ressaltando que tal hormônio foi benéfico não só para o estabelecimento quanto para a fase de multiplicação do material. Como se pode ver, as quatro cultivares aqui estudadas mostraram-se sensíveis à KIN quando esta era administrada junto com a BAP, principalmente.

Dentre todas estas cultivares, apenas duas, quais sejam: Appel Bloesen e Marleen, foram capazes de regenerar plântulas através da ocorrência de brotações adventícias dos calos. Assim, a cultivar Appel Bloesen regenerou seis plântulas, sendo uma plântula por calo, e a cultivar Marleen apenas três plântulas, do mesmo modo que a anterior, isto é, uma plântula por calo. A regeneração ocorreu somente no tratamento com 2,0 mg/l de BAP + 0,5 mg/l de AIA. Estes resultados estão bem defasados diante daqueles conseguidos por Pierik et al. (1982) ao trabalharem com quinze cultivares diferentes, usando a concentração mínima de 5,0 mg/l de BAP. Não se pode afirmar, com certeza, qual o local de origem destas brotações adventícias. Elas tanto podem ter-se originado por reorientação de tecidos

meristemáticos das inflorescências, como do tecido do receptáculo floral.

Para as condições do experimento, as cultivares testadas não se mostraram boas regeneradoras de plântulas, principalmente as cultivares Clementine e Pimpernel.

CONCLUSÕES

1. Houve grande percentagem de contaminação de explantes na fase de estabelecimento.
2. As cultivares Appel Bloesen e Marleen apresentaram boa capacidade de formação de calos com o uso de 2,0 mg/l de BAP + 0,5 mg/l de AIA.
3. Estas mesmas variedades foram capazes de regenerar plântulas com o uso de 2,0 mg/l de BAP + 0,5 mg/l de AIA.
4. A KIN foi desinteressante para a produção de calos das cultivares testadas.

REFERÊNCIAS

- CAPPADOCIA, M.; CHRÉTIEN, 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 of Botany*, v.66, p.1107-1110, 1987.
- LALIBERTÉ, S.; CHRETIEN, L.; VIETH, J. *In vitro* plantlet production from young capitulum explants of *Gerbera jamesonii*. *HortScience*, v.20, n.1, p.137-139, 1985.
- MURASHIGE, T.; SERPA, M.; JONES, J.B. Clonal multiplication of *Gerbera jamesonii* through tissue culture. *HortScience*, v.9, n.3, p.175-180, 1974.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, v.15, p.473-497, 1962.
- PIERIK, R.L.M.; JANSEN, A.; BINNENDIJK, M. Optimization of gerbera plantlet production from excised capitulum explants. *Scientia Horticulturae*, v.3, p.351-357, 1975.

PIERIK, R.L.M.; SEGERS, T.A. *In vitro* culture of midrib explants of gerbera: adventitious root formation and callus induction. **Zeitschrift fuer Pflanzenphysiologie**, v.69, p.204-212, 1973.

PIERIK, R.L.M.; STEEGMANS, H.H.M.; VERHAEGEN, J.A.M.; WOUTERS, M. Effect of cytokinin and cultivar on shoot

formation of *Gerbera jamesonii* *in vitro*. **Netherlands Journal of Agricultural Science**, v.30, p.341-346, 1982.

SKOOG, F.; MILLER, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. **Symposia of the Soc. for Experimental Biology**, v.11, p.118-131, 1957.